



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
ESCUELA DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIA, TECNOLOGÍA Y MEDIO
AMBIENTE



TESIS

**BIODEGRADACIÓN DE POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD EFECTUADA
POR MICROORGANISMOS ADAPTADOS A LAS CONDICIONES
ALTOANDINAS EN AGUAS RESIDUALES URBANAS DE LA CIUDAD
DE PUNO**

PRESENTADA POR:

MARIÁN ALICIA HERMOZA GUTIÉRREZ

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIA TECNOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE

PUNO, PERÚ

2022



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
ESCUELA DE POSGRADO

**DOCTORADO EN CIENCIA TECNOLOGÍA Y MEDIO
AMBIENTE**

TESIS

**BIODEGRADACIÓN DE POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD EFECTUADA
POR MICROORGANISMOS ADAPTADOS A LAS CONDICIONES
ALTOANDINAS EN AGUAS RESIDUALES URBANAS DE LA CIUDAD
DE PUNO**

PRESENTADA POR:


MARIÁN ALICIA HERMOZA GUTIÉRREZ

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIA TECNOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE

APROBADA POR EL JURADO SIGUIENTE:


PRESIDENTE


.....
Dr. WALTER ALEJANDRO ZAMALLOA CUBA

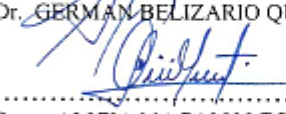
PRIMER MIEMBRO


.....
Dr. ALEJANDRO COLOMA PAXI

SEGUNDO MIEMBRO


.....
Dr. GERMAN BELIZARIO QUISPE

ASESOR DE TESIS


.....
Dra. ALICIA MAGALY LEON TACCA

Puno, 11 de julio del 2022

ÁREA: Ciencias Biomédicas

TEMA: Biodegradación de Polietileno de Baja Densidad efectuada por Microorganismos adaptados a las Condiciones Altoandinas en aguas Residuales Urbanas de la Ciudad de Puno

LÍNEA: Recursos Naturales y Medio Ambiente



DEDICATORIA

A la mayor gloria de Dios, al que doy gracias por tanto bien recibido.

A mi abuela, por su amor infinito.

A mis padres, por su cariño, comprensión y soporte constante.

A mi familia, por el aliento incondicional.



AGRADECIMIENTOS

Al Proyecto CONCYTEC – Banco Mundial "Mejoramiento y Ampliación de los Servicios del Sistema Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica" 8682-PE, a través de su unidad ejecutora ProCiencia (contrato número 01-2018-FONDECYT/BM-Programas de Doctorados en Áreas Estratégicas y Generales).

A la Dra. Alicia León por el acertado asesoramiento, compromiso, exigencia y apoyo durante el desarrollo de la presente investigación.

Al Dr. Nagamani Balagurusamy por la confianza puesta en mi trabajo, siendo además un gran referente como profesional y ser humano.

A mis compañeros y amigos Dante Salas Mercado y Ruth Meza Duman, por su colaboración en los muestreos de campo.

A Ludwig Aliaga, Nora Calcina, Ángel Solís, Mary Coila, Pamela Manrique, Clemente Luyo, Henry Huanca, Pierre Ramos y Alejandro Aranda, por el apoyo técnico brindado en los trabajos de laboratorio.



ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
i	
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xii
i	
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Marco teórico	3
1.1.1 Polímeros plásticos	3
1.1.2 Aplicaciones de los plásticos	4
1.1.3 Residuos plásticos	6
1.1.4 Tecnologías de remediación de residuos plásticos	9
1.1.4.1 Tecnología de membrana	9
1.1.4.2 Tecnología de Coagulación	10
1.1.4.3 Biodegradación microbiana	10

CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 Identificación del problema	15
2.2 Enunciado del problema	15
2.3 Justificación	16



2.4 Objetivos	16
2.4.1. Objetivo general	16
2.4.2 Objetivos específicos	16
2.5 Hipótesis	17
2.5.1 Hipótesis general	17
2.5.2 Hipótesis específicas	17

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de estudio	18
3.2 Población	19
3.3 Muestra	19
3.4 Método de investigación	19
3.5 Métodos por objetivos específicos	20
3.5.1 Recolección y preparación de muestras	20
3.5.2 Preparación de medios de cultivo	20
3.5.3 Determinación de cinética microbiana y preparación de inóculos	21
3.5.4 Establecimiento de sistemas reactores para ensayos de biodegradación sobre PEBD	21
3.5.5 Identificación molecular de consorcios microbianos	22
3.5.6 Ensayos para la determinación de la biodegradación en PEBD	24
3.5.6.1 Ensayo de tracción	24
3.5.6.2 Ensayo de Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)	24
3.5.6.3 Ensayo de espectroscopía Raman	24
3.5.6.4 Ensayo de microscopía electrónica de barrido (SEM)	25

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Parámetros de pH, tipo de medio de cultivo y surfactante que requieren los microorganismos procedentes de aguas residuales urbanas para biodegradar polietileno de baja densidad.	26
---	----



4.1.1 Determinación de la cinética de microorganismos procedentes de la laguna de estabilización “El Espinar”	26
4.1.2 Pérdida de peso de PEBD sometidos a ensayos de biodegradación con variaciones de pH, tipo de medio de cultivo y uso de surfactante	28
4.2 Microorganismos procedentes de aguas residuales urbanas con capacidad biodegradativa sobre polietileno de baja densidad.	39
4.2.1 Apariencia visual del crecimiento de consorcios sobre PEBD	39
4.2.2 Cuantificación de ADN extraído de microorganismos procedentes de agua residual de “El Espinar” (AR) y consorcios desarrollados en medio nutritivo (NT), medio mineral salino (SK) y agua residual estéril (AR2) con PEBD como fuente de carbono	40
4.2.3 Identificación molecular de microorganismos cultivados en agua residual (AR2) y en medio mineral salino (SK)	42
4.3 Propiedades físico-mecánicas, químicas y microestructurales del polietileno de baja densidad biodegradado en sistemas reactores provistos de microorganismos procedentes de aguas residuales urbanas	45
4.3.1 Análisis de resistencia a la tracción de PEBD	45
4.3.2 Análisis de espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)	49
4.3.3 Análisis de espectroscopía Raman	54
4.3.4 Análisis de morfología de la superficie de PEBD por microscopía electrónica de barrido (MEB)	56
CONCLUSIONES	60
RECOMENDACIONES	61
BIBLIOGRAFÍA	62
ANEXOS	72



ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
1. Uso de los plásticos sintéticos.	5
2. Factores que afectan los procesos de biodegradación de polímeros plásticos.	11
3. Bacterias, hongos y enzimas asociadas a la biodegradación de polietileno (PE).	14
4. Factores y niveles de la configuración experimental para la evaluación del potencial de biodegradación de los consorcios sobre PEBD.	22
5. Análisis de varianza multifactorial para Pérdida de Peso (%) al mes 1.	31
6. Análisis de varianza multifactorial para Pérdida de Peso (%) al mes 2.	34
7. Análisis de varianza multifactorial para la pérdida de peso (%) al mes 3.	37
8. Estadística descriptiva de las concentraciones de ADN extraídos a partir de cultivos líquidos.	41
9. Propiedades de PEBD (control), en medio AR2 y medio SK a 90 días de ensayo de tracción.	47

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
1. Producción anual de plásticos a nivel mundial desde 1950 al 2020.	4
2. Estructura química de polímeros plásticos.	5
3. Generación y eliminación acumulada de residuos plásticos (en millones de toneladas métricas). Las líneas sólidas muestran datos históricos desde 1950 hasta 2015; las líneas discontinuas muestran proyecciones de tendencias históricas hasta 2050. Fuente: (Geyer et al., 2017).	6
4. a: Fuentes de RSU (Banco Mundial, 2012). b: Composición de desechos plásticos (A. Adrados et al., 2012).	7
5. Lagunas de estabilización El Espinar, Puno – Perú.	19
6. Curva de crecimiento de microorganismos procedentes de muestras de polietileno de aguas residuales "El Espinar".	26
7. Curva de crecimiento en escala logarítmica de microorganismos procedentes de muestras de polietileno de aguas residuales "El Espinar".	27
8. Promedios de pérdida de peso (%) al mes 1. Según A) Surfactante, B) Tipo de agua y C) pH.	29
9. Interacciones de factores con la pérdida de peso (%) al mes 1. Donde A) Surfactante*Tipo de agua, B) pH*Surfactante y C) pH*Tipo de agua.	30
10. Promedios de pérdida de peso (%) al mes 2. Según A) Surfactante, B) Tipo de agua y C) pH.	32
11. Interacciones de factores en la pérdida de peso (%) al mes 2. Donde A) Surfactante*Tipo de agua, B) pH*Surfactante y C) pH*Tipo de agua.	33
12. Promedios de pérdida de peso (%) al mes 3. Según A) Surfactante, B) Tipo de agua y C) pH.	35
13. Interacciones de factores en la pérdida de peso (%) al mes 3. Donde A) Surfactante*Tipo de agua, B) pH*Surfactante y C) pH*Tipo de agua.	36
14. Vista macroscópica superficial de colonización de consorcio microbiano en PEBD (única fuente de carbono) obtenido del cultivo AR (agua residual estéril), a 30, 60 y 90 días de tratamiento.	39
15. Vista macroscópica superficial de colonización de consorcio microbiano en PEBD (única fuente de carbono) obtenido del cultivo SK (medio mineral salino) a los 30, 60 y 90 días de tratamiento.	40



16. Productos de electroforesis en gel de agarosa con contenido de ADN obtenido a partir de cultivos desarrollados en a) AR (medio agua residual natural) y NT (medio nutritivo); b) SK (medio mineral salino) y AR2 (medio agua residual estéril) con PEBD como única fuente de carbono.	42
17. Árbol filogenético de microorganismos que conforman el consorcio microbiano cultivado en SK con PEBD como única fuente de carbono.	43
18. Mapa de calor de la abundancia de especies en el consorcio AR2 y SK. La escala se representa al principio con un color negro que representa baja abundancia y al final con un color amarillo que representa una alta medida de abundancia.	44
19. Fuerza de tensión de película de PEBD (control) analizado por la relación entre elongación y fuerza.	46
20. Fuerza de tensión de película de PEBD (AR2) analizado por la relación entre elongación y fuerza.	46
21. Fuerza de tensión de película de PEBD (SK) analizado por la relación entre elongación y fuerza.	47
22. Espectrogramas FTIR de los films control de PEBD.	50
23. Espectrogramas FTIR de los films de PEBD degradados por microorganismos cultivados en medio AR a 30 días.	50
24. Espectrogramas FTIR de los films de PEBD degradados por microorganismos cultivados en medio AR a 60 días.	51
25. Espectrogramas FTIR de los films de PEBD degradados por microorganismos cultivados en medio AR a 90 días.	51
26. Espectrogramas FTIR de los films de PEBD degradados por microorganismos cultivados en medio SK a 30 días.	52
27. Espectrogramas FTIR de los films de PEBD degradados por microorganismos cultivados en medio SK a 60 días.	52
28. Espectrogramas FTIR de los films de PEBD degradados por microorganismos cultivados en medio SK a 90 días.	53
29. Espectrogramas Raman de los films de PEBD degradados por microorganismos cultivados en medio AR a 30, 60 y 90 días, respectivamente.	54
30. Espectrogramas Raman de los films de PEBD degradados por microorganismos cultivados en medio SK a 30, 60 y 90 días, respectivamente.	55
31. Micrografía superficial SEM de películas de PEBD a 30, 60 y 90 días de incubación en medio AR que muestra una ligera alteración de la superficie y pequeños	



- orificios con un aumento de 5.00 KX. Representación de la unión microbiana a la película de PEBD. 57
32. Micrografía superficial SEM de películas de PEBD a 30, 60 y 90 días de incubación en medio SK que muestra una ligera alteración de la superficie y pequeños orificios con un aumento de 5.00 KX. Representación de la unión microbiana a la película de PEBD. 58



ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
1. Protocolo de Kit de Purificación de ADN Invitrogen.	73
2. Resultados de Cinética de Crecimiento de Microorganismos con capacidad de degradación.	77
3. Resultados estadísticos del % de pérdida de peso de polímeros corridos en Statgraphic.	78
4. Resumen de los datos estadísticos de biodegradación de polietileno de baja densidad.	137
5. Resultados Análisis de muestras de polietileno de baja densidad.	140

RESUMEN

El polietileno de baja densidad (PEBD) es uno de los polímeros plásticos más abundantes en sistemas de tratamiento de aguas residuales y la aplicación de biodegradación microbiana de estos polímeros aún no ha sido investigada en aguas residuales procedentes de zonas altoandinas, donde la variabilidad genética de los microorganismos nativos y las características adversas del ambiente podrían influir positivamente en las tasas de biodegradación. En este estudio, se evaluó la biodegradación de PEBD usando dos consorcios microbianos procedentes de las lagunas de estabilización de aguas residuales “El Espinar” en Puno, cultivados en medio de cultivo natural (AR) y medio mínimo de sales (SK), con PEBD como única fuente de carbono. Las películas de PEBD que mostraron mayor pérdida de peso a 90 días de ensayo (6.36 ± 0.12 %) fueron las de los tratamientos con medio SK a pH 7 y suplementados con Tween 80. En la caracterización molecular de los microorganismos destacan especies que están incluidos los géneros *Pedobacter*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas*, con potencial capacidad biodegradativa de plásticos e hidrocarburos derivados de petróleo. Los análisis de resistencia a la tracción determinaron que el promedio de fuerza alcanzado por las muestras control fue de 24.46 ± 1.74 MPa, seguido por AR con 23.81 ± 1.47 MPa; sin embargo, el grupo SK presentó una resistencia de 22.67 ± 2.07 MPa. Los análisis FTIR, Raman y SEM confirmaron que en ambos medios de cultivo se alteró la composición química y morfología de la superficie en las láminas de PEBD.

Palabras clave:

Aguas residuales, biodegradación, contaminación, polietileno de baja densidad.

ABSTRACT

Low-density polyethylene (LDPE) is one of the most abundant plastic polymers in wastewater treatment systems and the application of microbial biodegradation of these polymers has not yet been investigated in wastewater from high Andean areas, where the genetic variability of native microorganisms and adverse environmental characteristics could positively influence biodegradation rates. In this study, the biodegradation of LDPE was evaluated using two microbial consortiums from the "El Espinar" wastewater stabilization ponds in Puno, cultivated in natural culture medium (AR) and minimal salt media (SK), with LDPE as the sole carbon source. The LDPE films that show the greatest weight loss at 90 days of testing ($6.36 \pm 0.12\%$) were those of the treatments with SK medium at pH 7 and supplemented with Tween 80. The molecular characterization of the microorganisms identified species that are including in the genera *Pedobacter*, *Acinetobacter* and *Pseudomonas*, with potential biodegradation capacity for plastics and oil-derived hydrocarbons. The tensile strength analysis determined that the average strength reached by the control samples was 24.46 ± 1.74 MPa, followed by AR with 23.81 ± 1.47 MPa; however, the SK group presented a resistance of 22.67 ± 2.07 MPa. The FTIR, Raman and SEM analyzes confirmed that the chemical composition and morphology of the surface of the LDPE sheets were altered in both culture media.

Keywords:

Wastewater, biodegradation, contamination, low-density polyethylene.

INTRODUCCIÓN

Los avances tecnológicos y el acelerado incremento de la población causaron que por más de 50 años la producción de plástico se masificara de forma exponencial a nivel global (Ranjan & Goel, 2019). Los plásticos son polímeros que tienen amplias aplicaciones en muchos aspectos de la vida diaria y la industria debido a las ventajas de propiedades como su ligereza, maleabilidad, durabilidad, versatilidad y bajo costo (Ranjan & Goel, 2019). Desafortunadamente, el desarrollo de la “era del plástico” tuvo repercusiones inmediatas en el ambiente, produciéndose la acumulación y fragmentación de estos polímeros, considerándose a estos residuos como un problema ambiental, global y emergente (Eriksen et al., 2013; Julienne et al., 2019; Wagner et al., 2014).

Por lo general, los polímeros plásticos no son biodegradables sin tratamiento previo por calor o luz ultravioleta (UV) debido a su superficie hidrófoba (Arutchelvi et al., 2008; Mahalakshmi, 2018), por lo que pueden persistir en ambientes naturales durante cientos de años (Tokiwa et al., 2009). Sin embargo, la composición de la membrana celular de un número limitado de especies bacterianas presentan grupos hidrofóbicos que hacen posible la adhesión de estos a las superficies poliméricas (Soleimani et al., 2020).

Las estrategias de biorremediación microbiana para la mitigación de ecosistemas impactados por contaminantes plásticos, no han sido suficientemente documentadas. No obstante, los registros científicos elucidan poco a poco los mecanismos fisicoquímicos y biológicos utilizados por hongos y bacterias hallados en medios terrestres (Braissant et al., 2003; Carolina Monmany-Garzia et al., 2020; Soleimani et al., 2020), acuáticos (Harrison et al., 2011; Müller et al., 2005; Wagner et al., 2014) e incluso en otros organismos vivos de mayor jerarquía (Sini Francis et al., 2021).

Las investigaciones coinciden en enfocar la búsqueda de microorganismos con potencial de degradación en depósitos dotados de antecedentes históricos de acumulación de residuos y una presunta actividad microbiana originada por hongos, levaduras, bacterias y consorcios microbianos en general (Gargouri et al., 2015; Moharir & Kumar, 2019). Por otro lado, se conoce que las características ambientales podrían influir en la variabilidad genética de los microorganismos nativos y en los mecanismos de degradación de compuestos orgánicos (Boone et al., 2001; Gong et al., 2019; Nölvak et al., 2013).



Enmarcado en las ciencias ambientales, biotecnológicas y ciencias de los materiales, esta investigación abarca varios enfoques físicos, químicos, mecánicos y biológicos involucrados en procesos de biodegradación microbiana sobre polietileno de baja densidad (PEBD).

El propósito de este estudio fue determinar la degradación de PEBD aplicando microorganismos procedentes de aguas residuales urbanas, adaptados a las condiciones ambientales de sistemas acuáticos altoandinos mediante el método mixto secuencial explicativo experimental que permitió obtener perspectivas múltiples de las evaluaciones.

En el capítulo 1 se desarrolla la revisión de literatura correspondiente al marco teórico y antecedentes de la investigación; en el capítulo 2 se presenta el planteamiento del problema, justificación, objetivos e hipótesis; en el capítulo 3 se describen detalladamente los materiales y métodos utilizados para el cumplimiento de los objetivos; finalmente, en el capítulo 4 se muestran los resultados y la discusión generada a partir de los mismos y del contraste con la literatura.

CAPÍTULO I

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Marco teórico

1.1.1 Polímeros plásticos

La palabra polímero deriva de los términos “poly” que significa “muchas” y “meres” que significa “partes”. Los polímeros son moléculas de largas cadenas, unidades repetidas y estructura idéntica (Fried, 2014) y existen diversos tipos como las proteínas, celulosa o el almidón que se encuentran de forma natural, mientras que otros como el poliestireno, polietileno y el nailon son producidos a partir de procesos de síntesis artificial (Scott, 1999).

Los plásticos son materiales poliméricos formados por cadenas hidrocarbonadas que poseen masas moleculares elevadas y cuya naturaleza orgánica los hace susceptibles a ser moldeados (Scott, 1999). La palabra plástico proviene del vocablo griego “plastikos”, cuyo significado refiere al tipo de material que es capaz de ser maleables (Fried, 2014).

La producción de plástico sintético es uno de los campos de más rápido crecimiento de la industria mundial, estimándose 367 millones de toneladas métricas de plástico en 2020. En 2020 la producción disminuyó aproximadamente un 0.3 % en comparación con el año anterior debido a los impactos de COVID-19 en la industria. La gran versatilidad de este grupo de materiales explica el continuo crecimiento de la producción año tras año (Figura 1). Junto con ese crecimiento, el valor comercial de los plásticos también continúa en ascenso (Statista, 2022).

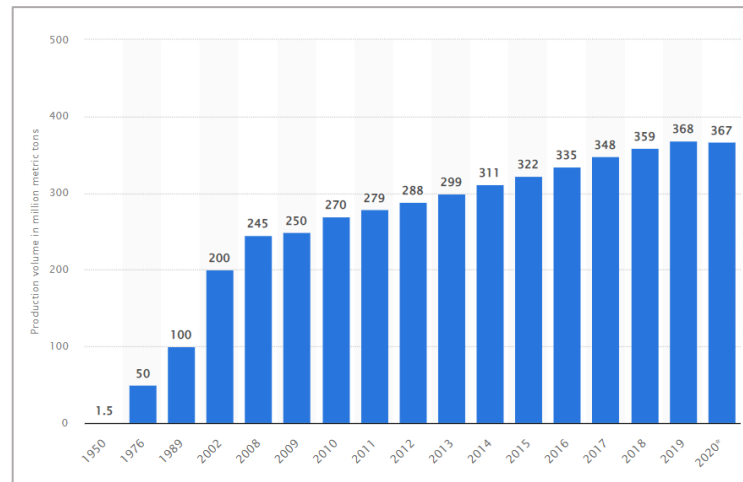


Figura 1. Producción anual de plásticos a nivel mundial desde 1950 al 2020.

Fuente: <https://www.statista.com/statistics/282732/global-production-of-plastics-since-1950/>

1.1.2 Aplicaciones de los plásticos

Debido a la diversificación de aplicaciones de los plásticos, actualmente son fabricados a partir de materias primas inorgánicas y orgánicas como carbono, silicio, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno y cloruro (Seymour, 1988). Sus propiedades pueden variar dependiendo de la conformación química y de los aditivos que se apliquen a las mezclas para su conformación. Debido a sus propiedades químicas y físicas favorables, los plásticos se han convertido en un material indispensable para la vida al ser utilizados para reemplazar a materiales naturales como la madera, el carbón y el metal (Boonmee et al., 2022; Shah et al., 2008).

Algunas de las propiedades más importantes de estos polímeros son su fuerza, ligereza, impermeabilidad y maleabilidad; sin embargo, la amplia gama de aplicaciones de los plásticos no solo se debe a sus propiedades mecánicas sino también a su estabilidad y durabilidad a largo plazo (Rivard et al., 1995). De hecho, los plásticos son comunes en aplicaciones de un solo uso, especialmente en bolsas de plástico para el envasado de productos alimenticios, cosméticos, detergentes, productos químicos y materiales médicos (Chanprateep, 2010). Aproximadamente el 30% de los plásticos se utilizan en todo el mundo para aplicaciones de embalaje (Sabir, 2004).

Los plásticos más utilizados en los envases son el polietileno (LDPE, MDPE, HDPE y LLDPE), el polipropileno (PP), el poliestireno (PS), el policloruro de vinilo (PVC),

poliuretano (PUR), poli(tereftalato de etileno) (PET), poli(tereftalato de butileno) (PBT), nailon (Figura 2 y Tabla 1).

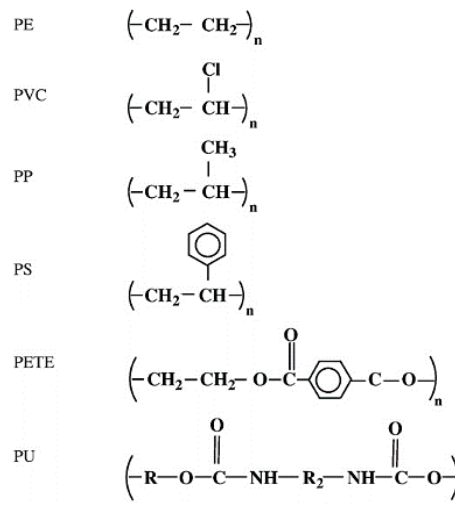


Figura 2. Estructura química de polímeros plásticos.

Fuente: Ru et al. (2020)

Tabla 1

Uso de los plásticos sintéticos

Plástico	Uso
Polietileno	Bolsas para productos alimenticios, envases para almacenamiento de aceites, películas de envasado de alimentos, juguetes y tuberías
Poliestireno	Materiales de empaque, artículos de laboratorio, vasos descartables usos electrónicos
Poliuretano	Neumáticos, esponjas, parachoques, aislamiento de refrigeradores, recubrimientos y chalecos
Policloruro de vinilo	Zuelas de zapatos, fundas de asientos de automóviles, cortinas de baño, impermeables, botellas, tuberías eléctricas y mangueras de jardín
Polipropileno	Tapas de botellas, frascos de medicamentos, asientos y baterías de automóviles, jeringas, parachoques, respaldos de alfombras, sorbetes
Polietileno ptereftalato (PET)	Botellas de gaseosas y productos carbonatados, empaques de carne procesada, sacos de dormir, fibras textiles

Nailon	Engranajes de velocímetro, boquillas de mangueras de agua, cascos, limpiaparabrisas, zapatos para caballos de carreras, telas para ropa impermeable.
Policarbonato	Lentes, viseras de seguridad, luces traseras de automóviles, alumbrado público, biberones y artículos para el hogar. También se utiliza en tragaluces, terrazas acristaladas.

Fuente: Fahrenfeld et al. (2019)

1.1.3 Residuos plásticos

No se puede ignorar los problemas asociados a las aplicaciones de los plásticos, a pesar de constituir una parte importante de la economía global (Urbanek et al., 2018). Grandes cantidades de polímeros plásticos sintéticos se introducen en el ecosistema como desechos industriales (Shimao, 2001). En la investigación realizada por Geyer et al., 2017, se obtuvo la aproximación de 6300 millones de toneladas de desechos plásticos generados desde el año 2015 hasta el 2017, de los cuales un porcentaje significativo ha llegado al medio ambiente como resultado del vertido incontrolado de desechos; asimismo, presentaron proyecciones de tendencia histórica hasta el año 2050 (Figura 3).

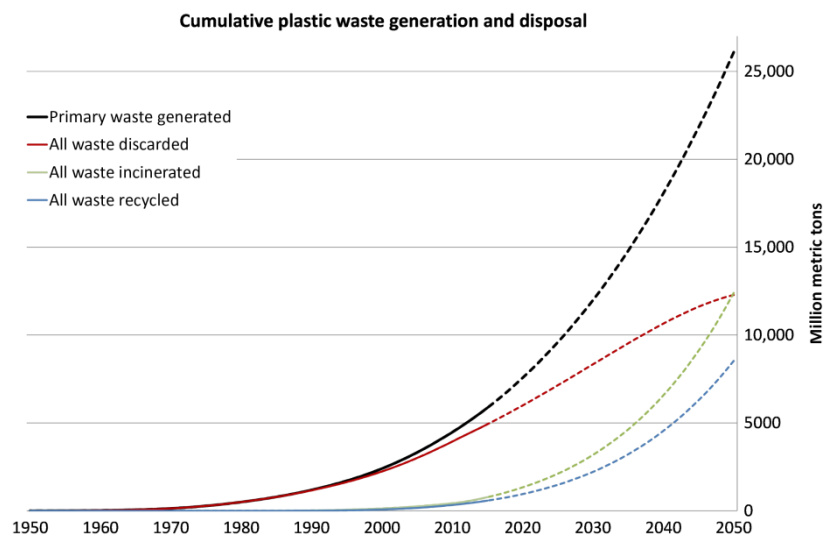


Figura 3. Generación y eliminación acumulada de residuos plásticos (en millones de toneladas métricas). Las líneas sólidas muestran datos históricos desde 1950 hasta 2015; las líneas discontinuas muestran proyecciones de tendencias históricas hasta 2050. Fuente: Geyer et al. (2017).

En los últimos años, debido a la durabilidad y visibilidad de la basura en diversos cuerpos ambientales, ha aumentado la atención de los medios y preocupación del público en general por la disposición de los residuos sólidos, especialmente del plástico de naturaleza no degradable y recalcitrante, que ha ocasionado grandes problemas para el ambiente, llegando a un punto crítico de contaminación que podría persistir durante siglos (Abdel-Shafy & Mansour, 2018; Quecholac-Piña et al., 2020), a comparación de cualquier otro componente presente en los flujos de desechos sólidos (Shah et al., 2008).

En general, los desechos son eliminados a través de vertederos, incineración y reciclaje (Shah et al., 2008). Las fracciones de residuos hechos con plástico conforman una parte importante de las fracciones inorgánicas de los residuos sólidos urbanos (RSU). De acuerdo al Banco Mundial, Capítulo 5, EPA (2012), aproximadamente 10-13% de residuos plásticos constituyen los RSU de todo el mundo (Figura 4a). Los desechos plásticos en los RSU incluyen principalmente los plásticos básicos utilizados en los envases (por ejemplo, comida rápida), la industria y la agricultura; asimismo, estos usos producen una gran cantidad de residuos de vertedero (Shah et al., 2008). Los polímeros plásticos más comunes son el polietileno (PE) y el polipropileno (PP), que son utilizados en diferentes aplicaciones entre todos los demás tipos (Banco Mundial, Capítulo 5, EPA, 2012). En la Figura 4b se observan los tipos de plásticos encontrados normalmente en vertederos de RSU (Aitziber Adrados et al., 2012).

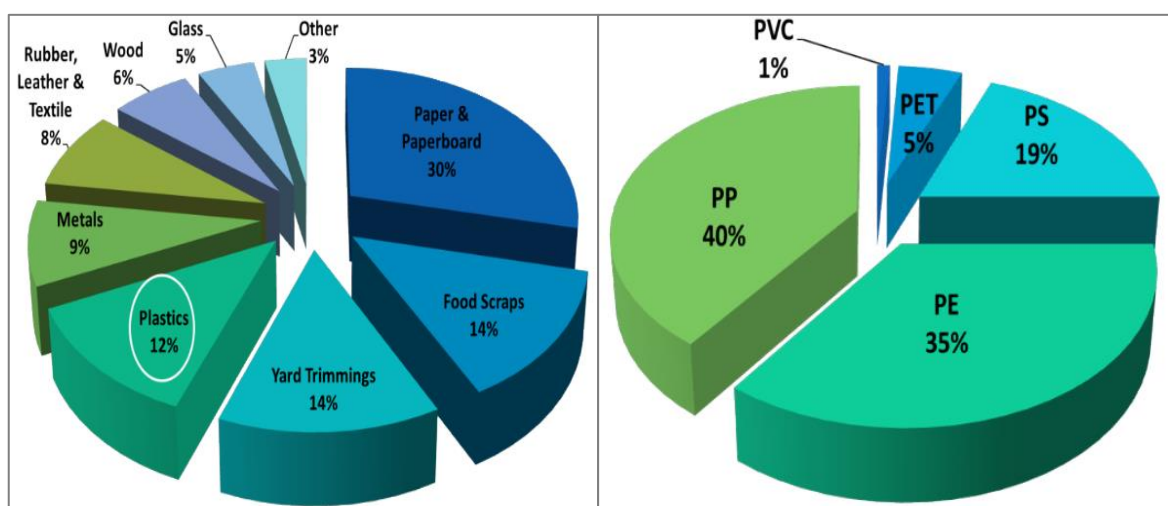


Figura 4. a: Fuentes de RSU (Banco Mundial, 2012). b: Composición de desechos plásticos (A. Adrados et al., 2012)

Una forma de disposición inadecuada de los residuos plásticos es la quema de estos polímeros que producen contaminantes orgánicos persistentes (COP) conocidos como furanos y dioxinas (Jayasekara et al., 2005), en algunos casos liberan sustancias químicas tóxicas y carcinógenas que contamina el aire (Shah et al., 2008).

Las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR's) son consideradas como fuentes que liberan plásticos en ambientes acuáticos y terrestres, que pueden ocasionar una contaminación mayor debido al flujo y transporte de los polímeros (Bayo et al., 2021). Las lagunas de estabilización son reservorios artificiales para el tratamiento de las aguas residuales y comprenden una o varias series de lagunas anaerobias, lagunas facultativas y lagunas de maduración. La tecnología de las lagunas de estabilización es uno de los métodos naturales más importantes para el tratamiento de aguas residuales empleado sobre todo en climas cálidos donde funcionan en forma óptima ya que el calor favorece la degradación de la materia orgánica (Sistema Regional de Información Ambiental, 2011)

Los desechos mal operados podrían eventualmente introducirse al océano, lagos, lagunas, ríos, pozos y otros cuerpos de agua a través de vías navegables interiores, salidas de aguas residuales y transporte por el viento o las mareas. Las estimaciones de la masa de desechos plásticos dependen de las características de las cuencas hidrográficas locales, estos resultados no pueden extrapolarse fácilmente a una escala global (Okoffo et al., 2019).

Los materiales plásticos que son eliminados incorrectamente pueden convertirse en una fuente importante de contaminación, que puede dañar la vida (Shah et al., 2008).

En los ambientes marinos ocurre la acumulación de basura plástica (Halpern et al., 2008), tanto en la superficie como en las zonas de convergencia de cada uno de los cinco giros subtropicales (Cózar et al., 2014). Asimismo, se han encontrado desechos plásticos en altas concentraciones (cientos de miles de piezas por kilómetro cuadrado) de los mares de Groenlandia y Barents (Cózar et al., 2017). Además, en el sistema marino antártico (Océano Austral), se han encontrado plásticos en la superficie y en sedimentos de aguas profundas. En estas regiones se han sido hallados principalmente microplásticos (<5 mm) y mesoplásticos (< 5 cm) (Waller et al., 2017).

Los artículos de plástico grandes que se degradan lentamente generan partículas de microplásticos que pueden trasladarse a largas distancias a la circulación de la capa superficial del océano impulsada por el viento (Thevenon et al., 2014). Así, los lugares alejados de las fuentes de contaminación se ven afectados por los desechos plásticos. También existe la preocupación de que el plástico sea una fuente de productos químicos tóxicos como los bifenilos o ftalatos policlorados y el bisfenol A (Bryant et al., 2016). Estas contaminaciones también tienen una influencia significativa en la fauna marina debido al enredo, la asfixia y la interrupción de la digestión en aves, peces, mamíferos y tortugas (Derraik, 2002). Según la investigación de Tekman (2017) del Instituto Alfred Wegener, Centro Helmholtz para la Investigación Polar y Marina, 1506 especies se ven afectadas por la basura. Debido a su persistencia en el ambiente, varias comunidades son más sensibles al impacto del plástico desechado y dispersado por los cuerpos de agua, incluidos los efectos nocivos sobre la vida silvestre y las cualidades estéticas de las ciudades y los bosques (Shah et al., 2008).

1.1.4 Tecnologías de remediación de residuos plásticos

1.1.4.1 Tecnología de membrana

Las tecnologías de membrana son prácticas para eliminar las altas concentraciones de plásticos de pequeñas dimensiones que existen como desechos poliméricos (Gurung et al., 2016). En Finlandia, se utilizaron diferentes técnicas, como la filtración de arena por gravedad, flotación por aire disuelto y los biorreactores de membrana (MBR) para el tratamiento terciario de MP, con tasas de remediación superiores al 95 % (Pico et al., 2019). Aunque una PTAR puede eliminar alrededor del 99% de los microplásticos, millones de pequeños fragmentos de plástico (1^{-10} mm) pueden escapar de esas instalaciones de tratamiento (Novotna et al., 2019). La filtración de carbón activado granular, altas dosis de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}/\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y la ultrafiltración a través de membranas de fluoruro de polivinilideno también se han sugerido como metodologías de tratamiento vitales para eliminar partículas pequeñas (Novotna et al., 2019). Se ha observado que la técnica MBR ha mejorado moderadamente la eficiencia de eliminación (99,4 %) en relación con el proceso convencional basado en lodos activados (98,3 %) (Pico et al., 2019).

1.1.4.2 Tecnología de Coagulación

La coagulación se utiliza frecuentemente en las PTAR's para la eliminación de plásticos (Skaf et al., 2020). El método de coagulación química consiste en que las sales de Fe y Al se unen con partículas de plástico mediante el intercambio de ligandos para facilitar la remediación mediante la formación de complejos (Chorghé et al., 2017). Dada la naturaleza coloidal de los plásticos se demostró que la coagulación con alumbre es eficaz en su remediación de aguas residuales (Skaf et al., 2020). Eso redujo la turbidez y aumentó la estabilidad, conduciendo a la remediación de PE a través de un mecanismo de floculación de barrido (Skaf et al., 2020). Últimamente también se ha investigado la remediación de PE a partir de coagulantes iónicos basados en Al^{3+} y Fe^{3+} (Ariza-Tarazona et al., 2019). La coagulación con Fe^{+3} fue más eficaz que las opciones basadas en Al^{+3} .

1.1.4.3 Biodegradación microbiana

Las estrategias de biodegradación para la remediación de plásticos se desarrollan cada vez más con un enfoque respetuoso del ambiente. La filtración biológicamente activa es una técnica eficaz para la remediación de partículas de plásticos (Talvitie et al., 2017). Asimismo, en las técnicas de bioingeniería, se explota el potencial de los las bacterias, hongos y otros microorganismos para degradar plásticos mediante acción enzimática (Urbanek et al., 2018). La nueva cepa bacteriana 201-F6 (*Ideonella sakaiensis*) pudo degradar el PET en ácido tereftálico y etilenglicoles inocuos para el medio ambiente (Yoshida et al., 2016). De igual forma, también se ha demostrado la biorremediación de PE mediante hidrólisis enzimática (Zumstein et al., 2017).

La biodegradación de plásticos se produce en 4 pasos:

- (1) Formación de biopelículas microbianas: el desarrollo de biopelículas que conforman plastisferas, disminuyendo la flotabilidad y la hidrofobicidad del polímero (Lobelle & Cunliffe, 2011).
- (2) Biodeterioro: la generación de biopelículas es seguida por el deterioro ocasionado por la acción enzimática (exo/endo-enzimas) y exo-polisacáridos (Rai et al., 2021).

(3) Biofragmentación: después del biodeterioro, la cadena carbonada del polímero se desestabiliza mediante la despolimerización enzimática con amidasas, oxidasas, lacasas y peroxidasas (Gómez-Méndez et al., 2018).

(4) Mineralización: en este paso final pero determinante de la velocidad, los polímeros se degradan por completo, lo que resulta en la liberación de productos finales como CO₂,

H₂O y CH₄ (Ganesh Kumar et al., 2021).

Estos pasos secuenciales pueden ser condicionados dependiendo de varios factores fisicoquímicos ambientales involucrados en la biorremediación:

(1) Características del polímero: los atributos integrales de los plásticos, como el peso molecular, la estructura 3D y la hidrofobicidad (Hadad et al., 2005) y la química compleja de las mezclas que contienen plastificantes/aditivos influyen en la tasa de degradación microbiana. degradación (Min' et al., 2015).

(2) Condiciones ambientales: Factores como la temperatura, luz UV, calor, salinidad, etc. (Tabla 2) afectan la tasa de hidrólisis al intervenir en la biodisponibilidad de los sitios catalíticos en los polímeros abiertos al ataque microbiano y la degradación (Ho et al., 1999).

Tabla 2

Factores que afectan los procesos de biodegradación de polímeros plásticos.

Factores (requerimiento)	Fotodegradación	Degradación termo - oxidativa	Biodegradación
Agente activo	Luz UV o alta energía de radiación	Calor y oxígeno	Agentes microbianos
Requerimiento de calor	No requiere	Requiere altas temperaturas ambientales	No requiere
Velocidad de degradación	Iniciación lenta, propagación rápida	Rápida	Moderado

Otras consideraciones	Amigable ambientalmente si no se usa alta energía de radiación	Ambientalmente no aceptable	Ambientalmente amigable
Aceptación general	Aceptable pero costoso	No aceptable	Barato y bastante aceptable

Fuente: ICPE (2006).

Las enzimas hidrolasas como ureasas, proteasas y esterases, juegan un papel fundamental en la hidrólisis de los polímeros plásticos y, consecuentemente, en la tasa de biodegradación (Ho et al., 2018). Por esta razón, la exploración de enzimas microbianas y el esclarecimiento de los mecanismos de degradación pueden ampliar la posibilidad de remediación a través de la biodegradación (Xu & Wang, 2018). Las biopelículas microbianas también pueden conducir a la remediación de micro y nano plásticos a través de la degradación bioquímica (Yuan et al., 2020). En este proceso, los factores ambientales como la irradiación solar, materia orgánica del medio y material particulado también influyen en el proceso de degradación efectuado por los microbiomas. Las biopelículas en micro y nano plásticos pueden facilitar la producción de enzimas catalíticas que permiten degradar eficientemente los polímeros sintéticos (Ganesh Kumar et al., 2021). Ciertos microorganismos, como *Alcanivorax borkumensis*, juegan un papel clave en la degradación de PEBD (Delacuvellerie et al., 2019). Por lo tanto, los enfoques biotecnológicos pueden ser de gran utilidad en la biodegradación de los polímeros plásticos en general (Moog et al., 2019).

En la

Tabla 3 se presenta una lista de microorganismos y enzimas asociadas que participan en procesos de degradación de polietileno. El proceso de degradación de plásticos está estrechamente relacionado con la dinámica de biopelícula dominante, es decir, cambios en las comunidades microbianas (por ejemplo, de *Rhodobacterales*, *Oceanospirillales* y *Burkholderiales*) (Syranidou et al., 2019). Las variaciones fisicoquímicas del medio se pueden observar y medir a través de instrumentos analíticos. Cepas bacterianas como *Bacillus cereus* y *Bacillus gottheilii* remediaron de manera efectiva muchos polímeros plásticos (PET, PP, PE y PS) procedentes de sedimentos de manglares (Auta et al., 2018). El hongo *Zalerion maritimum* mostró potencial para degradar partículas de plástico (Paço et al., 2017). Generalmente las hifas de los hongos están equipadas con recubrimientos superficiales que liberan biosurfactantes naturales pegajosos como las hidrofobinas (Sánchez, 2020). Estas hidrofobinas (p. ej., ABH1 de *Agaricus bisporus*, Rod A de *Claviceps fusiformis* y SC 1;3;4 de *Schizophyllum commune*) pueden unirse con superficies plásticas hidrofóbicas, lo que conduce a la biodegradación del plástico, utilizándolo como fuente de carbono y energía. La biodegradación de PP utilizando dos hongos (*Phanerochaete chrysosporium* NCIM 1170 y *Engyodontium album* MTP091) mejoró mediante un pretratamiento con almidón/prooxidante (Jeyakumar et al., 2013).

Tabla 3

Bacterias, hongos y enzimas asociadas a la biodegradación de polietileno (PE).

Cepa/Enzima	Fuente	Tipo de PE	Tiempo incubación, d	Pérdida de peso
Rhodococcus ruber C208	Suelo	Film de LDPE	30	4
Bacillus sphericus Alt	Agua de mar	Film de LDPE	180	2.5-10
Arthrobacter sp. GMB5	Botadero de plásticos	Film de HDPE	30	12-15
Pseudomonas sp. E4	Suelo	LMWPE	80	5
Pseudomonas sp. AKS2	Botadero de residuos	Film de LDPE	45	1.75
Bacillus subtilis H1584	Agua de mar	Film de LDPE	30	6-11
Enterobacter asburiae YT1	Intestino de gusano	Film de LDPE	60	
Serratia marcescens	Suelo	Film de LLDPE	70	36
Achromobacter xylooxidans	Suelo	Film de HDPE	150	9.38
Zalerion maritimum	Ambiente marino	Pellets de PE	28	
Phormidium lucidum	Agua doméstica	Film de LDPE	42	
Alcanivorax borkumensis	Mar mediterráneo	Film de LDPE	7	3.5

Fuente: Ru et al. (2020)

CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 Identificación del problema

La presencia de partículas de plástico en plantas de tratamiento de agua y aguas residuales plantea una preocupación por la calidad del agua tratada a nivel mundial. Debido a su amplia distribución, pequeño tamaño y su naturaleza química diversa, los nano/microplásticos pueden viajar fácilmente a lo largo de la línea de procesos del tratamiento de agua, afectando la eficiencia de la remediación en varios niveles, lo que representa desafíos operativos y de estabilidad de procesos.

2.2 Enunciado del problema

Las estrategias de reducción de contaminantes plásticos en plantas de tratamiento de aguas residuales mediante la aplicación de sistemas biológicos controlados, no han sido suficientemente investigados como alternativa de atenuación natural y menos en zonas altoandinas, en donde las características adversas del medio podrían influir en la variabilidad genética de especies microbianas involucradas en los procesos de biodegradación de polímeros plásticos.

El conocimiento de microorganismos nativos con potencial de biodegradación de plásticos puede ser la pieza clave para el desarrollo de tecnologías de procesamiento de aguas tratadas en la región, teniendo impactos económicos importantes, como la generación de empleos en diversos sectores industriales que apuestan por la sostenibilidad; sociales, que aseguren la calidad de la salud en la población y que permitan un óptimo desarrollo ecológico.

2.3 Justificación

Entre las soluciones para limitar los impactos de los nano y microplásticos en agua y aguas residuales, se contemplan como alternativas la separación por densidad, coagulación y biodegradación, los cuales podrían actuar de manera individual o en conjunto en algunas etapas del tratamiento. La degradación microbiana, adaptada a las condiciones ambientales óptimas y la amplia variabilidad genética de los microorganismos, pueden contribuir con la fragmentación de los polímeros plásticos presentes en sistemas acuáticos a condiciones ambientales adecuadas (Restrepo-Flórez et al., 2014), hasta lograr la transformación final de la materia orgánica, conocida también como mineralización.

2.4 Objetivos

2.4.1. Objetivo general

Evaluar la biodegradación del polietileno de baja densidad efectuada por microorganismos adaptados a las condiciones altoandinas en aguas residuales urbanas de la ciudad de Puno.

2.4.2 Objetivos específicos

Objetivo Específico 1 (OE1): Determinar los parámetros de pH, tipo de medio de cultivo y surfactante que requieren los microorganismos procedentes de aguas residuales urbanas de la ciudad de Puno para biodegradar polietileno de baja densidad.

Objetivo Específico 2 (OE2): Identificar microorganismos procedentes de aguas residuales urbanas de la ciudad de Puno con capacidad biodegradativa sobre polietileno de baja densidad.

Objetivo Específico 3 (OE3): Analizar las propiedades físico-mecánicas, químicas y microestructurales en polietileno de baja densidad biodegradado en sistemas reactores provistos de microorganismos procedentes de aguas residuales urbanas de la ciudad de Puno.

2.5 Hipótesis

2.5.1 Hipótesis general

Los microorganismos adaptados a las condiciones altoandinas en aguas residuales urbanas de la ciudad de Puno influyen positivamente en la biodegradación del polietileno de baja densidad.

2.5.2 Hipótesis específicas

Hipótesis Específica 1 (HE1): Los parámetros óptimos de pH, tipo de medio de cultivo y surfactante permiten a los microorganismos desarrollar una significativa capacidad biodegradativa sobre el polietileno de baja densidad.

Hipótesis Específica 2 (HE2): La variabilidad de microorganismos procedentes de aguas residuales urbanas de la ciudad de Puno asociada a la biodegradación de polietileno de baja densidad es significativa.

Hipótesis Específica 3 (HE3): Las propiedades físico-mecánicas, químicas y microestructurales del polietileno de baja densidad son determinadas a partir de la biodegradación significativa en sistemas reactores provistos de microorganismos procedentes de aguas residuales urbanas de la ciudad de Puno.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de estudio

El área de estudio está comprendida por las Lagunas de Estabilización “El Espinar” (-15.8553 S, -70.0045 O), definidas por un área total de 23 has y ubicadas en el extremo sur de la ciudad de Puno (Perú), entre la Isla Espinar y los Barrios de Chanu-Chanu (Figura 5) a 3810 m.s.n.m. Se trata de un sistema de tratamiento conformado por dos lagunas en serie (primaria y secundaria) en donde desembocan afluentes residuales provenientes de la ciudad de Puno, las cuales son trasladadas a través de la red de alcantarillado. El sistema comprende de un tratamiento preliminar mediante un sistema de cámara de rejas, así como de un desarenador y seguido de dos módulos hidráulicos de caudal unidos de forma paralela, de allí los líquidos residuales son derivados a siete tubos de descarga distribuidos alrededor de la Laguna de Estabilización Primaria. Asimismo, los residuales se retiran mediante seis buzones de salida que derivan a seis tuberías hacia la Laguna de Estabilización Secundaria, desde allí son dirigidos hacia tres buzones que se dirigen a una tubería de descarga final que desemboca a la Bahía Interior del Lago Titicaca (Sistema Regional de Información Ambiental, 2011).



Figura 5. Lagunas de estabilización El Espinar, Puno – Perú.

3.2 Población

La población para la obtención de microorganismos degradadores está determinada por muestras de plásticos contaminados en zonas de depósito de residuos con historia de deposición.

La población de muestras para el cultivo de microorganismos en medio de origen natural está definida por submuestras tomadas en cada tubo colector de las lagunas de estabilización de aguas residuales “El Espinar” (siete colectores), de los cuales se conformará una sola muestra compuesta y representativa.

3.3 Muestra

Las muestras fueron un total de 7 plásticos con signos de degradación microbiana en cada punto receptor de agua residual.

3.4 Método de investigación

Se desarrolló el método de investigación experimental para estudiar los fenómenos asociados a la biodegradación de microorganismos procedentes de aguas residuales de las lagunas de estabilización “El Espinar” sobre PEBD.

3.5 Métodos por objetivos específicos

OE 1: Determinar los parámetros de pH, tipo de medio de cultivo y surfactante que requieren los microorganismos procedentes de aguas residuales urbanas de la ciudad de Puno para biodegradar polietileno de baja densidad.

3.5.1 Recolección y preparación de muestras

Se tomó 1 L de muestras de agua superficial a 50 metros de distancia de 7 puntos de vertimientos de aguas residuales de las Lagunas de Estabilización “El Espinar”, luego las muestras fueron mezcladas y homogeneizadas en un mismo recipiente conformando una mezcla compuesta, siguiendo las directrices del Protocolo Nacional para el Monitoreo de la Calidad de los Recursos Hídricos Superficiales (ANA, 2016). Asimismo, se recogieron muestras de desechos de polietileno en zonas que presentan gran acumulación de residuos plásticos durante mucho tiempo (10-20 años), donde existe una mayor probabilidad encontrar bacterias con potencial de degradación de PEBD. Las muestras se almacenaron a 4 °C hasta su procesamiento en el laboratorio. Por otro lado, se prepararon láminas de bolsas de plástico con cierre hermético (Ziploc) de un espesor aproximado de 63 µm, cortadas en tiras de 10 x 2 cm. Las láminas fueron desinfectadas con una solución compuesta por 10 mL de lejía y 7 mL de Tween 80 en 983 mL de agua bidestilada por 30 a 60 minutos, luego fueron transferidas a un frasco con agua destilada estéril y movidas por 30 minutos para, seguidamente, traspasarlas con etanol al 70% por 30 minutos. Por último, las tiras se secaron a 60 °C por 12 h antes de someterlas a las pruebas de degradación bacteriana (Maroof et al., 2020).

3.5.2 Preparación de medios de cultivo

Para el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos, entre ellos los degradadores más exigentes, se preparó caldo nutritivo (HIMEDIA) como medio de pre-enriquecimiento, suspendiendo 13 g en 1000 mL de agua destilada y se calentó lo necesario para disolver el medio completamente.

Para el aislamiento de los consorcios microbianos degradadores se prepararon dos medios: medio mineral salino (SK) usando 1.73 K₂HPO₄ (CDH), 0.68 KH₂PO₄ (CDH), 0.1 MgSO₄·7H₂O (HIMEDIA), 4 NaCl (CDH), 0.03 FeSO₄·7H₂O (HIMEDIA), 1 NH₄NO₃ (CDH), 0.02 CaCl₂·2H₂O (HIMEDIA), 5 C₆H₁₂O₆ (CDH) en g/L de agua ultrapura y medio de agua residual procedente de las lagunas de

estabilización “El Espinar” (AR), haciendo un filtrado inicial con mallas para separar la materia sólida de gran tamaño. Ambos medios fueron esterilizados en una autoclave digital vertical automático de 105 litros (JSR JSAT-105) a 121 °C por 20 minutos.

3.5.3 Determinación de cinética microbiana y preparación de inóculos

A partir de las muestras de polietileno obtenidas de las lagunas de estabilización “El Espinar” se cortaron tiras de 10 x 2 cm, las cuales fueron introducidas en un balón volumétrico que contenía 100 mL de caldo nutritivo de pre-enriquecimiento. Después de 24 h de incubación a 30 °C, se introdujo 1 mL del cultivo pre-enriquecido en 100 mL (dilución 1/100) de caldo nutritivo nuevo que sirvió como medio para la determinación de cinética microbiana. Para hacer el seguimiento del crecimiento del consorcio cultivado se midió la absorbancia a 600 nm, cada hora, durante 24 horas. Asimismo, se realizó un recuento de viables, haciendo para todas las muestras un banco de diluciones hasta la dilución 10^{-7} y se sembraron por duplicado 100 μ de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} y se registraron las unidades formadoras de colonias (UFC) obtenidas en las diferentes placas de dos duplicados de aquellos que atendían a cada muestreo en el rango estadísticamente válido de 30 – 300 UFC) por placa (Tortora et al., 2007). Para cada uno de los tiempos de muestreo se calculó el promedio del recuento de las dos placas en UFC/mL, así como la desviación estándar y el coeficiente de variación. Con estos datos se determinaron los parámetros de crecimiento microbiano: tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación o generación.

3.5.4 Establecimiento de sistemas reactores para ensayos de biodegradación sobre PEBD

Se tomó 1 mL del medio de pre-enriquecimiento previamente incubado por 16 horas (crecimiento máximo del consorcio microbiano) y se inoculó en los balones de cuello liso con fondo plano configurados como sistemas reactores de biodegradación. Se estableció un diseño completamente aleatorizado (DCA) con arreglo factorial multinivel con tres repeticiones, teniendo como factores el medio de cultivo, pH y surfactante en los niveles que se detallan en la Tabla 4, siendo un total de 36 tratamientos distribuidos en dos bloques; la ejecución de la matriz mostrada fue de manera aleatoria en cada bloque. Cada reactor contenía una lámina de PEBD cuyo peso se registró al inicio de los ensayos de degradación. La respuesta Pérdida de Peso

de PEBD (%) fue evaluada a través del tiempo al cumplirse 30, 60 y 90 días de ensayo con la fórmula:

$$\text{Porcentaje de pérdida de peso} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

Con dichos resultados, se procedió a seleccionar el tiempo de pérdida de peso máxima y los factores significativos a los procesos de biodegradación realizados por los consorcios microbianos.

Tabla 4

Factores y niveles de la configuración experimental para la evaluación del potencial de biodegradación de los consorcios sobre PEBD.

Variables	Niveles				
pH	4.2	5	7	9	9.8
Surfactante	Sin surfactante	Tween 20	Tween 80	-	-
Medio de cultivo o Tipo de Agua	AR	SK	-	-	-

OE 2: Identificar microorganismos procedentes de aguas residuales urbanas de la ciudad de Puno con capacidad biodegradativa sobre polietileno de baja densidad.

3.5.5 Identificación molecular de consorcios microbianos

Para capturar los microorganismos de las muestras líquidas se realizó la filtración de una muestra integrada y homogeneizada de agua residual procedente de la Laguna de Estabilización “El Espinar” (AR), además, se seleccionaron las dos configuraciones que obtuvieron mejores resultados de pérdida de peso (%) tanto para el medio sintético (SK) como para el medio conformado por agua residual estéril (AR2). Para ello, se conectó un embudo de filtro desechable (Pall MicroFunnel – Thermo Fisher Scientific) a un colector de vacío, después se vertió 100 mL de la muestra en el embudo y se encendió la bomba de vacío para iniciar la filtración. Cuando el filtro estuvo visiblemente seco, se apagó la bomba y se retiró el embudo desenroscando la base con cuidado de no tocar la membrana de 0.2 μm (Whatman Nucleopore – Sigma Aldrich).

Se esterilizó dos pares de pinzas empapándolas en etanol y luego aplicándolas a una llama, cuando las pinzas se enfriaron se dobló con cuidado el filtro por la mitad, manipulando por los bordes. Se dobló el filtro dos veces de nuevo, se colocó en un tubo precargado con perlas de vidrio y se almacenó en el ultracongelador a -80°C .

La extracción de ADN se realizó utilizando el kit de purificación de ADN de microbioma (PureLink – Thermo Fisher Scientific) y siguiendo la guía de usuario del producto (Anexo 1).

La cuantificación de las muestras de ADN obtenidas se realizó colocando $2\ \mu\text{L}$ de ADN en un espectrofotómetro de microvolúmenes UV/Vis (Lambda – PCR max).

Para visualizar la calidad del ADN extraído, se realizó una corrida electroforética de las muestras. Primero se preparó el buffer de corrida TAE (Tris Acetatos EDTA) al 1% que permitió el flujo de corriente para la migración del ADN.

Se preparó un gel disolviendo $0.5\ \text{g}$ de agarosa en $50\ \text{mL}$ de agua destilada, se calentó hasta ebullición para disolver el polvo y se agitó la solución para evitar la formación de burbujas. Cuando enfrió aproximadamente a 60°C , la preparación fue vertida al contenedor de geles de la cámara electroforética, se colocó el peine para la formación de los pozos en donde se cargaron las muestras. Cuando el gel solidificó y enfrió por completo, se agregó el buffer TAE hasta cubrir bien, retirando el peine con cuidado de no romper el fondo de los pozos. Se mezcló cada muestra con un colorante de corrida y se vertió $2\ \mu\text{L}$ de ADN en un pozo. Cuando los pozos están cargados, se conectan los cables de la cámara electroforética a la fuente de poder (cable rojo para conectarlo al polo positivo y uno negro en el negativo). Se programa la corrida a $100\ \text{V}$ por 30 minutos y, al finalizar, se coloca el gel en el transiluminador para observar la migración de las bandas con luz UV. Finalmente, se realizó la secuenciación mediante el análisis del metagenoma por tecnología de secuenciación Shotgun, con una longitud de lectura PE $2\times 150\ \text{pb}$ y 10 millones de lecturas por muestra (5M en cada dirección). Para la obtención del árbol filogenético, se programó en Linux, usando los programas MEGAHit para los contigs (segmentos de ADN superpuestos), MetaPhlan2 para obtener los árboles y Graphlan para los gráficos.

OE 3: Analizar las propiedades físico-mecánicas, químicas y microestructurales en polietileno de baja densidad biodegradado en sistemas reactores provistos de microorganismos procedentes de aguas residuales urbanas de la ciudad de Puno.

3.5.6 Ensayos para la determinación de la biodegradación en PEBD

Después de la incubación en los sistemas de degradación, se recolectaron las láminas de PEBD de los reactores con mejor respuesta de la evaluación de pérdida de peso, tanto para las cultivadas en ambiente natural (AR) como para las cultivadas en ambiente sintético (SK) correspondientes a cada mes de ensayo (1 tira por mes). Las láminas se lavaron con agua destilada doble desionizada estéril y etanol al 70%.

3.5.6.1 Ensayo de tracción

Se midió la resistencia a la tracción de las tiras de PEBD seleccionadas para determinar la tensión máxima que pueden soportar a los 30, 60 y 90 días de degradación en los sistemas reactores (Ranjan & Goel, 2019; Soleimani et al., 2020), para ello se usó una máquina de prueba universal (INSTRON 3365, USA). El procedimiento para realizar las pruebas se desarrolló de acuerdo a la norma ASTM 882-02 (ASTM, 2010). La longitud de calibre de PEBD fue de 90.00 mm, anchura de 20.00 mm y velocidad 150.00 mm y los resultados fueron registrados en MPa. La resistencia a la tracción del LDPE tratado con cultivo bacteriano se comparó con un control (sin inóculo en el sistema reactor).

3.5.6.2 Ensayo de Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Para la determinación de los cambios en la composición química de PEBD sometido a tratamiento de biodegradación, se realizó el análisis de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (IR Prestige 21 - Shimadzu), se utilizó el accesorio ATR con un barrido de 650 cm^{-1} hasta 4000 cm^{-1} .

3.5.6.3 Ensayo de espectroscopía Raman

Los espectros Raman se obtuvieron utilizando un microscopio Raman NTEGRA SPECTRA – NT-MDT), el láser utilizado fue de 532 nm y 45 mW. Los espectros se recogieron de 1000 a 3200 cm^{-1} a temperatura ambiente, utilizando una resolución espectral de 3 cm^{-1} .



3.5.6.4 Ensayo de microscopía electrónica de barrido (SEM)

Con el fin de observar los cambios en la microestructura de la superficie de las películas de PEBD, se utilizó un microscopio electrónico de barrido (Zeiss – EVO MA 10), bajo diferentes aumentos que van de 500 X a 10.00 KX. Se tomaron imágenes en diferentes zonas de todas las muestras de PEBD sometidas a biodegradación y se compararon con las imágenes de la muestra control.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Parámetros de pH, tipo de medio de cultivo y surfactante que requieren los microorganismos procedentes de aguas residuales urbanas para biodegradar polietileno de baja densidad.

4.1.1 Determinación de la cinética de microorganismos procedentes de la laguna de estabilización “El Espinar”

En la Figura 6, se observa la evolución en el tiempo de las medidas de absorbancia a 600 nm. Se trata de una representación lineal en la que, en un periodo de tiempo inicial, no se establece claramente el crecimiento (0 - 3 horas), luego crece de manera muy eficaz (3 - 15 horas) y, finalmente, se presenta un periodo en el que el crecimiento nuevamente y se detiene (15 - 24 horas).

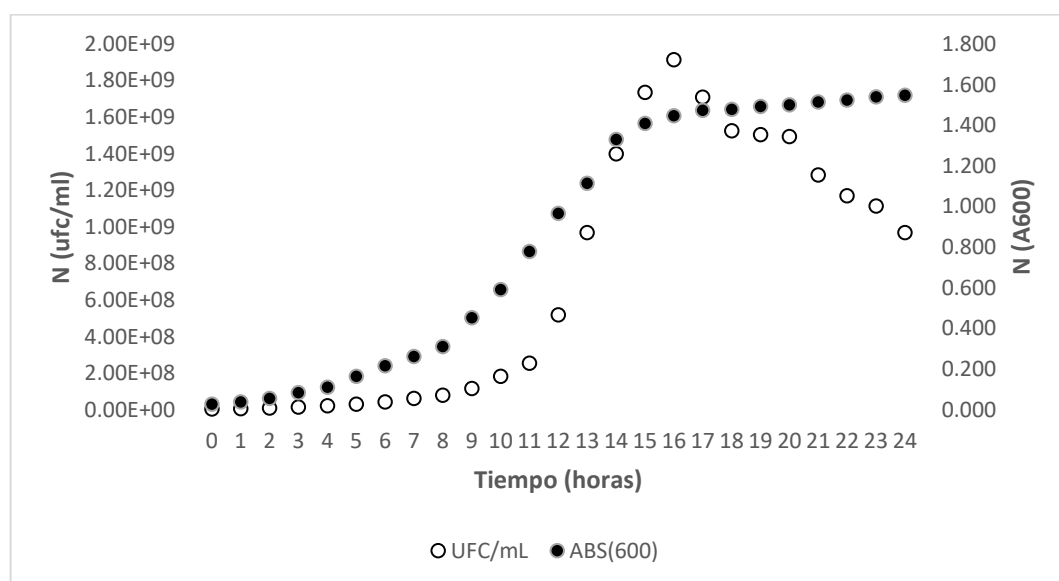


Figura 6. Curva de crecimiento de microorganismos procedentes de muestras de

polietileno de aguas residuales "El Espinar".

Los puntos blancos refieren el mismo parámetro representado de manera lineal, pero en UFC/mL, donde el comportamiento es parecido a las absorbancias a 600 nm. Al inicio la curva muestra bajo crecimiento (0 - 5 horas), luego empieza a proyectarse (7 -16 horas) y, finalmente, entra en la fase estacionaria (16 – 24 horas). En este rango, la curva empieza a decaer debido a que registra UFC y las células empiezan a entrar en fase de muerte. Reportando en absorbancias no se puede visualizar la fase de muerte, pero en la curva de UFC sí es mucho más visible.

En la Figura 7, se muestra el crecimiento de los microorganismos en escala logarítmica, a partir de la absorbancia a 600 nm y de las UFC. Se evidencia que ambas curvas casi se superponen, algunas de las pendientes son muy parecidas; por lo tanto, se puede ver en qué punto se pierde la linealidad y se presentan las fases de crecimiento.

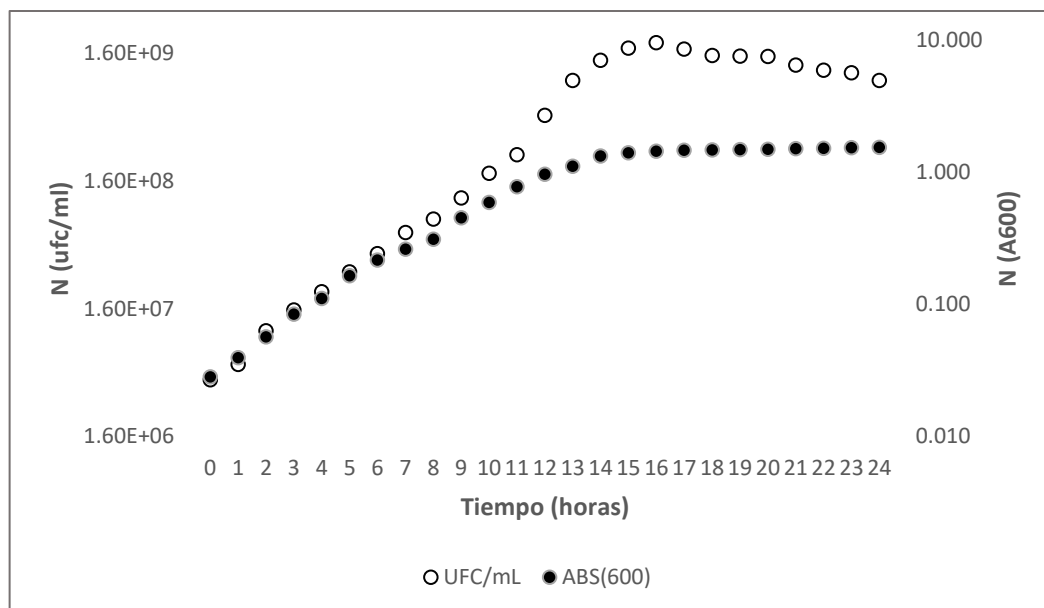


Figura 7. Curva de crecimiento en escala logarítmica de microorganismos procedentes de muestras de polietileno de aguas residuales "El Espinar".

Al analizar las UFC/ml en escala logarítmica, se puede observar que la recta se mantiene con tendencia lineal hasta la hora 16, para después perder incremento de tamaño poblacional de células viables; es así que, al analizar las medidas de absorbancia, el rango en que mantiene este crecimiento exponencial es más estrecho que el número de unidades formadoras de colonia por mililitro, en donde el rango es

mucho mayor. Los resultados hicieron factible la toma de muestras después de 16 horas de incubación del cultivo de pre-enriquecimiento (consorcio) para su subsecuente inoculación en los sistemas reactores que biodegradación sobre el polietileno de baja densidad (Anexo 2).

4.1.2 Pérdida de peso de PEBD sometidos a ensayos de biodegradación con variaciones de pH, tipo de medio de cultivo y uso de surfactante

En la Figura 8 se puede observar los promedios de pérdida de peso (%) de PEBD al mes 1 de ensayo. El promedio alcanzado según el uso de surfactante fue de 1.48 % (sin surfactante), 3.45% (surfactante Tween 20) y 4.23 (surfactante Tween 80). Respecto al tipo de medio empleado se obtuvo un 2.49 % de pérdida de peso con agua residual de laguna y un 3.62% de pérdida de peso con MSM. Por su parte los pH empleados en el medio permitieron obtener porcentajes de remoción de 2.38% (pH 4.2), 2.81% (pH 5), 3.67% (pH 7), 3.23% (pH 9), 2.92 % (pH 9.8) y 3.32% (pH sin modificar).

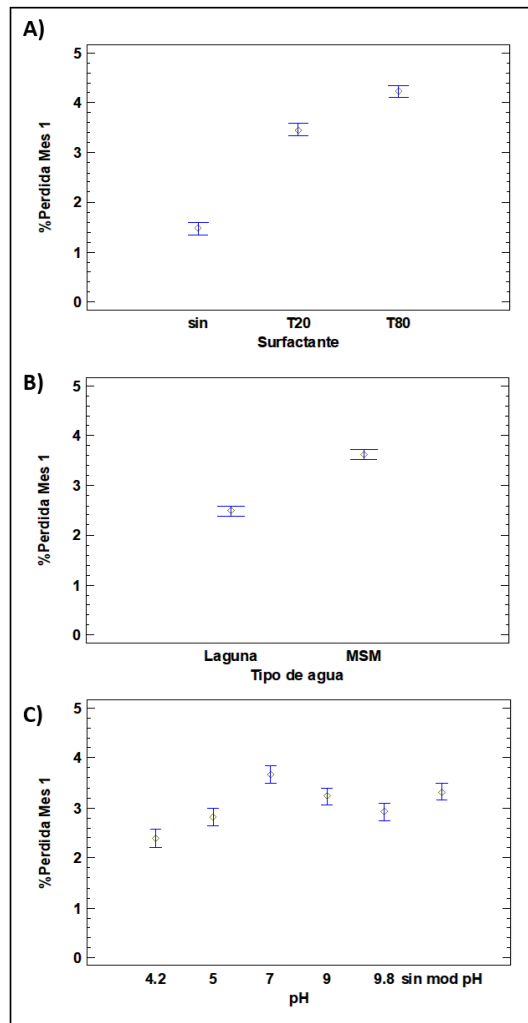


Figura 8. Promedios de pérdida de peso (%) al mes 1. Según A) Surfactante, B) Tipo de agua y C) pH.

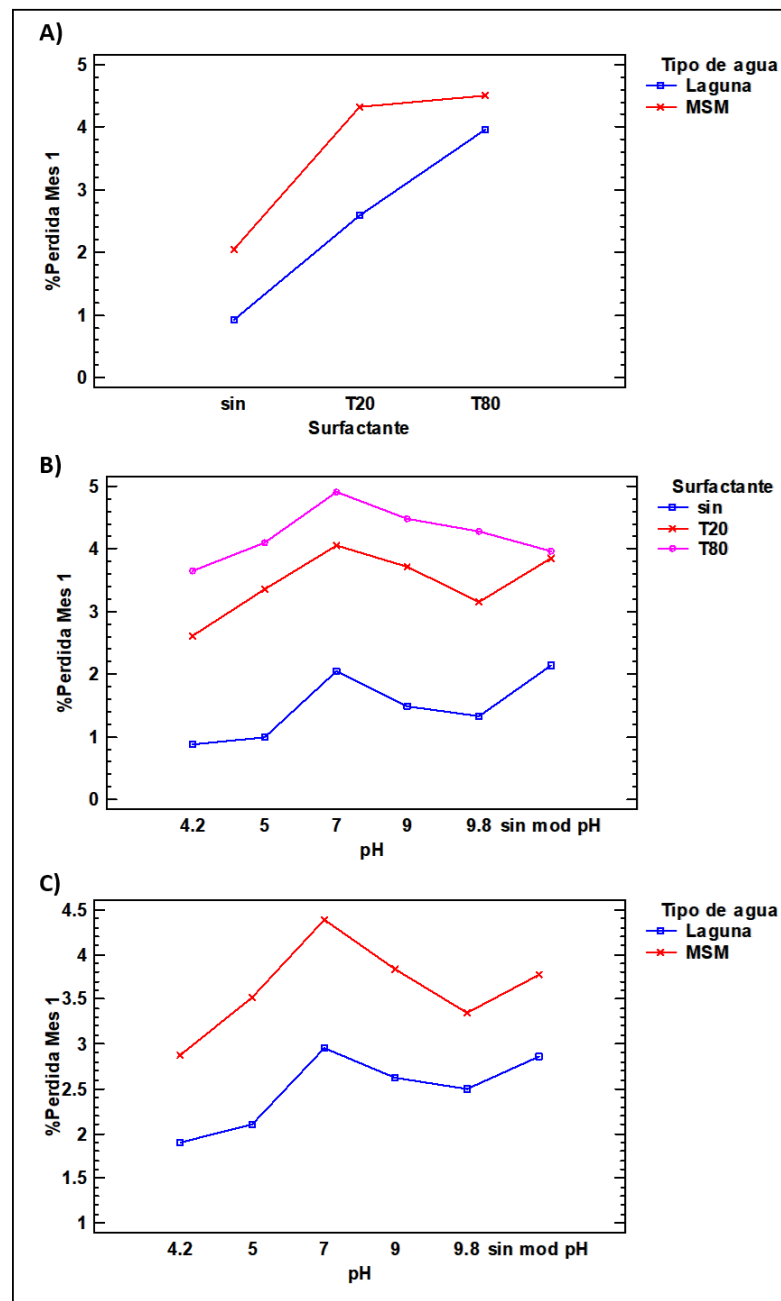


Figura 9. Interacciones de factores con la pérdida de peso (%) al mes 1. Donde A) Surfactante*Tipo de agua, B) pH*Surfactante y C) pH*Tipo de agua.

Para identificar diferencias significativas entre estos factores y posibles interacciones se procedió a realizar el análisis de varianza factorial respectivo Tabla 5.

Tabla 5

Análisis de varianza multifactorial para Pérdida de Peso (%) al mes 1.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	Valor P
Surfactante	144.0	2	72.02	521.50	0.0000
Tipo de agua	34.76	1	34.76	251.69	0.0000
pH	18.1	5	3.621	26.22	0.0000
Surfactante*Tipo de agua	6.359	2	3.179	23.02	0.0000
Surfactante*pH	4.181	10	0.4181	3.03	0.0030
Tipo de agua*pH	1.53	5	0.306	2.22	0.0619
Surfactante*Tipo de agua*pH	8.34	10	0.834	6.04	0.0000
Residual	9.943	72	0.1381		
Total (corrected)	227.3	107			

El análisis de varianza factorial realizado a la pérdida de peso de PEBD al primer mes permitió identificar diferencias estadísticamente significativas en los factores: Surfactante $F(2,107)=521.50$, valor- $p=0.0001$, $\eta^2p=0.38$; Tipo de agua $F(1,107)=251.69$, valor- $p=0.0001$, $\eta^2p=0.13$ y pH $F(5,107)=26.22$, valor- $p=0.0001$, $\eta^2p=0.07$.

Así como también en las interacciones Surfactante*Tipo de agua, Surfactante*pH y la interacción triple, no siendo significativa, por el contrario de la interacción Tipo de agua*pH con $F(5,107)=2.22$, valor- $p=0.0619$, $\eta^2p=0.006$.

El análisis de Tukey realizado evidenció que el uso de T80, medio MSM y pH 7 presentan valores superiores de pérdida de peso del PEBD, correspondiendo dichas condiciones al tratamiento T28 que alcanzó un promedio de pérdida de peso de 5.12+/- 0.12 %.

En la Figura 10 se pueden observar los promedios de pérdida de peso (%) de PEBD al mes 2 de ensayo. El promedio alcanzado según el uso de surfactante fue de 1.88 % (sin surfactante), 3.93 % (surfactante Tween 20) y 4.85 % (surfactante Tween 80). Respecto al tipo de medio empleado se obtuvo un 2.94 % de pérdida de peso con agua

residual de laguna y un 4.17 % de pérdida de peso con MSM. Por su parte los pH empleados en el medio permitieron obtener porcentajes de remoción de 2.94 % (pH 4.2), 3.44 % (pH 5), 4.21 % (pH 7), 3.61 % (pH 9), 3.38 % (pH 9.8) y 3.75 % (pH sin modificar) (ANEXO 3).

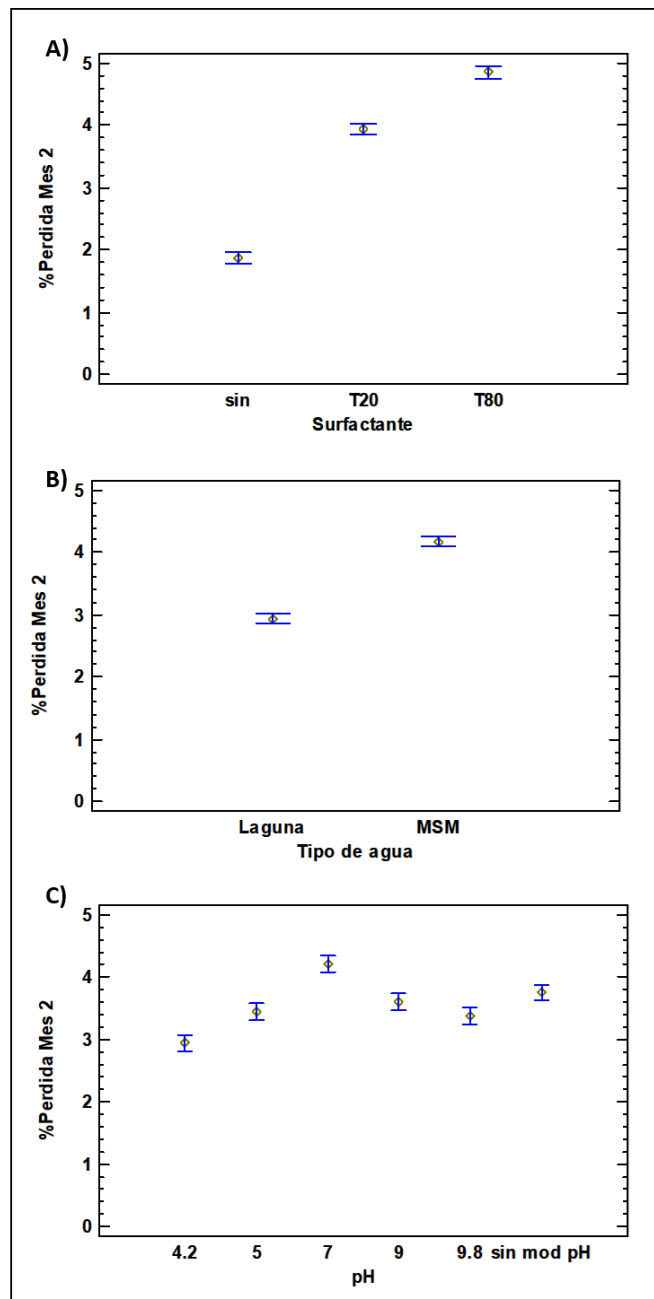


Figura 10. Promedios de pérdida de peso (%) al mes 2. Según A) Surfactante, B) Tipo de agua y C) pH.

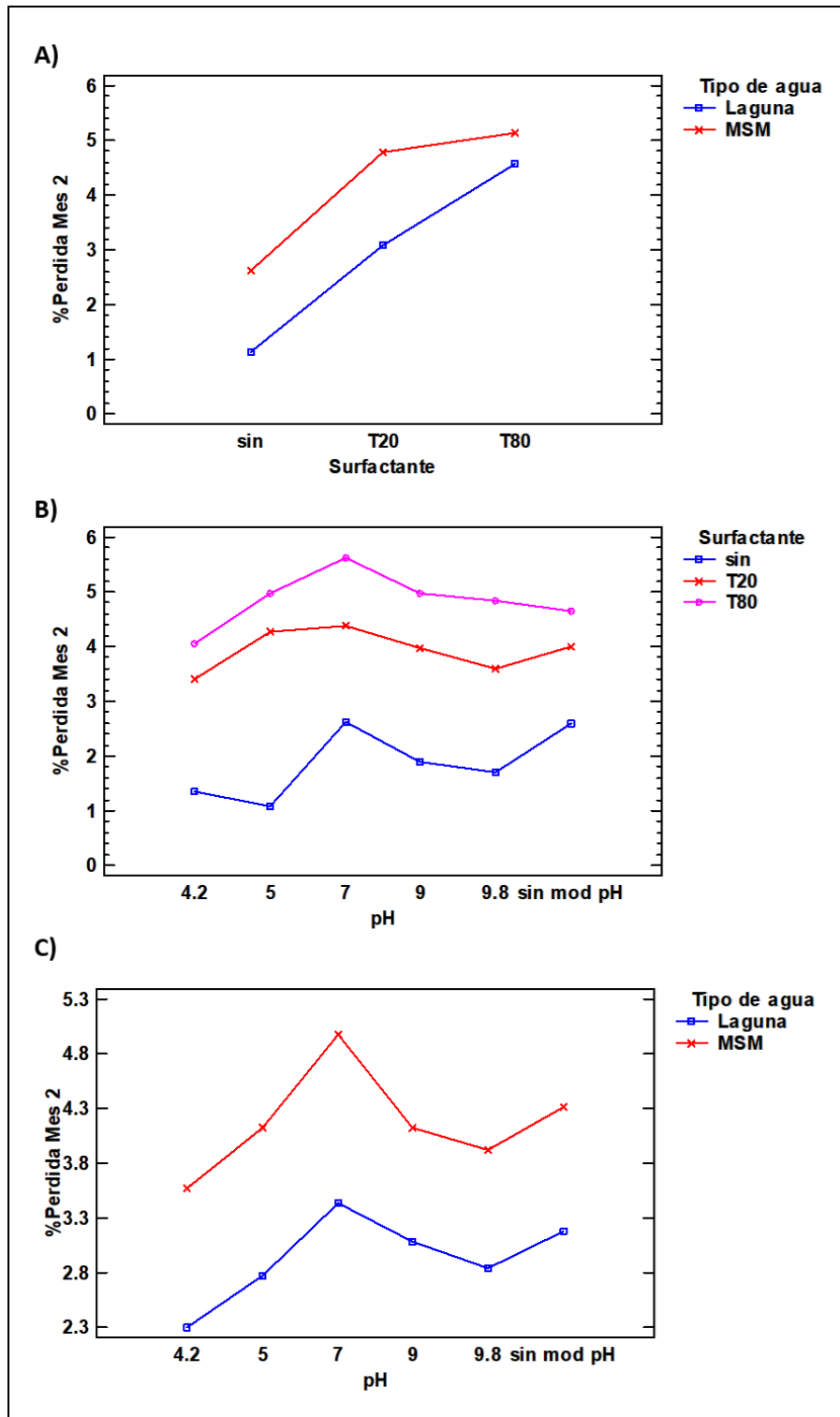


Figura 11. Interacciones de factores en la pérdida de peso (%) al mes 2. Donde A) Surfactante*Tipo de agua, B) pH*Surfactante y C) pH*Tipo de agua

Para identificar diferencias significativas entre estos factores y posibles interacciones se procedió a realizar el análisis de varianza factorial respectivo Tabla 6.

Tabla 6

Análisis de varianza multifactorial para Pérdida de Peso (%) al mes 2.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	Valor P
Surfactante	167.003	2	83.5013	553.42	0.0000
Tipo de agua	41.3022	1	41.3022	273.74	0.0000
pH	15.8988	5	3.17976	21.07	0.0000
Surfactante*Tipo de agua	6.33522	2	3.16761	20.99	0.0000
Surfactante*pH	8.00114	10	0.800114	5.30	0.0000
Tipo de agua*pH	0.805513	5	0.161103	1.07	0.3855
Surfactante*Tipo de agua*pH	17.2435	10	1.72435	11.43	0.0000
Residual	10.8635	72	0.150882		
Total (corrected)	267.452	107			

El análisis de varianza factorial realizado a la pérdida de peso de PEBD al segundo mes permitió identificar diferencias estadísticamente significativas en los factores: Surfactante $F(2,107)=553.42$, valor-p=0.0001, $\eta^2_p=0.38$, Tipo de agua $F(1,107)=273.74$, valor-p=0.0001, $\eta^2_p=0.13$ y pH $F(5,107)=21.07$, valor-p=0.0001, $\eta^2_p=0.06$.

Se mantuvo como no significativa estadísticamente la interacción Tipo de agua*pH con $F(5,107)=1.07$, valor-p=0.3855, $\eta^2_p=0.003$.

El análisis de Tukey realizado evidenció nuevamente que el uso de T80, medio MSM y pH 7 presentan valores superiores de pérdida de peso del PEBD, correspondiendo dichas condiciones al tratamiento T28 que alcanzó un promedio de pérdida de peso de 5.83+/-0.12 %.

En la Figura 12 se puede observar los promedios de pérdida de peso (%) de PEBD al mes 3 de ensayo. El promedio alcanzado según el uso de surfactante fue de 2.03 % (sin surfactante), 4.04 % (surfactante Tween 20) y 5.30 % (surfactante Tween 80). Respecto al tipo de medio empleado se obtuvo un 3.14 % de pérdida de peso con agua residual de laguna y un 4.44 % de pérdida de peso con MSM. Por su parte los pH empleados en el medio permitieron obtener porcentajes de remoción de 3.24 % (pH 4.2), 3.60 % (pH 5), 4.51 % (pH 7), 3.97 % (pH 9), 3.53 % (pH 9.8) y 3.91 % (pH sin modificar) (ANEXO 3).

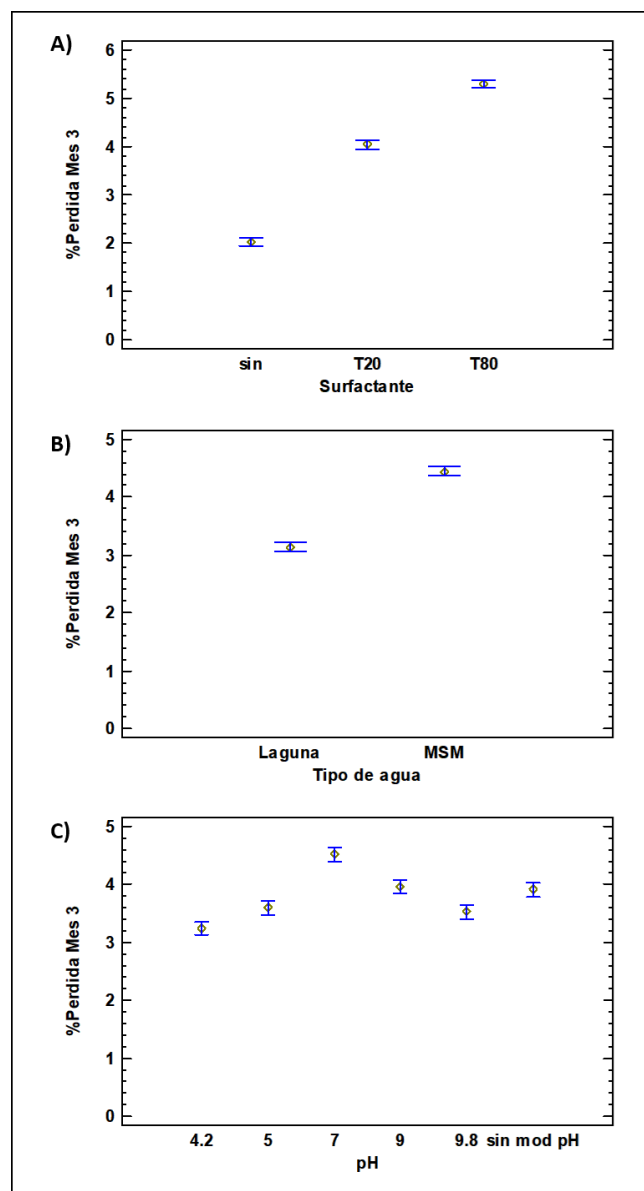


Figura 12. Promedios de pérdida de peso (%) al mes 3. Según A) Surfactante, B) Tipo de agua y C) pH.

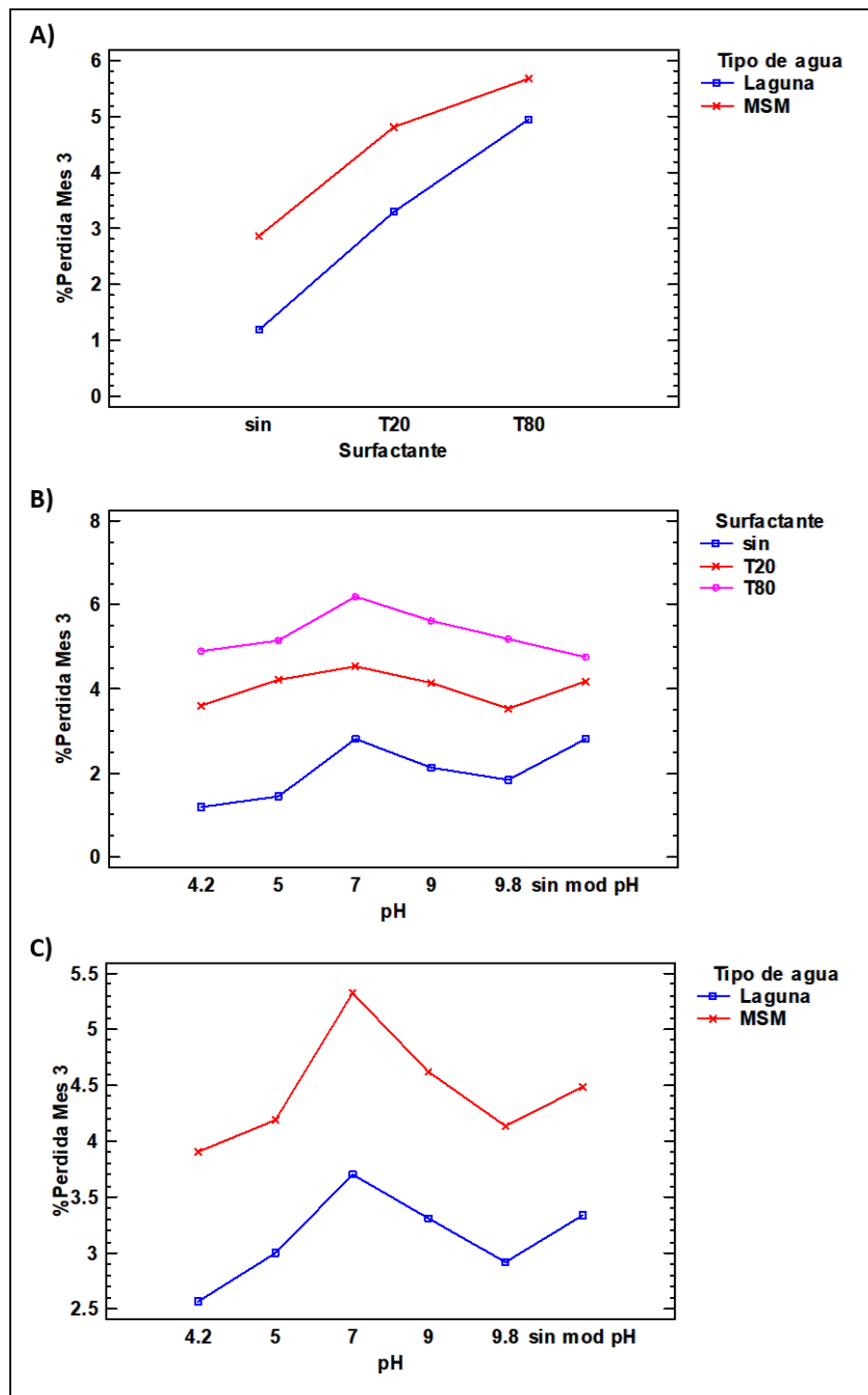


Figura 13. Interacciones de factores en la pérdida de peso (%) al mes 3. Donde A) Surfactante*Tipo de agua, B) pH*Surfactante y C) pH*Tipo de agua.

Para identificar diferencias significativas entre estos factores y posibles interacciones se procedió a realizar el análisis de varianza factorial respectivo Tabla 7.

Tabla 7

Análisis de varianza multifactorial para la pérdida de peso (%) al mes 3

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	Valor P
Surfactante	196.009	2	98.0045	745.47	0.0000
Tipo de agua	45.9008	1	45.9008	349.15	0.0000
pH	17.6533	5	3.53067	26.86	0.0000
Surfactante*Tipo de agua	4.53156	2	2.26578	17.23	0.0000
Surfactante*pH	8.9563	10	0.89563	6.81	0.0000
Tipo de agua*pH	0.689707	5	0.137941	1.05	0.3957
Surfactante*Tipo de agua*pH	10.9313	10	1.09313	8.31	0.0000
Residual	9.46556	72	0.131466		
Total (corrected)	294.137	107			

El análisis de varianza factorial realizado a la pérdida de peso de las tiras de PEBD al tercer mes permitió identificar diferencias estadísticamente significativas en los factores: Surfactante $F(2,107)=745.7$, valor- $p=0.0001$, $\eta^2_p=0.40$, Tipo de agua $F(1,107)=349.15$, valor- $p=0.0001$, $\eta^2_p=0.13$ y pH $F(5,107)=26.86$, valor- $p=0.0001$, $\eta^2_p=0.06$.

Se mantuvo como no significativa estadísticamente la interacción Tipo de agua*pH con $F(5,107)=1.05$, valor- $p=0.3957$, $\eta^2_p=0.002$.

El análisis de Tukey realizado evidenció nuevamente que el uso de T80, medio MSM y pH 7 presentan valores superiores de pérdida de peso del PEBD, correspondiendo dichas condiciones al tratamiento T28 que alcanzó un promedio de pérdida de peso de $6.36\pm 0.12\%$. (ANEXO 3).

De acuerdo a la literatura, la pérdida de masa de especímenes de prueba, como películas o barras de prueba, se aplica ampliamente en las pruebas de degradación (especialmente en pruebas de campo y de simulación); sin embargo, no constituye una prueba directa de biodegradación (Shah et al., 2008). No obstante, al combinar un

análisis estructural del material residual y los intermedios de bajo peso molecular obtenidos de las pruebas de composición química del material, se puede obtener información detallada sobre el proceso de degradación, especialmente si se usa un medio de prueba sintético definido (Witt et al., 2001).

Las pérdidas de masa de los polímeros ensayados en las pruebas de degradación, podrían deberse a la migración de algún material de bajo peso molecular, tal como se argumenta en los hallazgos de Witt et al. (2001), quienes también experimentaron en copoliésteres aromáticos alifáticos comerciales, determinando la pérdida de masa por el método de centrifugación de sustancia sólida. Para obtener más información cuantitativa sobre posibles residuos derivados de polímeros en la fracción sólida, realizaron un análisis por cromatografía de gases, sin hallar cantidades significativas de dioles y diácidos (1,4-butanodiol, tereftalato y adipato).

Estudios previos reportaron pérdidas de peso (%) de aislados bacterianos como *Bacillus siamensis* (8.46 +/-0.3), *Bacillus cereus* (6.33+/-0.2), *Bacillus wiedmannii* (5.39+/-0.3) y *Bacillus subtilis* (3.75+/-0.1); los microorganismos fueron obtenidos de botaderos donde se depositaron pilas de plásticos durante mucho tiempo (10-20 años), luego fueron cultivados en medio mineral salino (MSM) líquido y subsecuentemente aislados en MSM sólido (Maroof et al., 2020). Por otro lado, Dey et al. (2020) encontró que *Stenotrophomonas* sp P2 y *Achromobacter* sp. DF22, microorganismos obtenidos a partir de muestras de suelo y fluido drenado, también presentaron pérdidas de peso en películas de polietileno de baja densidad a 100 días de tratamiento (~8 %).

Asimismo, Soleimani et al. (2020) reportaron pérdidas de peso (%) en películas de polietileno de baja densidad en cultivos con *Streptomyces* sp. IR-SGS-Y1 (6.69 +/- 0.16), *Streptomyces alborgiseolus* IR-SGS-T10 (9.5 +/-0.3), *Streptomyces* sp. IG-SGS-T4 (6.48 +/- 0.75), *Nocardia* sp. IG-SGS-T3 (5.98 +/- 0.72) y *Rhodococcus ruber* IR-SGS-T6 (6.23 +/- 0.5). Los autores resaltan los resultados inesperados de la mezcla bacteriana, de los cuales se obtuvo pequeñas cantidades de pérdida de peso a los 60 días de evaluación (3.69 +/-0.39). En contraste, este estudio reportó porcentajes promedio de pérdida de peso a 90 días similares a los hallazgos de los aislados de Soleimani et al., 2020 (6.358 +/-0.12 %), lo cual podría atribuirse a las diferencias metodológicas de los estudios, partiendo desde el origen de los aislados y consorcios en zonas climáticas diversas, las diferencias de espesor del polímero tratado, los

tiempos de incubación o el procedimiento adicional de aislamiento en placa que produce la disminución de la variabilidad de especies microbianas presentes en medios sólidos.

4.2 Microorganismos procedentes de aguas residuales urbanas con capacidad biodegradativa sobre polietileno de baja densidad.

4.2.1 Apariencia visual del crecimiento de consorcios sobre PEBD

En los films de PEBD seleccionados para ensayos físico-químicos, correspondientes a los cultivos en AR2 (agua residual) y SK (agua sintética), se logró distinguir varios tipos de colonización microbiana a nivel macroscópico (Figura 14 y Figura 15, respectivamente).

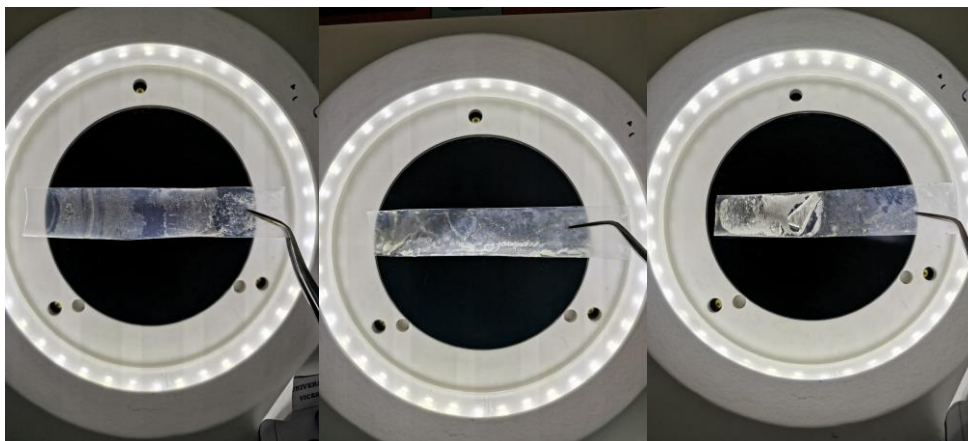


Figura 14. Vista macroscópica superficial de colonización de consorcio microbiano en PEBD (única fuente de carbono) obtenido del cultivo AR (agua residual estéril), a 30, 60 y 90 días de tratamiento.

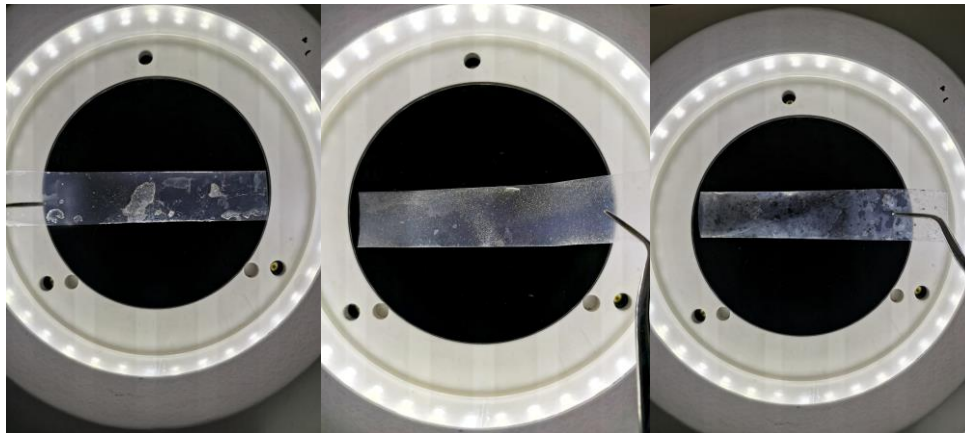


Figura 15. Vista macroscópica superficial de colonización de consorcio microbiano en PEBD (única fuente de carbono) obtenido del cultivo SK (medio mineral salino) a los 30, 60 y 90 días de tratamiento.

Los tratamientos en PEBD mostraron algunos cambios físicos debido a la colonización de los consorcios después de 30, 60 y 90 días de incubación. Estos cambios no tuvieron una distribución uniforme en la totalidad de la superficie de los films, pues los microorganismos colonizaron preferentemente algunas zonas, con la subsecuente formación de biofilms que es comúnmente reportado en la literatura al referirse a una biodegradación eficiente (Maroof et al., 2020).

Si bien la presencia de colonización microbiana y biofilm son más evidentes en los films de AR (Figura 14), es en la tira de PEBD cultivada a 90 días en SK la que muestra severos cambios en zonas de coloración oscura que no han mostrado otras muestras y que coincidiría con cambios microestructurales de mayor relevancia. Se reportaron hallazgos similares en las investigaciones de Maroof et al., 2020, donde se confirmó la biodegradación bacteriana en la superficie de films de PEBD así como la pérdida de peso hasta un 8.46 +/-3 % con la especie *Bacillus siamensis*.

4.2.2 Cuantificación de ADN extraído de microorganismos procedentes de agua residual de “El Espinar” (AR) y consorcios desarrollados en medio nutritivo (NT), medio mineral salino (SK) y agua residual estéril (AR2) con PEBD como fuente de carbono

Las concentraciones de ADN de los consorcios microbianos que se desarrollaron en los distintos medios de cultivo se muestran en la Tabla 8.

Se observó que los datos siguieron una distribución normal pero no presentaron homogeneidad de varianza ($F= 3.89$, valor $p=0.0324$), por ello se procedió a realizar el análisis de varianza con el test de Welch, identificando que existió diferencia estadísticamente significativa ($F(3,6.19)=217.61$, $p=0.0001$) entre las concentraciones de ADN, siendo mayor la concentración en NT (54.51 ± 9.35) y AR (55.99 ± 7.64), seguido de SK (38.58 ± 2.09) y AR2 (10.3 ± 1.08), con menor concentración (Anexo 4).

Tabla 8

Estadística descriptiva de las concentraciones de ADN extraídos a partir de cultivos líquidos.

	AR	NT	SK	AR2
Conteo	5	4	4	5
Promedio	53.99 \pm 7.64 C	54.51 \pm 9.35 BC	38.58 \pm 2.09 B	10.36 \pm 1.08 A
% CV	0.14	0.17	0.05	0.10
Mínimo	43.06	46.58	36.61	8.98
Máximo	61.60	68.05	41.43	12.00
Rango	18.54	21.47	4.83	3.02
Sesgo estandarizado	-0.4662	1.2922	0.8581	0.5195
Curtosis estandarizada	-0.3016	1.2097	0.3642	0.8257

En la Figura 16 se presentan los registros fotográficos de las bandas expresadas en las corridas electroforéticas de las muestras de ADN. En el primer y último carril de ambas fotografías se muestran los marcadores moleculares de bajo y alto peso molecular, respectivamente. En la Figura 16a se corrieron 20 ng de ADN procedente de AR (agua residual natural) y NT (cultivo en medio nutritivo con PEBD) en los carriles 2 y 3, respectivamente; así como el peso molecular total de AR y NT (carriles 4 y 5). En la Figura 16b se presentan las corridas de 20 ng de ADN procedente de SK (cultivo en medio mineral salino con PEBD) y AR2 (cultivo en medio de agua residual con PEBD) en los carriles 2 y 3, respectivamente), así como el peso molecular total de AR y NT (carriles 4 y 5).

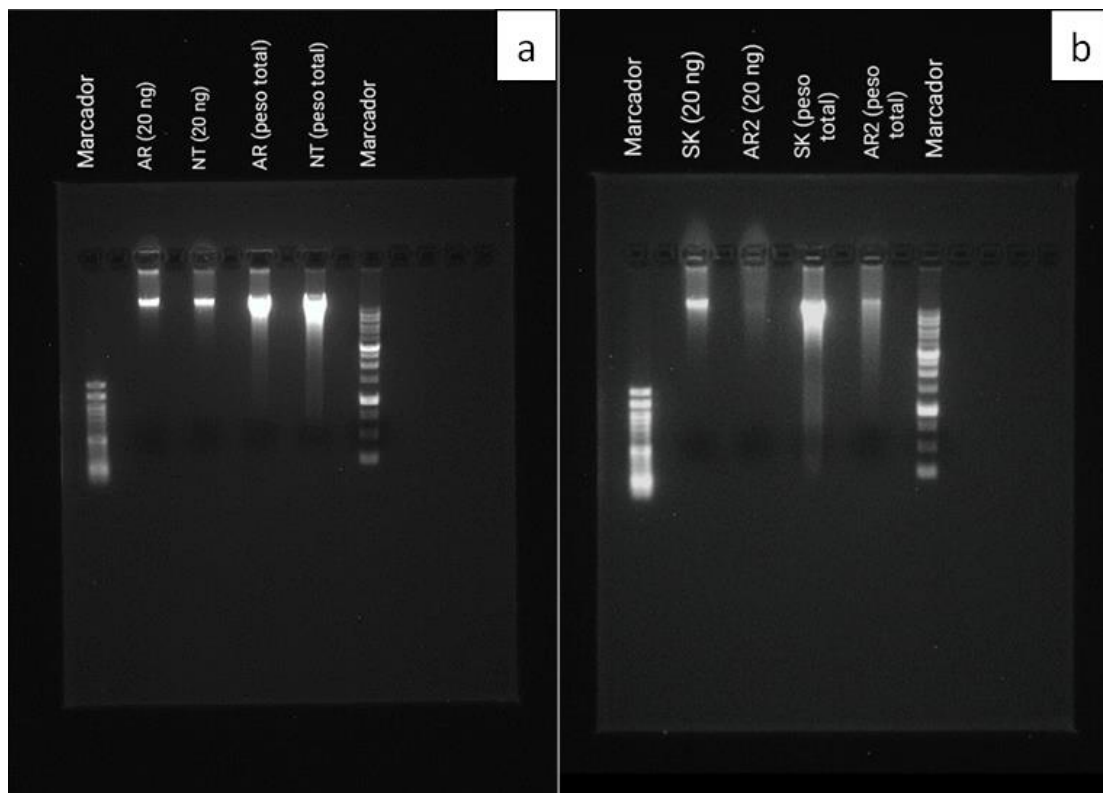


Figura 16. Productos de electroforesis en gel de agarosa con contenido de ADN obtenido a partir de cultivos desarrollados en a) AR (medio agua residual natural) y NT (medio nutritivo); b) SK (medio mineral salino) y AR2 (medio agua residual estéril) con PEBD como única fuente de carbono.

Esta prueba cualitativa sirvió para determinar la integridad de la extracción de ADN (Watson et al., 2000). Las moléculas cargadas de ácidos nucleicos migraron favorablemente al aplicarle el campo eléctrico y fueron claramente visibles en el transiluminador UV. Además, las representaciones coinciden con la proporción de concentraciones de cuantificación halladas en cada muestra donde $NT > AR > SK > AR2$.

4.2.3 Identificación molecular de microorganismos cultivados en agua residual (AR2) y en medio mineral salino (SK)

Las órdenes más representativas de los microorganismos hallados en el consorcio microbiano que proliferó en el medio de cultivo SK con PEBD como única fuente de carbono fueron aeromonadales, alteromonadales, bacteroidales, burkholderiales,

enterobacteriales, pseudomonadales, rhizobiales, sphingobacteriales, viruses noname y xanthomonadales, las que incluyeron 15 especies no clasificadas y otras 15 previamente determinadas en las bases de datos bioinformáticas (Figura 17a). En AR se desarrollaron más grupos u órdenes taxonómicos: bacteroidales, burkholderiales, caulobacterale, enterobacteriales flavobacteriales, lactobacillales, pseudomonadales, rhodospirillales, sphingobacteriales, viruses noname, xanthomonadales, pero menor cantidad de especies, de las cuales 14 aún no han sido clasificadas (Figura 17b).

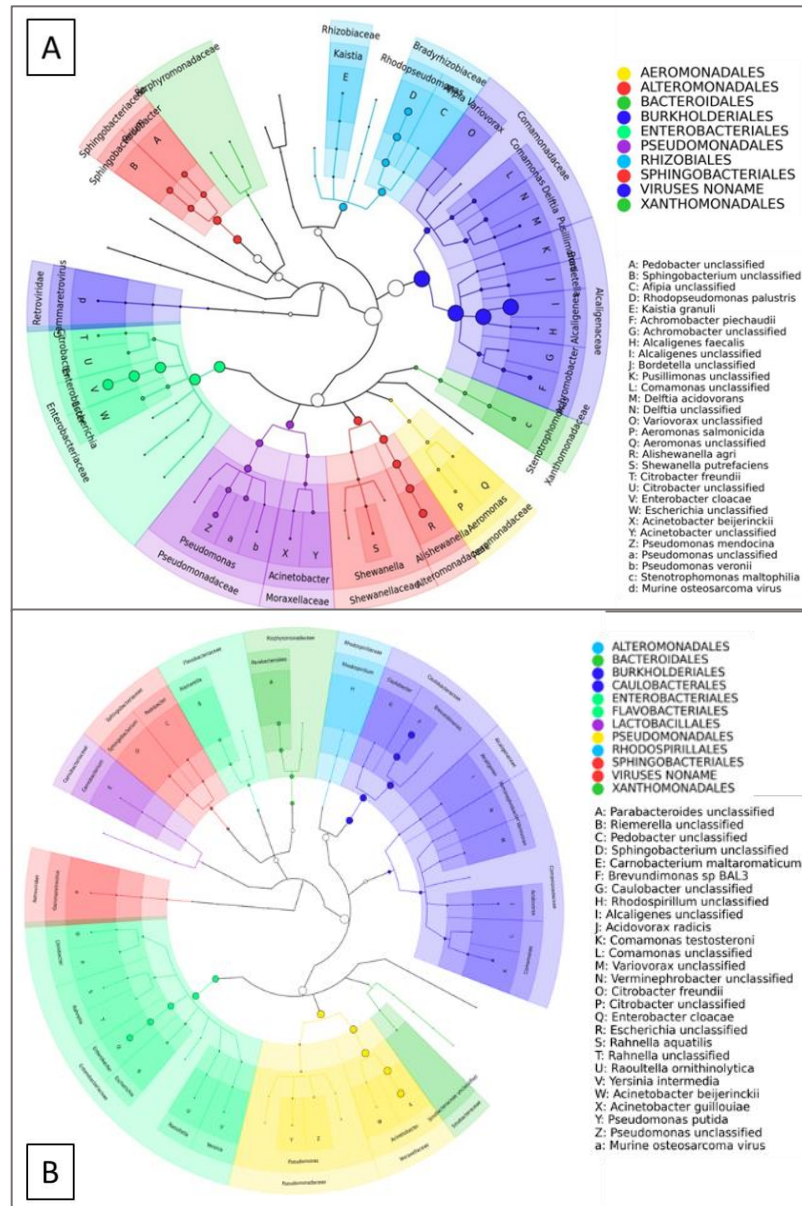


Figura 17. Árbol filogenético de microorganismos que conforman el consorcio microbiano cultivado en SK con PEBD como única fuente de carbono.

De los resultados se puede interpretar que SK es un medio donde se desarrollan mejor los microorganismos, hay mayor viabilidad microbiana, pero AR presenta una mayor variabilidad de órdenes, aunque menor variabilidad de especies en dichas órdenes y en menor abundancia, tal y como se puede apreciar en la Figura 18.

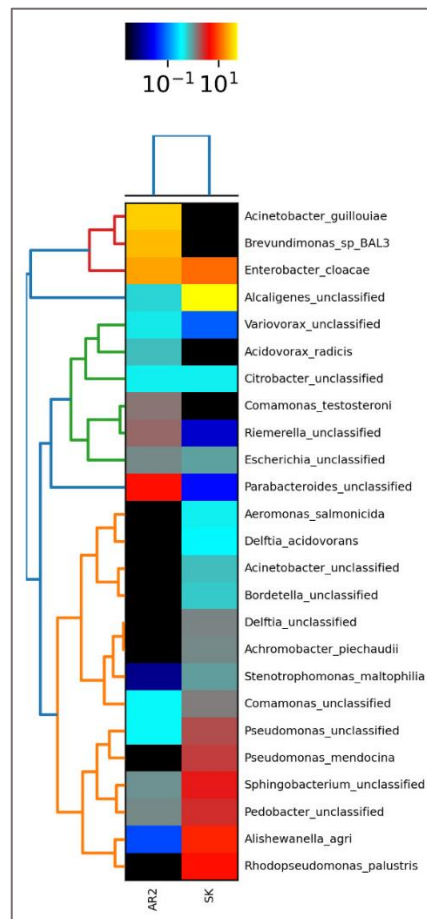


Figura 18. Mapa de calor de la abundancia de especies en el consorcio AR y SK. La escala se representa al principio con un color negro que representa baja abundancia y al final con un color amarillo que representa una alta medida de abundancia.

Los plásticos provienen de reacciones de polimerización a partir de derivados del petróleo. Wu et al., 2017 han reportado al género *Pedobacter* (del orden bacteroidetes), identificándolo en su estudio como potencial degradador de hidrocarburos derivados de petróleo. Asimismo, Al-Hadithi et al., 2017 reportan especies del género *Acinetobacter* aisladas de fuentes ambientales contaminadas con diésel, las cuales presentaron altas tasas de degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos, confirmando su alto potencial de biorremediación. Por otro lado, varios estudios han reportado la biodegradación de PEBD efectuado por especies de *Pseudomonas*

obtenidas de muestras ambientales (Kyaw et al., 2012; Maroof et al., 2020; Saminathan et al., 2014), coincidiendo con los hallazgos de este estudio

Se ha demostrado que las *Actinobacterias* desempeñan funciones importantes en la biorremediación (Amoroso et al., 2013) y la eliminación de contaminantes inorgánicos como los metales pesados (Alvarez et al., 2017), contaminantes orgánicos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Chaudhary et al., 2011), y compuestos poliaromáticos (Antai & Crawford, 1983). La capacidad de biodegradar plásticos, especialmente polímeros de polietileno, ha sido desarrollada por varias cepas de *Streptomyces* (Penkhrue et al., 2015). Usha et al. (2011) aislaron una serie de bacterias que degradan el polietileno del suelo y sugirieron que, entre las bacterias que degradan, las especies de *Streptomyces* tienen una mayor capacidad para degradar el polietileno que otros aislados de hongos como *Aspergillus* y bacterias como *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y géneros de bacilos. Aproximadamente el 35 % de la pérdida de peso en películas de polietileno después de 6 meses de incubación con especies de *Streptomyces* se ha informado anteriormente Usha et al. (2011). Las especies de *Rhodococcus*, especialmente *Rhodococcus ruber*, se encuentran entre las bacterias degradadoras de polietileno más importantes. Estas bacterias tienen la capacidad de formar una biopelícula en la superficie hidrófoba de las películas de LDPE.

4.3 Propiedades físico-mecánicas, químicas y microestructurales del polietileno de baja densidad biodegradado en sistemas reactores provistos de microorganismos procedentes de aguas residuales urbanas

4.3.1 Análisis de resistencia a la tracción de PEBD

Se obtuvieron típicas curvas de fuerza de tensión de PEBD expuestos a los diferentes tratamientos, las cuales se muestran en las Figura 19, Figura 20 y Figura 21, correspondientes a las muestras que provienen de los tratamientos Control, AR2 y SK, respectivamente.

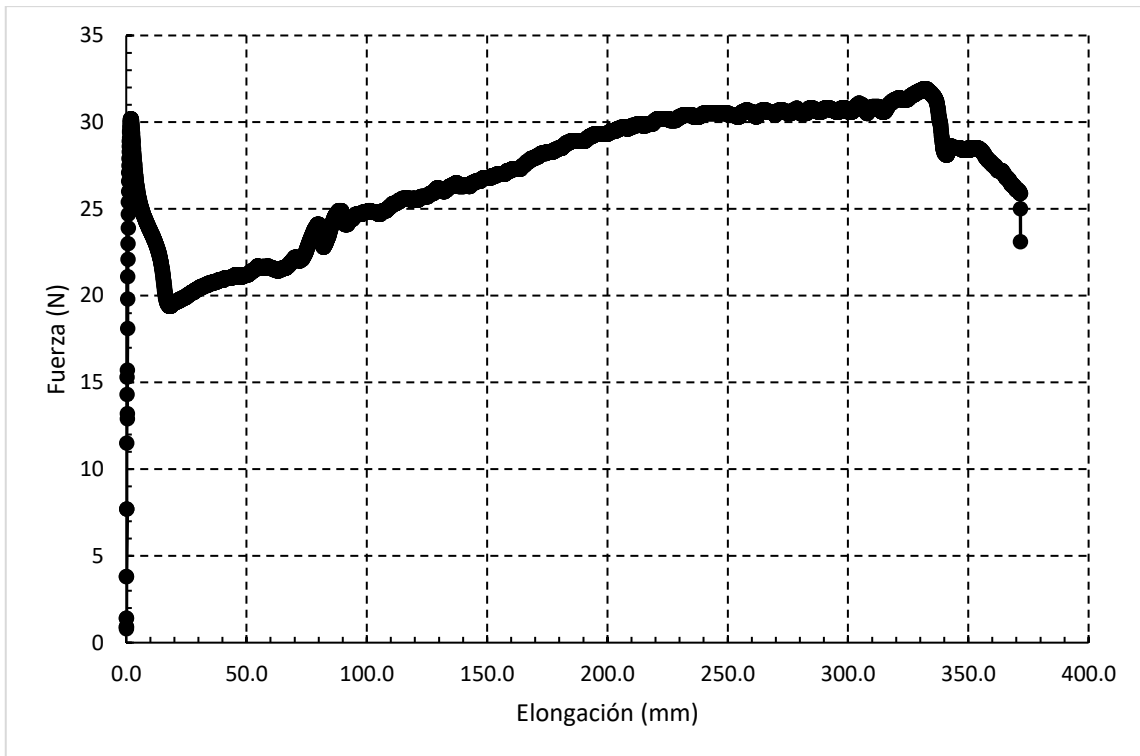


Figura 19. Fuerza de tensión de película de PEBD (control) analizado por la relación entre elongación y fuerza.

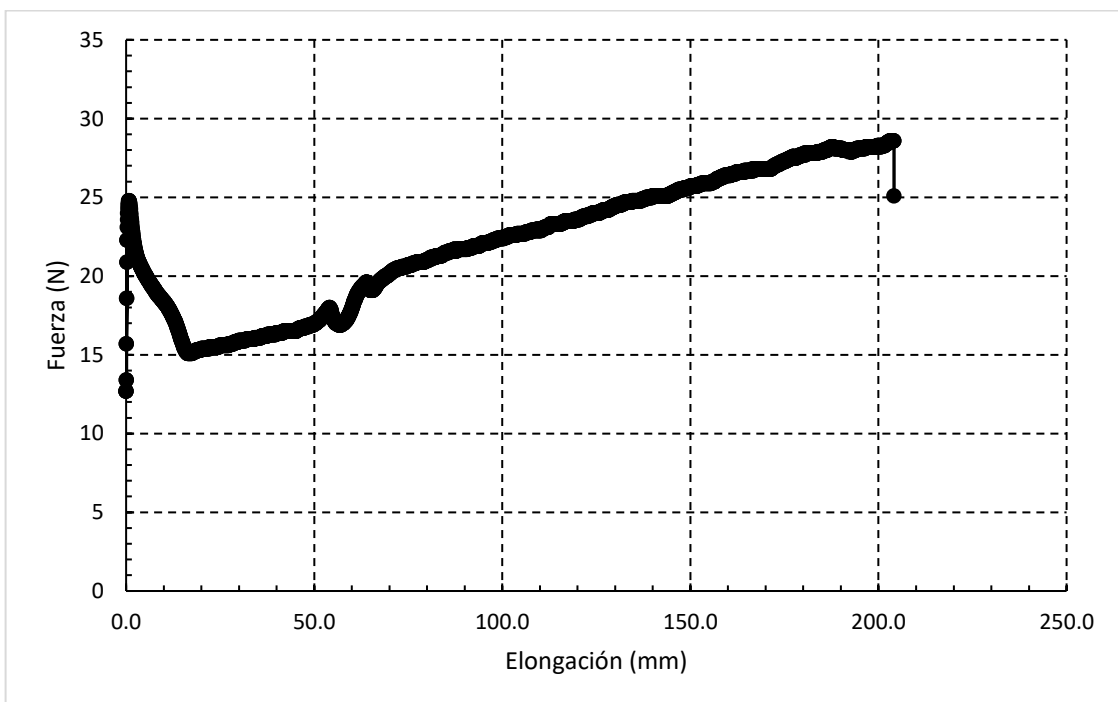


Figura 20. Fuerza de tensión de película de PEBD (AR2) analizado por la relación entre elongación y fuerza.

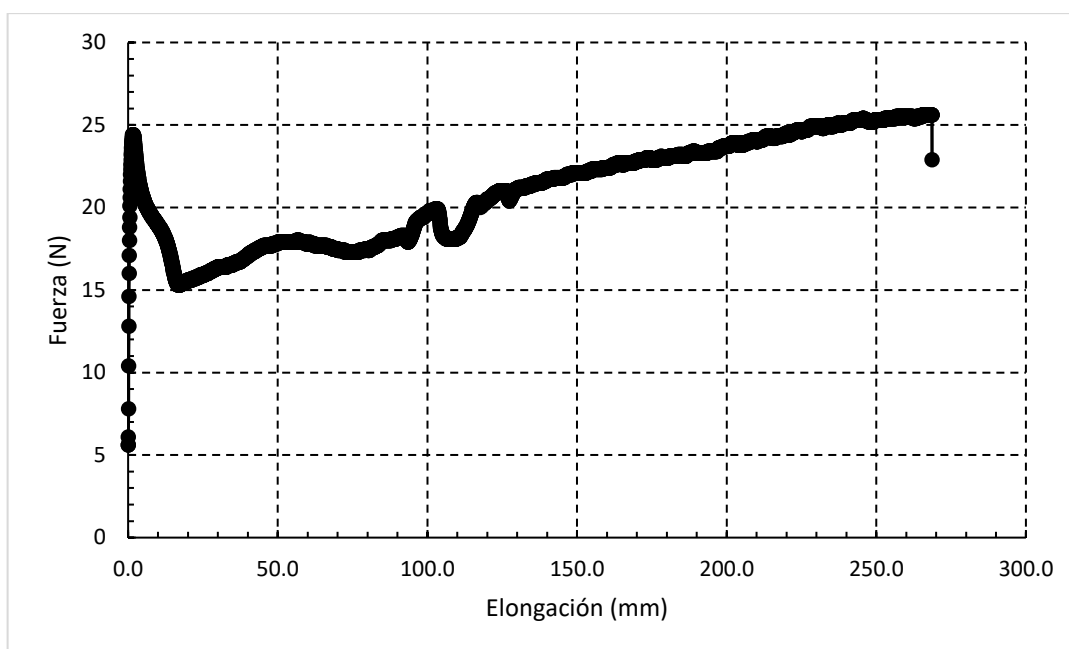


Figura 21. Fuerza de tensión de película de PEBD (SK) analizado por la relación entre elongación y fuerza.

En la Tabla 9 se observan los resultados cuantitativos del ensayo para la determinación de la fuerza de tracción de los films de PEBD controles y de los films sometidos a tratamientos en los medios AR2 y SK. El promedio de fuerza alcanzado por las muestras control fue de $24.46 \text{ N/mm}^2 \pm 1.74$, seguido por el agua residual $23.81 \pm 1.47 \text{ N/mm}^2 \text{ MPa}$; sin embargo, el grupo de SK presentaron resistencias promedio de $22.67 \pm 2.07 \text{ N/mm}^2$.

Tabla 9

Propiedades de PEBD (control), en medio AR y medio SK a 90 días de ensayo de tracción.

Propiedad	Control	Medio AR	Medio SK
Elongación (mm)	361.15	23.36	221.99
Módulo elástico (MPa)	1170.08	1295.94	863.04
Punto de fluencia (N/mm ²)	21.99	21.26	19.52
Resistencia a la tracción (N/mm ²)	24.46	23.81	22.67
Punto de rotura (N/mm ²)	17.84	20.87	19.97

Resiliencia (MPa)	0.27	0.17	0.19
Tenacidad (MPa)	66.71	38.66	54.01
Ductilidad (%)	535.80	526.23	504.94

Trabajos previos hallaron decrementos de la fuerza de tracción de hasta 13.15 MPa después de 60 días de degradación, utilizando especies microbianas aisladas (*Rhodococcus* sp.) procedentes de vertederos y suelos ricos en residuos plásticos que fueron capaces de participar en la degradación de films de polietileno de baja densidad (Soleimani et al., 2020). Dey et al. (2020) reportaron una disminución de resistencia a la tensión de 0.43 MPa en LDPE degradado por el aislado bacteriano *Marinobacter* H-246. Todos estos cambios característicos en polietileno ocurrieron debido a la producción de la enzima esterasa (Khandare et al., 2022).

Por otro lado, Kyaw et al (2012) estudiaron la degradación de PEBD usando *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ATCC 15729), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15692), *Pseudomonas putida* (KT2440 ATCC 47054) y *Pseudomonas syringae* (DC3000 ATCC 10862), reportando 20%, 11%, 9%, 11,3% y 0,3% de degradación en 120 días. También hallaron la disminución de la resistencia a la tracción de las láminas de PEBD de 0,0032 MPa a -0,00078 MPa.

El módulo de elasticidad longitudinal (módulo de Young), reveló el comportamiento del material elástico en función de la tipología de fuerza que se les aplicó a las películas de PEBD y el consiguiente aumento o disminución de la longitud de los materiales. Es así, que se obtuvo la relación que se da entre la tensión que se le aplica al objeto en su eje longitudinal y la deformación medida en ese mismo eje. En esta zona las deformaciones se reparten a lo largo de la probeta de PEBD, los resultados de pequeña magnitud indican que, si se retirara la carga aplicada, la probeta recuperaría su forma inicial, confirmando que es un parámetro útil para predecir hasta qué punto se estiraron las piezas bajo la carga aplicada y confirmando las características plásticas del polietileno (Sridharan et al., 2021). En este estudio no se hallaron diferencias significativas de la fuerza de tensión de las muestras control con respecto a los tratamientos en AR y SK, esto pudo deberse a la generación de ramificaciones producidas por reacciones enzimáticas de los microorganismos involucrados en el proceso de degradación, dichas ramificaciones podrían fortalecer las uniones entre

cadenas u otros productos de degradación (Allende Ponce y Arriagada Gonzáles, 2013); sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que las diferencias de ajuste manual de las pinzas de la máquina de ensayo universal hayan influenciado en los resultados. En el estudio realizado por Soleimani et al. (2020), usando microorganismos de las familias de *Streptomyces* y *Rhodococcus ruber* también se reportaron valores de fuerza de tensión que superaron los obtenidos por el control; sin embargo, los ensayos de FTIR y SEM respaldaron su acción biodegradativa.

4.3.2 Análisis de espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

El espectro control de la película de PEBD (sin tratamiento) muestra un número de picos que reflejan la naturaleza compleja del material. En las muestras previamente afectadas por los ensayos de biodegradación se muestran variaciones en la intensidad de las bandas de diferentes regiones, pero las más importantes a considerar para procesos de biodegradación son los cambios en los grupos carbonilos o los dobles enlaces.

Para el espectro de la muestra control (Figura 22), las bandas con características de fuerte absorción se asignaron a 717 cm^{-1} (-C-H), 1472 cm^{-1} (-C-H), $2847 - 2914$ (=C-H). Este resultado para PEBD no sometido a biodegradación (control) es muy aproximado al que reporta Soleimani et al., 2020, cuyas bandas representativas se encontraron a 719 , 1472 y $2820 - 2850\text{ cm}^{-1}$, respectivamente.

El espectro de la muestra AR1 (Figura 23) no muestra la aparición de cambios significativos al tratarse de la muestra que estuvo sometida a un mes de tratamiento; sin embargo, se observa la aparición de nuevos picos a 1045 , 1643 y 3308 cm^{-1} en AR2 (Figura 24) y, con mayor intensidad, a 1072 , 1643 y 3352 cm^{-1} en la muestra AR3 (Figura 25),

Se encontraron cambios significativos y similares para las películas de LDPE tratadas en medio SK; no obstante, las modificaciones fueron evidentes desde el primer mes de cultivo de PEBD con el consorcio en el medio selectivo (Figura 26) y las intensidades fueron aumentando conforme pasaron los meses (Figura 27 y Figura 28).

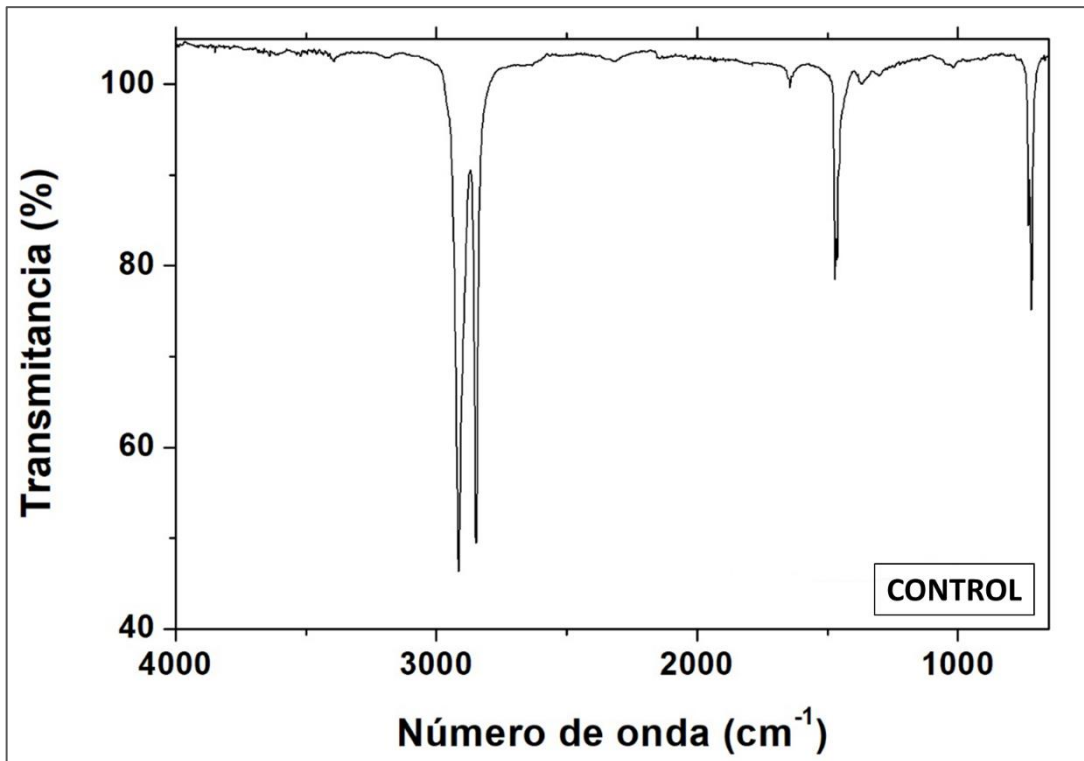


Figura 22. Espectrogramas FTIR de los films control de PEBD.

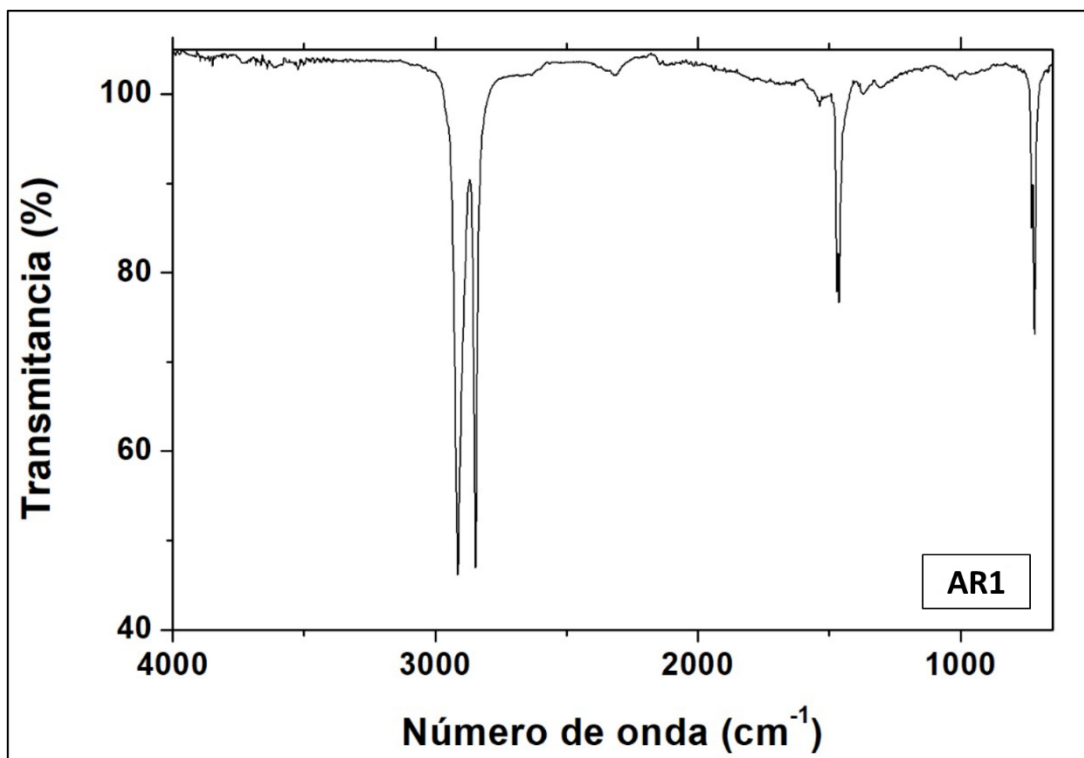


Figura 23. Espectrogramas FTIR de los films de PEBD degradados por microorganismos cultivados en medio AR a 30 días.

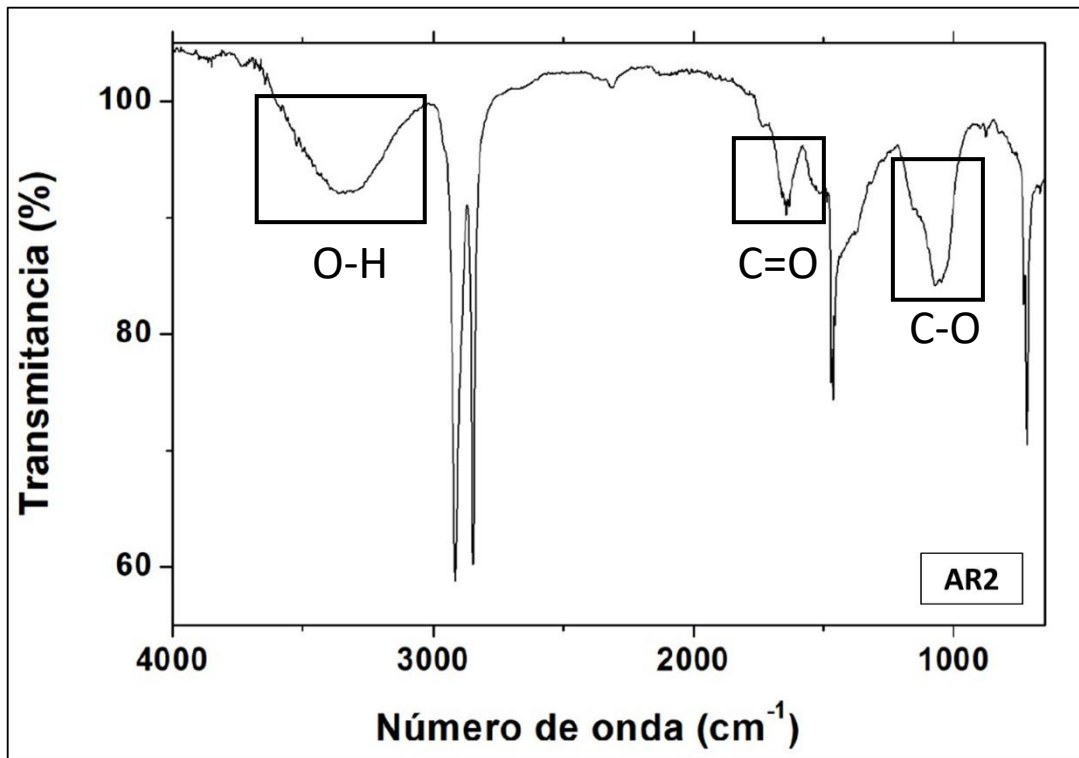


Figura 24. Espectrogramas FTIR de los films de PEBD degradados por microorganismos cultivados en medio AR a 60 días.

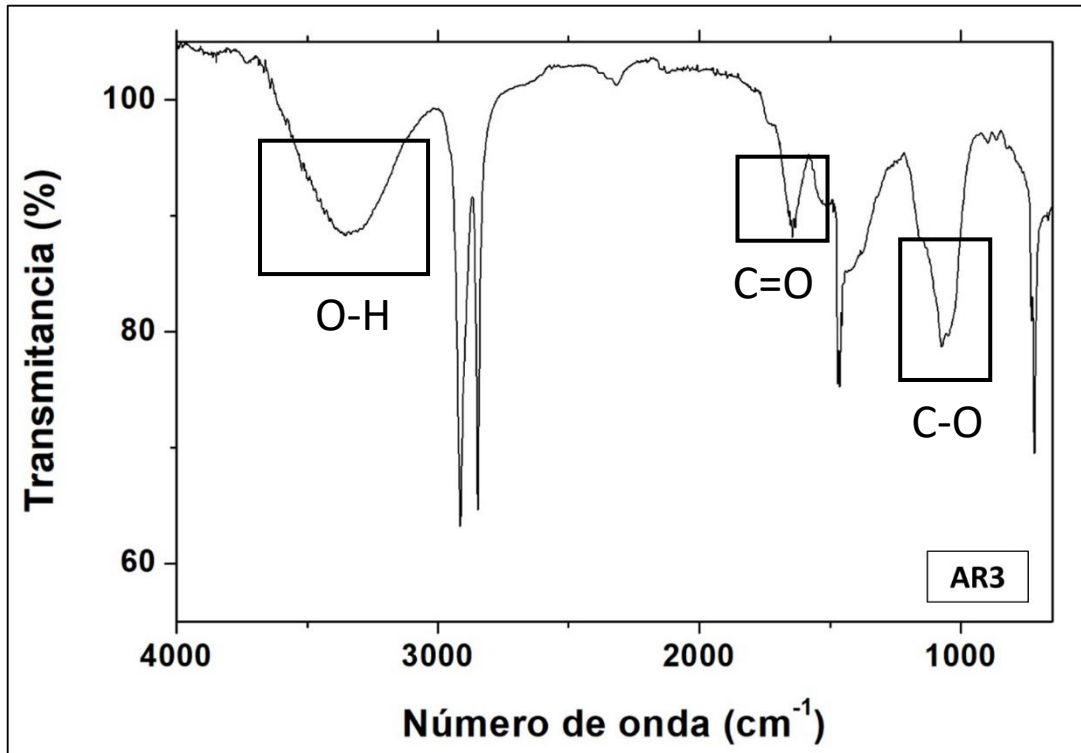


Figura 25. Espectrogramas FTIR de los films de PEBD degradados por microorganismos cultivados en medio AR a 90 días.

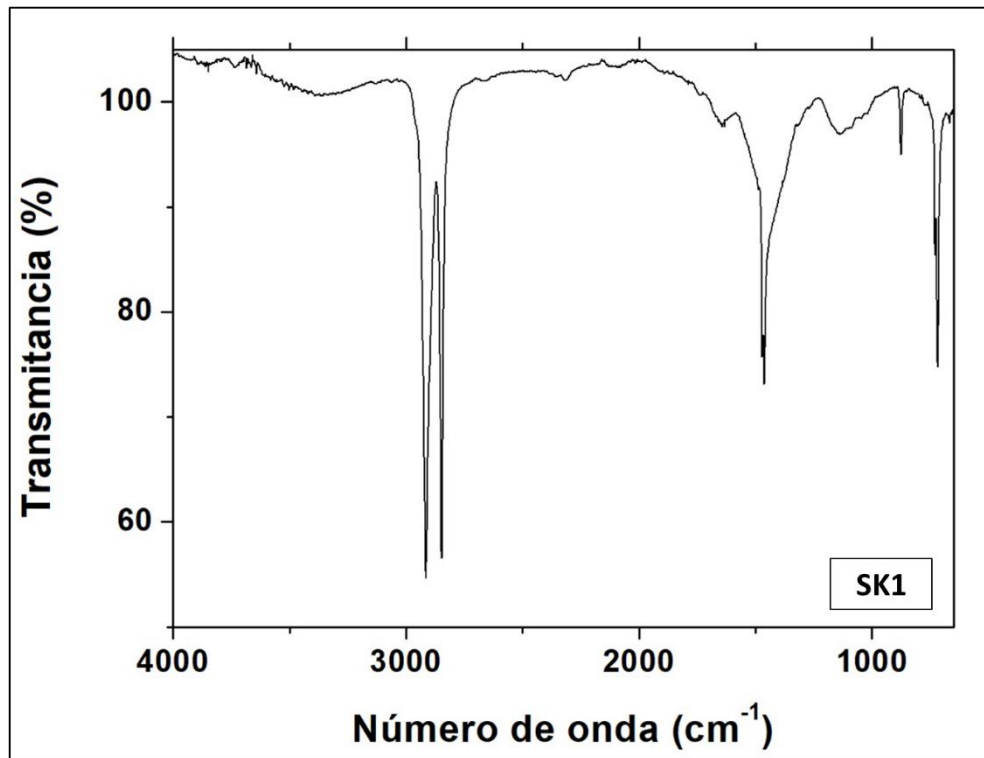


Figura 26. Espectrogramas FTIR de los films de PEBD degradados por microorganismos cultivados en medio SK a 30 días.

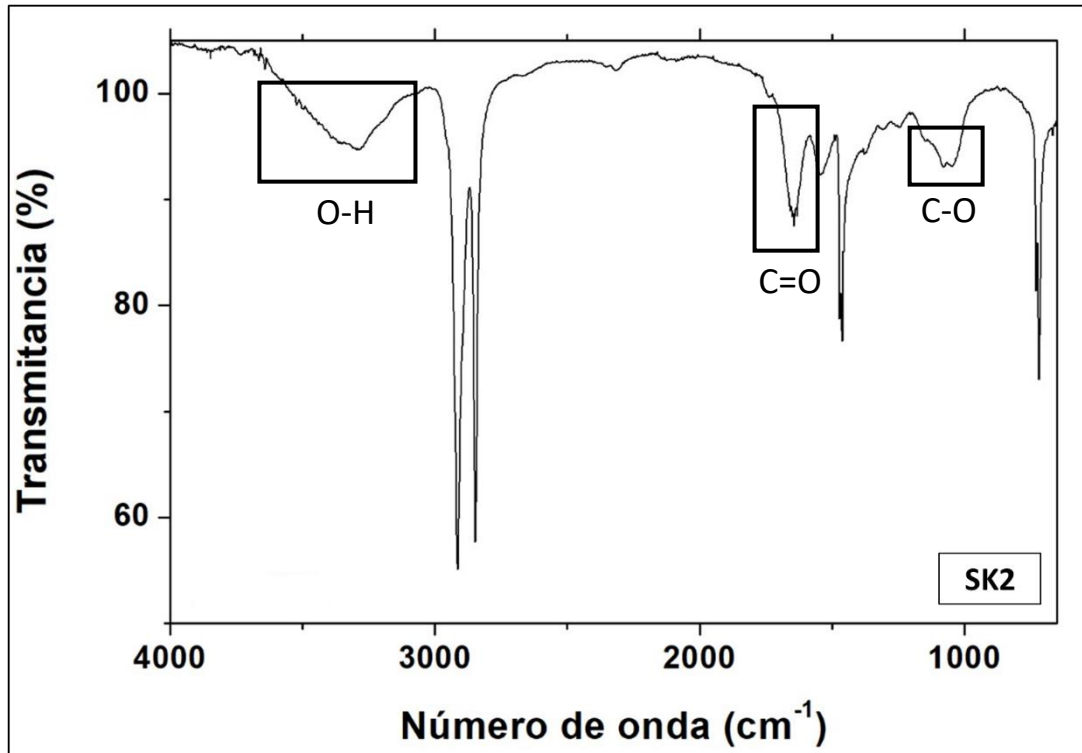


Figura 27. Espectrogramas FTIR de los films de PEBD degradados por microorganismos cultivados en medio SK a 60 días.

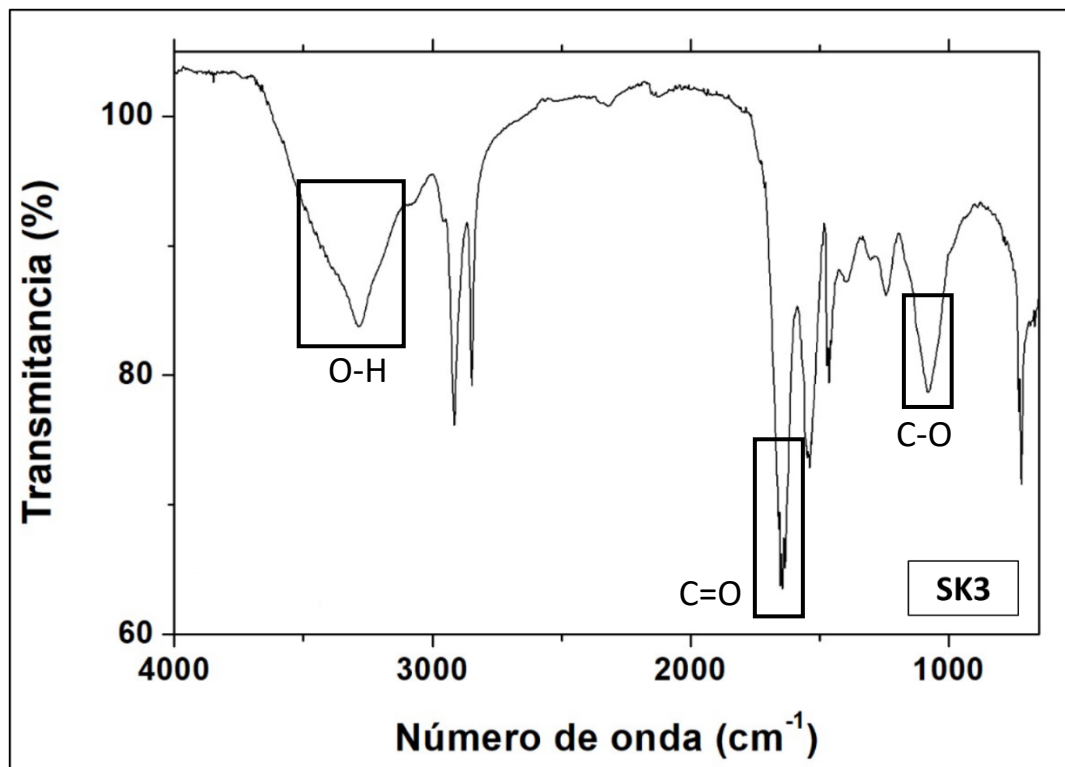


Figura 28. Espectrogramas FTIR de los films de PEBD degradados por microorganismos cultivados en medio SK a 90 días.

Estos resultados son consistentes debido a que la aparición de las bandas de absorción de carbonilo se pueden observar en el rango de $1670\text{--}1820\text{ cm}^{-1}$ debido a la formación de grupos cetona o aldehído $\text{C}=\text{O}$ por acción del consorcio bacteriano (Maroof et al., 2020; Soleimani et al., 2020). El pico medio en $1045\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$ representaría el grupo $\text{C}-\text{O}$, y la absorbancia en la región de $2020\text{--}2260\text{ cm}^{-1}$ está asociada con el tramo $-\text{C}\equiv\text{C}-$, mientras que $3200\text{--}3400$ representa el grupo funcional $\text{O}-\text{H}$ (Soleimani et al., 2020), manifestándose al 2do y tercer mes de ensayo.

Se ha demostrado que el análisis FTIR de películas de PE después del crecimiento bacteriano suele acompañar a variaciones en el grupo carbonilo y formaciones de dobles enlaces (Saha et al. 2003). Los resultados de este estudio en FTIR indican que los consorcios crean cambios significativos en las películas de PE, lo cual es confirmado por otros investigadores que trabajan en la biodegradación de PEBD (Kunlere et al. 2019, Maroof et al., 2020 y Soleimani et al., 2020)

4.3.3 Análisis de espectroscopía Raman

Las propiedades estructurales de las muestras de PEBD se investigaron mediante espectroscopia Raman. La Figura 29 muestra el espectro con las bandas típicas de LDPE (Sato et al., 2002; Vasileiou et al., 2014) centradas entre 1200 y 1400 cm^{-1} , asignadas a los grupos $-(\text{CH}_2)-$ y a las partes anisotrópicas del polímero, respectivamente.

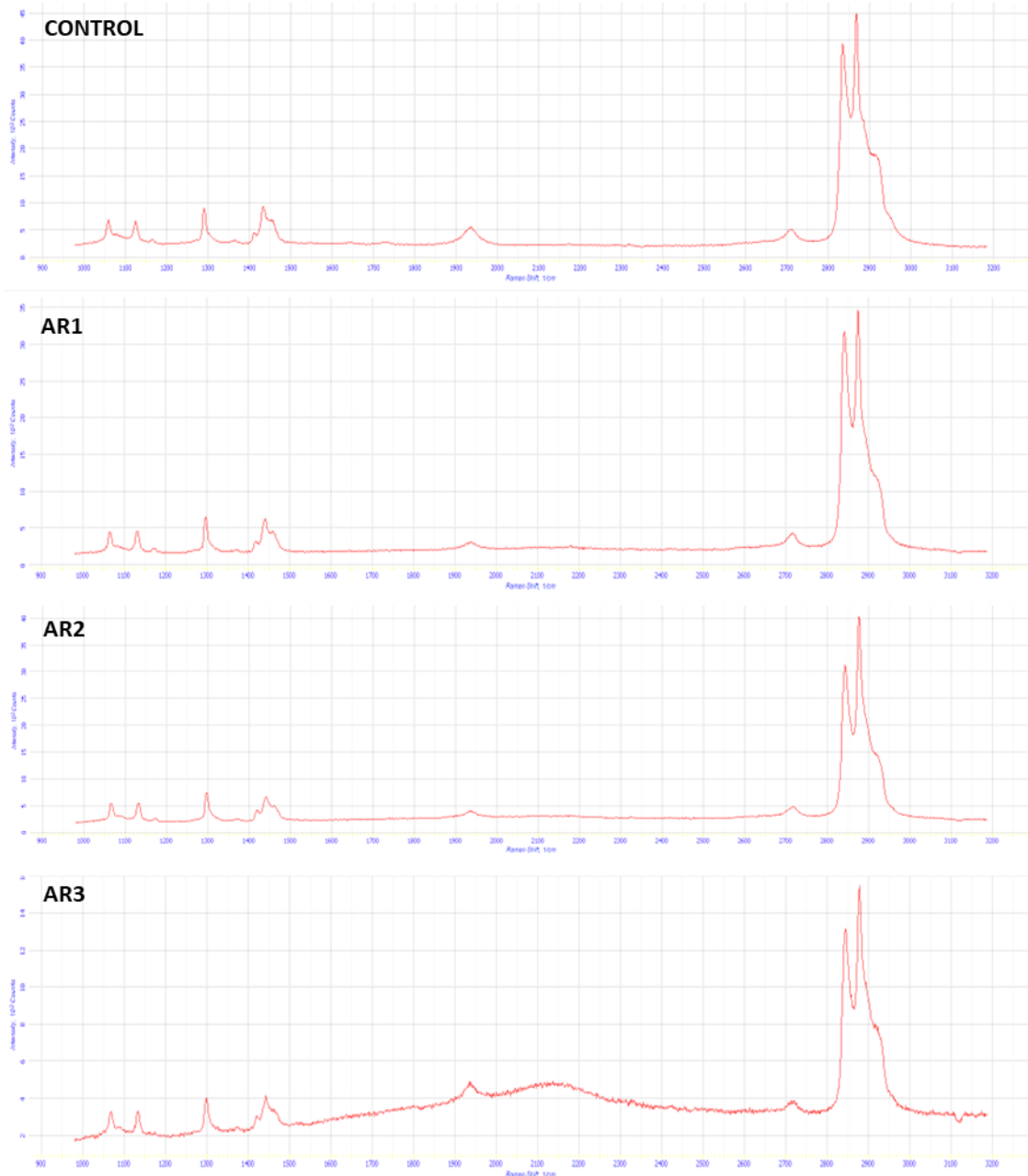


Figura 29. Espectrogramas Raman de los films de PEBD degradados por microorganismos cultivados en medio AR a 30, 60 y 90 días, respectivamente.

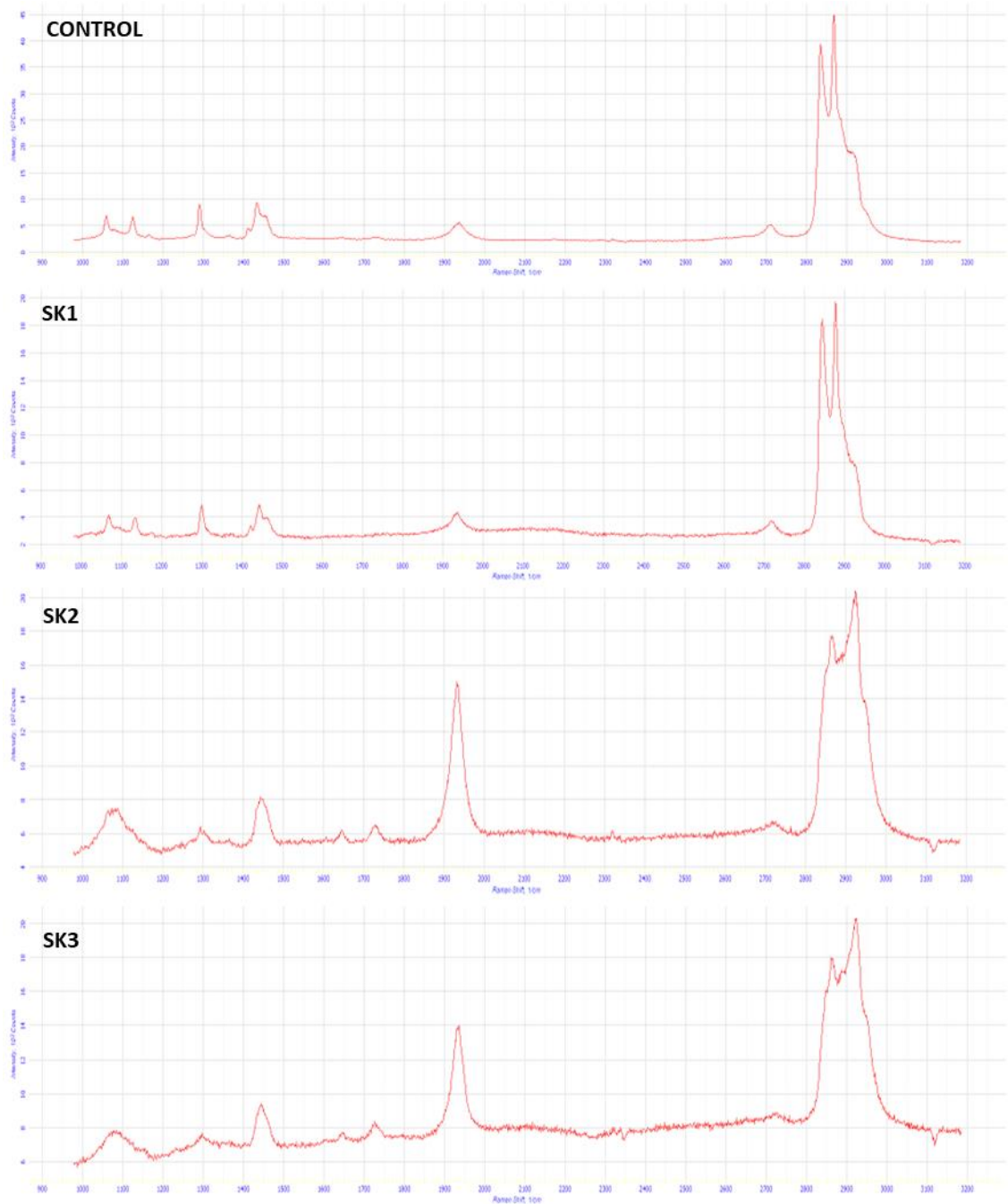


Figura 30. Espectrogramas Raman de los films de PEBD degradados por microorganismos cultivados en medio SK a 30, 60 y 90 días, respectivamente.

Dos bandas más entre 2800 y 2900 cm^{-1} pueden atribuirse a vibraciones de estiramiento C-H (metilo). En la Figura 30, se puede ver que el espectro Raman al tercer mes de tratamiento se ve afectado por un mayor nivel de ruido y la aparición de nuevas bandas. Estas pueden atribuirse a la cantidad de desorden/defectos en la estructura (Palomba et al., 2018), mas no a degradación de estructuras poliméricas.

4.3.4 Análisis de morfología de la superficie de PEBD por microscopía electrónica de barrido (MEB)

Los ensayos de MEB permitieron observar los fenómenos de colonización y penetración microbiana en las películas de PEBD para validar aún más la modificación de la superficie de PEBD debido a la acción enzimática de microorganismos. Las muestras tratadas mostraron algunas modificaciones físicas, interrupciones leves en la superficie que se manifiestan a partir de regiones con relieves pronunciados y evidente colonización bacteriana. En contraste, la muestra control mantuvo una superficie lisa en las mismas condiciones. Estos cambios no tuvieron una distribución uniforme en las superficies de las muestras, ya que los microbios se adhirieron solo a ciertas regiones.

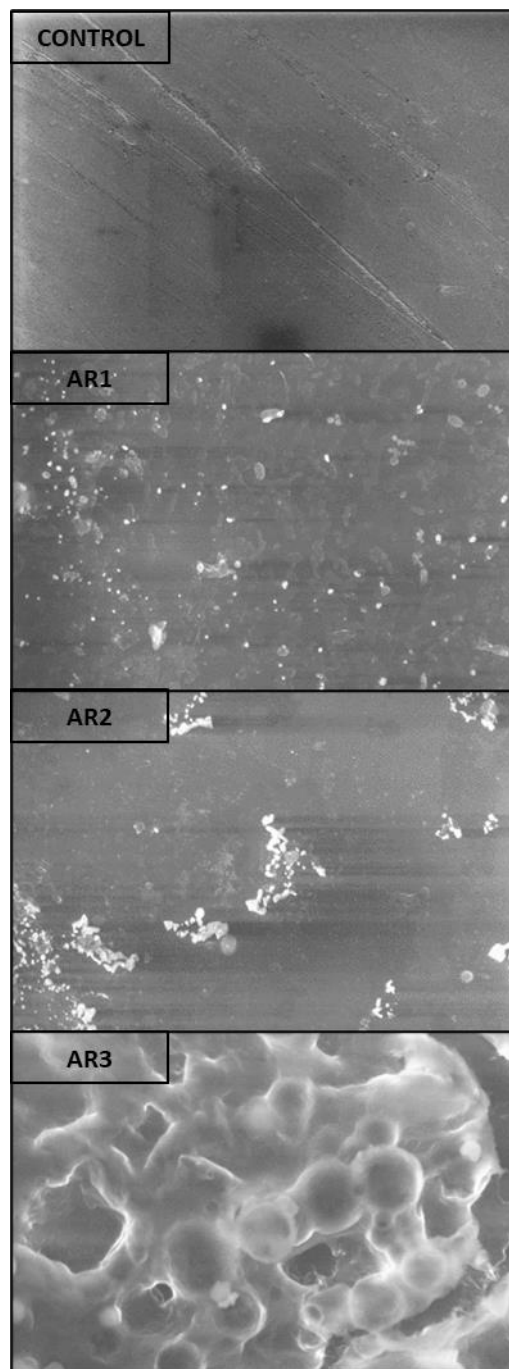


Figura 31. Micrografía superficial SEM de películas de PEBD a 30, 60 y 90 días de incubación en medio AR que muestra una ligera alteración de la superficie y pequeños orificios con un aumento de 5.00 KX. Representación de la unión microbiana a la película de PEBD.

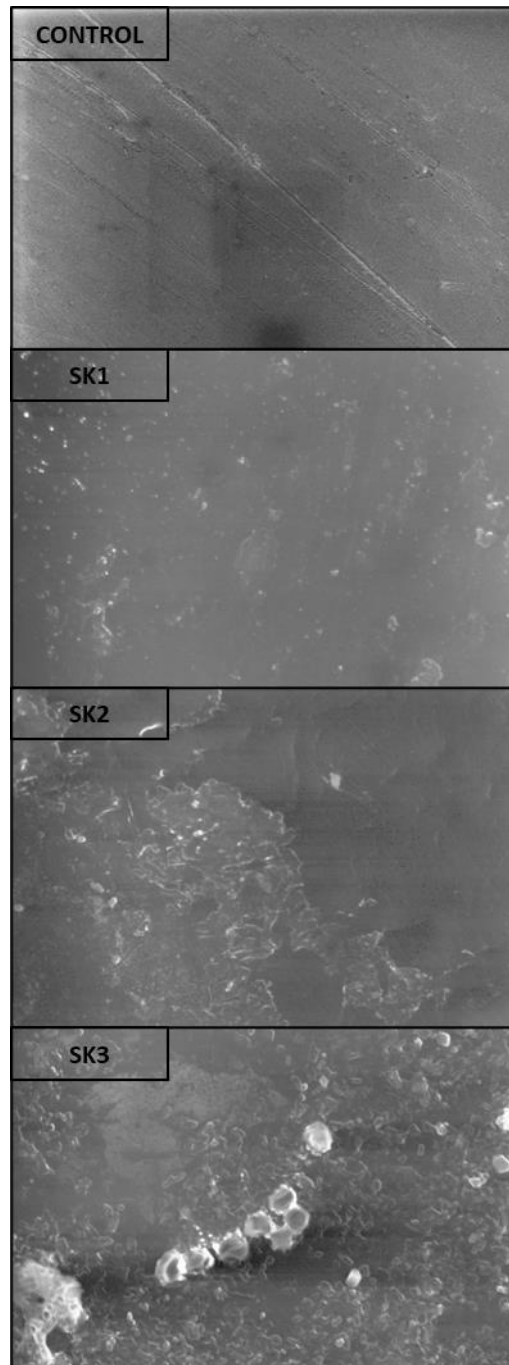


Figura 32. Micrografía superficial SEM de películas de PEBD a 30, 60 y 90 días de incubación en medio SK que muestra una ligera alteración de la superficie y pequeños orificios con un aumento de 5.00 KX. Representación de la unión microbiana a la película de PEBD.

Se reportaron vistas similares en un estudio anterior donde se demostró la formación de relieves en las micrografías de películas de LDPE cuando se trataron con *Bacillus wiedmannii*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus siamensis*, *Bacillus cereus* (Maroof et al., 2020).



Koutny et al. (2006) informaron que transcurridos 100 días de incubación con microorganismos, el análisis MEB no reveló signos claros de bioerosión en la superficie de las películas sometidas a tratamientos de biodegradación de PEBD, lo cual coincide con nuestros hallazgos de acción bacteriana desarrollada solo en la superficie de la película de PEBD, presentando únicamente ligeras alteraciones de la superficie y la respectiva colonización, indicando que la biodegradación es un proceso relativamente lento y continuo.

CONCLUSIONES

Se estudió la capacidad de biodegradación de PEBD de consorcios microbianos obtenidos de aguas residuales de las Lagunas de Oxidación “El Espinar” y cultivados en dos medios enriquecidos con PEBD (AR y SK) durante 90 días.

El uso de T80, medio MSM y pH 7, con respecto a los otros niveles estudiados, mostró significativa reducción de peso de las películas de PEBD sometidos a tratamientos de biodegradación, lo cual fue el indicador inicial de la capacidad biodegradativa de los consorcios.

Diez órdenes microbianas fueron determinadas en SK con PEBD como única fuente de carbono, las que contienen quince especies clasificadas y otras quince no clasificadas con potencial capacidad biodegradativa de hidrocarburos derivados de petróleo como polietileno. Entre los géneros más representativos se encuentran *Pedobacter*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas*, con potencial capacidad biodegradativa de plásticos.

Los análisis de resistencia a la tracción determinaron que la variación del promedio de fuerza de tensión alcanzado por las muestras no muestra significancia, sin embargo; esto podría atribuirse a la formación de ramificaciones producto de reacciones enzimáticas bacterianas.

Los análisis FTIR y SEM confirmaron que en ambos medios de cultivo se alteró la morfología de la superficie de las láminas de PEBD. La aparición de nuevos picos alrededor de 1045, 1643 y 3308 cm^{-1} en los medios AR y SK sugieren que ocurren cambios químicos a partir de oxidación y deshidrogenación, posiblemente debido a acción enzimática del consorcio bacteriano y de forma gradual desde el segundo hasta el tercer mes de tratamiento. Finalmente, las micrografías en MEB mostraron algunas modificaciones como disrupciones leves en la superficie, además de una evidente colonización bacteriana.



RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar ensayos de determinación gravimétrica de pérdida de peso de PEBD sometido a tratamientos en sistemas reactores a diferentes temperaturas controladas que pudieran afectar la actividad enzimática de los consorcios estudiados y a mayor tiempo de cultivo.

También se sugiere comparar la identificación molecular con la capacidad de crecimiento en placa de microorganismos aislados en medios enriquecidos con PEBD, así como la determinación de genes promotores para la síntesis enzimática asociada a la biodegradación de PEBD.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Shafy, H. I., & Mansour, M. S. M. (2018). Solid waste issue: sources, composition, disposal, recycling, and valorization. *Egyptian Journal of Petroleum*, 27, 1275–1290.
- Adrados, A., de Marco, I., Caballero, B. M., López, A., Laresgoiti, M. F., & Torres, A. (2012). Pyrolysis of plastic packaging waste: A comparison of plastic residuals from material recovery facilities with simulated plastic waste. *Waste Management*, 32(5), 826–832. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.06.016>
- Adrados, Aitziber, De Marco, I., Caballero, B. M., López, A., Laresgoiti, M. F., & Torres, A. (2012). Pyrolysis of plastic packaging waste: A comparison of plastic residuals from material recovery facilities with simulated plastic waste. *Waste Management*, 32(5), 826–832.
- Al-Hadithi, H. T., Al-Razzaq, E. A., & Fadhil, G. F. (2017). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Acinetobacter* species isolated from ecological sources. *Journal of Environmental Biology*, 38(5), 785.
- Allende Ponce, S. P., & Arriagada Gonzáles, P. (2013). Polietileno de alta y baja densidad. In *Universidad de Chile*.
- Alvarez, A., Saez, J. M., Costa, J. S. D., Colin, V. L., Fuentes, M. S., Cuozzo, S. A., Benimeli, C. S., Polti, M. A., & Amoroso, M. J. (2017). Actinobacteria: current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals. *Chemosphere*, 166, 41–62.
- Amoroso, M. J., Benimeli, C. S., & Cuozzo, S. A. (2013). *Actinobacteria: application in bioremediation and production of industrial enzymes*. CRC Press.
- ANA. (2016). *Protocolo Nacional para el Monitoreo de la Calidad de los Recursos Hídricos Superficiales*.
- Antai, S. P., & Crawford, D. L. (1983). Degradation of phenol by *Streptomyces setonii*. *Canadian Journal of Microbiology*, 29(1), 142–143.
- Ariza-Tarazona, M. C., Villarreal-Chiu, J. F., Barbieri, V., Siligardi, C., & Cedillo-González, E. I. (2019). New strategy for microplastic degradation: Green photocatalysis using a protein-based porous N-TiO₂ semiconductor. *Ceramics International*, 45(7), 9618–9624.
- Arutchelvi, J., Sudhakar, M., Arkatkar, A., Doble, M., Bhaduri, S., & Uppara, P. (2008). *Biodegradation of polyethylene and polypropylene*.

- <https://www.semanticscholar.org/paper/Biodegradation-of-polyethylene-and-polypropylene-Arutchelvi-Sudhakar/24505625e6d7b99dff9081815785ad5196defe5d>
- ASTM. (2010). *ASTM D882-02 Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting*. <https://www.aenor.com/normas-y-libros/buscador-de-normas/astm?c=002985>
- Auta, H. S., Emenike, C. U., Jayanthi, B., & Fauziah, S. H. (2018). Growth kinetics and biodeterioration of polypropylene microplastics by *Bacillus* sp. and *Rhodococcus* sp. isolated from mangrove sediment. *Marine Pollution Bulletin*, *127*, 15–21.
- Banco Mundial. (2012). *What A Waste. A Global Review Of Solid Waste Management*. Urban Development Series-Knowledge Papers, Chapter 5. <https://www.scribd.com/document/215616452/What-a-Waste-A-Global-Review-of-Solid-Waste-Management>
- Bayo, J., Olmos, S., & López-Castellanos, J. (2021). Assessment of Microplastics in a Municipal Wastewater Treatment Plant with Tertiary Treatment: Removal Efficiencies and Loading per Day into the Environment. *Water*, *13*(10), 1339.
- Boone, D. R., Castenholz, R. W., & Garrity, G. M. (2001). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer.
- Boonmee, C., Kositanont, C., & Leejarkpai, T. (2022). Degradation Behavior of Biodegradable Plastics in Thermophilic Landfill Soil and Wastewater Sludge Conditions. *Environmental Research, Engineering and Management*, *78*(1), 57–69. <https://doi.org/10.5755/J01.EREM.78.1.29502>
- Braissant, O., Cailleau, G., Dupraz, C., & Verrecchia, E. P. (2003). Bacterially Induced Mineralization of Calcium Carbonate in Terrestrial Environments: The Role of Exopolysaccharides and Amino Acids. *Journal of Sedimentary Research*, *73*(3), 485–490. <https://doi.org/10.1306/111302730485>
- Bryant, J. A., Clemente, T. M., Viviani, D. A., Fong, A. A., Thomas, K. A., Kemp, P., Karl, D. M., White, A. E., & DeLong, E. F. (2016). Diversity and activity of communities inhabiting plastic debris in the North Pacific Gyre. *MSystems*, *1*(3), e00024-16.
- Carolina Monmany-Garzia, A., Malizia, A., Pazos, R., Ruiz Barrionuevo, J. M., Fernanda Argarañá, M., Garelo, N., Blettler, M., Galindo-Cardona, A., Angélica Occhionero, M., Martín, E., & De Cristobal, R. E. (2020). What do we ecologists study when we investigate plastic waste in terrestrial and freshwater environments of Argentina?

- Ecologia Austral*, 30(1), 77–84. <https://doi.org/10.25260/EA.20.30.1.0.913>
- Chanprateep, S. (2010). Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(6), 621–632. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.07.014>
- Chaudhary, P., Sharma, R., Singh, S. B., & Nain, L. (2011). Bioremediation of PAH by *Streptomyces* sp. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 86(3), 268–271.
- Chorghé, D., Sari, M. A., & Chellam, S. (2017). Boron removal from hydraulic fracturing wastewater by aluminum and iron coagulation: mechanisms and limitations. *Water Research*, 126, 481–487.
- Cózar, A., Echevarría, F., González-Gordillo, J. I., Irigoien, X., Úbeda, B., Hernández-León, S., Palma, Á. T., Navarro, S., García-de-Lomas, J., & Ruiz, A. (2014). Plastic debris in the open ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(28), 10239–10244.
- Cózar, A., Martí, E., Duarte, C. M., García-de-Lomas, J., Van Sebille, E., Ballatore, T. J., Eguíluz, V. M., González-Gordillo, J. I., Pedrotti, M. L., & Echevarría, F. (2017). The Arctic Ocean as a dead end for floating plastics in the North Atlantic branch of the Thermohaline Circulation. *Science Advances*, 3(4), e1600582.
- Delacuvellerie, A., Cyriaque, V., Gobert, S., Benali, S., & Wattiez, R. (2019). The plastisphere in marine ecosystem hosts potential specific microbial degraders including *Alcanivorax borkumensis* as a key player for the low-density polyethylene degradation. *Journal of Hazardous Materials*, 380, 120899.
- Derraik, J. G. B. (2002). The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Marine Pollution Bulletin*, 44(9), 842–852.
- Dey, A. S., Bose, H., Mohapatra, B., & Sar, P. (2020). Biodegradation of Unpretreated Low-Density Polyethylene (LDPE) by *Stenotrophomonas* sp. and *Achromobacter* sp., Isolated From Waste Dumpsite and Drilling Fluid. *Frontiers in Microbiology*, 11(December), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.603210>
- Eriksen, M., Mason, S., Wilson, S., Box, C., Zellers, A., Edwards, W., Farley, H., & Amato, S. (2013). Microplastic pollution in the surface waters of the Laurentian Great Lakes. *Marine Pollution Bulletin*, 77(1–2), 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.10.007>
- Fahrenfeld, N. L., Arbuckle-Keil, G., Naderi Beni, N., & Bartelt-Hunt, S. L. (2019). Source tracking microplastics in the freshwater environment. *TrAC Trends in*

- Analytical Chemistry*, 112, 248–254. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2018.11.030>
- Fried, J. R. (2014). Polymer Science & Technology: Third Edition. In *Prentice Hall* (Third edit).
- Ganesh Kumar, A., Manisha, D., Sujitha, K., Magesh Peter, D., Kirubakaran, R., & Dharani, G. (2021). Genome sequence analysis of deep sea *Aspergillus sydowii* BOBA1 and effect of high pressure on biodegradation of spent engine oil. *Scientific Reports*, 11(1), 1–19.
- Gargouri, B., Mhiri, N., Karray, F., Aloui, F., & Sayadi, S. (2015). Isolation and Characterization of Hydrocarbon-Degrading Yeast Strains from Petroleum Contaminated Industrial Wastewater. *BioMed Research International*, 2015, 929424. <https://doi.org/10.1155/2015/929424>
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3(7), e1700782.
- Gómez-Méndez, L. D., Moreno-Bayona, D. A., Poutou-Piñales, R. A., Salcedo-Reyes, J. C., Pedroza-Rodríguez, A. M., Vargas, A., & Bogoya, J. M. (2018). Biodeterioration of plasma pretreated LDPE sheets by *Pleurotus ostreatus*. *PloS One*, 13(9), e0203786.
- Gong, M., Yang, G., Zhuang, L., & Zeng, E. Y. (2019). Microbial biofilm formation and community structure on low-density polyethylene microparticles in lake water microcosms. *Environmental Pollution*, 252, 94–102. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2019.05.090>
- Gurung, K., Ncibi, M. C., Fontmorin, J.-M., Särkkä, H., & Sillanpää, M. (2016). Incorporating submerged MBR in conventional activated sludge process for municipal wastewater treatment: a feasibility and performance assessment. *J. Membr. Sci. Technol*, 6(3).
- Hadad, D., Geresh, S., & Sivan, A. (2005). Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *Brevibacillus borstelensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 98(5), 1093–1100.
- Halpern, B. S., Walbridge, S., Selkoe, K. A., Kappel, C. V., Micheli, F., D'Agrosa, C., Bruno, J. F., Casey, K. S., Ebert, C., & Fox, H. E. (2008). A global map of human impact on marine ecosystems. *Science*, 319(5865), 948–952.
- Harrison, J. P., Sapp, M., Schratzberger, M., & Osborn, A. M. (2011). Interactions Between Microorganisms and Marine Microplastics: A Call for Research. *Marine Technology Society Journal*, 45(2), 12–20. <https://doi.org/10.4031/MTSJ.45.2.2>

- Ho, B. T., Roberts, T. K., & Lucas, S. (2018). An overview on biodegradation of polystyrene and modified polystyrene: the microbial approach. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(2), 308–320.
- Ho, K.-L. G., Pometto, A. L., Gadea-Rivas, A., Briceño, J. A., & Rojas, A. (1999). Degradation of polylactic acid (PLA) plastic in Costa Rican soil and Iowa state university compost rows. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 7(4), 173–177.
- ICPE, I. C. for P. in the E. (2006). *Plastics recycling-economic and ecological options*. Eco-Echoes. <http://www.envis-icpe.com>
- Jayasekara, R., Harding, I., Bowater, I., & Lonergan, G. (2005). Biodegradability of a selected range of polymers and polymer blends and standard methods for assessment of biodegradation. *Journal of Polymers and the Environment*, 13(3), 231–251.
- Jeyakumar, D., Chirsteen, J., & Doble, M. (2013). Synergistic effects of pretreatment and blending on fungi mediated biodegradation of polypropylenes. *Bioresource Technology*, 148, 78–85.
- Julienne, F., Delorme, N., & Lagarde, F. (2019). From macroplastics to microplastics: Role of water in the fragmentation of polyethylene. *Chemosphere*, 124409. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.124409>
- Khandare, S. D., Agrawal, D., Mehru, N., & Chaudhary, D. R. (2022). Marine bacterial based enzymatic degradation of low-density polyethylene (LDPE) plastic. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(3), 107437.
- Koutny, M., Sancelme, M., Dabin, C., Pichon, N., Delort, A.-M., & Lemaire, J. (2006). Acquired biodegradability of polyethylenes containing pro-oxidant additives. *Polymer Degradation and Stability*, 91(7), 1495–1503.
- Kyaw, B. M., Champakalakshmi, R., Sakharkar, M. K., Lim, C. S., & Sakharkar, K. R. (2012). Biodegradation of low density polythene (LDPE) by Pseudomonas species. *Indian Journal of Microbiology*, 52(3), 411–419.
- Lobelle, D., & Cunliffe, M. (2011). Early microbial biofilm formation on marine plastic debris. *Marine Pollution Bulletin*, 62(1), 197–200.
- Mahalakshmi, V. (2018). *Evaluation of Biodegradation of Plastics*. April.
- Maroof, L., Khan, I., Yoo, H. S., Kim, S., Park, H.-T., Ahmad, B., & Azam, S. (2020). Identification and characterization of low density polyethylene-degrading bacteria isolated from soils of waste disposal sites. *Environmental Engineering Research*, 26(3), 1–9. <https://doi.org/10.4491/eer.2020.167>

- Min', T. T., Spiridonova, R. R., Agzamov, R. Z., Kochnev, A. M., & Sirotkin, A. S. (2015). Improving the compatibility and assessing the biodegradation of polymer composites of low-density polyethylene and polyamide-6. *International Polymer Science and Technology*, 42(1), 51–56.
- Moharir, R. V., & Kumar, S. (2019). Challenges associated with plastic waste disposal and allied microbial routes for its effective degradation: A comprehensive review. In *Journal of Cleaner Production* (Vol. 208, pp. 65–76). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.10.059>
- Moog, D., Schmitt, J., Senger, J., Zarzycki, J., Rexer, K.-H., Linne, U., Erb, T., & Maier, U. G. (2019). Using a marine microalga as a chassis for polyethylene terephthalate (PET) degradation. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 1–15.
- Müller, R. J., Schrader, H., Profe, J., Dresler, K., & Deckwer, W. D. (2005). Enzymatic degradation of poly(ethylene terephthalate): Rapid hydrolyse using a hydrolase from *T. fusca*. *Macromolecular Rapid Communications*, 26(17), 1400–1405. <https://doi.org/10.1002/marc.200500410>
- Nõlvak, H., Truu, J., Limane, B., Truu, M., Cepurnieks, G., Bartkevičs, V., Juhanson, J., & Muter, O. (2013). Microbial community changes in TNT spiked soil bioremediation trial using biostimulation, phytoremediation and bioaugmentation. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management*, 21(3), 153–162. <https://doi.org/10.3846/16486897.2012.721784>
- Novotna, K., Cermakova, L., Pivokonska, L., Cajthaml, T., & Pivokonsky, M. (2019). Microplastics in drinking water treatment—Current knowledge and research needs. *Science of the Total Environment*, 667, 730–740.
- Okoffo, E. D., O'Brien, S., O'Brien, J. W., Tscharke, B. J., & Thomas, K. V. (2019). Wastewater treatment plants as a source of plastics in the environment: a review of occurrence, methods for identification, quantification and fate. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 5(11), 1908–1931.
- Paço, A., Duarte, K., da Costa, J. P., Santos, P. S. M., Pereira, R., Pereira, M. E., Freitas, A. C., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. A. P. (2017). Biodegradation of polyethylene microplastics by the marine fungus *Zalerion maritimum*. *Science of the Total Environment*, 586, 10–15.
- Palomba, M., Longo, A., Carotenuto, G., Coscia, U., Ambrosone, G., Rusciano, G., Nenna, G., Barucca, G., & Longobardo, L. (2018). Optical and electrical characterizations of graphene nanoplatelet coatings on low density polyethylene.

- Journal of Vacuum Science & Technology B, Nanotechnology and Microelectronics: Materials, Processing, Measurement, and Phenomena*, 36(1), 01A104.
<https://doi.org/10.1116/1.4998570>
- Penkhrue, W., Khanongnuch, C., Masaki, K., Pathom-Aree, W., Punyodom, W., & Lumyong, S. (2015). Isolation and screening of biopolymer-degrading microorganisms from northern Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(9), 1431–1442.
- Pico, Y., Alfarhan, A., & Barcelo, D. (2019). Nano-and microplastic analysis: Focus on their occurrence in freshwater ecosystems and remediation technologies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 113, 409–425.
- Quecholac-Piña, X., Hernández-Berriel, M. del C., Mañón-Salas, M. del C., Espinosa-Valdemar, R. M., & Vázquez-Morillas, A. (2020). Degradation of plastics under anaerobic conditions: A short review. *Polymers*, 12(1), 109.
- Rai, P. K., Lee, J., Brown, R. J. C., & Kim, K.-H. (2021). Micro and nanoplastic pollution: Behavior, microbial ecology, and remediation technologies. *Journal of Cleaner Production*, 291, 125240.
- Ranjan, V. P., & Goel, S. (2019). Degradation of Low-Density Polyethylene Film Exposed to UV Radiation in Four Environments. *Journal of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste*, 23(4). [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)HZ.2153-5515.0000453](https://doi.org/10.1061/(ASCE)HZ.2153-5515.0000453)
- Restrepo-Flórez, J.-M., Bassi, A., & Thompson, M. R. (2014). Microbial degradation and deterioration of polyethylene – A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 88, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.12.014>
- Rivard, C., Moens, L., Roberts, K., Brigham, J., & Kelley, S. (1995). Starch esters as biodegradable plastics: Effects of ester group chain length and degree of substitution on anaerobic biodegradation. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(19), 848–852.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)00120-G](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)00120-G)
- Ru, J., Huo, Y., & Yang, Y. (2020). Microbial Degradation and Valorization of Plastic Wastes. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 11, p. 442). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00442>
- Sabir, I. (2004). *Plastic Industry in Pakistan*. <http://www.jang.com.pk/thenews/investors/nov2004/index.html>, 2004.
- Saminathan, P., Sripriya, A., Nalini, K., Sivakumar, T., & Thangapandian, V. (2014). Biodegradation of plastics by *Pseudomonas putida* isolated from garden soil samples. *J Adv Bot Zool*, 1(3), 34–38.

- Sánchez, C. (2020). Fungal potential for the degradation of petroleum-based polymers: An overview of macro-and microplastics biodegradation. *Biotechnology Advances*, 40, 107501.
- Sato, H., Shimoyama, M., Kamiya, T., Amari, T., Šašic, S., Ninomiya, T., Siesler, H. W., & Ozaki, Y. (2002). Raman spectra of high-density, low-density, and linear low-density polyethylene pellets and prediction of their physical properties by multivariate data analysis. *Journal of Applied Polymer Science*, 86(2), 443–448.
- Scott, G. (1999). *Polymers in modern life. Polymers and the Environment*. The Royal Society of Chemistry.
- Seymour, R. B. (1988). Polymer Science Before and After 1899: Notable Developments During the Lifetime of Maurits Dekker. *Journal of Macromolecular Science: Part A - Chemistry*.
- Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., & Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 26(3), 246–265.
- Shimao, M. (2001). Biodegradation of plastics. *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 242–247.
- Sini Francis, C., Sharrel, R., Embalil Mathachan, A., Raveendran, S., Parameswaran, B., Suren, S., & Ashok, P. (2021). Bioprospecting of gut microflora for plastic biodegradation. *Bioengineered*, 12(1), 1040–1053. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1902173>
- Sistema Regional de Información Ambiental. (2011). *Resumen descriptivo del sistema de tratamiento de agua residual en la ciudad de Puno - Perú*. <http://siar.minam.gob.pe/puno/documentos/resumen-descriptivo-sistema-tratamiento-agua-residual-ciudad-puno>
- Skaf, D. W., Punzi, V. L., Rolle, J. T., & Kleinberg, K. A. (2020). Removal of micron-sized microplastic particles from simulated drinking water via alum coagulation. *Chemical Engineering Journal*, 386, 123807.
- Soleimani, Z., Gharavi, S., Soudi, M., & Moosavi-Nejad, Z. (2020). A survey of intact low-density polyethylene film biodegradation by terrestrial Actinobacterial species. *International Microbiology*, 24, 65–73. <https://doi.org/10.1007/s10123-020-00142-0>
- Sridharan, R., Krishnaswamy, V. G., & Kumar, P. S. (2021). Analysis and microbial degradation of Low-Density Polyethylene (LDPE) in Winogradsky column. *Environmental Research*, 201(June), 111646.

- <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111646>
- Statista. (2022). *Global plastic production 1950-2020*.
<https://www.statista.com/statistics/282732/global-production-of-plastics-since-1950/>
- Syraniidou, E., Karkanorachaki, K., Amorotti, F., Avgeropoulos, A., Kolvenbach, B., Zhou, N.-Y., Fava, F., Corvini, P. F.-X., & Kalogerakis, N. (2019). Biodegradation of mixture of plastic films by tailored marine consortia. *Journal of Hazardous Materials*, 375, 33–42.
- Talvitie, J., Mikola, A., Koistinen, A., & Setälä, O. (2017). Solutions to microplastic pollution—Removal of microplastics from wastewater effluent with advanced wastewater treatment technologies. *Water Research*, 123, 401–407.
- Tekman, M. B., Gutow, L., Macario, A., Haas, A., Walter, A., & Bergmann, M. (2017). 1,510 species are affected by litter. *Alfred Wegener Institute Helmholtz Centre for Polar and Marine Research*.
- Thevenon, F., Carroll, C., & Sousa, J. (2014). Plastic debris in the ocean: the characterization of marine plastics and their environmental impacts, situation analysis report. *Gland, Switzerland: IUCN*, 52.
- Tokiwa, Y., Calabria, B., Ugwu, C., & Aiba, S. (2009). Biodegradability of plastics. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(9), 3722–3742.
- Tortora, G. J., Funke, B. R. ., & Case, C. L. (2007). Introducción a la microbiología. In *Pearson Education, Inc*.
- Urbanek, A. K., Rymowicz, W., & Mirończuk, A. M. (2018). Degradation of plastics and plastic-degrading bacteria in cold marine habitats. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 102, Issue 18, pp. 7669–7678). Springer Verlag.
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-9195-y>
- Usha, R., Sangeetha, T., & Palaniswamy, M. (2011). Screening of polyethylene degrading microorganisms from garbage soil. *Libyan Agric Res Cent J Int*, 2(4), 200–204.
- Vasileiou, A. A., Kontopoulou, M., & Docoslis, A. (2014). A noncovalent compatibilization approach to improve the filler dispersion and properties of polyethylene/graphene composites. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 6(3), 1916–1925.
- Wagner, M., Scherer, C., Alvarez-Muñoz, D., Brennholt, N., Bourrain, X., Buchinger, S., Fries, E., Grosbois, C., Klasmeier, J., Marti, T., Rodriguez-Mozaz, S., Urbatzka, R., Vethaak, A. D., Winther-Nielsen, M., & Reifferscheid, G. (2014). Microplastics in

- freshwater ecosystems: what we know and what we need to know. *Environmental Sciences Europe*, 26(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s12302-014-0012-7>
- Waller, C. L., Griffiths, H. J., Waluda, C. M., Thorpe, S. E., Loaiza, I., Moreno, B., Pacherras, C. O., & Hughes, K. A. (2017). Microplastics in the Antarctic marine system: an emerging area of research. *Science of the Total Environment*, 598, 220–227.
- Watson, J. D., Jones, S., & Rodríguez Tapia, M. L. (2000). *La Doble hélice : relato personal del descubrimiento de la estructura del ADN / James D. Watson ; introducción de Steve Jones ; [traducción: María Luisa Rodríguez Tapia]*.
- Witt, U., Einig, T., Yamamoto, M., Kleeberg, I., Deckwer, W. D., & Müller, R. J. (2001). Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters: Evaluation of the final biodegradability and ecotoxicological impact of degradation intermediates. *Chemosphere*, 44(2), 289–299. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00162-4](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00162-4)
- Wu, Y., Zeng, J., Zhu, Q., Zhang, Z., & Lin, X. (2017). pH is the primary determinant of the bacterial community structure in agricultural soils impacted by polycyclic aromatic hydrocarbon pollution. *Scientific Reports*, 7, 40093.
- Xu, J., & Wang, X. (2018). Self-healing of concrete cracks by use of bacteria-containing low alkali cementitious material. *Construction and Building Materials*, 167, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2018.02.020>
- Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Toyohara, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., & Oda, K. (2016). A bacterium that degrades and assimilates poly (ethylene terephthalate). *Science*, 351(6278), 1196–1199.
- Yuan, J., Ma, J., Sun, Y., Zhou, T., Zhao, Y., & Yu, F. (2020). Microbial degradation and other environmental aspects of microplastics/plastics. *Science of the Total Environment*, 715, 136968.
- Zumstein, M. T., Rechsteiner, D., Roduner, N., Perz, V., Ribitsch, D., Guebitz, G. M., Kohler, H.-P. E., McNeill, K., & Sander, M. (2017). Enzymatic hydrolysis of polyester thin films at the nanoscale: effects of polyester structure and enzyme active-site accessibility. *Environmental Science & Technology*, 51(13), 7476–7485.



ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de Kit de Purificación de ADN Invitrogen.

USER GUIDE

invitrogen

PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit

Purification of high-quality microbial DNA from microbial culture and transport media samples

Catalog Number A29790

Pub. No. MAN0014332 Rev. A.0

WARNING! Read the Safety Data Sheets (SDSs) and follow the handling instructions. Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves. Safety Data Sheets (SDSs) are available from thermofisher.com/support.

Product description

The Invitrogen™ PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit enables fast purification of high-quality microbial and host DNA from a wide variety of sample types. The kit uses proven PureLink™ spin-column technology for robust yields of purified DNA that is ready for downstream PCR, sequencing, or other applications.

Typical DNA recovery is 5–20 µg from 1 mL of microbial culture. For transport media, DNA is recovered in sufficient quantity for downstream PCR detection, but may be undetectable by spectrophotometric methods.

Procedure overview

This guide describes purification of DNA from microbial culture (for example, from single colonies or from broth cultures) or liquid transport media (for example, Amies or Stuart Transport Medium). In this procedure, the microorganisms are efficiently lysed by a combination of heat, chemical, and mechanical disruption with specialized beads. The sample is then applied to a PureLink™ spin column, and the DNA that is bound to the column undergoes a single wash step before elution.

Kit contents

Table 1 PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit (Cat. no. A29790, 50 reactions)

Component	Quantity	Storage
S1—Lysis Buffer	40 mL	15°C to 30°C
S2—Lysis Enhancer	5 mL	
S3—Cleanup Buffer ⁽¹⁾	12.5 mL	
S4—Binding Buffer	45 mL	
S5—Wash Buffer Concentrate ⁽²⁾	13 mL	
S6—Elution Buffer	5 mL	

Component	Quantity	Storage
PureLink™ Spin Columns with Collection Tubes	50	15°C to 30°C
PureLink™ Collection Tubes	100	
Bead Tubes ⁽³⁾	50	

⁽¹⁾ Not used in this procedure.

⁽²⁾ Add 13 mL of 96–100% ethanol before use. See “Before you begin” on page 2.

⁽³⁾ Ships separately.

Required materials

Unless otherwise indicated, all materials are available through thermofisher.com. MLS: Fisher Scientific (www.fisherscientific.com) or other major laboratory supplier.

Table 2 Required materials not included with the kit

Item	Source
Heat block, dry bath, or water bath, 65°C	MLS
(Optional) For dry bath, Lab Armor® Beads	Cat. no. A12543
Microcentrifuge capable of 14,000 × g	MLS
Vortex mixers, 2 ⁽¹⁾	MLS
For vortex bead homogenization: hands-free adapter for vortex mixer, with horizontal tube orientation	Fisher Scientific NC0070788 ⁽²⁾
(Optional; alternative to vortex bead homogenization) Bead mill homogenizer	Omni 19-040, or equivalent
Adjustable pipettors, 100–1000 µL	MLS
Microcentrifuge tubes, DNase-free, 1.5 mL or 2.0 mL	MLS
Ethanol, 96–100%	MLS

⁽¹⁾ For vortex bead homogenization, we recommend using two mixers, one dedicated to the hands-free adapter.

⁽²⁾ Cat. no. AM10024 (not available for sale) can also be used.

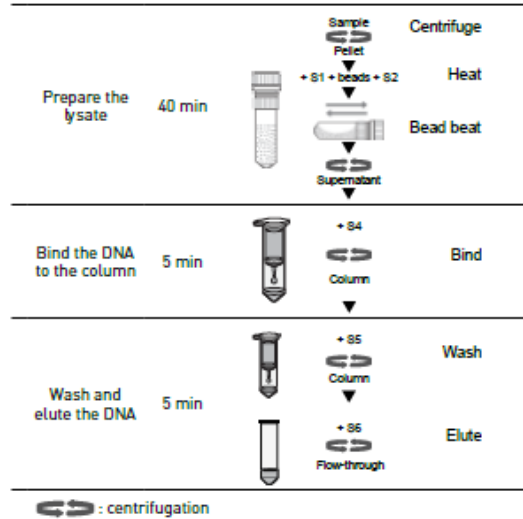
For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Table 3 Additional materials required for sample volumes >2.0 mL

Item	Source
Conical tubes, 15 mL, DNase-free	Cat. no. AM12500
Benchtop centrifuge for 15-mL conical tubes	MLS

Workflow



Important procedural guidelines

Sample input requirements and handling

- Collect samples according to your laboratory guidelines and experimental needs.
- Recommended input amount:

Sample type	Amount
Microbial culture	0.2–2 mL
Transport media ⁽¹⁾	0.2–5 mL

⁽¹⁾ Swab removed; squeeze swab against the side of the tube before removal to ensure maximal release of cells into the media.

For either sample type, volumes as low as 0.2 mL can be used. For 0.2-mL samples, you may add the sample directly to 600 μ L of S1—Lysis Buffer, instead of centrifuging and resuspending the microbial pellet in 800 μ L of S1—Lysis Buffer.

- Ensure that samples are mixed thoroughly with S1—Lysis Buffer and S2—Lysis Enhancer to create a homogenous sample.

Alternatives to the optimized procedure

- This procedure is optimized for homogenization by bead beating on the vortex mixer with horizontal agitation. This is a cost-effective method for recovery of high-quality microbial DNA. Ensure that the vortex adapter enables horizontal agitation; adapters with a vertical tube orientation may not agitate adequately.

Note: Balance the vortex adapter to ensure proper movement of the adapter and optimal homogenization.

If you use a bead mill homogenizer, follow the manufacturer's instructions to optimize sample disruption.

- This procedure is optimized for centrifugations at 14,000 \times g. The PureLink™ Spin Columns with Collection Tubes can withstand up to 16,000 \times g.

If your microcentrifuge is not capable of 14,000 \times g, adjust the centrifugation times to ensure that all of the sample passes through the column.

Options for elution

- The DNA can be eluted from the column with 50–200 μ L of S6—Elution Buffer, to optimize the concentration of the recovered DNA.
- Two sequential elution steps with S6—Elution Buffer might increase the yield slightly. For example, for a total elution volume of 100 μ L, either:
 - Perform two sequential elution steps with 50 μ L of S6—Elution Buffer, or
 - Perform the first elution step with 100 μ L of S6—Elution Buffer, then apply the flow-through (containing the eluted DNA) to the same column and repeat for a second elution.
- If desired, perform the final elution spin into nuclease-free 1.5-mL microcentrifuge tubes, instead of the collection tubes supplied with the kit, which do not have caps. Position the cap of the microcentrifuge tubes opposite the direction of rotation.

Before you begin

Before first use of the kit: prepare S5—Wash Buffer

Add 13 mL of 96–100% ethanol to S5—Wash Buffer Concentrate, mix well, and store at room temperature.

Before each use of the kit

If precipitate is visible in S1—Lysis Buffer or S4—Binding Buffer, warm the buffers at 37°C for 5 minutes and shake well to dissolve the precipitate.

Methods

Perform the procedure at room temperature (20–25°C), unless otherwise indicated.

-
- | | | |
|----------|--------------------|--|
| 1 | Prepare the lysate | <p>a. Centrifuge the sample at $14,000 \times g$ for 10 minutes to pellet the microorganisms.
Samples larger than 5 mL may require longer centrifugation times for optimal recovery of microorganisms.
Use an appropriately sized centrifuge tube; do not use a Bead Tube.</p> <p>b. Carefully remove the supernatant and discard.
Avoid disturbing the microbial pellet during this step. Loss of pellet will result in decreased yield.</p> <p>c. Resuspend the microbial pellet in 800 μL of S1—Lysis Buffer, pipet up and down or vortex to resuspend, then transfer the sample to the Bead Tube.</p> <p>d. Add 100 μL of S2—Lysis Enhancer, cap securely, and vortex briefly.</p> <p>e. Incubate at 65°C for 10 minutes.</p> <p>f. Homogenize by bead beating for 10 minutes at maximum speed on the vortex mixer.
Use the hands-free adapter and horizontal agitation.</p> <p>g. Centrifuge at $14,000 \times g$ for 2 minutes.</p> <p>h. Transfer up to 500 μL of the supernatant to a clean microcentrifuge tube, avoiding the bead pellet and any debris.</p> |
|----------|--------------------|--|
-
- | | | |
|----------|----------------------------|---|
| 2 | Bind the DNA to the column | <p>a. Add 900 μL of S4—Binding Buffer, and vortex briefly.</p> <p>b. Load 700 μL of the sample mixture onto a spin column-tube assembly, and centrifuge at $14,000 \times g$ for 1 minute.</p> <p>c. Discard the flow-through, and repeat step 2b with the remaining sample mixture.</p> |
|----------|----------------------------|---|
-
- | | | |
|----------|------------------------|--|
| 3 | Wash and elute the DNA | <p>a. Place the spin column in a clean collection tube, add 500 μL of S5—Wash Buffer, then centrifuge the spin column-tube assembly at $14,000 \times g$ for 1 minute.</p> <p>b. Discard the flow-through, then centrifuge the spin column-tube assembly at $14,000 \times g$ for 30 seconds.
The second centrifugation optimizes removal of S5—Wash Buffer, which could interfere with downstream applications.</p> <p>c. Place the spin column in a clean tube, add 100 μL of S6—Elution Buffer, then incubate at room temperature for 1 minute.</p> <p>d. Centrifuge the spin column-tube assembly at $14,000 \times g$ for 1 minute, then discard the column.
The purified DNA is in the tube.</p> <p>The DNA is ready for immediate use. Alternatively, store the purified DNA:</p> <ul style="list-style-type: none">• At 4°C for up to 1 week.• At –20°C for long-term storage. |
|----------|------------------------|--|
-

Troubleshooting

Observation	Possible cause	Recommended action
Low yield	Inefficient lysis.	Heat samples at 95°C for 5–10 minutes instead of at 65°C for 10 minutes. Heat at 95°C for 5–10 minutes, and bead beat for a longer time or using a higher power setting.
	Low levels of DNA in the sample.	Repeat the purification with more starting material. Larger sample volumes may require longer centrifugation times in the initial step to pellet the microorganisms.
Inhibition of PCR or other downstream reactions	Presence of inhibitors in the recovered DNA.	Dilute the DNA 10- to 100-fold for PCR.
		Repeat the purification with an additional cleanup step: <ol style="list-style-type: none"> 1. After bead beating and centrifugation, transfer up to 400 µL of the supernatant to a clean microcentrifuge tube. 2. Add 250 µL of S3–Cleanup Buffer, and vortex immediately. 3. Centrifuge at 14,000 × g for 2 minutes, then transfer up to 500 µL of the supernatant to a clean microcentrifuge tube, avoiding the pellet. 4. Proceed to “Bind the DNA to the column” on page 3.

Documentation and support

Revision history MAN0014332 (English)

Revision	Date	Description
A.0	September 2015	New document.

Limited product warranty

Life Technologies Corporation and/or its affiliate(s) warrant their products as set forth in the Life Technologies' General Terms and Conditions of Sale found on Life Technologies' website at www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html. If you have any questions, please contact Life Technologies at www.thermofisher.com/support.

The information in this guide is subject to change without notice.

DISCLAIMER

TO THE EXTENT ALLOWED BY LAW, LIFE TECHNOLOGIES AND/OR ITS AFFILIATE(S) WILL NOT BE LIABLE FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE, OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING YOUR USE OF IT.

Important Licensing Information: These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses. By use of these products, you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

©2015 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

For support visit thermofisher.com/support or email techsupport@lifetech.com

thermofisher.com

10 September 2015

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Anexo 2. Resultados de Cinética de Crecimiento de Microorganismos con capacidad de degradación.

Medición (hora)	Hora	CINÉTICA (Caldo Nutritivo)										CINÉTICA (Agar Nutritivo)										PARAMETROS			
		CUANTIFICACIÓN POR ABSORBANCIA (600 nm)										CUANTIFICACIÓN POR DILUCIONES SERIADAS Y SIEMBRA EN PLACA										TASA DE CRECIMIENTO		TIEMPO DE DUPLICACIÓN	
		NT1	NT2	NT3	NT Blanco	NT1- blanco	NT2- blanco	NT3- blanco	ABS(600)	SD	ufcA	ufcB	dilución	promediac	SD	CV	UFC/mL	SD	μ _{ufc} (horas-1)	μ _{AG00} (horas-1)	g _{ufc} (horas)	g _{AG00} (horas)			
0	8:38 a. m.	0.031	0.032	0.034	0.004	0.027	0.028	0.030	0.028	0.002	46	43	1E+04	44.5	2.1	4.76701201	4.45E+06	30.0	0.27	0.34	2.53	2.06			
1	9:38 a. m.	0.046	0.040	0.045	0.004	0.042	0.036	0.041	0.040	0.003	56	61	1E+04	58.5	3.5	6.0436477	5.85E+06	38.9	0.61	0.36	1.14	1.91			
2	10:38 a. m.	0.061	0.064	0.061	0.005	0.056	0.059	0.056	0.057	0.002	105	110	1E+04	107.5	3.5	3.28886875	1.08E+07	73.5	0.38	0.39	1.85	1.77			
3	11:38 a. m.	0.091	0.091	0.089	0.006	0.085	0.085	0.083	0.084	0.001	160	153	1E+04	156.5	4.9	3.16277794	1.57E+07	107.2	0.32	0.27	2.14	2.52			
4	12:38 p. m.	0.113	0.119	0.119	0.006	0.107	0.113	0.113	0.111	0.003	218	215	1E+04	216.5	2.1	0.97982464	2.17E+07	151.6	0.36	0.40	1.93	1.73			
5	1:38 p. m.	0.171	0.177	0.161	0.004	0.167	0.173	0.157	0.166	0.008	30	32	1E+05	31	1.4	4.56197923	3.10E+07	20.9	0.33	0.27	2.12	2.55			
6	2:38 p. m.	0.217	0.227	0.220	0.004	0.213	0.223	0.216	0.217	0.005	41	45	1E+05	43	2.8	6.5777375	4.30E+07	28.4	0.38	0.19	1.81	3.71			
7	3:38 p. m.	0.276	0.261	0.261	0.004	0.272	0.257	0.257	0.262	0.009	67	59	1E+05	63	5.7	8.97913373	6.30E+07	40.5	0.24	0.17	2.90	4.02			
8	4:38 p. m.	0.312	0.313	0.321	0.004	0.308	0.309	0.317	0.311	0.005	79	81	1E+05	80	1.4	1.76776695	8.00E+07	55.6	0.38	0.38	1.80	1.85			
9	5:38 p. m.	0.468	0.461	0.451	0.007	0.461	0.454	0.444	0.453	0.009	112	123	1E+05	117.5	7.8	6.61972306	1.18E+08	77.6	0.44	0.27	1.57	2.60			
10	6:38 p. m.	0.597	0.590	0.600	0.004	0.593	0.586	0.596	0.592	0.005	179	186	1E+05	182.5	4.9	2.71219039	1.83E+08	125.5	0.33	0.28	2.07	2.51			
11	7:38 p. m.	0.783	0.793	0.790	0.009	0.774	0.784	0.781	0.780	0.005	248	262	1E+05	255	9.9	3.88215488	2.55E+08	173.3	0.71	0.22	0.97	3.21			
12	8:38 p. m.	0.973	0.987	0.975	0.011	0.962	0.976	0.964	0.967	0.008	56	48	1E+06	52	5.7	10.8785659	5.20E+08	32.8	0.62	0.14	1.11	4.86			
13	9:38 p. m.	1.129	1.136	1.139	0.019	1.110	1.117	1.120	1.116	0.005	95	99	1E+06	97	2.8	2.91590425	9.70E+08	66.6	0.37	0.18	1.89	3.93			
14	10:38 p. m.	1.351	1.342	1.347	0.016	1.335	1.326	1.331	1.331	0.005	143	137	1E+06	140	4.2	3.03045763	1.40E+09	96.0	0.21	0.06	3.23	12.07			
15	11:38 p. m.	1.432	1.421	1.417	0.014	1.418	1.407	1.403	1.409	0.008	172	175	1E+06	173.5	2.1	1.22266302	1.74E+09	121.2	0.10	0.03	7.02	26.28			
16	12:38 a. m.	1.464	1.458	1.467	0.016	1.448	1.442	1.451	1.447	0.005	186	197	1E+06	191.5	7.8	4.06170997	1.92E+09	129.9	-0.11	0.00	-6.12	36.60			
17	1:38 a. m.	1.499	1.483	1.487	0.015	1.484	1.468	1.472	1.475	0.008	179	163	1E+06	171	11.3	6.6162038	1.71E+09	112.9	-0.01	0.00	-6.05	255.89			
18	2:38 a. m.	1.495	1.49	1.499	0.016	1.479	1.474	1.483	1.479	0.005	148	157	1E+06	152.5	6.4	4.1730892	1.53E+09	103.3	-0.11	0.00	-52.51	75.34			
19	3:38 a. m.	1.513	1.501	1.505	0.014	1.499	1.487	1.491	1.492	0.006	158	143	1E+06	150.5	10.6	7.04757589	1.51E+09	98.9	-0.01	0.01	-103.97	129.65			
20	4:38 a. m.	1.519	1.522	1.517	0.019	1.500	1.503	1.498	1.500	0.003	155	144	1E+06	149.5	7.8	5.20279237	1.50E+09	100.2	-0.01	0.01	-4.58	72.90			
21	5:38 a. m.	1.543	1.534	1.528	0.016	1.514	1.518	1.512	1.515	0.003	126	131	1E+06	128.5	3.5	2.75138825	1.29E+09	88.4	-0.15	0.01	-7.39	105.33			
22	6:38 a. m.	1.544	1.542	1.53	0.014	1.530	1.528	1.516	1.525	0.008	120	114	1E+06	117	4.2	3.62618862	1.17E+09	79.7	-0.09	0.01	-14.40	69.27			
23	7:38 a. m.	1.55	1.566	1.552	0.016	1.534	1.550	1.536	1.540	0.009	116	107	1E+06	111.5	6.4	5.70758837	1.12E+09	74.3	-0.05	0.01	-4.98	128.44			
24	8:38 a. m.	1.561	1.572	1.569	0.019	1.542	1.553	1.550	1.548	0.006	102	92	1E+06	97	7.1	7.28976063	9.70E+08	63.6	-0.14	0.01	-4.98	128.44			

Anexo 3. Resultados estadísticos del % de pérdida de peso de polímeros corridos en Statgraphic.

<i>Level</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Std. Error</i>	<i>Lower Limit</i>	<i>Upper Limit</i>
GRAND MEAN	108	3.0572	0.0357592	2.98592	3.12849
Surfactante					
sin	36	1.48639	0.0619368	1.36292	1.60986
T20	36	3.45533	0.0619368	3.33186	3.5788
T80	36	4.22989	0.0619368	4.10642	4.35336
Tipo de agua					
Laguna	54	2.48989	0.0505712	2.38908	2.5907
MSM	54	3.62452	0.0505712	3.52371	3.72533
pH					
4.2	18	2.38611	0.0875918	2.2115	2.56072
5	18	2.81378	0.0875918	2.63917	2.98839
7	18	3.67194	0.0875918	3.49733	3.84656
9	18	3.23267	0.0875918	3.05806	3.40728
9.8	18	2.91972	0.0875918	2.74511	3.09433
sin mod pH	18	3.319	0.0875918	3.14439	3.49361
Surfactante by Tipo de agua					
sin Laguna	18	0.915667	0.0875918	0.741055	1.09028
sin MSM	18	2.05711	0.0875918	1.8825	2.23172
T20 Laguna	18	2.59256	0.0875918	2.41794	2.76717
T20 MSM	18	4.31811	0.0875918	4.1435	4.49272
T80 Laguna	18	3.96144	0.0875918	3.78683	4.13606
T80 MSM	18	4.49833	0.0875918	4.32372	4.67294
Surfactante by pH					
sin 4.2	6	0.885833	0.151713	0.583397	1.18827
sin 5	6	0.989667	0.151713	0.687231	1.2921
sin 7	6	2.05983	0.151713	1.7574	2.36227
sin 9	6	1.49683	0.151713	1.1944	1.79927
sin 9.8	6	1.33983	0.151713	1.0374	1.64227
sin sin mod pH	6	2.14633	0.151713	1.8439	2.44877
T20 4.2	6	2.61833	0.151713	2.3159	2.92077
T20 5	6	3.34767	0.151713	3.04523	3.6501
T20 7	6	4.0585	0.151713	3.75606	4.36094
T20 9	6	3.71467	0.151713	3.41223	4.0171
T20 9.8	6	3.1475	0.151713	2.84506	3.44994
T20 sin mod pH	6	3.84533	0.151713	3.5429	4.14777
T80 4.2	6	3.65417	0.151713	3.35173	3.9566
T80 5	6	4.104	0.151713	3.80156	4.40644
T80 7	6	4.8975	0.151713	4.59506	5.19994
T80 9	6	4.4865	0.151713	4.18406	4.78894
T80 9.8	6	4.27183	0.151713	3.9694	4.57427
T80 sin mod pH	6	3.96533	0.151713	3.6629	4.26777

Tipo de agua by pH						
Laguna	4.2	9	1.90044	0.123874	1.65351	2.14738
Laguna	5	9	2.10178	0.123874	1.85484	2.34872
Laguna	7	9	2.95433	0.123874	2.7074	3.20127
Laguna	9	9	2.62367	0.123874	2.37673	2.8706
Laguna	9.8	9	2.49678	0.123874	2.24984	2.74372
Laguna	sin mod pH	9	2.86233	0.123874	2.6154	3.10927
MSM	4.2	9	2.87178	0.123874	2.62484	3.11872
MSM	5	9	3.52578	0.123874	3.27884	3.77272
MSM	7	9	4.38956	0.123874	4.14262	4.63649
MSM	9	9	3.84167	0.123874	3.59473	4.0886
MSM	9.8	9	3.34267	0.123874	3.09573	3.5896
MSM	sin mod pH	9	3.77567	0.123874	3.52873	4.0226

Multiple Range Tests for %Perdida Mes 1 by Tratamiento

Method: 95.0 percent Tukey HSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
1	3	0.673667	X
2	3	0.760333	X
5	3	0.843667	XX
4	3	0.979	XXX
3	3	1.037	XXX
6	3	1.098	XXX
31	3	1.20033	XXX
7	3	1.219	XXXX
11	3	1.51933	XXXXX
10	3	1.836	XXXXX
9	3	2.01467	XXXXX
12	3	2.06167	XXXX
15	3	2.433	XXXX
14	3	2.66	XXXX
8	3	3.08267	XXXX
32	3	3.09233	XXXX
13	3	3.14867	XXXXX
22	3	3.48333	XXXXX
21	3	3.50833	XXXXX
35	3	3.654	XXXXX
16	3	3.71733	XXXXX
33	3	3.73267	XXXXX
26	3	3.8	XXXXXX
20	3	3.862	XXXXXX
34	3	3.958	XXXXXX
25	3	4.21367	XXXXXX
24	3	4.232	XXXXXX
36	3	4.27667	XXXXXX
30	3	4.33	XXXXX
17	3	4.63367	XXXX

23	3	4.67733	XXXX
27	3	4.72467	XXX
29	3	4.741	XXX
19	3	4.76933	XXX
18	3	4.96833	XX
28	3	5.11767	X

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
1 - 2		-0.0866667	1.21567
1 - 3		-0.3633333	1.21567
1 - 4		-0.3053333	1.21567
1 - 5		-0.17	1.21567
1 - 6		-0.4243333	1.21567
1 - 7		-0.5453333	1.21567
1 - 8	*	-2.409	1.21567
1 - 9	*	-1.341	1.21567
1 - 10		-1.16233	1.21567
1 - 11		-0.845667	1.21567
1 - 12	*	-1.388	1.21567
1 - 13	*	-2.475	1.21567
1 - 14	*	-1.98633	1.21567
1 - 15	*	-1.75933	1.21567
1 - 16	*	-3.04367	1.21567
1 - 17	*	-3.96	1.21567
1 - 18	*	-4.29467	1.21567
1 - 19	*	-4.09567	1.21567
1 - 20	*	-3.18833	1.21567
1 - 21	*	-2.83467	1.21567
1 - 22	*	-2.80967	1.21567
1 - 23	*	-4.00367	1.21567
1 - 24	*	-3.55833	1.21567
1 - 25	*	-3.54	1.21567
1 - 26	*	-3.12633	1.21567
1 - 27	*	-4.051	1.21567
1 - 28	*	-4.444	1.21567
1 - 29	*	-4.06733	1.21567
1 - 30	*	-3.65633	1.21567
1 - 31		-0.526667	1.21567
1 - 32	*	-2.41867	1.21567
1 - 33	*	-3.059	1.21567
1 - 34	*	-3.28433	1.21567
1 - 35	*	-2.98033	1.21567
1 - 36	*	-3.603	1.21567
2 - 3		-0.276667	1.21567
2 - 4		-0.218667	1.21567
2 - 5		-0.0833333	1.21567
2 - 6		-0.337667	1.21567
2 - 7		-0.458667	1.21567



2 - 8	*	-2.32233	1.21567
2 - 9	*	-1.25433	1.21567
2 - 10		-1.07567	1.21567
2 - 11		-0.759	1.21567
2 - 12	*	-1.30133	1.21567
2 - 13	*	-2.38833	1.21567
2 - 14	*	-1.89967	1.21567
2 - 15	*	-1.67267	1.21567
2 - 16	*	-2.957	1.21567
2 - 17	*	-3.87333	1.21567
2 - 18	*	-4.208	1.21567
2 - 19	*	-4.009	1.21567
2 - 20	*	-3.10167	1.21567
2 - 21	*	-2.748	1.21567
2 - 22	*	-2.723	1.21567
2 - 23	*	-3.917	1.21567
2 - 24	*	-3.47167	1.21567
2 - 25	*	-3.45333	1.21567
2 - 26	*	-3.03967	1.21567
2 - 27	*	-3.96433	1.21567
2 - 28	*	-4.35733	1.21567
2 - 29	*	-3.98067	1.21567
2 - 30	*	-3.56967	1.21567
2 - 31		-0.44	1.21567
2 - 32	*	-2.332	1.21567
2 - 33	*	-2.97233	1.21567
2 - 34	*	-3.19767	1.21567
2 - 35	*	-2.89367	1.21567
2 - 36	*	-3.51633	1.21567
3 - 4		0.058	1.21567
3 - 5		0.193333	1.21567
3 - 6		-0.061	1.21567
3 - 7		-0.182	1.21567
3 - 8	*	-2.04567	1.21567
3 - 9		-0.977667	1.21567
3 - 10		-0.799	1.21567
3 - 11		-0.482333	1.21567
3 - 12		-1.02467	1.21567
3 - 13	*	-2.11167	1.21567
3 - 14	*	-1.623	1.21567
3 - 15	*	-1.396	1.21567
3 - 16	*	-2.68033	1.21567
3 - 17	*	-3.59667	1.21567
3 - 18	*	-3.93133	1.21567
3 - 19	*	-3.73233	1.21567
3 - 20	*	-2.825	1.21567
3 - 21	*	-2.47133	1.21567
3 - 22	*	-2.44633	1.21567



3 - 23	*	-3.64033	1.21567
3 - 24	*	-3.195	1.21567
3 - 25	*	-3.17667	1.21567
3 - 26	*	-2.763	1.21567
3 - 27	*	-3.68767	1.21567
3 - 28	*	-4.08067	1.21567
3 - 29	*	-3.704	1.21567
3 - 30	*	-3.293	1.21567
3 - 31		-0.163333	1.21567
3 - 32	*	-2.05533	1.21567
3 - 33	*	-2.69567	1.21567
3 - 34	*	-2.921	1.21567
3 - 35	*	-2.617	1.21567
3 - 36	*	-3.23967	1.21567
4 - 5		0.135333	1.21567
4 - 6		-0.119	1.21567
4 - 7		-0.24	1.21567
4 - 8	*	-2.10367	1.21567
4 - 9		-1.03567	1.21567
4 - 10		-0.857	1.21567
4 - 11		-0.540333	1.21567
4 - 12		-1.08267	1.21567
4 - 13	*	-2.16967	1.21567
4 - 14	*	-1.681	1.21567
4 - 15	*	-1.454	1.21567
4 - 16	*	-2.73833	1.21567
4 - 17	*	-3.65467	1.21567
4 - 18	*	-3.98933	1.21567
4 - 19	*	-3.79033	1.21567
4 - 20	*	-2.883	1.21567
4 - 21	*	-2.52933	1.21567
4 - 22	*	-2.50433	1.21567
4 - 23	*	-3.69833	1.21567
4 - 24	*	-3.253	1.21567
4 - 25	*	-3.23467	1.21567
4 - 26	*	-2.821	1.21567
4 - 27	*	-3.74567	1.21567
4 - 28	*	-4.13867	1.21567
4 - 29	*	-3.762	1.21567
4 - 30	*	-3.351	1.21567
4 - 31		-0.221333	1.21567
4 - 32	*	-2.11333	1.21567
4 - 33	*	-2.75367	1.21567
4 - 34	*	-2.979	1.21567
4 - 35	*	-2.675	1.21567
4 - 36	*	-3.29767	1.21567
5 - 6		-0.254333	1.21567
5 - 7		-0.375333	1.21567



5 - 8	*	-2.239	1.21567
5 - 9		-1.171	1.21567
5 - 10		-0.992333	1.21567
5 - 11		-0.675667	1.21567
5 - 12	*	-1.218	1.21567
5 - 13	*	-2.305	1.21567
5 - 14	*	-1.81633	1.21567
5 - 15	*	-1.58933	1.21567
5 - 16	*	-2.87367	1.21567
5 - 17	*	-3.79	1.21567
5 - 18	*	-4.12467	1.21567
5 - 19	*	-3.92567	1.21567
5 - 20	*	-3.01833	1.21567
5 - 21	*	-2.66467	1.21567
5 - 22	*	-2.63967	1.21567
5 - 23	*	-3.83367	1.21567
5 - 24	*	-3.38833	1.21567
5 - 25	*	-3.37	1.21567
5 - 26	*	-2.95633	1.21567
5 - 27	*	-3.881	1.21567
5 - 28	*	-4.274	1.21567
5 - 29	*	-3.89733	1.21567
5 - 30	*	-3.48633	1.21567
5 - 31		-0.356667	1.21567
5 - 32	*	-2.24867	1.21567
5 - 33	*	-2.889	1.21567
5 - 34	*	-3.11433	1.21567
5 - 35	*	-2.81033	1.21567
5 - 36	*	-3.433	1.21567
6 - 7		-0.121	1.21567
6 - 8	*	-1.98467	1.21567
6 - 9		-0.916667	1.21567
6 - 10		-0.738	1.21567
6 - 11		-0.421333	1.21567
6 - 12		-0.963667	1.21567
6 - 13	*	-2.05067	1.21567
6 - 14	*	-1.562	1.21567
6 - 15	*	-1.335	1.21567
6 - 16	*	-2.61933	1.21567
6 - 17	*	-3.53567	1.21567
6 - 18	*	-3.87033	1.21567
6 - 19	*	-3.67133	1.21567
6 - 20	*	-2.764	1.21567
6 - 21	*	-2.41033	1.21567
6 - 22	*	-2.38533	1.21567
6 - 23	*	-3.57933	1.21567
6 - 24	*	-3.134	1.21567
6 - 25	*	-3.11567	1.21567



6 - 26	*	-2.702	1.21567
6 - 27	*	-3.62667	1.21567
6 - 28	*	-4.01967	1.21567
6 - 29	*	-3.643	1.21567
6 - 30	*	-3.232	1.21567
6 - 31		-0.102333	1.21567
6 - 32	*	-1.99433	1.21567
6 - 33	*	-2.63467	1.21567
6 - 34	*	-2.86	1.21567
6 - 35	*	-2.556	1.21567
6 - 36	*	-3.17867	1.21567
7 - 8	*	-1.86367	1.21567
7 - 9		-0.795667	1.21567
7 - 10		-0.617	1.21567
7 - 11		-0.300333	1.21567
7 - 12		-0.842667	1.21567
7 - 13	*	-1.92967	1.21567
7 - 14	*	-1.441	1.21567
7 - 15		-1.214	1.21567
7 - 16	*	-2.49833	1.21567
7 - 17	*	-3.41467	1.21567
7 - 18	*	-3.74933	1.21567
7 - 19	*	-3.55033	1.21567
7 - 20	*	-2.643	1.21567
7 - 21	*	-2.28933	1.21567
7 - 22	*	-2.26433	1.21567
7 - 23	*	-3.45833	1.21567
7 - 24	*	-3.013	1.21567
7 - 25	*	-2.99467	1.21567
7 - 26	*	-2.581	1.21567
7 - 27	*	-3.50567	1.21567
7 - 28	*	-3.89867	1.21567
7 - 29	*	-3.522	1.21567
7 - 30	*	-3.111	1.21567
7 - 31		0.0186667	1.21567
7 - 32	*	-1.87333	1.21567
7 - 33	*	-2.51367	1.21567
7 - 34	*	-2.739	1.21567
7 - 35	*	-2.435	1.21567
7 - 36	*	-3.05767	1.21567
8 - 9		1.068	1.21567
8 - 10	*	1.24667	1.21567
8 - 11	*	1.56333	1.21567
8 - 12		1.021	1.21567
8 - 13		-0.066	1.21567
8 - 14		0.422667	1.21567
8 - 15		0.649667	1.21567
8 - 16		-0.634667	1.21567



8 - 17	*	-1.551	1.21567
8 - 18	*	-1.88567	1.21567
8 - 19	*	-1.68667	1.21567
8 - 20		-0.779333	1.21567
8 - 21		-0.425667	1.21567
8 - 22		-0.400667	1.21567
8 - 23	*	-1.59467	1.21567
8 - 24		-1.14933	1.21567
8 - 25		-1.131	1.21567
8 - 26		-0.717333	1.21567
8 - 27	*	-1.642	1.21567
8 - 28	*	-2.035	1.21567
8 - 29	*	-1.65833	1.21567
8 - 30	*	-1.24733	1.21567
8 - 31	*	1.88233	1.21567
8 - 32		-0.00966667	1.21567
8 - 33		-0.65	1.21567
8 - 34		-0.875333	1.21567
8 - 35		-0.571333	1.21567
8 - 36		-1.194	1.21567
9 - 10		0.178667	1.21567
9 - 11		0.495333	1.21567
9 - 12		-0.047	1.21567
9 - 13		-1.134	1.21567
9 - 14		-0.645333	1.21567
9 - 15		-0.418333	1.21567
9 - 16	*	-1.70267	1.21567
9 - 17	*	-2.619	1.21567
9 - 18	*	-2.95367	1.21567
9 - 19	*	-2.75467	1.21567
9 - 20	*	-1.84733	1.21567
9 - 21	*	-1.49367	1.21567
9 - 22	*	-1.46867	1.21567
9 - 23	*	-2.66267	1.21567
9 - 24	*	-2.21733	1.21567
9 - 25	*	-2.199	1.21567
9 - 26	*	-1.78533	1.21567
9 - 27	*	-2.71	1.21567
9 - 28	*	-3.103	1.21567
9 - 29	*	-2.72633	1.21567
9 - 30	*	-2.31533	1.21567
9 - 31		0.814333	1.21567
9 - 32		-1.07767	1.21567
9 - 33	*	-1.718	1.21567
9 - 34	*	-1.94333	1.21567
9 - 35	*	-1.63933	1.21567
9 - 36	*	-2.262	1.21567
10 - 11		0.316667	1.21567



10 - 12		-0.225667	1.21567
10 - 13	*	-1.31267	1.21567
10 - 14		-0.824	1.21567
10 - 15		-0.597	1.21567
10 - 16	*	-1.88133	1.21567
10 - 17	*	-2.79767	1.21567
10 - 18	*	-3.13233	1.21567
10 - 19	*	-2.93333	1.21567
10 - 20	*	-2.026	1.21567
10 - 21	*	-1.67233	1.21567
10 - 22	*	-1.64733	1.21567
10 - 23	*	-2.84133	1.21567
10 - 24	*	-2.396	1.21567
10 - 25	*	-2.37767	1.21567
10 - 26	*	-1.964	1.21567
10 - 27	*	-2.88867	1.21567
10 - 28	*	-3.28167	1.21567
10 - 29	*	-2.905	1.21567
10 - 30	*	-2.494	1.21567
10 - 31		0.635667	1.21567
10 - 32	*	-1.25633	1.21567
10 - 33	*	-1.89667	1.21567
10 - 34	*	-2.122	1.21567
10 - 35	*	-1.818	1.21567
10 - 36	*	-2.44067	1.21567
11 - 12		-0.542333	1.21567
11 - 13	*	-1.62933	1.21567
11 - 14		-1.14067	1.21567
11 - 15		-0.913667	1.21567
11 - 16	*	-2.198	1.21567
11 - 17	*	-3.11433	1.21567
11 - 18	*	-3.449	1.21567
11 - 19	*	-3.25	1.21567
11 - 20	*	-2.34267	1.21567
11 - 21	*	-1.989	1.21567
11 - 22	*	-1.964	1.21567
11 - 23	*	-3.158	1.21567
11 - 24	*	-2.71267	1.21567
11 - 25	*	-2.69433	1.21567
11 - 26	*	-2.28067	1.21567
11 - 27	*	-3.20533	1.21567
11 - 28	*	-3.59833	1.21567
11 - 29	*	-3.22167	1.21567
11 - 30	*	-2.81067	1.21567
11 - 31		0.319	1.21567
11 - 32	*	-1.573	1.21567
11 - 33	*	-2.21333	1.21567
11 - 34	*	-2.43867	1.21567



11 - 35	*	-2.13467	1.21567
11 - 36	*	-2.75733	1.21567
12 - 13		-1.087	1.21567
12 - 14		-0.598333	1.21567
12 - 15		-0.371333	1.21567
12 - 16	*	-1.65567	1.21567
12 - 17	*	-2.572	1.21567
12 - 18	*	-2.90667	1.21567
12 - 19	*	-2.70767	1.21567
12 - 20	*	-1.80033	1.21567
12 - 21	*	-1.44667	1.21567
12 - 22	*	-1.42167	1.21567
12 - 23	*	-2.61567	1.21567
12 - 24	*	-2.17033	1.21567
12 - 25	*	-2.152	1.21567
12 - 26	*	-1.73833	1.21567
12 - 27	*	-2.663	1.21567
12 - 28	*	-3.056	1.21567
12 - 29	*	-2.67933	1.21567
12 - 30	*	-2.26833	1.21567
12 - 31		0.861333	1.21567
12 - 32		-1.03067	1.21567
12 - 33	*	-1.671	1.21567
12 - 34	*	-1.89633	1.21567
12 - 35	*	-1.59233	1.21567
12 - 36	*	-2.215	1.21567
13 - 14		0.488667	1.21567
13 - 15		0.715667	1.21567
13 - 16		-0.568667	1.21567
13 - 17	*	-1.485	1.21567
13 - 18	*	-1.81967	1.21567
13 - 19	*	-1.62067	1.21567
13 - 20		-0.713333	1.21567
13 - 21		-0.359667	1.21567
13 - 22		-0.334667	1.21567
13 - 23	*	-1.52867	1.21567
13 - 24		-1.08333	1.21567
13 - 25		-1.065	1.21567
13 - 26		-0.651333	1.21567
13 - 27	*	-1.576	1.21567
13 - 28	*	-1.969	1.21567
13 - 29	*	-1.59233	1.21567
13 - 30		-1.18133	1.21567
13 - 31	*	1.94833	1.21567
13 - 32		0.0563333	1.21567
13 - 33		-0.584	1.21567
13 - 34		-0.809333	1.21567
13 - 35		-0.505333	1.21567

13 - 36		-1.128	1.21567
14 - 15		0.227	1.21567
14 - 16		-1.05733	1.21567
14 - 17	*	-1.97367	1.21567
14 - 18	*	-2.30833	1.21567
14 - 19	*	-2.10933	1.21567
14 - 20		-1.202	1.21567
14 - 21		-0.848333	1.21567
14 - 22		-0.823333	1.21567
14 - 23	*	-2.01733	1.21567
14 - 24	*	-1.572	1.21567
14 - 25	*	-1.55367	1.21567
14 - 26		-1.14	1.21567
14 - 27	*	-2.06467	1.21567
14 - 28	*	-2.45767	1.21567
14 - 29	*	-2.081	1.21567
14 - 30	*	-1.67	1.21567
14 - 31	*	1.45967	1.21567
14 - 32		-0.432333	1.21567
14 - 33		-1.07267	1.21567
14 - 34	*	-1.298	1.21567
14 - 35		-0.994	1.21567
14 - 36	*	-1.61667	1.21567
15 - 16	*	-1.28433	1.21567
15 - 17	*	-2.20067	1.21567
15 - 18	*	-2.53533	1.21567
15 - 19	*	-2.33633	1.21567
15 - 20	*	-1.429	1.21567
15 - 21		-1.07533	1.21567
15 - 22		-1.05033	1.21567
15 - 23	*	-2.24433	1.21567
15 - 24	*	-1.799	1.21567
15 - 25	*	-1.78067	1.21567
15 - 26	*	-1.367	1.21567
15 - 27	*	-2.29167	1.21567
15 - 28	*	-2.68467	1.21567
15 - 29	*	-2.308	1.21567
15 - 30	*	-1.897	1.21567
15 - 31	*	1.23267	1.21567
15 - 32		-0.659333	1.21567
15 - 33	*	-1.29967	1.21567
15 - 34	*	-1.525	1.21567
15 - 35	*	-1.221	1.21567
15 - 36	*	-1.84367	1.21567
16 - 17		-0.916333	1.21567
16 - 18	*	-1.251	1.21567
16 - 19		-1.052	1.21567
16 - 20		-0.144667	1.21567



16 - 21		0.209	1.21567
16 - 22		0.234	1.21567
16 - 23		-0.96	1.21567
16 - 24		-0.514667	1.21567
16 - 25		-0.496333	1.21567
16 - 26		-0.0826667	1.21567
16 - 27		-1.00733	1.21567
16 - 28	*	-1.40033	1.21567
16 - 29		-1.02367	1.21567
16 - 30		-0.612667	1.21567
16 - 31	*	2.517	1.21567
16 - 32		0.625	1.21567
16 - 33		-0.0153333	1.21567
16 - 34		-0.240667	1.21567
16 - 35		0.0633333	1.21567
16 - 36		-0.559333	1.21567
17 - 18		-0.334667	1.21567
17 - 19		-0.135667	1.21567
17 - 20		0.771667	1.21567
17 - 21		1.12533	1.21567
17 - 22		1.15033	1.21567
17 - 23		-0.0436667	1.21567
17 - 24		0.401667	1.21567
17 - 25		0.42	1.21567
17 - 26		0.833667	1.21567
17 - 27		-0.091	1.21567
17 - 28		-0.484	1.21567
17 - 29		-0.107333	1.21567
17 - 30		0.303667	1.21567
17 - 31	*	3.43333	1.21567
17 - 32	*	1.54133	1.21567
17 - 33		0.901	1.21567
17 - 34		0.675667	1.21567
17 - 35		0.979667	1.21567
17 - 36		0.357	1.21567
18 - 19		0.199	1.21567
18 - 20		1.10633	1.21567
18 - 21	*	1.46	1.21567
18 - 22	*	1.485	1.21567
18 - 23		0.291	1.21567
18 - 24		0.736333	1.21567
18 - 25		0.754667	1.21567
18 - 26		1.16833	1.21567
18 - 27		0.243667	1.21567
18 - 28		-0.149333	1.21567
18 - 29		0.227333	1.21567
18 - 30		0.638333	1.21567
18 - 31	*	3.768	1.21567



18 - 32	*	1.876	1.21567
18 - 33	*	1.23567	1.21567
18 - 34		1.01033	1.21567
18 - 35	*	1.31433	1.21567
18 - 36		0.691667	1.21567
19 - 20		0.907333	1.21567
19 - 21	*	1.261	1.21567
19 - 22	*	1.286	1.21567
19 - 23		0.092	1.21567
19 - 24		0.537333	1.21567
19 - 25		0.555667	1.21567
19 - 26		0.969333	1.21567
19 - 27		0.0446667	1.21567
19 - 28		-0.348333	1.21567
19 - 29		0.0283333	1.21567
19 - 30		0.439333	1.21567
19 - 31	*	3.569	1.21567
19 - 32	*	1.677	1.21567
19 - 33		1.03667	1.21567
19 - 34		0.811333	1.21567
19 - 35		1.11533	1.21567
19 - 36		0.492667	1.21567
20 - 21		0.353667	1.21567
20 - 22		0.378667	1.21567
20 - 23		-0.815333	1.21567
20 - 24		-0.37	1.21567
20 - 25		-0.351667	1.21567
20 - 26		0.062	1.21567
20 - 27		-0.862667	1.21567
20 - 28	*	-1.25567	1.21567
20 - 29		-0.879	1.21567
20 - 30		-0.468	1.21567
20 - 31	*	2.66167	1.21567
20 - 32		0.769667	1.21567
20 - 33		0.129333	1.21567
20 - 34		-0.096	1.21567
20 - 35		0.208	1.21567
20 - 36		-0.414667	1.21567
21 - 22		0.025	1.21567
21 - 23		-1.169	1.21567
21 - 24		-0.723667	1.21567
21 - 25		-0.705333	1.21567
21 - 26		-0.291667	1.21567
21 - 27	*	-1.21633	1.21567
21 - 28	*	-1.60933	1.21567
21 - 29	*	-1.23267	1.21567
21 - 30		-0.821667	1.21567
21 - 31	*	2.308	1.21567



21 - 32		0.416	1.21567
21 - 33		-0.224333	1.21567
21 - 34		-0.449667	1.21567
21 - 35		-0.145667	1.21567
21 - 36		-0.768333	1.21567
22 - 23		-1.194	1.21567
22 - 24		-0.748667	1.21567
22 - 25		-0.730333	1.21567
22 - 26		-0.316667	1.21567
22 - 27	*	-1.24133	1.21567
22 - 28	*	-1.63433	1.21567
22 - 29	*	-1.25767	1.21567
22 - 30		-0.846667	1.21567
22 - 31	*	2.283	1.21567
22 - 32		0.391	1.21567
22 - 33		-0.249333	1.21567
22 - 34		-0.474667	1.21567
22 - 35		-0.170667	1.21567
22 - 36		-0.793333	1.21567
23 - 24		0.445333	1.21567
23 - 25		0.463667	1.21567
23 - 26		0.877333	1.21567
23 - 27		-0.0473333	1.21567
23 - 28		-0.440333	1.21567
23 - 29		-0.0636667	1.21567
23 - 30		0.347333	1.21567
23 - 31	*	3.477	1.21567
23 - 32	*	1.585	1.21567
23 - 33		0.944667	1.21567
23 - 34		0.719333	1.21567
23 - 35		1.02333	1.21567
23 - 36		0.400667	1.21567
24 - 25		0.0183333	1.21567
24 - 26		0.432	1.21567
24 - 27		-0.492667	1.21567
24 - 28		-0.885667	1.21567
24 - 29		-0.509	1.21567
24 - 30		-0.098	1.21567
24 - 31	*	3.03167	1.21567
24 - 32		1.13967	1.21567
24 - 33		0.499333	1.21567
24 - 34		0.274	1.21567
24 - 35		0.578	1.21567
24 - 36		-0.0446667	1.21567
25 - 26		0.413667	1.21567
25 - 27		-0.511	1.21567
25 - 28		-0.904	1.21567
25 - 29		-0.527333	1.21567

25 - 30		-0.116333	1.21567
25 - 31	*	3.01333	1.21567
25 - 32		1.12133	1.21567
25 - 33		0.481	1.21567
25 - 34		0.255667	1.21567
25 - 35		0.559667	1.21567
25 - 36		-0.063	1.21567
26 - 27		-0.924667	1.21567
26 - 28	*	-1.31767	1.21567
26 - 29		-0.941	1.21567
26 - 30		-0.53	1.21567
26 - 31	*	2.59967	1.21567
26 - 32		0.707667	1.21567
26 - 33		0.0673333	1.21567
26 - 34		-0.158	1.21567
26 - 35		0.146	1.21567
26 - 36		-0.476667	1.21567
27 - 28		-0.393	1.21567
27 - 29		-0.0163333	1.21567
27 - 30		0.394667	1.21567
27 - 31	*	3.52433	1.21567
27 - 32	*	1.63233	1.21567
27 - 33		0.992	1.21567
27 - 34		0.766667	1.21567
27 - 35		1.07067	1.21567
27 - 36		0.448	1.21567
28 - 29		0.376667	1.21567
28 - 30		0.787667	1.21567
28 - 31	*	3.91733	1.21567
28 - 32	*	2.02533	1.21567
28 - 33	*	1.385	1.21567
28 - 34		1.15967	1.21567
28 - 35	*	1.46367	1.21567
28 - 36		0.841	1.21567
29 - 30		0.411	1.21567
29 - 31	*	3.54067	1.21567
29 - 32	*	1.64867	1.21567
29 - 33		1.00833	1.21567
29 - 34		0.783	1.21567
29 - 35		1.087	1.21567
29 - 36		0.464333	1.21567
30 - 31	*	3.12967	1.21567
30 - 32	*	1.23767	1.21567
30 - 33		0.597333	1.21567
30 - 34		0.372	1.21567
30 - 35		0.676	1.21567
30 - 36		0.0533333	1.21567
31 - 32	*	-1.892	1.21567

31 - 33	*	-2.53233	1.21567
31 - 34	*	-2.75767	1.21567
31 - 35	*	-2.45367	1.21567
31 - 36	*	-3.07633	1.21567
32 - 33		-0.640333	1.21567
32 - 34		-0.865667	1.21567
32 - 35		-0.561667	1.21567
32 - 36		-1.18433	1.21567
33 - 34		-0.225333	1.21567
33 - 35		0.0786667	1.21567
33 - 36		-0.544	1.21567
34 - 35		0.304	1.21567
34 - 36		-0.318667	1.21567
35 - 36		-0.622667	1.21567

* denotes a statistically significant difference.

The StatAdvisor

This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. An asterisk has been placed next to 348 pairs, indicating that these pairs show statistically significant differences at the 95.0% confidence level. At the top of the page, 14 homogenous groups are identified using columns of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Tukey's honestly significant difference (HSD) procedure. With this method, there is a 5.0% risk of calling one or more pairs significantly different when their actual difference equals 0.

ANALISIS DE VARIANZA FACTORIAL

Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Surfactante	144.0	2	72.02	521.50	0.0000
Tipo de agua	34.76	1	34.76	251.69	0.0000
pH	18.1	5	3.621	26.22	0.0000
Surfactante*Tipo de agua	6.359	2	3.179	23.02	0.0000
Surfactante*pH	4.181	10	0.4181	3.03	0.0030
Tipo de agua*pH	1.53	5	0.306	2.22	0.0619
Surfactante*Tipo de agua*pH	8.34	10	0.834	6.04	0.0000
Residual	9.943	72	0.1381		
Total (corrected)	227.3	107			

R-Squared = 95.62 percent

R-Squared (adjusted for d.f.) = 93.5 percent

Standard Error of Est. = 0.3716

Mean absolute error = 0.2131

Durbin-Watson statistic = 2.233 (P=0.8859)

Multiple Comparisons for %Perdida Mes 1 by Surfactante

Method: 95.0 percent Tukey HSD

Surfactante	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
sin	36	1.48639	0.0619368	X
T20	36	3.45533	0.0619368	X
T80	36	4.22989	0.0619368	X

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
sin - T20	*	-1.96894	0.209629
sin - T80	*	-2.7435	0.209629
T20 - T80	*	-0.774556	0.209629

* denotes a statistically significant difference.

Multiple Comparisons for %Perdida Mes 1 by Tipo de agua

Method: 95.0 percent Tukey HSD

Tipo de agua	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Laguna	54	2.48989	0.0505712	X
MSM	54	3.62452	0.0505712	X

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
Laguna - MSM	*	-1.13463	0.14257

* denotes a statistically significant difference.

Multiple Comparisons for %Perdida Mes 1 by pH

Method: 95.0 percent Tukey HSD

pH	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
4.2	18	2.38611	0.0875918	X
5	18	2.81378	0.0875918	X
9.8	18	2.91972	0.0875918	XX
9	18	3.23267	0.0875918	XX
sin mod pH	18	3.319	0.0875918	XX
7	18	3.67194	0.0875918	X

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
4.2 - 5	*	-0.427667	0.362679
4.2 - 7	*	-1.28583	0.362679
4.2 - 9	*	-0.846556	0.362679
4.2 - 9.8	*	-0.533611	0.362679
4.2 - sin mod pH	*	-0.932889	0.362679
5 - 7	*	-0.858167	0.362679
5 - 9	*	-0.418889	0.362679
5 - 9.8		-0.105944	0.362679

5 - sin mod pH	*	-0.505222	0.362679
7 - 9	*	0.439278	0.362679
7 - 9.8	*	0.752222	0.362679
7 - sin mod pH		0.352944	0.362679
9 - 9.8		0.312944	0.362679
9 - sin mod pH		-0.0863333	0.362679
9.8 - sin mod pH	*	-0.399278	0.362679

* denotes a statistically significant difference.

Summary Statistics for %Perdida Mes 1

<i>Tratamiento</i>	<i>Count</i>	<i>Average</i>	<i>Standard deviation</i>	<i>Coeff. of variation</i>	<i>Range</i>
1	3	0.673667	0.497739	73.8851%	0.981
2	3	0.760333	0.202446	26.6259%	0.401
3	3	1.037	0.108171	10.4312%	0.199
4	3	0.979	0.711117	72.6371%	1.411
5	3	0.843667	0.103365	12.2519%	0.199
6	3	1.098	0.0569298	5.18486%	0.109
7	3	1.219	0.216723	17.7788%	0.401
8	3	3.08267	0.637875	20.6923%	1.151
9	3	2.01467	0.139472	6.92281%	0.276
10	3	1.836	0.24157	13.1574%	0.474
11	3	1.51933	0.161445	10.626%	0.293
12	3	2.06167	0.236272	11.4602%	0.467
13	3	3.14867	0.519225	16.4903%	1.037
14	3	2.66	0.566601	21.3008%	1.025
15	3	2.433	0.202156	8.30891%	0.4
16	3	3.71733	0.545854	14.684%	1.057
17	3	4.63367	0.458988	9.90551%	0.906
18	3	4.96833	0.879784	17.7078%	1.756
19	3	4.76933	0.289659	6.07336%	0.553
20	3	3.862	0.43223	11.1919%	0.853
21	3	3.50833	0.0909634	2.59278%	0.174
22	3	3.48333	0.0871569	2.50211%	0.163
23	3	4.67733	0.060302	1.28924%	0.113
24	3	4.232	0.0597578	1.41205%	0.104
25	3	4.21367	0.175015	4.15351%	0.339
26	3	3.8	0.123887	3.26019%	0.228
27	3	4.72467	0.0799396	1.69196%	0.151
28	3	5.11767	0.124821	2.43903%	0.249
29	3	4.741	0.156144	3.29349%	0.306
30	3	4.33	0.163	3.76443%	0.299
31	3	1.20033	0.196136	16.3401%	0.388
32	3	3.09233	0.262611	8.49231%	0.524
33	3	3.73267	0.508714	13.6287%	0.994
34	3	3.958	0.134347	3.3943%	0.238
35	3	3.654	0.89507	24.4956%	1.619
36	3	4.27667	0.160637	3.75613%	0.321
Total	108	3.0572	1.45736	47.6697%	5.582

<i>Tratamiento</i>	<i>Std. skewness</i>	<i>Std. kurtosis</i>
1	0.60033	
2	0.495242	
3	1.14562	
4	0.451217	
5	-0.897953	
6	0.943681	
7	1.1268	
8	1.19164	
9	-0.51744	
10	-0.67575	
11	1.18044	
12	0.543693	
13	0.193342	
14	-1.18693	
15	0.52003	
16	-0.842415	
17	-0.571134	
18	-0.232621	
19	-0.96524	
20	-0.575362	
21	-0.950821	
22	-1.08408	
23	1.07493	
24	-1.22436	
25	-0.839429	
26	-1.14444	
27	-1.03356	
28	-0.261615	
29	-0.694629	
30	1.15413	
31	0.525159	
32	-0.248861	
33	-0.736368	
34	1.21551	
35	1.18718	
36	0.151519	
Total	-1.23889	-2.58681

The StatAdvisor

This table shows various statistics for each of the 36 columns of data. To test for significant differences amongst the column means, select Analysis of Variance from the list of Tabular Options. Select Means Plot from the list of Graphical Options to display the means graphically.

WARNING: There is more than a 3 to 1 difference between the smallest standard deviation and the largest. This may cause problems since the



analysis of variance assumes that the standard deviations at all levels are equal. Select Variance Check from the list of Tabular Options to run a formal statistical test for differences among the sigmas. You may want to consider transforming the data to remove any dependence of the standard deviation on the mean.

**Table of Least Squares Means for %Perdida Mes 2
with 95.0 Percent Confidence Intervals**

			<i>Std.</i>	<i>Lower</i>	<i>Upper</i>
<i>Level</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Error</i>	<i>Limit</i>	<i>Limit</i>
GRAND MEAN	108	3.55491	0.0373773	3.4804	3.62942
Surfactante					
sin	36	1.87817	0.0647393	1.74911	2.00722
T20	36	3.93406	0.0647393	3.805	4.06311
T80	36	4.8525	0.0647393	4.72344	4.98156
Tipo de agua					
Laguna	54	2.9365	0.0528594	2.83113	3.04187
MSM	54	4.17331	0.0528594	4.06794	4.27869
pH					
4.2	18	2.94139	0.0915552	2.75888	3.1239
5	18	3.44483	0.0915552	3.26232	3.62735
7	18	4.20511	0.0915552	4.0226	4.38762
9	18	3.60667	0.0915552	3.42415	3.78918
9.8	18	3.37989	0.0915552	3.19738	3.5624
sin mod pH	18	3.75156	0.0915552	3.56904	3.93407
Surfactante by Tipo de agua					
sin Laguna	18	1.14678	0.0915552	0.964265	1.32929
sin MSM	18	2.60956	0.0915552	2.42704	2.79207
T20 Laguna	18	3.09211	0.0915552	2.9096	3.27462
T20 MSM	18	4.776	0.0915552	4.59349	4.95851
T80 Laguna	18	4.57061	0.0915552	4.3881	4.75312
T80 MSM	18	5.13439	0.0915552	4.95188	5.3169
Surfactante by pH					
sin 4.2	6	1.35483	0.158578	1.03871	1.67095
sin 5	6	1.094	0.158578	0.777879	1.41012
sin 7	6	2.63267	0.158578	2.31655	2.94879
sin 9	6	1.89167	0.158578	1.57555	2.20779
sin 9.8	6	1.69683	0.158578	1.38071	2.01295
sin sin mod pH	6	2.599	0.158578	2.28288	2.91512
T20 4.2	6	3.40333	0.158578	3.08721	3.71945
T20 5	6	4.277	0.158578	3.96088	4.59312
T20 7	6	4.3635	0.158578	4.04738	4.67962
T20 9	6	3.96583	0.158578	3.64971	4.28195
T20 9.8	6	3.59567	0.158578	3.27955	3.91179
T20 sin mod pH	6	3.999	0.158578	3.68288	4.31512
T80 4.2	6	4.066	0.158578	3.74988	4.38212
T80 5	6	4.9635	0.158578	4.64738	5.27962
T80 7	6	5.61917	0.158578	5.30305	5.93529
T80 9	6	4.9625	0.158578	4.64638	5.27862
T80 9.8	6	4.84717	0.158578	4.53105	5.16329
T80 sin mod pH	6	4.65667	0.158578	4.34055	4.97279
Tipo de agua by pH					
Laguna 4.2	9	2.30622	0.129479	2.04811	2.56433
Laguna 5	9	2.76878	0.129479	2.51067	3.02689

Laguna	7	9	3.435	0.129479	3.17689	3.69311
Laguna	9	9	3.08511	0.129479	2.827	3.34322
Laguna	9.8	9	2.84022	0.129479	2.58211	3.09833
Laguna	sin mod pH	9	3.18367	0.129479	2.92556	3.44178
MSM	4.2	9	3.57656	0.129479	3.31844	3.83467
MSM	5	9	4.12089	0.129479	3.86278	4.379
MSM	7	9	4.97522	0.129479	4.71711	5.23333
MSM	9	9	4.12822	0.129479	3.87011	4.38633
MSM	9.8	9	3.91956	0.129479	3.66144	4.17767
MSM	sin mod pH	9	4.31944	0.129479	4.06133	4.57756

ANALISIS DE VARIANZA FACTORIAL MES 2

Analysis of Variance for %Perdida Mes 2

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	256.589	35	7.33111	48.59	0.0000
Residual	10.8635	72	0.150882		
Total (Corr.)	267.452	107			

Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Surfactante	167.003	2	83.5013	553.42	0.0000
Tipo de agua	41.3022	1	41.3022	273.74	0.0000
pH	15.8988	5	3.17976	21.07	0.0000
Surfactante*Tipo de agua	6.33522	2	3.16761	20.99	0.0000
Surfactante*pH	8.00114	10	0.800114	5.30	0.0000
Tipo de agua*pH	0.805513	5	0.161103	1.07	0.3855
Surfactante*Tipo de agua*pH	17.2435	10	1.72435	11.43	0.0000
Residual	10.8635	72	0.150882		
Total (corrected)	267.452	107			

Multiple Comparisons for %Perdida Mes 2 by Surfactante

Method: 95.0 percent Tukey HSD

Surfactante	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
sin	36	1.87817	0.0647393	X
T20	36	3.93406	0.0647393	X
T80	36	4.8525	0.0647393	X

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
sin - T20	*	-2.05589	0.219114
sin - T80	*	-2.97433	0.219114
T20 - T80	*	-0.918444	0.219114

* denotes a statistically significant difference.

Multiple Comparisons for %Perdida Mes 2 by Tipo de agua

Method: 95.0 percent Tukey HSD

<i>Tipo de agua</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Laguna	54	2.9365	0.0528594	X
MSM	54	4.17331	0.0528594	X

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
Laguna - MSM	*	-1.23681	0.149021

* denotes a statistically significant difference.

Multiple Comparisons for %Perdida Mes 2 by pH

Method: 95.0 percent Tukey HSD

<i>pH</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
4.2	18	2.94139	0.0915552	X
9.8	18	3.37989	0.0915552	X
5	18	3.44483	0.0915552	X
9	18	3.60667	0.0915552	X
sin mod pH	18	3.75156	0.0915552	X
7	18	4.20511	0.0915552	X

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
4.2 - 5	*	-0.503444	0.37909
4.2 - 7	*	-1.26372	0.37909
4.2 - 9	*	-0.665278	0.37909
4.2 - 9.8	*	-0.4385	0.37909
4.2 - sin mod pH	*	-0.810167	0.37909
5 - 7	*	-0.760278	0.37909
5 - 9		-0.161833	0.37909
5 - 9.8		0.0649444	0.37909
5 - sin mod pH		-0.306722	0.37909
7 - 9	*	0.598444	0.37909
7 - 9.8	*	0.825222	0.37909
7 - sin mod pH	*	0.453556	0.37909
9 - 9.8		0.226778	0.37909
9 - sin mod pH		-0.144889	0.37909
9.8 - sin mod pH		-0.371667	0.37909

* denotes a statistically significant difference.

DESCRIPTIVO

Summary Statistics for %Perdida Mes 2

<i>Tratamiento</i>	<i>Count</i>	<i>Average</i>	<i>Standard deviation</i>	<i>Coeff. of variation</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	<i>Range</i>
1	3	1.358	0.732623	53.9487%	0.555	1.99	1.435
2	3	0.878	0.249994	28.4731%	0.717	1.166	0.449
3	3	1.19867	0.0997112	8.31851%	1.084	1.265	0.181
4	3	1.07533	0.245508	22.8309%	0.867	1.346	0.479
5	3	1.006	0.0648151	6.44286%	0.935	1.062	0.127
6	3	1.35167	0.0359212	2.65755%	1.313	1.384	0.071
7	3	1.31	0.476257	36.3555%	0.819	1.77	0.951
8	3	4.06667	0.702716	17.2799%	3.566	4.87	1.304
9	3	2.708	0.643802	23.7741%	2.244	3.443	1.199
10	3	2.38767	0.435002	18.2187%	2.078	2.885	0.807
11	3	1.91	0.7805	40.8639%	1.039	2.546	1.507
12	3	3.25633	0.356853	10.9587%	2.857	3.544	0.687
13	3	3.69733	0.555504	15.0244%	3.143	4.254	1.111
14	3	3.28233	0.132364	4.03263%	3.156	3.42	0.264
15	3	2.584	0.146164	5.65651%	2.486	2.752	0.266
16	3	4.89667	0.648006	13.2336%	4.247	5.543	1.296
17	3	5.29767	0.307178	5.79836%	4.956	5.551	0.595
18	3	5.02967	0.908963	18.072%	4.028	5.802	1.774
19	3	4.64933	0.120658	2.59517%	4.516	4.751	0.235
20	3	4.60733	0.335895	7.29044%	4.372	4.992	0.62
21	3	3.65067	0.06914	1.8939%	3.571	3.695	0.124
22	3	4.172	0.0795676	1.90718%	4.082	4.233	0.151
23	3	5.409	0.0341174	0.630753%	5.381	5.447	0.066
24	3	4.89767	0.152959	3.12309%	4.734	5.037	0.303
25	3	4.93067	0.0542801	1.10087%	4.868	4.963	0.095
26	3	4.48133	0.231651	5.16925%	4.215	4.636	0.421
27	3	5.755	0.136737	2.37597%	5.662	5.912	0.25
28	3	5.82933	0.116899	2.00535%	5.698	5.922	0.224
29	3	5.02733	0.0397157	0.789994%	4.984	5.062	0.078
30	3	4.76367	0.0730365	1.5332%	4.721	4.848	0.127
31	3	1.36467	0.0854244	6.25973%	1.268	1.43	0.162
32	3	3.83333	0.674401	17.5931%	3.363	4.606	1.243
33	3	3.82267	0.503363	13.1679%	3.271	4.257	0.986
34	3	4.17533	0.153787	3.68322%	4.065	4.351	0.286
35	3	4.36367	0.0973156	2.23013%	4.305	4.476	0.171
36	3	4.94967	0.0215019	0.434412%	4.926	4.968	0.042
Total	108	3.55491	1.581	44.4737%	0.555	5.922	5.367

<i>Tratamiento</i>	<i>Std. skewness</i>	<i>Std. kurtosis</i>
1	-0.702237	
2	1.19931	
3	-1.18	
4	0.75581	
5	-0.696957	

6	-0.543581	
7	-0.20624	
8	1.11627	
9	1.10209	
10	1.11726	
11	-0.871207	
12	-0.898208	
13	0.0133653	
14	0.270451	
15	1.17438	
16	-0.0163676	
17	-0.839357	
18	-0.751716	
19	-0.777588	
20	1.13504	
21	-1.20144	
22	-1.00568	
23	0.85253	
24	-0.493393	
25	-1.22287	
26	-1.17744	
27	1.16306	
28	-0.937351	
29	-0.6613	
30	1.22449	
31	-1.01011	
32	1.1398	
33	-0.701415	
34	1.10783	
35	1.22111	
36	-0.740699	
Total	-1.83636	-2.39358

TUKEY

Multiple Range Tests for %Perdida Mes 2 by Tratamiento

Method: 95.0 percent Tukey HSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
2	3	0.878	X
5	3	1.006	X
4	3	1.07533	X
3	3	1.19867	XX
7	3	1.31	XX
6	3	1.35167	XXX
1	3	1.358	XXX
31	3	1.36467	XXX
11	3	1.91	XXXX

10	3	2.38767	XXXX
15	3	2.584	XXXX
9	3	2.708	XXX
12	3	3.25633	XXX
14	3	3.28233	XXX
21	3	3.65067	XXXX
13	3	3.69733	XXXX
33	3	3.82267	XXXXX
32	3	3.83333	XXXXX
8	3	4.06667	XXXXX
22	3	4.172	XXXXXX
34	3	4.17533	XXXXXX
35	3	4.36367	XXXXXX
26	3	4.48133	XXXXXX
20	3	4.60733	XXXXXX
19	3	4.64933	XXXXXX
30	3	4.76367	XXXXXX
16	3	4.89667	XXXXXX
24	3	4.89767	XXXXXX
25	3	4.93067	XXXXX
36	3	4.94967	XXXXX
29	3	5.02733	XXXX
18	3	5.02967	XXXX
17	3	5.29767	XXX
23	3	5.409	XX
27	3	5.755	X
28	3	5.82933	X

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
1 - 2		0.48	1.27068
1 - 3		0.159333	1.27068
1 - 4		0.282667	1.27068
1 - 5		0.352	1.27068
1 - 6		0.00633333	1.27068
1 - 7		0.048	1.27068
1 - 8	*	-2.70867	1.27068
1 - 9	*	-1.35	1.27068
1 - 10		-1.02967	1.27068
1 - 11		-0.552	1.27068
1 - 12	*	-1.89833	1.27068
1 - 13	*	-2.33933	1.27068
1 - 14	*	-1.92433	1.27068
1 - 15		-1.226	1.27068
1 - 16	*	-3.53867	1.27068
1 - 17	*	-3.93967	1.27068
1 - 18	*	-3.67167	1.27068
1 - 19	*	-3.29133	1.27068
1 - 20	*	-3.24933	1.27068



1 - 21	*	-2.29267	1.27068
1 - 22	*	-2.814	1.27068
1 - 23	*	-4.051	1.27068
1 - 24	*	-3.53967	1.27068
1 - 25	*	-3.57267	1.27068
1 - 26	*	-3.12333	1.27068
1 - 27	*	-4.397	1.27068
1 - 28	*	-4.47133	1.27068
1 - 29	*	-3.66933	1.27068
1 - 30	*	-3.40567	1.27068
1 - 31		-0.00666667	1.27068
1 - 32	*	-2.47533	1.27068
1 - 33	*	-2.46467	1.27068
1 - 34	*	-2.81733	1.27068
1 - 35	*	-3.00567	1.27068
1 - 36	*	-3.59167	1.27068
2 - 3		-0.320667	1.27068
2 - 4		-0.197333	1.27068
2 - 5		-0.128	1.27068
2 - 6		-0.473667	1.27068
2 - 7		-0.432	1.27068
2 - 8	*	-3.18867	1.27068
2 - 9	*	-1.83	1.27068
2 - 10	*	-1.50967	1.27068
2 - 11		-1.032	1.27068
2 - 12	*	-2.37833	1.27068
2 - 13	*	-2.81933	1.27068
2 - 14	*	-2.40433	1.27068
2 - 15	*	-1.706	1.27068
2 - 16	*	-4.01867	1.27068
2 - 17	*	-4.41967	1.27068
2 - 18	*	-4.15167	1.27068
2 - 19	*	-3.77133	1.27068
2 - 20	*	-3.72933	1.27068
2 - 21	*	-2.77267	1.27068
2 - 22	*	-3.294	1.27068
2 - 23	*	-4.531	1.27068
2 - 24	*	-4.01967	1.27068
2 - 25	*	-4.05267	1.27068
2 - 26	*	-3.60333	1.27068
2 - 27	*	-4.877	1.27068
2 - 28	*	-4.95133	1.27068
2 - 29	*	-4.14933	1.27068
2 - 30	*	-3.88567	1.27068
2 - 31		-0.486667	1.27068
2 - 32	*	-2.95533	1.27068
2 - 33	*	-2.94467	1.27068
2 - 34	*	-3.29733	1.27068



2 - 35	*	-3.48567	1.27068
2 - 36	*	-4.07167	1.27068
3 - 4		0.123333	1.27068
3 - 5		0.192667	1.27068
3 - 6		-0.153	1.27068
3 - 7		-0.111333	1.27068
3 - 8	*	-2.868	1.27068
3 - 9	*	-1.50933	1.27068
3 - 10		-1.189	1.27068
3 - 11		-0.711333	1.27068
3 - 12	*	-2.05767	1.27068
3 - 13	*	-2.49867	1.27068
3 - 14	*	-2.08367	1.27068
3 - 15	*	-1.38533	1.27068
3 - 16	*	-3.698	1.27068
3 - 17	*	-4.099	1.27068
3 - 18	*	-3.831	1.27068
3 - 19	*	-3.45067	1.27068
3 - 20	*	-3.40867	1.27068
3 - 21	*	-2.452	1.27068
3 - 22	*	-2.97333	1.27068
3 - 23	*	-4.21033	1.27068
3 - 24	*	-3.699	1.27068
3 - 25	*	-3.732	1.27068
3 - 26	*	-3.28267	1.27068
3 - 27	*	-4.55633	1.27068
3 - 28	*	-4.63067	1.27068
3 - 29	*	-3.82867	1.27068
3 - 30	*	-3.565	1.27068
3 - 31		-0.166	1.27068
3 - 32	*	-2.63467	1.27068
3 - 33	*	-2.624	1.27068
3 - 34	*	-2.97667	1.27068
3 - 35	*	-3.165	1.27068
3 - 36	*	-3.751	1.27068
4 - 5		0.0693333	1.27068
4 - 6		-0.276333	1.27068
4 - 7		-0.234667	1.27068
4 - 8	*	-2.99133	1.27068
4 - 9	*	-1.63267	1.27068
4 - 10	*	-1.31233	1.27068
4 - 11		-0.834667	1.27068
4 - 12	*	-2.181	1.27068
4 - 13	*	-2.622	1.27068
4 - 14	*	-2.207	1.27068
4 - 15	*	-1.50867	1.27068
4 - 16	*	-3.82133	1.27068
4 - 17	*	-4.22233	1.27068



4 - 18	*	-3.95433	1.27068
4 - 19	*	-3.574	1.27068
4 - 20	*	-3.532	1.27068
4 - 21	*	-2.57533	1.27068
4 - 22	*	-3.09667	1.27068
4 - 23	*	-4.33367	1.27068
4 - 24	*	-3.82233	1.27068
4 - 25	*	-3.85533	1.27068
4 - 26	*	-3.406	1.27068
4 - 27	*	-4.67967	1.27068
4 - 28	*	-4.754	1.27068
4 - 29	*	-3.952	1.27068
4 - 30	*	-3.68833	1.27068
4 - 31		-0.289333	1.27068
4 - 32	*	-2.758	1.27068
4 - 33	*	-2.74733	1.27068
4 - 34	*	-3.1	1.27068
4 - 35	*	-3.28833	1.27068
4 - 36	*	-3.87433	1.27068
5 - 6		-0.345667	1.27068
5 - 7		-0.304	1.27068
5 - 8	*	-3.06067	1.27068
5 - 9	*	-1.702	1.27068
5 - 10	*	-1.38167	1.27068
5 - 11		-0.904	1.27068
5 - 12	*	-2.25033	1.27068
5 - 13	*	-2.69133	1.27068
5 - 14	*	-2.27633	1.27068
5 - 15	*	-1.578	1.27068
5 - 16	*	-3.89067	1.27068
5 - 17	*	-4.29167	1.27068
5 - 18	*	-4.02367	1.27068
5 - 19	*	-3.64333	1.27068
5 - 20	*	-3.60133	1.27068
5 - 21	*	-2.64467	1.27068
5 - 22	*	-3.166	1.27068
5 - 23	*	-4.403	1.27068
5 - 24	*	-3.89167	1.27068
5 - 25	*	-3.92467	1.27068
5 - 26	*	-3.47533	1.27068
5 - 27	*	-4.749	1.27068
5 - 28	*	-4.82333	1.27068
5 - 29	*	-4.02133	1.27068
5 - 30	*	-3.75767	1.27068
5 - 31		-0.358667	1.27068
5 - 32	*	-2.82733	1.27068
5 - 33	*	-2.81667	1.27068
5 - 34	*	-3.16933	1.27068



5 - 35	*	-3.35767	1.27068
5 - 36	*	-3.94367	1.27068
6 - 7		0.0416667	1.27068
6 - 8	*	-2.715	1.27068
6 - 9	*	-1.35633	1.27068
6 - 10		-1.036	1.27068
6 - 11		-0.558333	1.27068
6 - 12	*	-1.90467	1.27068
6 - 13	*	-2.34567	1.27068
6 - 14	*	-1.93067	1.27068
6 - 15		-1.23233	1.27068
6 - 16	*	-3.545	1.27068
6 - 17	*	-3.946	1.27068
6 - 18	*	-3.678	1.27068
6 - 19	*	-3.29767	1.27068
6 - 20	*	-3.25567	1.27068
6 - 21	*	-2.299	1.27068
6 - 22	*	-2.82033	1.27068
6 - 23	*	-4.05733	1.27068
6 - 24	*	-3.546	1.27068
6 - 25	*	-3.579	1.27068
6 - 26	*	-3.12967	1.27068
6 - 27	*	-4.40333	1.27068
6 - 28	*	-4.47767	1.27068
6 - 29	*	-3.67567	1.27068
6 - 30	*	-3.412	1.27068
6 - 31		-0.013	1.27068
6 - 32	*	-2.48167	1.27068
6 - 33	*	-2.471	1.27068
6 - 34	*	-2.82367	1.27068
6 - 35	*	-3.012	1.27068
6 - 36	*	-3.598	1.27068
7 - 8	*	-2.75667	1.27068
7 - 9	*	-1.398	1.27068
7 - 10		-1.07767	1.27068
7 - 11		-0.6	1.27068
7 - 12	*	-1.94633	1.27068
7 - 13	*	-2.38733	1.27068
7 - 14	*	-1.97233	1.27068
7 - 15	*	-1.274	1.27068
7 - 16	*	-3.58667	1.27068
7 - 17	*	-3.98767	1.27068
7 - 18	*	-3.71967	1.27068
7 - 19	*	-3.33933	1.27068
7 - 20	*	-3.29733	1.27068
7 - 21	*	-2.34067	1.27068
7 - 22	*	-2.862	1.27068
7 - 23	*	-4.099	1.27068



7 - 24	*	-3.58767	1.27068
7 - 25	*	-3.62067	1.27068
7 - 26	*	-3.17133	1.27068
7 - 27	*	-4.445	1.27068
7 - 28	*	-4.51933	1.27068
7 - 29	*	-3.71733	1.27068
7 - 30	*	-3.45367	1.27068
7 - 31		-0.0546667	1.27068
7 - 32	*	-2.52333	1.27068
7 - 33	*	-2.51267	1.27068
7 - 34	*	-2.86533	1.27068
7 - 35	*	-3.05367	1.27068
7 - 36	*	-3.63967	1.27068
8 - 9	*	1.35867	1.27068
8 - 10	*	1.679	1.27068
8 - 11	*	2.15667	1.27068
8 - 12		0.810333	1.27068
8 - 13		0.369333	1.27068
8 - 14		0.784333	1.27068
8 - 15	*	1.48267	1.27068
8 - 16		-0.83	1.27068
8 - 17		-1.231	1.27068
8 - 18		-0.963	1.27068
8 - 19		-0.582667	1.27068
8 - 20		-0.540667	1.27068
8 - 21		0.416	1.27068
8 - 22		-0.105333	1.27068
8 - 23	*	-1.34233	1.27068
8 - 24		-0.831	1.27068
8 - 25		-0.864	1.27068
8 - 26		-0.414667	1.27068
8 - 27	*	-1.68833	1.27068
8 - 28	*	-1.76267	1.27068
8 - 29		-0.960667	1.27068
8 - 30		-0.697	1.27068
8 - 31	*	2.702	1.27068
8 - 32		0.233333	1.27068
8 - 33		0.244	1.27068
8 - 34		-0.108667	1.27068
8 - 35		-0.297	1.27068
8 - 36		-0.883	1.27068
9 - 10		0.320333	1.27068
9 - 11		0.798	1.27068
9 - 12		-0.548333	1.27068
9 - 13		-0.989333	1.27068
9 - 14		-0.574333	1.27068
9 - 15		0.124	1.27068
9 - 16	*	-2.18867	1.27068



9 - 17	*	-2.58967	1.27068
9 - 18	*	-2.32167	1.27068
9 - 19	*	-1.94133	1.27068
9 - 20	*	-1.89933	1.27068
9 - 21		-0.942667	1.27068
9 - 22	*	-1.464	1.27068
9 - 23	*	-2.701	1.27068
9 - 24	*	-2.18967	1.27068
9 - 25	*	-2.22267	1.27068
9 - 26	*	-1.77333	1.27068
9 - 27	*	-3.047	1.27068
9 - 28	*	-3.12133	1.27068
9 - 29	*	-2.31933	1.27068
9 - 30	*	-2.05567	1.27068
9 - 31	*	1.34333	1.27068
9 - 32		-1.12533	1.27068
9 - 33		-1.11467	1.27068
9 - 34	*	-1.46733	1.27068
9 - 35	*	-1.65567	1.27068
9 - 36	*	-2.24167	1.27068
10 - 11		0.477667	1.27068
10 - 12		-0.868667	1.27068
10 - 13	*	-1.30967	1.27068
10 - 14		-0.894667	1.27068
10 - 15		-0.196333	1.27068
10 - 16	*	-2.509	1.27068
10 - 17	*	-2.91	1.27068
10 - 18	*	-2.642	1.27068
10 - 19	*	-2.26167	1.27068
10 - 20	*	-2.21967	1.27068
10 - 21		-1.263	1.27068
10 - 22	*	-1.78433	1.27068
10 - 23	*	-3.02133	1.27068
10 - 24	*	-2.51	1.27068
10 - 25	*	-2.543	1.27068
10 - 26	*	-2.09367	1.27068
10 - 27	*	-3.36733	1.27068
10 - 28	*	-3.44167	1.27068
10 - 29	*	-2.63967	1.27068
10 - 30	*	-2.376	1.27068
10 - 31		1.023	1.27068
10 - 32	*	-1.44567	1.27068
10 - 33	*	-1.435	1.27068
10 - 34	*	-1.78767	1.27068
10 - 35	*	-1.976	1.27068
10 - 36	*	-2.562	1.27068
11 - 12	*	-1.34633	1.27068
11 - 13	*	-1.78733	1.27068



11 - 14	*	-1.37233	1.27068
11 - 15		-0.674	1.27068
11 - 16	*	-2.98667	1.27068
11 - 17	*	-3.38767	1.27068
11 - 18	*	-3.11967	1.27068
11 - 19	*	-2.73933	1.27068
11 - 20	*	-2.69733	1.27068
11 - 21	*	-1.74067	1.27068
11 - 22	*	-2.262	1.27068
11 - 23	*	-3.499	1.27068
11 - 24	*	-2.98767	1.27068
11 - 25	*	-3.02067	1.27068
11 - 26	*	-2.57133	1.27068
11 - 27	*	-3.845	1.27068
11 - 28	*	-3.91933	1.27068
11 - 29	*	-3.11733	1.27068
11 - 30	*	-2.85367	1.27068
11 - 31		0.545333	1.27068
11 - 32	*	-1.92333	1.27068
11 - 33	*	-1.91267	1.27068
11 - 34	*	-2.26533	1.27068
11 - 35	*	-2.45367	1.27068
11 - 36	*	-3.03967	1.27068
12 - 13		-0.441	1.27068
12 - 14		-0.026	1.27068
12 - 15		0.672333	1.27068
12 - 16	*	-1.64033	1.27068
12 - 17	*	-2.04133	1.27068
12 - 18	*	-1.77333	1.27068
12 - 19	*	-1.393	1.27068
12 - 20	*	-1.351	1.27068
12 - 21		-0.394333	1.27068
12 - 22		-0.915667	1.27068
12 - 23	*	-2.15267	1.27068
12 - 24	*	-1.64133	1.27068
12 - 25	*	-1.67433	1.27068
12 - 26		-1.225	1.27068
12 - 27	*	-2.49867	1.27068
12 - 28	*	-2.573	1.27068
12 - 29	*	-1.771	1.27068
12 - 30	*	-1.50733	1.27068
12 - 31	*	1.89167	1.27068
12 - 32		-0.577	1.27068
12 - 33		-0.566333	1.27068
12 - 34		-0.919	1.27068
12 - 35		-1.10733	1.27068
12 - 36	*	-1.69333	1.27068
13 - 14		0.415	1.27068

13 - 15		1.11333	1.27068
13 - 16		-1.19933	1.27068
13 - 17	*	-1.60033	1.27068
13 - 18	*	-1.33233	1.27068
13 - 19		-0.952	1.27068
13 - 20		-0.91	1.27068
13 - 21		0.0466667	1.27068
13 - 22		-0.474667	1.27068
13 - 23	*	-1.71167	1.27068
13 - 24		-1.20033	1.27068
13 - 25		-1.23333	1.27068
13 - 26		-0.784	1.27068
13 - 27	*	-2.05767	1.27068
13 - 28	*	-2.132	1.27068
13 - 29	*	-1.33	1.27068
13 - 30		-1.06633	1.27068
13 - 31	*	2.33267	1.27068
13 - 32		-0.136	1.27068
13 - 33		-0.125333	1.27068
13 - 34		-0.478	1.27068
13 - 35		-0.666333	1.27068
13 - 36		-1.25233	1.27068
14 - 15		0.698333	1.27068
14 - 16	*	-1.61433	1.27068
14 - 17	*	-2.01533	1.27068
14 - 18	*	-1.74733	1.27068
14 - 19	*	-1.367	1.27068
14 - 20	*	-1.325	1.27068
14 - 21		-0.368333	1.27068
14 - 22		-0.889667	1.27068
14 - 23	*	-2.12667	1.27068
14 - 24	*	-1.61533	1.27068
14 - 25	*	-1.64833	1.27068
14 - 26		-1.199	1.27068
14 - 27	*	-2.47267	1.27068
14 - 28	*	-2.547	1.27068
14 - 29	*	-1.745	1.27068
14 - 30	*	-1.48133	1.27068
14 - 31	*	1.91767	1.27068
14 - 32		-0.551	1.27068
14 - 33		-0.540333	1.27068
14 - 34		-0.893	1.27068
14 - 35		-1.08133	1.27068
14 - 36	*	-1.66733	1.27068
15 - 16	*	-2.31267	1.27068
15 - 17	*	-2.71367	1.27068
15 - 18	*	-2.44567	1.27068
15 - 19	*	-2.06533	1.27068



15 - 20	*	-2.02333	1.27068
15 - 21		-1.06667	1.27068
15 - 22	*	-1.588	1.27068
15 - 23	*	-2.825	1.27068
15 - 24	*	-2.31367	1.27068
15 - 25	*	-2.34667	1.27068
15 - 26	*	-1.89733	1.27068
15 - 27	*	-3.171	1.27068
15 - 28	*	-3.24533	1.27068
15 - 29	*	-2.44333	1.27068
15 - 30	*	-2.17967	1.27068
15 - 31		1.21933	1.27068
15 - 32		-1.24933	1.27068
15 - 33		-1.23867	1.27068
15 - 34	*	-1.59133	1.27068
15 - 35	*	-1.77967	1.27068
15 - 36	*	-2.36567	1.27068
16 - 17		-0.401	1.27068
16 - 18		-0.133	1.27068
16 - 19		0.247333	1.27068
16 - 20		0.289333	1.27068
16 - 21		1.246	1.27068
16 - 22		0.724667	1.27068
16 - 23		-0.512333	1.27068
16 - 24		-0.001	1.27068
16 - 25		-0.034	1.27068
16 - 26		0.415333	1.27068
16 - 27		-0.858333	1.27068
16 - 28		-0.932667	1.27068
16 - 29		-0.130667	1.27068
16 - 30		0.133	1.27068
16 - 31	*	3.532	1.27068
16 - 32		1.06333	1.27068
16 - 33		1.074	1.27068
16 - 34		0.721333	1.27068
16 - 35		0.533	1.27068
16 - 36		-0.053	1.27068
17 - 18		0.268	1.27068
17 - 19		0.648333	1.27068
17 - 20		0.690333	1.27068
17 - 21	*	1.647	1.27068
17 - 22		1.12567	1.27068
17 - 23		-0.111333	1.27068
17 - 24		0.4	1.27068
17 - 25		0.367	1.27068
17 - 26		0.816333	1.27068
17 - 27		-0.457333	1.27068
17 - 28		-0.531667	1.27068



17 - 29		0.270333	1.27068
17 - 30		0.534	1.27068
17 - 31	*	3.933	1.27068
17 - 32	*	1.46433	1.27068
17 - 33	*	1.475	1.27068
17 - 34		1.12233	1.27068
17 - 35		0.934	1.27068
17 - 36		0.348	1.27068
18 - 19		0.380333	1.27068
18 - 20		0.422333	1.27068
18 - 21	*	1.379	1.27068
18 - 22		0.857667	1.27068
18 - 23		-0.379333	1.27068
18 - 24		0.132	1.27068
18 - 25		0.099	1.27068
18 - 26		0.548333	1.27068
18 - 27		-0.725333	1.27068
18 - 28		-0.799667	1.27068
18 - 29		0.00233333	1.27068
18 - 30		0.266	1.27068
18 - 31	*	3.665	1.27068
18 - 32		1.19633	1.27068
18 - 33		1.207	1.27068
18 - 34		0.854333	1.27068
18 - 35		0.666	1.27068
18 - 36		0.08	1.27068
19 - 20		0.042	1.27068
19 - 21		0.998667	1.27068
19 - 22		0.477333	1.27068
19 - 23		-0.759667	1.27068
19 - 24		-0.248333	1.27068
19 - 25		-0.281333	1.27068
19 - 26		0.168	1.27068
19 - 27		-1.10567	1.27068
19 - 28		-1.18	1.27068
19 - 29		-0.378	1.27068
19 - 30		-0.114333	1.27068
19 - 31	*	3.28467	1.27068
19 - 32		0.816	1.27068
19 - 33		0.826667	1.27068
19 - 34		0.474	1.27068
19 - 35		0.285667	1.27068
19 - 36		-0.300333	1.27068
20 - 21		0.956667	1.27068
20 - 22		0.435333	1.27068
20 - 23		-0.801667	1.27068
20 - 24		-0.290333	1.27068
20 - 25		-0.323333	1.27068



20 - 26		0.126	1.27068
20 - 27		-1.14767	1.27068
20 - 28		-1.222	1.27068
20 - 29		-0.42	1.27068
20 - 30		-0.156333	1.27068
20 - 31	*	3.24267	1.27068
20 - 32		0.774	1.27068
20 - 33		0.784667	1.27068
20 - 34		0.432	1.27068
20 - 35		0.243667	1.27068
20 - 36		-0.342333	1.27068
21 - 22		-0.521333	1.27068
21 - 23	*	-1.75833	1.27068
21 - 24		-1.247	1.27068
21 - 25	*	-1.28	1.27068
21 - 26		-0.830667	1.27068
21 - 27	*	-2.10433	1.27068
21 - 28	*	-2.17867	1.27068
21 - 29	*	-1.37667	1.27068
21 - 30		-1.113	1.27068
21 - 31	*	2.286	1.27068
21 - 32		-0.182667	1.27068
21 - 33		-0.172	1.27068
21 - 34		-0.524667	1.27068
21 - 35		-0.713	1.27068
21 - 36	*	-1.299	1.27068
22 - 23		-1.237	1.27068
22 - 24		-0.725667	1.27068
22 - 25		-0.758667	1.27068
22 - 26		-0.309333	1.27068
22 - 27	*	-1.583	1.27068
22 - 28	*	-1.65733	1.27068
22 - 29		-0.855333	1.27068
22 - 30		-0.591667	1.27068
22 - 31	*	2.80733	1.27068
22 - 32		0.338667	1.27068
22 - 33		0.349333	1.27068
22 - 34		-0.00333333	1.27068
22 - 35		-0.191667	1.27068
22 - 36		-0.777667	1.27068
23 - 24		0.511333	1.27068
23 - 25		0.478333	1.27068
23 - 26		0.927667	1.27068
23 - 27		-0.346	1.27068
23 - 28		-0.420333	1.27068
23 - 29		0.381667	1.27068
23 - 30		0.645333	1.27068
23 - 31	*	4.04433	1.27068



23 - 32	*	1.57567	1.27068
23 - 33	*	1.58633	1.27068
23 - 34		1.23367	1.27068
23 - 35		1.04533	1.27068
23 - 36		0.459333	1.27068
24 - 25		-0.033	1.27068
24 - 26		0.416333	1.27068
24 - 27		-0.857333	1.27068
24 - 28		-0.931667	1.27068
24 - 29		-0.129667	1.27068
24 - 30		0.134	1.27068
24 - 31	*	3.533	1.27068
24 - 32		1.06433	1.27068
24 - 33		1.075	1.27068
24 - 34		0.722333	1.27068
24 - 35		0.534	1.27068
24 - 36		-0.052	1.27068
25 - 26		0.449333	1.27068
25 - 27		-0.824333	1.27068
25 - 28		-0.898667	1.27068
25 - 29		-0.0966667	1.27068
25 - 30		0.167	1.27068
25 - 31	*	3.566	1.27068
25 - 32		1.09733	1.27068
25 - 33		1.108	1.27068
25 - 34		0.755333	1.27068
25 - 35		0.567	1.27068
25 - 36		-0.019	1.27068
26 - 27	*	-1.27367	1.27068
26 - 28	*	-1.348	1.27068
26 - 29		-0.546	1.27068
26 - 30		-0.282333	1.27068
26 - 31	*	3.11667	1.27068
26 - 32		0.648	1.27068
26 - 33		0.658667	1.27068
26 - 34		0.306	1.27068
26 - 35		0.117667	1.27068
26 - 36		-0.468333	1.27068
27 - 28		-0.0743333	1.27068
27 - 29		0.727667	1.27068
27 - 30		0.991333	1.27068
27 - 31	*	4.39033	1.27068
27 - 32	*	1.92167	1.27068
27 - 33	*	1.93233	1.27068
27 - 34	*	1.57967	1.27068
27 - 35	*	1.39133	1.27068
27 - 36		0.805333	1.27068
28 - 29		0.802	1.27068

28 - 30		1.06567	1.27068
28 - 31	*	4.46467	1.27068
28 - 32	*	1.996	1.27068
28 - 33	*	2.00667	1.27068
28 - 34	*	1.654	1.27068
28 - 35	*	1.46567	1.27068
28 - 36		0.879667	1.27068
29 - 30		0.263667	1.27068
29 - 31	*	3.66267	1.27068
29 - 32		1.194	1.27068
29 - 33		1.20467	1.27068
29 - 34		0.852	1.27068
29 - 35		0.663667	1.27068
29 - 36		0.0776667	1.27068
30 - 31	*	3.399	1.27068
30 - 32		0.930333	1.27068
30 - 33		0.941	1.27068
30 - 34		0.588333	1.27068
30 - 35		0.4	1.27068
30 - 36		-0.186	1.27068
31 - 32	*	-2.46867	1.27068
31 - 33	*	-2.458	1.27068
31 - 34	*	-2.81067	1.27068
31 - 35	*	-2.999	1.27068
31 - 36	*	-3.585	1.27068
32 - 33		0.0106667	1.27068
32 - 34		-0.342	1.27068
32 - 35		-0.530333	1.27068
32 - 36		-1.11633	1.27068
33 - 34		-0.352667	1.27068
33 - 35		-0.541	1.27068
33 - 36		-1.127	1.27068
34 - 35		-0.188333	1.27068
34 - 36		-0.774333	1.27068
35 - 36		-0.586	1.27068

* denotes a statistically significant difference.

95.0% confidence intervals for coefficient estimates (%Perdida Mes 3)

<i>Parameter</i>	<i>Estimate</i>	<i>Standard</i>	
		<i>Error</i>	<i>Lower Limit</i>
CONSTANT	3.79278	0.0348895	3.72323
Surfactante	-1.76033	0.0493412	-1.85869
Surfactante	0.249083	0.0493412	0.150723
Tipo de agua	-0.651926	0.0348895	-0.721477
pH	-0.552556	0.0780153	-0.708077
pH	-0.194444	0.0780153	-0.349965
pH	0.722611	0.0780153	0.56709
pH	0.173	0.0780153	0.017479
pH	-0.267278	0.0780153	-0.422799
Surfactante*Tipo de agua	0.103491	0.0493412	0.00513061
Surfactante*Tipo de agua	-0.286065	0.0493412	-0.384425
Surfactante*pH	0.353083	0.11033	0.133143
Surfactante*pH	-0.217306	0.11033	-0.437245
Surfactante*pH	-0.0613611	0.11033	-0.281301
Surfactante*pH	-0.229417	0.11033	-0.449357
Surfactante*pH	0.0256389	0.11033	-0.194301
Surfactante*pH	0.0580833	0.11033	-0.161857
Surfactante*pH	0.162528	0.11033	-0.0574122
Surfactante*pH	0.144472	0.11033	-0.0754677
Surfactante*pH	0.152917	0.11033	-0.0670233
Surfactante*pH	-0.676194	0.11033	-0.896134
Tipo de agua*pH	-0.0581481	0.0780153	-0.213669
Tipo de agua*pH	0.161907	0.0780153	0.00638639
Tipo de agua*pH	0.00751852	0.0780153	-0.148002
Tipo de agua*pH	-0.0426481	0.0780153	-0.198169
Tipo de agua*pH	-0.0817037	0.0780153	-0.237225
Surfactante*Tipo de agua*pH	0.213231	0.11033	-0.00670845
Surfactante*Tipo de agua*pH	-0.124824	0.11033	-0.344764
Surfactante*Tipo de agua*pH	-0.0251019	0.11033	-0.245042
Surfactante*Tipo de agua*pH	0.207065	0.11033	-0.0128751
Surfactante*Tipo de agua*pH	-0.475546	0.11033	-0.695486
Surfactante*Tipo de agua*pH	0.382954	0.11033	0.163014
Surfactante*Tipo de agua*pH	-0.359269	0.11033	-0.579208
Surfactante*Tipo de agua*pH	-0.150546	0.11033	-0.370486
Surfactante*Tipo de agua*pH	-0.155546	0.11033	-0.375486
Surfactante*Tipo de agua*pH	0.0166759	0.11033	-0.203264

The StatAdvisor

This table shows 95.0% confidence intervals for the coefficients in the model.

Confidence intervals show how precisely the coefficients can be estimated given the amount of available data and the noise which is present.

Also included are variance inflation factors, which can be used to measure the extent to which the predictor variables are correlated amongst themselves. VIF's above 10, of which there are 0, are usually considered to indicate

serious multicollinearity. Serious multicollinearity greatly increases the estimation error of the model coefficients as compared with an orthogonal sample.

General Linear Models

Number of dependent variables: 1

Number of categorical factors: 3

A=Surfactante

B=Tipo de agua

C=pH

Number of quantitative factors: 0

Number of observations: 108

Analysis of Variance for %Perdida Mes 3

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	284.672	35	8.13348	61.87	0.0000
Residual	9.46556	72	0.131466		
Total (Corr.)	294.137	107			

Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Surfactante	196.009	2	98.0045	745.47	0.0000
Tipo de agua	45.9008	1	45.9008	349.15	0.0000
pH	17.6533	5	3.53067	26.86	0.0000
Surfactante*Tipo de agua	4.53156	2	2.26578	17.23	0.0000
Surfactante*pH	8.9563	10	0.89563	6.81	0.0000
Tipo de agua*pH	0.689707	5	0.137941	1.05	0.3957
Surfactante*Tipo de agua*pH	10.9313	10	1.09313	8.31	0.0000
Residual	9.46556	72	0.131466		
Total (corrected)	294.137	107			

R-Squared = 96.7819 percent

R-Squared (adjusted for d.f.) = 95.2176 percent

Standard Error of Est. = 0.362582

Mean absolute error = 0.221432

Durbin-Watson statistic = 3.05369 (P=1.0000)

Multiple Comparisons for %Perdida Mes 3 by Surfactante

Method: 95.0 percent Tukey HSD

Surfactante	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
sin	36	2.03244	0.0604304	X
T20	36	4.04186	0.0604304	X
T80	36	5.30403	0.0604304	X

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
sin - T20	*	-2.00942	0.20453

sin - T80	*	-3.27158	0.20453
T20 - T80	*	-1.26217	0.20453

* denotes a statistically significant difference.

The StatAdvisor

This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. An asterisk has been placed next to 3 pairs, indicating that these pairs show statistically significant differences at the 95.0% confidence level. At the top of the page, 3 homogenous groups are identified using columns of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Tukey's honestly significant difference (HSD) procedure. With this method, there is a 5.0% risk of calling one or more pairs significantly different when their actual difference equals 0.

Multiple Comparisons for %Perdida Mes 3 by Tipo de agua

Method: 95.0 percent Tukey HSD

<i>Tipo de agua</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Laguna	54	3.14085	0.0493412	X
MSM	54	4.4447	0.0493412	X

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
Laguna - MSM	*	-1.30385	0.139102

* denotes a statistically significant difference.

The StatAdvisor

This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. An asterisk has been placed next to 1 pair, indicating that this pair shows a statistically significant difference at the 95.0% confidence level. At the top of the page, 2 homogenous groups are identified using columns of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Tukey's honestly significant difference (HSD) procedure. With this method, there is a 5.0% risk of calling one or more pairs significantly different when their actual difference equals 0.

Multiple Comparisons for %Perdida Mes 3 by pH

Method: 95.0 percent Tukey HSD

<i>pH</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
4.2	18	3.24022	0.0854615	X
9.8	18	3.5255	0.0854615	XX

5	18	3.59833	0.0854615	XX
sin mod pH	18	3.91144	0.0854615	XX
9	18	3.96578	0.0854615	X
7	18	4.51539	0.0854615	X

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
4.2 - 5	*	-0.358111	0.353858
4.2 - 7	*	-1.27517	0.353858
4.2 - 9	*	-0.725556	0.353858
4.2 - 9.8		-0.285278	0.353858
4.2 - sin mod pH	*	-0.671222	0.353858
5 - 7	*	-0.917056	0.353858
5 - 9	*	-0.367444	0.353858
5 - 9.8		0.0728333	0.353858
5 - sin mod pH		-0.313111	0.353858
7 - 9	*	0.549611	0.353858
7 - 9.8	*	0.989889	0.353858
7 - sin mod pH	*	0.603944	0.353858
9 - 9.8	*	0.440278	0.353858
9 - sin mod pH		0.0543333	0.353858
9.8 - sin mod pH	*	-0.385944	0.353858

* denotes a statistically significant difference.

The StatAdvisor

This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. An asterisk has been placed next to 11 pairs, indicating that these pairs show statistically significant differences at the 95.0% confidence level. At the top of the page, 5 homogenous groups are identified using columns of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Tukey's honestly significant difference (HSD) procedure. With this method, there is a 5.0% risk of calling one or more pairs significantly different when their actual difference equals 0.

Summary Statistics for %Perdida Mes 3

<i>Tratamiento</i>	<i>Count</i>	<i>Average</i>	<i>Standard deviation</i>	<i>Coeff. of variation</i>	<i>Range</i>
1	3	0.815667	0.168352	20.6398%	0.327
2	3	1.24667	0.473437	37.9762%	0.938
3	3	1.32933	0.310635	23.3678%	0.563
4	3	1.10467	0.068413	6.19309%	0.136
5	3	1.10133	0.294057	26.7001%	0.588
6	3	1.569	0.060531	3.85793%	0.116
7	3	1.607	0.589959	36.7118%	1.154
8	3	4.29033	0.173275	4.03874%	0.341
9	3	3.14	0.759899	24.2006%	1.435

10	3	2.582	0.343856	13.3174%	0.619
11	3	2.645	0.236381	8.9369%	0.452
12	3	3.29	0.708966	21.5491%	1.322
13	3	3.75467	0.839051	22.3469%	1.565
14	3	3.41567	0.435629	12.7538%	0.837
15	3	2.62533	0.157865	6.01314%	0.292
16	3	4.59233	0.500452	10.8976%	0.901
17	3	5.111	0.262795	5.14175%	0.511
18	3	5.33967	0.471297	8.82635%	0.93
19	3	4.89133	0.195342	3.99363%	0.385
20	3	4.465	0.32883	7.36461%	0.621
21	3	4.265	0.0622656	1.45992%	0.121
22	3	4.477	0.114839	2.56509%	0.228
23	3	6.02067	0.103718	1.72269%	0.192
24	3	5.39867	0.293538	5.43722%	0.539
25	3	5.022	0.145503	2.8973%	0.291
26	3	5.55433	0.374567	6.74369%	0.709
27	3	5.85833	0.117798	2.01077%	0.235
28	3	6.35767	0.115941	1.82364%	0.207
29	3	5.84433	0.125954	2.15514%	0.241
30	3	5.35733	0.229587	4.28548%	0.414
31	3	1.59	0.246075	15.4764%	0.458
32	3	4.01333	0.165437	4.12218%	0.326
33	3	3.988	0.140823	3.53116%	0.268
34	3	4.38433	0.250053	5.70332%	0.487
35	3	4.44567	0.704074	15.8373%	1.239
36	3	5.04733	0.112882	2.23647%	0.219
Total	108	3.79278	1.658	43.7145%	5.802

<i>Tratamiento</i>	<i>Std. skewness</i>	<i>Std. kurtosis</i>
1	-0.809404	
2	0.489354	
3	-1.18324	
4	0.39663	
5	-0.0721028	
6	0.936579	
7	-0.721515	
8	-0.627222	
9	-1.03512	
10	-1.19568	
11	-0.953551	
12	-1.09693	
13	1.09576	
14	0.915309	
15	1.12794	
16	-1.19549	
17	-0.796934	
18	0.577448	

19	0.600378	
20	-1.0348	
21	0.803998	
22	-0.434725	
23	-1.12509	
24	-1.15122	
25	-0.0218679	
26	-1.02152	
27	-0.25936	
28	-1.20745	
29	0.948659	
30	-1.1928	
31	1.1046	
32	-0.603807	
33	0.987357	
34	-0.777996	
35	-1.2203	
36	-0.82239	
Total	-1.7327	-2.26589

Multiple Range Tests for %Perdida Mes 3 by Tratamiento

Method: 95.0 percent Tukey HSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
1	3	0.815667	X
5	3	1.10133	X
4	3	1.10467	X
2	3	1.24667	X
3	3	1.32933	X
6	3	1.569	XX
31	3	1.59	XX
7	3	1.607	XX
10	3	2.582	XX
15	3	2.62533	XX
11	3	2.645	XX
9	3	3.14	XX
12	3	3.29	XXX
14	3	3.41567	XXXX
13	3	3.75467	XXXXX
33	3	3.988	XXXXX
32	3	4.01333	XXXXX
21	3	4.265	XXXXXX
8	3	4.29033	XXXXXX
34	3	4.38433	XXXXXX
35	3	4.44567	XXXXXX
20	3	4.465	XXXXXX

22	3	4.477	XXXXX
16	3	4.59233	XXXXX
19	3	4.89133	XXXXX
25	3	5.022	XXXX
36	3	5.04733	XXXX
17	3	5.111	XXXX
18	3	5.33967	XXXX
30	3	5.35733	XXXX
24	3	5.39867	XXXX
26	3	5.55433	XXX
29	3	5.84433	XX
27	3	5.85833	XX
23	3	6.02067	XX
28	3	6.35767	X

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
1 - 2		-0.431	1.18611
1 - 3		-0.513667	1.18611
1 - 4		-0.289	1.18611
1 - 5		-0.285667	1.18611
1 - 6		-0.753333	1.18611
1 - 7		-0.791333	1.18611
1 - 8	*	-3.47467	1.18611
1 - 9	*	-2.32433	1.18611
1 - 10	*	-1.76633	1.18611
1 - 11	*	-1.82933	1.18611
1 - 12	*	-2.47433	1.18611
1 - 13	*	-2.939	1.18611
1 - 14	*	-2.6	1.18611
1 - 15	*	-1.80967	1.18611
1 - 16	*	-3.77667	1.18611
1 - 17	*	-4.29533	1.18611
1 - 18	*	-4.524	1.18611
1 - 19	*	-4.07567	1.18611
1 - 20	*	-3.64933	1.18611
1 - 21	*	-3.44933	1.18611
1 - 22	*	-3.66133	1.18611
1 - 23	*	-5.205	1.18611
1 - 24	*	-4.583	1.18611
1 - 25	*	-4.20633	1.18611
1 - 26	*	-4.73867	1.18611
1 - 27	*	-5.04267	1.18611
1 - 28	*	-5.542	1.18611
1 - 29	*	-5.02867	1.18611
1 - 30	*	-4.54167	1.18611
1 - 31		-0.774333	1.18611
1 - 32	*	-3.19767	1.18611
1 - 33	*	-3.17233	1.18611



1 - 34	*	-3.56867	1.18611
1 - 35	*	-3.63	1.18611
1 - 36	*	-4.23167	1.18611
2 - 3		-0.0826667	1.18611
2 - 4		0.142	1.18611
2 - 5		0.145333	1.18611
2 - 6		-0.322333	1.18611
2 - 7		-0.360333	1.18611
2 - 8	*	-3.04367	1.18611
2 - 9	*	-1.89333	1.18611
2 - 10	*	-1.33533	1.18611
2 - 11	*	-1.39833	1.18611
2 - 12	*	-2.04333	1.18611
2 - 13	*	-2.508	1.18611
2 - 14	*	-2.169	1.18611
2 - 15	*	-1.37867	1.18611
2 - 16	*	-3.34567	1.18611
2 - 17	*	-3.86433	1.18611
2 - 18	*	-4.093	1.18611
2 - 19	*	-3.64467	1.18611
2 - 20	*	-3.21833	1.18611
2 - 21	*	-3.01833	1.18611
2 - 22	*	-3.23033	1.18611
2 - 23	*	-4.774	1.18611
2 - 24	*	-4.152	1.18611
2 - 25	*	-3.77533	1.18611
2 - 26	*	-4.30767	1.18611
2 - 27	*	-4.61167	1.18611
2 - 28	*	-5.111	1.18611
2 - 29	*	-4.59767	1.18611
2 - 30	*	-4.11067	1.18611
2 - 31		-0.343333	1.18611
2 - 32	*	-2.76667	1.18611
2 - 33	*	-2.74133	1.18611
2 - 34	*	-3.13767	1.18611
2 - 35	*	-3.199	1.18611
2 - 36	*	-3.80067	1.18611
3 - 4		0.224667	1.18611
3 - 5		0.228	1.18611
3 - 6		-0.239667	1.18611
3 - 7		-0.277667	1.18611
3 - 8	*	-2.961	1.18611
3 - 9	*	-1.81067	1.18611
3 - 10	*	-1.25267	1.18611
3 - 11	*	-1.31567	1.18611
3 - 12	*	-1.96067	1.18611
3 - 13	*	-2.42533	1.18611
3 - 14	*	-2.08633	1.18611



3 - 15	*	-1.296	1.18611
3 - 16	*	-3.263	1.18611
3 - 17	*	-3.78167	1.18611
3 - 18	*	-4.01033	1.18611
3 - 19	*	-3.562	1.18611
3 - 20	*	-3.13567	1.18611
3 - 21	*	-2.93567	1.18611
3 - 22	*	-3.14767	1.18611
3 - 23	*	-4.69133	1.18611
3 - 24	*	-4.06933	1.18611
3 - 25	*	-3.69267	1.18611
3 - 26	*	-4.225	1.18611
3 - 27	*	-4.529	1.18611
3 - 28	*	-5.02833	1.18611
3 - 29	*	-4.515	1.18611
3 - 30	*	-4.028	1.18611
3 - 31		-0.260667	1.18611
3 - 32	*	-2.684	1.18611
3 - 33	*	-2.65867	1.18611
3 - 34	*	-3.055	1.18611
3 - 35	*	-3.11633	1.18611
3 - 36	*	-3.718	1.18611
4 - 5		0.00333333	1.18611
4 - 6		-0.464333	1.18611
4 - 7		-0.502333	1.18611
4 - 8	*	-3.18567	1.18611
4 - 9	*	-2.03533	1.18611
4 - 10	*	-1.47733	1.18611
4 - 11	*	-1.54033	1.18611
4 - 12	*	-2.18533	1.18611
4 - 13	*	-2.65	1.18611
4 - 14	*	-2.311	1.18611
4 - 15	*	-1.52067	1.18611
4 - 16	*	-3.48767	1.18611
4 - 17	*	-4.00633	1.18611
4 - 18	*	-4.235	1.18611
4 - 19	*	-3.78667	1.18611
4 - 20	*	-3.36033	1.18611
4 - 21	*	-3.16033	1.18611
4 - 22	*	-3.37233	1.18611
4 - 23	*	-4.916	1.18611
4 - 24	*	-4.294	1.18611
4 - 25	*	-3.91733	1.18611
4 - 26	*	-4.44967	1.18611
4 - 27	*	-4.75367	1.18611
4 - 28	*	-5.253	1.18611
4 - 29	*	-4.73967	1.18611
4 - 30	*	-4.25267	1.18611



4 - 31		-0.485333	1.18611
4 - 32	*	-2.90867	1.18611
4 - 33	*	-2.88333	1.18611
4 - 34	*	-3.27967	1.18611
4 - 35	*	-3.341	1.18611
4 - 36	*	-3.94267	1.18611
5 - 6		-0.467667	1.18611
5 - 7		-0.505667	1.18611
5 - 8	*	-3.189	1.18611
5 - 9	*	-2.03867	1.18611
5 - 10	*	-1.48067	1.18611
5 - 11	*	-1.54367	1.18611
5 - 12	*	-2.18867	1.18611
5 - 13	*	-2.65333	1.18611
5 - 14	*	-2.31433	1.18611
5 - 15	*	-1.524	1.18611
5 - 16	*	-3.491	1.18611
5 - 17	*	-4.00967	1.18611
5 - 18	*	-4.23833	1.18611
5 - 19	*	-3.79	1.18611
5 - 20	*	-3.36367	1.18611
5 - 21	*	-3.16367	1.18611
5 - 22	*	-3.37567	1.18611
5 - 23	*	-4.91933	1.18611
5 - 24	*	-4.29733	1.18611
5 - 25	*	-3.92067	1.18611
5 - 26	*	-4.453	1.18611
5 - 27	*	-4.757	1.18611
5 - 28	*	-5.25633	1.18611
5 - 29	*	-4.743	1.18611
5 - 30	*	-4.256	1.18611
5 - 31		-0.488667	1.18611
5 - 32	*	-2.912	1.18611
5 - 33	*	-2.88667	1.18611
5 - 34	*	-3.283	1.18611
5 - 35	*	-3.34433	1.18611
5 - 36	*	-3.946	1.18611
6 - 7		-0.038	1.18611
6 - 8	*	-2.72133	1.18611
6 - 9	*	-1.571	1.18611
6 - 10		-1.013	1.18611
6 - 11		-1.076	1.18611
6 - 12	*	-1.721	1.18611
6 - 13	*	-2.18567	1.18611
6 - 14	*	-1.84667	1.18611
6 - 15		-1.05633	1.18611
6 - 16	*	-3.02333	1.18611
6 - 17	*	-3.542	1.18611



6 - 18	*	-3.77067	1.18611
6 - 19	*	-3.32233	1.18611
6 - 20	*	-2.896	1.18611
6 - 21	*	-2.696	1.18611
6 - 22	*	-2.908	1.18611
6 - 23	*	-4.45167	1.18611
6 - 24	*	-3.82967	1.18611
6 - 25	*	-3.453	1.18611
6 - 26	*	-3.98533	1.18611
6 - 27	*	-4.28933	1.18611
6 - 28	*	-4.78867	1.18611
6 - 29	*	-4.27533	1.18611
6 - 30	*	-3.78833	1.18611
6 - 31		-0.021	1.18611
6 - 32	*	-2.44433	1.18611
6 - 33	*	-2.419	1.18611
6 - 34	*	-2.81533	1.18611
6 - 35	*	-2.87667	1.18611
6 - 36	*	-3.47833	1.18611
7 - 8	*	-2.68333	1.18611
7 - 9	*	-1.533	1.18611
7 - 10		-0.975	1.18611
7 - 11		-1.038	1.18611
7 - 12	*	-1.683	1.18611
7 - 13	*	-2.14767	1.18611
7 - 14	*	-1.80867	1.18611
7 - 15		-1.01833	1.18611
7 - 16	*	-2.98533	1.18611
7 - 17	*	-3.504	1.18611
7 - 18	*	-3.73267	1.18611
7 - 19	*	-3.28433	1.18611
7 - 20	*	-2.858	1.18611
7 - 21	*	-2.658	1.18611
7 - 22	*	-2.87	1.18611
7 - 23	*	-4.41367	1.18611
7 - 24	*	-3.79167	1.18611
7 - 25	*	-3.415	1.18611
7 - 26	*	-3.94733	1.18611
7 - 27	*	-4.25133	1.18611
7 - 28	*	-4.75067	1.18611
7 - 29	*	-4.23733	1.18611
7 - 30	*	-3.75033	1.18611
7 - 31		0.017	1.18611
7 - 32	*	-2.40633	1.18611
7 - 33	*	-2.381	1.18611
7 - 34	*	-2.77733	1.18611
7 - 35	*	-2.83867	1.18611
7 - 36	*	-3.44033	1.18611



8 - 9		1.15033	1.18611
8 - 10	*	1.70833	1.18611
8 - 11	*	1.64533	1.18611
8 - 12		1.00033	1.18611
8 - 13		0.535667	1.18611
8 - 14		0.874667	1.18611
8 - 15	*	1.665	1.18611
8 - 16		-0.302	1.18611
8 - 17		-0.820667	1.18611
8 - 18		-1.04933	1.18611
8 - 19		-0.601	1.18611
8 - 20		-0.174667	1.18611
8 - 21		0.0253333	1.18611
8 - 22		-0.186667	1.18611
8 - 23	*	-1.73033	1.18611
8 - 24		-1.10833	1.18611
8 - 25		-0.731667	1.18611
8 - 26	*	-1.264	1.18611
8 - 27	*	-1.568	1.18611
8 - 28	*	-2.06733	1.18611
8 - 29	*	-1.554	1.18611
8 - 30		-1.067	1.18611
8 - 31	*	2.70033	1.18611
8 - 32		0.277	1.18611
8 - 33		0.302333	1.18611
8 - 34		-0.094	1.18611
8 - 35		-0.155333	1.18611
8 - 36		-0.757	1.18611
9 - 10		0.558	1.18611
9 - 11		0.495	1.18611
9 - 12		-0.15	1.18611
9 - 13		-0.614667	1.18611
9 - 14		-0.275667	1.18611
9 - 15		0.514667	1.18611
9 - 16	*	-1.45233	1.18611
9 - 17	*	-1.971	1.18611
9 - 18	*	-2.19967	1.18611
9 - 19	*	-1.75133	1.18611
9 - 20	*	-1.325	1.18611
9 - 21		-1.125	1.18611
9 - 22	*	-1.337	1.18611
9 - 23	*	-2.88067	1.18611
9 - 24	*	-2.25867	1.18611
9 - 25	*	-1.882	1.18611
9 - 26	*	-2.41433	1.18611
9 - 27	*	-2.71833	1.18611
9 - 28	*	-3.21767	1.18611
9 - 29	*	-2.70433	1.18611



9 - 30	*	-2.21733	1.18611
9 - 31	*	1.55	1.18611
9 - 32		-0.873333	1.18611
9 - 33		-0.848	1.18611
9 - 34	*	-1.24433	1.18611
9 - 35	*	-1.30567	1.18611
9 - 36	*	-1.90733	1.18611
10 - 11		-0.063	1.18611
10 - 12		-0.708	1.18611
10 - 13		-1.17267	1.18611
10 - 14		-0.833667	1.18611
10 - 15		-0.0433333	1.18611
10 - 16	*	-2.01033	1.18611
10 - 17	*	-2.529	1.18611
10 - 18	*	-2.75767	1.18611
10 - 19	*	-2.30933	1.18611
10 - 20	*	-1.883	1.18611
10 - 21	*	-1.683	1.18611
10 - 22	*	-1.895	1.18611
10 - 23	*	-3.43867	1.18611
10 - 24	*	-2.81667	1.18611
10 - 25	*	-2.44	1.18611
10 - 26	*	-2.97233	1.18611
10 - 27	*	-3.27633	1.18611
10 - 28	*	-3.77567	1.18611
10 - 29	*	-3.26233	1.18611
10 - 30	*	-2.77533	1.18611
10 - 31		0.992	1.18611
10 - 32	*	-1.43133	1.18611
10 - 33	*	-1.406	1.18611
10 - 34	*	-1.80233	1.18611
10 - 35	*	-1.86367	1.18611
10 - 36	*	-2.46533	1.18611
11 - 12		-0.645	1.18611
11 - 13		-1.10967	1.18611
11 - 14		-0.770667	1.18611
11 - 15		0.0196667	1.18611
11 - 16	*	-1.94733	1.18611
11 - 17	*	-2.466	1.18611
11 - 18	*	-2.69467	1.18611
11 - 19	*	-2.24633	1.18611
11 - 20	*	-1.82	1.18611
11 - 21	*	-1.62	1.18611
11 - 22	*	-1.832	1.18611
11 - 23	*	-3.37567	1.18611
11 - 24	*	-2.75367	1.18611
11 - 25	*	-2.377	1.18611
11 - 26	*	-2.90933	1.18611



11 - 27	*	-3.21333	1.18611
11 - 28	*	-3.71267	1.18611
11 - 29	*	-3.19933	1.18611
11 - 30	*	-2.71233	1.18611
11 - 31		1.055	1.18611
11 - 32	*	-1.36833	1.18611
11 - 33	*	-1.343	1.18611
11 - 34	*	-1.73933	1.18611
11 - 35	*	-1.80067	1.18611
11 - 36	*	-2.40233	1.18611
12 - 13		-0.464667	1.18611
12 - 14		-0.125667	1.18611
12 - 15		0.664667	1.18611
12 - 16	*	-1.30233	1.18611
12 - 17	*	-1.821	1.18611
12 - 18	*	-2.04967	1.18611
12 - 19	*	-1.60133	1.18611
12 - 20		-1.175	1.18611
12 - 21		-0.975	1.18611
12 - 22	*	-1.187	1.18611
12 - 23	*	-2.73067	1.18611
12 - 24	*	-2.10867	1.18611
12 - 25	*	-1.732	1.18611
12 - 26	*	-2.26433	1.18611
12 - 27	*	-2.56833	1.18611
12 - 28	*	-3.06767	1.18611
12 - 29	*	-2.55433	1.18611
12 - 30	*	-2.06733	1.18611
12 - 31	*	1.7	1.18611
12 - 32		-0.723333	1.18611
12 - 33		-0.698	1.18611
12 - 34		-1.09433	1.18611
12 - 35		-1.15567	1.18611
12 - 36	*	-1.75733	1.18611
13 - 14		0.339	1.18611
13 - 15		1.12933	1.18611
13 - 16		-0.837667	1.18611
13 - 17	*	-1.35633	1.18611
13 - 18	*	-1.585	1.18611
13 - 19		-1.13667	1.18611
13 - 20		-0.710333	1.18611
13 - 21		-0.510333	1.18611
13 - 22		-0.722333	1.18611
13 - 23	*	-2.266	1.18611
13 - 24	*	-1.644	1.18611
13 - 25	*	-1.26733	1.18611
13 - 26	*	-1.79967	1.18611
13 - 27	*	-2.10367	1.18611



13 - 28	*	-2.603	1.18611
13 - 29	*	-2.08967	1.18611
13 - 30	*	-1.60267	1.18611
13 - 31	*	2.16467	1.18611
13 - 32		-0.258667	1.18611
13 - 33		-0.233333	1.18611
13 - 34		-0.629667	1.18611
13 - 35		-0.691	1.18611
13 - 36	*	-1.29267	1.18611
14 - 15		0.790333	1.18611
14 - 16		-1.17667	1.18611
14 - 17	*	-1.69533	1.18611
14 - 18	*	-1.924	1.18611
14 - 19	*	-1.47567	1.18611
14 - 20		-1.04933	1.18611
14 - 21		-0.849333	1.18611
14 - 22		-1.06133	1.18611
14 - 23	*	-2.605	1.18611
14 - 24	*	-1.983	1.18611
14 - 25	*	-1.60633	1.18611
14 - 26	*	-2.13867	1.18611
14 - 27	*	-2.44267	1.18611
14 - 28	*	-2.942	1.18611
14 - 29	*	-2.42867	1.18611
14 - 30	*	-1.94167	1.18611
14 - 31	*	1.82567	1.18611
14 - 32		-0.597667	1.18611
14 - 33		-0.572333	1.18611
14 - 34		-0.968667	1.18611
14 - 35		-1.03	1.18611
14 - 36	*	-1.63167	1.18611
15 - 16	*	-1.967	1.18611
15 - 17	*	-2.48567	1.18611
15 - 18	*	-2.71433	1.18611
15 - 19	*	-2.266	1.18611
15 - 20	*	-1.83967	1.18611
15 - 21	*	-1.63967	1.18611
15 - 22	*	-1.85167	1.18611
15 - 23	*	-3.39533	1.18611
15 - 24	*	-2.77333	1.18611
15 - 25	*	-2.39667	1.18611
15 - 26	*	-2.929	1.18611
15 - 27	*	-3.233	1.18611
15 - 28	*	-3.73233	1.18611
15 - 29	*	-3.219	1.18611
15 - 30	*	-2.732	1.18611
15 - 31		1.03533	1.18611
15 - 32	*	-1.388	1.18611



15 - 33	*	-1.36267	1.18611
15 - 34	*	-1.759	1.18611
15 - 35	*	-1.82033	1.18611
15 - 36	*	-2.422	1.18611
16 - 17		-0.518667	1.18611
16 - 18		-0.747333	1.18611
16 - 19		-0.299	1.18611
16 - 20		0.127333	1.18611
16 - 21		0.327333	1.18611
16 - 22		0.115333	1.18611
16 - 23	*	-1.42833	1.18611
16 - 24		-0.806333	1.18611
16 - 25		-0.429667	1.18611
16 - 26		-0.962	1.18611
16 - 27	*	-1.266	1.18611
16 - 28	*	-1.76533	1.18611
16 - 29	*	-1.252	1.18611
16 - 30		-0.765	1.18611
16 - 31	*	3.00233	1.18611
16 - 32		0.579	1.18611
16 - 33		0.604333	1.18611
16 - 34		0.208	1.18611
16 - 35		0.146667	1.18611
16 - 36		-0.455	1.18611
17 - 18		-0.228667	1.18611
17 - 19		0.219667	1.18611
17 - 20		0.646	1.18611
17 - 21		0.846	1.18611
17 - 22		0.634	1.18611
17 - 23		-0.909667	1.18611
17 - 24		-0.287667	1.18611
17 - 25		0.089	1.18611
17 - 26		-0.443333	1.18611
17 - 27		-0.747333	1.18611
17 - 28	*	-1.24667	1.18611
17 - 29		-0.733333	1.18611
17 - 30		-0.246333	1.18611
17 - 31	*	3.521	1.18611
17 - 32		1.09767	1.18611
17 - 33		1.123	1.18611
17 - 34		0.726667	1.18611
17 - 35		0.665333	1.18611
17 - 36		0.0636667	1.18611
18 - 19		0.448333	1.18611
18 - 20		0.874667	1.18611
18 - 21		1.07467	1.18611
18 - 22		0.862667	1.18611
18 - 23		-0.681	1.18611



18 - 24		-0.059	1.18611
18 - 25		0.317667	1.18611
18 - 26		-0.214667	1.18611
18 - 27		-0.518667	1.18611
18 - 28		-1.018	1.18611
18 - 29		-0.504667	1.18611
18 - 30		-0.0176667	1.18611
18 - 31	*	3.74967	1.18611
18 - 32	*	1.32633	1.18611
18 - 33	*	1.35167	1.18611
18 - 34		0.955333	1.18611
18 - 35		0.894	1.18611
18 - 36		0.292333	1.18611
19 - 20		0.426333	1.18611
19 - 21		0.626333	1.18611
19 - 22		0.414333	1.18611
19 - 23		-1.12933	1.18611
19 - 24		-0.507333	1.18611
19 - 25		-0.130667	1.18611
19 - 26		-0.663	1.18611
19 - 27		-0.967	1.18611
19 - 28	*	-1.46633	1.18611
19 - 29		-0.953	1.18611
19 - 30		-0.466	1.18611
19 - 31	*	3.30133	1.18611
19 - 32		0.878	1.18611
19 - 33		0.903333	1.18611
19 - 34		0.507	1.18611
19 - 35		0.445667	1.18611
19 - 36		-0.156	1.18611
20 - 21		0.2	1.18611
20 - 22		-0.012	1.18611
20 - 23	*	-1.55567	1.18611
20 - 24		-0.933667	1.18611
20 - 25		-0.557	1.18611
20 - 26		-1.08933	1.18611
20 - 27	*	-1.39333	1.18611
20 - 28	*	-1.89267	1.18611
20 - 29	*	-1.37933	1.18611
20 - 30		-0.892333	1.18611
20 - 31	*	2.875	1.18611
20 - 32		0.451667	1.18611
20 - 33		0.477	1.18611
20 - 34		0.0806667	1.18611
20 - 35		0.0193333	1.18611
20 - 36		-0.582333	1.18611
21 - 22		-0.212	1.18611
21 - 23	*	-1.75567	1.18611



21 - 24		-1.13367	1.18611
21 - 25		-0.757	1.18611
21 - 26	*	-1.28933	1.18611
21 - 27	*	-1.59333	1.18611
21 - 28	*	-2.09267	1.18611
21 - 29	*	-1.57933	1.18611
21 - 30		-1.09233	1.18611
21 - 31	*	2.675	1.18611
21 - 32		0.251667	1.18611
21 - 33		0.277	1.18611
21 - 34		-0.119333	1.18611
21 - 35		-0.180667	1.18611
21 - 36		-0.782333	1.18611
22 - 23	*	-1.54367	1.18611
22 - 24		-0.921667	1.18611
22 - 25		-0.545	1.18611
22 - 26		-1.07733	1.18611
22 - 27	*	-1.38133	1.18611
22 - 28	*	-1.88067	1.18611
22 - 29	*	-1.36733	1.18611
22 - 30		-0.880333	1.18611
22 - 31	*	2.887	1.18611
22 - 32		0.463667	1.18611
22 - 33		0.489	1.18611
22 - 34		0.0926667	1.18611
22 - 35		0.0313333	1.18611
22 - 36		-0.570333	1.18611
23 - 24		0.622	1.18611
23 - 25		0.998667	1.18611
23 - 26		0.466333	1.18611
23 - 27		0.162333	1.18611
23 - 28		-0.337	1.18611
23 - 29		0.176333	1.18611
23 - 30		0.663333	1.18611
23 - 31	*	4.43067	1.18611
23 - 32	*	2.00733	1.18611
23 - 33	*	2.03267	1.18611
23 - 34	*	1.63633	1.18611
23 - 35	*	1.575	1.18611
23 - 36		0.973333	1.18611
24 - 25		0.376667	1.18611
24 - 26		-0.155667	1.18611
24 - 27		-0.459667	1.18611
24 - 28		-0.959	1.18611
24 - 29		-0.445667	1.18611
24 - 30		0.0413333	1.18611
24 - 31	*	3.80867	1.18611
24 - 32	*	1.38533	1.18611

24 - 33	*	1.41067	1.18611
24 - 34		1.01433	1.18611
24 - 35		0.953	1.18611
24 - 36		0.351333	1.18611
25 - 26		-0.532333	1.18611
25 - 27		-0.836333	1.18611
25 - 28	*	-1.33567	1.18611
25 - 29		-0.822333	1.18611
25 - 30		-0.335333	1.18611
25 - 31	*	3.432	1.18611
25 - 32		1.00867	1.18611
25 - 33		1.034	1.18611
25 - 34		0.637667	1.18611
25 - 35		0.576333	1.18611
25 - 36		-0.0253333	1.18611
26 - 27		-0.304	1.18611
26 - 28		-0.803333	1.18611
26 - 29		-0.29	1.18611
26 - 30		0.197	1.18611
26 - 31	*	3.96433	1.18611
26 - 32	*	1.541	1.18611
26 - 33	*	1.56633	1.18611
26 - 34		1.17	1.18611
26 - 35		1.10867	1.18611
26 - 36		0.507	1.18611
27 - 28		-0.499333	1.18611
27 - 29		0.014	1.18611
27 - 30		0.501	1.18611
27 - 31	*	4.26833	1.18611
27 - 32	*	1.845	1.18611
27 - 33	*	1.87033	1.18611
27 - 34	*	1.474	1.18611
27 - 35	*	1.41267	1.18611
27 - 36		0.811	1.18611
28 - 29		0.513333	1.18611
28 - 30		1.00033	1.18611
28 - 31	*	4.76767	1.18611
28 - 32	*	2.34433	1.18611
28 - 33	*	2.36967	1.18611
28 - 34	*	1.97333	1.18611
28 - 35	*	1.912	1.18611
28 - 36	*	1.31033	1.18611
29 - 30		0.487	1.18611
29 - 31	*	4.25433	1.18611
29 - 32	*	1.831	1.18611
29 - 33	*	1.85633	1.18611
29 - 34	*	1.46	1.18611
29 - 35	*	1.39867	1.18611



29 - 36		0.797	1.18611
30 - 31	*	3.76733	1.18611
30 - 32	*	1.344	1.18611
30 - 33	*	1.36933	1.18611
30 - 34		0.973	1.18611
30 - 35		0.911667	1.18611
30 - 36		0.31	1.18611
31 - 32	*	-2.42333	1.18611
31 - 33	*	-2.398	1.18611
31 - 34	*	-2.79433	1.18611
31 - 35	*	-2.85567	1.18611
31 - 36	*	-3.45733	1.18611
32 - 33		0.0253333	1.18611
32 - 34		-0.371	1.18611
32 - 35		-0.432333	1.18611
32 - 36		-1.034	1.18611
33 - 34		-0.396333	1.18611
33 - 35		-0.457667	1.18611
33 - 36		-1.05933	1.18611
34 - 35		-0.0613333	1.18611
34 - 36		-0.663	1.18611
35 - 36		-0.601667	1.18611

* denotes a statistically significant difference.

Anexo 4. Resumen de los datos estadísticos de biodegradación de polietileno de baja densidad.

Summary Statistics

	<i>Coun t</i>	<i>Avera ge</i>	<i>Standard deviation</i>	<i>Coeff. of variation</i>	<i>Minimu m</i>	<i>Maxim um</i>	<i>Rang e</i>	<i>Std. skewness</i>
AR	5	53.99	7.63953	14.1499%	43.062	61.602	18.54	-0.466198
NT	4	54.5118	9.34692	17.1466%	46.582	68.052	21.47	1.29219
SK	4	38.5805	2.08969	5.41643%	36.606	41.431	4.825	0.858098
AR 2	5	10.3574	1.08456	10.4714%	8.976	11.996	3.02	0.519456
Tot al	18	38.5614	19.8502	51.4769%	8.976	68.052	59.076	-0.779972

	<i>Std. kurtosis</i>
AR	-0.301623
NT	1.20972
SK	0.364166
AR2	0.825737
Total	-0.973282

The StatAdvisor

This table shows various statistics for each of the 4 columns of data. To test for significant differences amongst the column means, select Analysis of Variance from the list of Tabular Options. Select Means Plot from the list of Graphical Options to display the means graphically.

WARNING: There is more than a 3 to 1 difference between the smallest standard deviation and the largest. This may cause problems since the analysis of variance assumes that the standard deviations at all levels are equal. Select Variance Check from the list of Tabular Options to run a formal statistical test for differences among the sigmas. You may want to consider transforming the data to remove any dependence of the standard deviation on the mean.

Multiple Sample Comparison

Sample 1: AR
Sample 2: NT
Sample 3: SK
Sample 4: AR2

Sample 1: 5 values ranging from 43.062 to 61.602
Sample 2: 4 values ranging from 46.582 to 68.052
Sample 3: 4 values ranging from 36.606 to 41.431
Sample 4: 5 values ranging from 8.976 to 11.996

The StatAdvisor

This procedure compares the data in 4 columns of the current data file. It constructs various statistical tests and graphs to compare the samples. The F-test in the ANOVA table will test whether there are any significant differences amongst the means. If there are, the Multiple Range Tests will tell you which means are significantly different from which others. If you are worried about the presence of outliers, choose the Kruskal-Wallis Test which compares medians instead of means. The various plots will help you judge the practical significance of the results, as well as allow you to look for possible violations of the assumptions underlying the analysis of variance.

Variance Check

	<i>Test</i>	<i>P-Value</i>
Levene's	3.89704	0.0324

<i>Comparison</i>	<i>Sigma1</i>	<i>Sigma2</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
AR / NT	7.63953	9.34692	0.66803	0.6871
AR / SK	7.63953	2.08969	13.3651	0.0593
AR / AR2	7.63953	1.08456	49.6163	0.0023
NT / SK	9.34692	2.08969	20.0067	0.0348
NT / AR2	9.34692	1.08456	74.2727	0.0012
SK / AR2	2.08969	1.08456	3.71239	0.2375

The StatAdvisor

The statistic displayed in this table tests the null hypothesis that the standard deviations within each of the 4 columns are the same. Of particular interest is the P-value. Since the P-value is less than 0.05, there is a statistically significant difference amongst the standard deviations at the 95.0% confidence level. This violates one of the important assumptions underlying the analysis of variance and will invalidate most of the standard statistical tests.

The table also shows a comparison of the standard deviations for each pair of samples. P-Values below 0.05, of which there are 3, indicate a statistically significant difference between the two sigmas at the 5% significance level.

ANOVA Table

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	6185.19	3	2061.73	56.23	0.0000
Within groups	513.35	14	36.6679		
Total (Corr.)	6698.54	17			

Robust Test

	<i>Test Statistic</i>	<i>Df1</i>	<i>Df2</i>	<i>P-Value</i>
Welch test	217.61	3.00	6.19	0.0000

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variance of the data into two components: a



between-group component and a within-group component.

The F-ratio, which in this case equals 56.2272, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the means of the 4 variables at the 5% significance level. To determine which means are significantly different from which others, select Multiple Range Tests from the list of Tabular Options.

The output also shows the results of a robust test for equality of the group means that does not assume equal variances within each group.

Since the P-value for that test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the means at the 5% significance level.

Anexo 5. Resultados Análisis de muestras de polietileno de baja densidad.



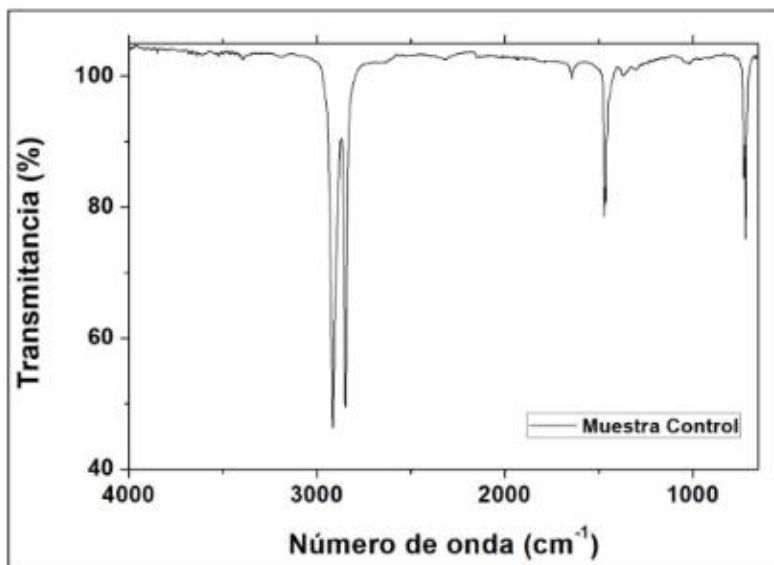
Análisis FTIR

Equipo:

Prestige 21 -SHIMADZU

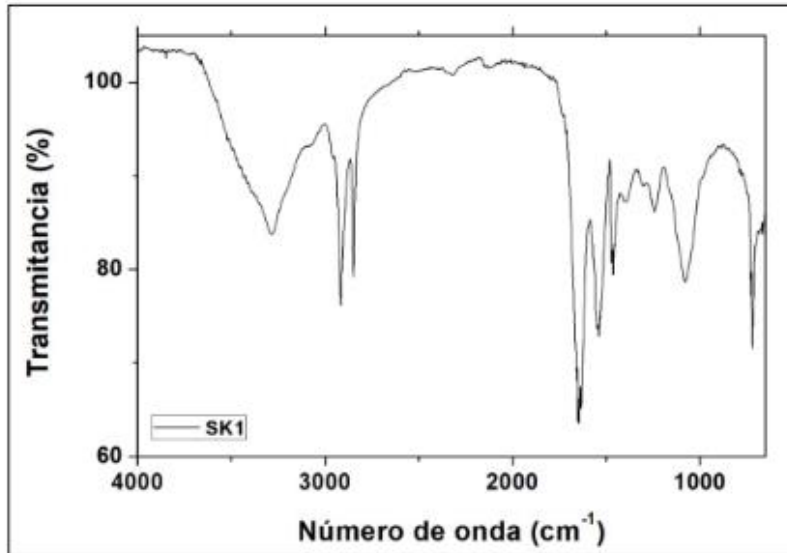
Fecha: 01 de abril 2022

1. Muestra control.

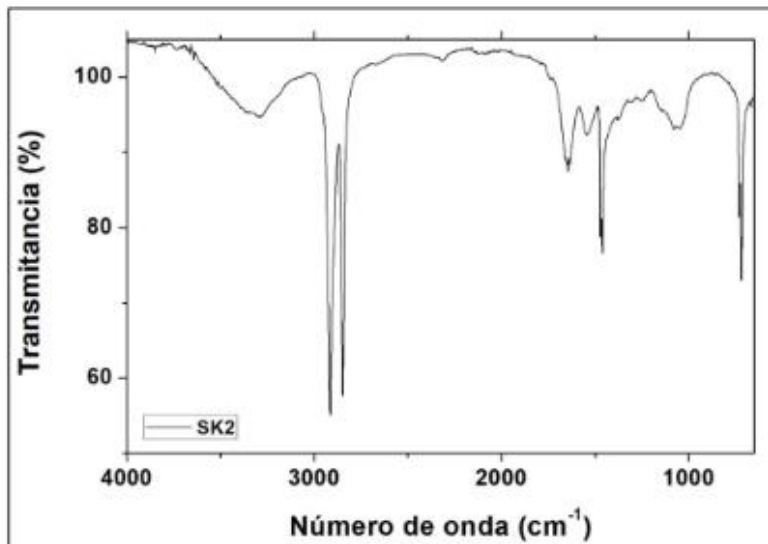




2. Muestra SK1

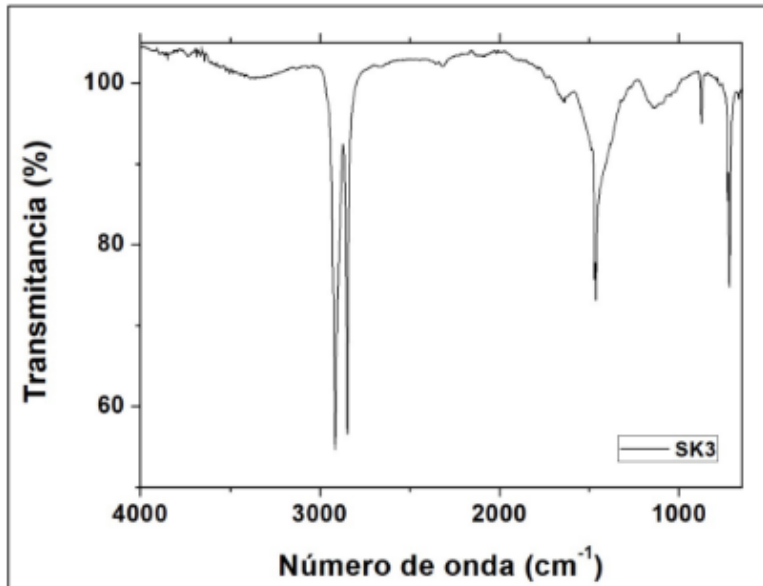


3. Muestra SK2

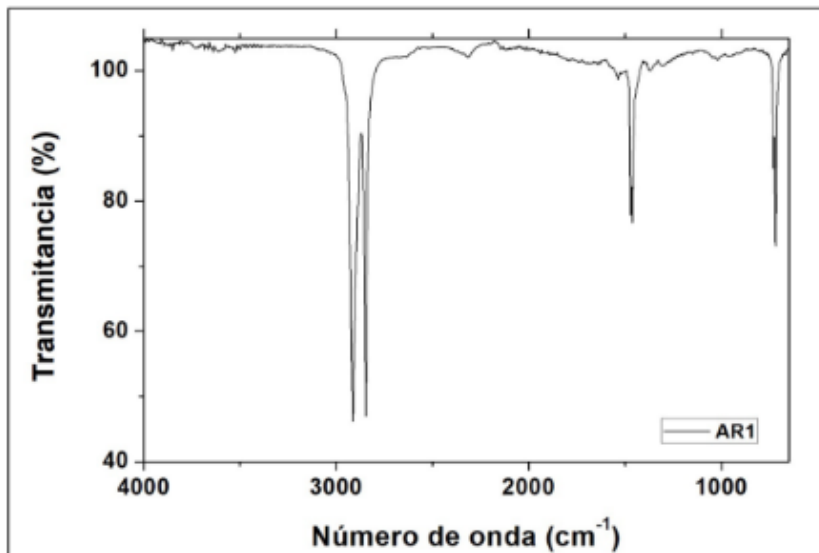




4. Muestra SK3

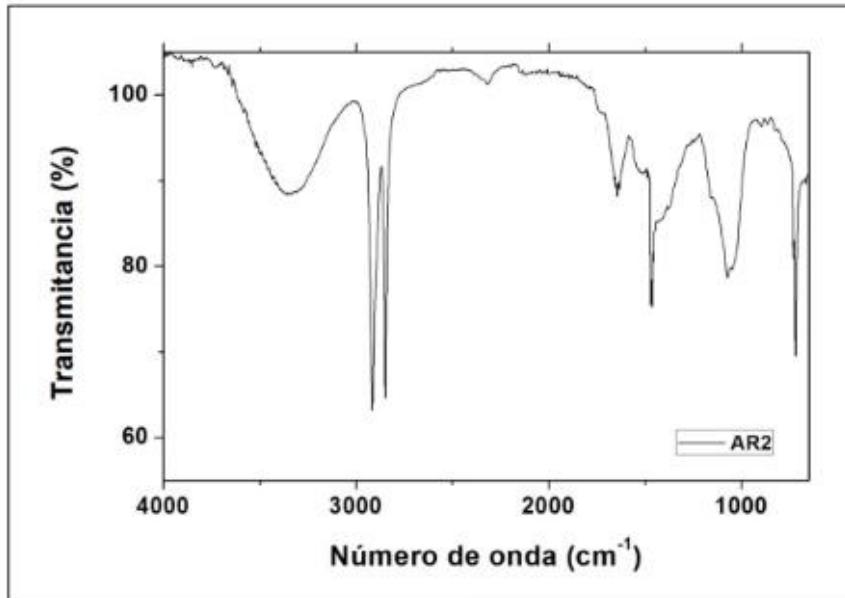


5. Muestra AR1

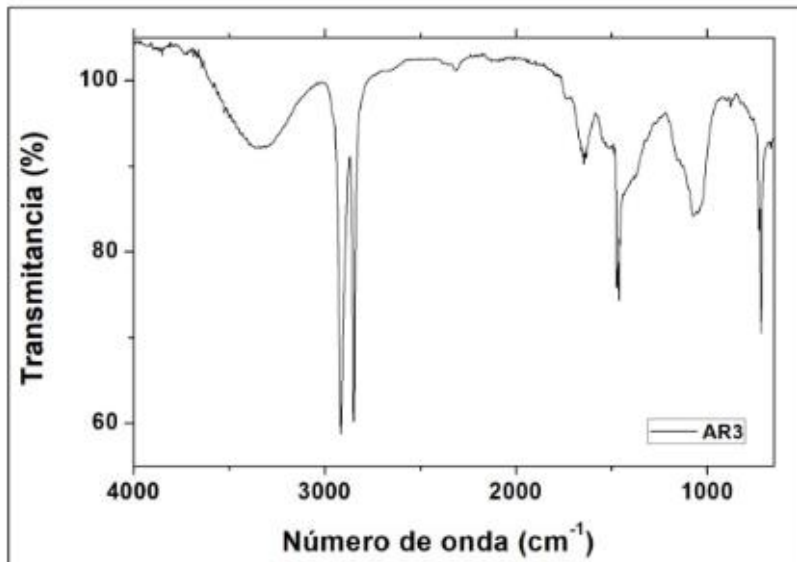




6. Muestra AR2



7. Muestra AR3





8. Comparación de las muestras SK

