



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE CUENCA
CARRERA DE INGENIERÍA EN
BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

“ESTUDIO DEL EFECTO DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES EN EL
ESPECTRO DEL POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD A TRAVÉS DE TÉCNICAS
ESTADÍSTICAS MULTIVARIABLES”

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de
Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales

AUTORA: TATIANA ELIZABETH MURILLO BRITO

TUTOR: ING. PABLO WILSON ARÉVALO MOSCOSO, PhD

Cuenca - Ecuador

2022

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Tatiana Elizabeth Murillo Brito con documento de identificación N° 0107124513 manifiesto que:

Soy la autora y responsable del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Cuenca, 04 de mayo del 2022

Atentamente,



Tatiana Elizabeth Murillo Brito
0107124513

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Yo, Tatiana Elizabeth Murillo Brito con documento de identificación No. 0107124513, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del Trabajo Experimental: “Estudio del efecto de microorganismos degradadores en el espectro del polietileno de baja densidad a través de técnicas estadísticas multivariantes”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 04 de mayo del 2022

Atentamente,

A handwritten signature in blue ink, reading "Tatiana Murillo", enclosed within a large, stylized blue oval flourish.

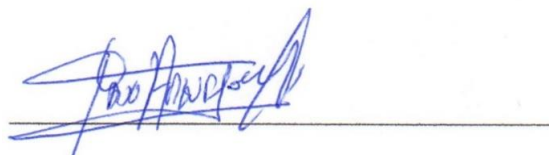
Tatiana Elizabeth Murillo Brito
0107124513

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Pablo Wilson Arévalo Moscoso con documento de identificación N° 0102156957, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: “ESTUDIO DEL EFECTO DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES EN EL ESPECTRO DEL POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD A TRAVÉS DE TÉCNICAS ESTADÍSTICAS MULTIVARIABLES”, realizado por Tatiana Elizabeth Murillo Brito con documento de identificación N° 0107124513, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo Experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 04 de mayo del 2022

Atentamente,



Ing. Pablo Wilson Arévalo Moscoso, PhD
0102156957

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de titulación en primer lugar a Jehová, que siempre ha iluminado mi camino y me ha llenado de sabiduría para afrontar las adversidades de la vida.

A mi padre Bolívar, por ser mi ejemplo de perseverancia y quién con un sabio consejo me ha ayudado a no rendirme.

A mi madre Sandra, por brindarme su amor, paciencia y comprensión a lo largo de mi vida.

A mis hermanos y familiares que han estado conmigo durante todo mi proceso de formación.

Tatiana Murillo

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a Dios por guiarme en cada momento de mi vida, por ser mi roca, mi fortaleza y permitirme alcanzar esta meta.

A mis padres por su apoyo incondicional, que con una palabra de aliento me han animado a seguir adelante en mis estudios y a poder superar cualquier obstáculo que la vida me presente.

A mi tutor de tesis, PhD Pablo Arévalo, por compartirme su valioso conocimiento y guiarme en el desarrollo de este trabajo de investigación.

A la Dra. Inés Malo, por su ejemplo de constancia y perseverancia, y por sus aportes académicos durante mi etapa de estudiante.

A todos los docentes que forman parte de la carrera de Biotecnología, quienes han aportado positivamente en mi formación académica.

A mis amigas que con un consejo me han ayudado a sobrellevar momentos difíciles.

Tatiana Murillo

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|------|
| DEDICATORIA | I |
| AGRADECIMIENTOS | II |
| RESUMEN | VIII |
| ABSTRAC | IX |
| CAPÍTULO 1 | 1 |
| EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN..... | 1 |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Planteamiento del problema..... | 3 |
| 1.2. Pregunta de investigación | 4 |
| 1.3. Justificación de la Investigación | 4 |
| 1.4. Limitaciones..... | 4 |
| 1.5. Objetivos | 5 |
| 1.5.1. <i>Objetivo General:</i> | 5 |
| 1.5.2. <i>Objetivos Específicos:</i> | 5 |
| 1.6. Hipótesis | 5 |
| CAPÍTULO 2..... | 6 |
| MARCO TEÓRICO..... | 6 |
| 2.1. Estado del Arte..... | 6 |
| 2.2. Bases Teóricas | 12 |
| 2.2.1. Biodegradación de Polietileno | 12 |
| 2.2.2. Fases en la degradación del plástico por microorganismos. | 12 |
| 2.2.3. Microorganismos con capacidad de degradar plásticos | 13 |
| 2.2.4. <i>Aspergillus brasiliensis</i> | 15 |
| 2.2.5. <i>Pseudomona aeruginosa</i> | 16 |
| 2.2.6. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)..... | 17 |
| 2.2.6.1. El espectro de absorción como método para identificar los cambios en la estructura del polietileno sometido a biodegradación | 18 |
| 2.2.6.2. ATR para aplicaciones FTIR | 19 |
| 2.2.6.3. Cálculo de la segunda derivada en espectros FTIR..... | 19 |
| 2.2.7. Análisis de Componentes Principales (ACP) como método de reducción de variables. | 19 |
| 2.2.7.1. Interpretación de las componentes principales | 20 |
| 2.2.7.2. Plano principal y círculo de correlación..... | 21 |

| | |
|--|----|
| 2.2.8. Análisis Clúster..... | 22 |
| 2.3. Definición de términos..... | 25 |
| 2.3.1. Polietileno de baja densidad (LDPE)..... | 25 |
| 2.3.2. Degradación de polímeros | 26 |
| 2.3.3. Degradación química | 26 |
| 2.3.4. Degradación mecánica | 26 |
| 2.3.5. Degradación térmica | 27 |
| 2.3.6. Biodegradación | 27 |
| 2.3.7. Biopelícula..... | 27 |
| CAPÍTULO 3..... | 28 |
| MARCO METODOLÓGICO..... | 28 |
| 3.1. Nivel de Investigación | 28 |
| 3.2. Diseño de Investigación..... | 28 |
| 3.3. Población y muestra..... | 28 |
| 3.3.1. Población: | 28 |
| 3.3.2. Muestra: | 28 |
| 3.3.3. Muestreo: | 29 |
| 3.4. Variables | 29 |
| 3.4.1. Variables Independientes | 29 |
| 3.4.2. Variables Dependientes | 29 |
| 3.4.3. Variables Intervinientes | 29 |
| 3.4.4. Variables Extrañas..... | 29 |
| 3.5. Técnicas e instrumentos de recolección de datos..... | 30 |
| 3.6. Técnicas de procesamiento y análisis de datos | 30 |
| 3.7. Protocolo: Microorganismos utilizados | 30 |
| 3.8. Elaboración de Medios de cultivo..... | 30 |
| 3.9. Tratamiento del polietileno de baja densidad (PEBD)..... | 31 |
| 3.10. Adaptación del metabolismo de cepas puras en medios sintéticos con polietileno | 31 |
| 3.11. Prueba de la Biodegradación del PEBD..... | 32 |
| 3.12. Desinfección del PEBD luego del tratamiento y determinación del peso seco del polietileno..... | 33 |
| 3.13. Análisis FTIR..... | 34 |
| 3.14. Modelo estadístico | 35 |
| 3.14.1. Análisis de Componentes Principales (ACP)..... | 35 |

| | |
|---|--------------------------------------|
| 3.14.2. Análisis de Clúster | 37 |
| CAPÍTULO 4..... | 38 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 38 |
| 4.1. Caracterización de Cepas | 38 |
| 4.2. Proceso de adaptación de las cepas en medios con polietileno de baja densidad | 40 |
| 4.3. Observación del período de biodegradación | 40 |
| 4.4. Determinación del porcentaje de pérdida de peso del polietileno biodegradado | 41 |
| 4.5. Análisis FTIR | 42 |
| 4.5.1. Análisis FTIR del PEBD antes y después de la biodegradación | 42 |
| 4.5.2. Análisis FTIR de los medios de cultivo líquidos antes y después de la biodegradación | 46 |
| 4.6. Análisis estadístico..... | 49 |
| 4.6.1. Análisis de Componentes Principales (ACP)..... | 49 |
| 4.6.2. Análisis de Clúster | 57 |
| CAPÍTULO 5..... | 61 |
| CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| 5.1. Conclusiones | 61 |
| 5.2. Recomendaciones | 64 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 65 |
| ANEXOS | 76 |
| Anexo A. REGISTRO FOTOGRÁFICO..... | 76 |
| Anexo B. REGISTROS SEMANALES DE OBSERVACIÓN DEL PERIODO DE BIODEGRADACIÓN | 78 |
| Anexo C: TABLA DE INTERPRETACIÓN DE ESPECTROS IR | 82 |
| Anexo D. RESULTADOS DEL ANÁLISIS MULTICOMPONENTE REALIZADO POR EL SOFTWARE OMNIC SPECTA..... | 82 |
| Anexo E. TABLA RESUMEN DE VARIANZA EXPLICADA DE LOS PC..... | 86 |
| Anexo F. LISTA DE ABREVIATURAS | 87 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| <i>Figura 1. Interpretación geométrica de las CP.</i> | 20 |
| <i>Figura 2. Plano principal (Nube de puntos).</i> | 21 |
| <i>Figura 3. Círculo de correlación.</i> | 22 |
| <i>Figura 4. Clustering particional. Método McQueen de k-means</i> | 24 |
| <i>Figura 5. Dendograma resultado de la clasificación ascendente jerárquica.</i> | 25 |
| <i>Figura 6. Tratamiento de normalización del espectro.</i> | 35 |
| <i>Figura 7. Cultivo de cepa ATCC de Ps. aeruginosa</i> | 38 |
| <i>Figura 8. Cultivo de cepa ATCC de A. brasiliensis</i> | 38 |
| <i>Figura 9. Tinción de Gram de Ps. aeruginosa.</i> | 39 |
| <i>Figura 10. A. brasiliensis observado al microscopio.</i> | 39 |
| <i>Figura 11. Espectro IR del Blanco del polietileno de baja densidad</i> | 43 |
| <i>Figura 12. Espectro IR del PEBD sometido a tratamiento con Ps. aeruginosa.</i> | 44 |
| <i>Figura 13. Espectro IR del PEBD tratado con A. brasiliensis.</i> | 45 |
| <i>Figura 14. Comparación del espectro de PEBD tratado con A. brasiliensis en relación al blanco.</i> | 45 |
| <i>Figura 15. Espectro IR del Blanco del medio de cultivo.</i> | 46 |
| <i>Figura 16. Espectro IR del medio de cultivo inoculado con Ps. aeruginosa empleado para la degradación.</i> | 47 |
| <i>Figura 17. Comparación del espectro del medio inoculado con A. brasiliensis en relación con el blanco.</i> | 48 |
| <i>Figura 18. Prueba de Bartlett realizada en RStudio</i> | 50 |
| <i>Figura 19. Gráfico del porcentaje de varianza explicada de los Componentes Principales.</i> | 51 |
| <i>Figura 20. Representación gráfica de la ubicación de los individuos en el plano principal.</i> | 52 |
| <i>Figura 21. Longitudes de onda representadas en el plano principal.</i> | 53 |
| <i>Figura 22. Gráfico de dispersión de las 3 primeras componentes.</i> | 54 |
| <i>Figura 23. Gráfica de la Contribución de los individuos al PCI.</i> | 55 |
| <i>Figura 24. Representación de las variables sobre CP</i> | 56 |
| <i>Figura 25. Correlación de Pearson en RStudio</i> | 57 |
| <i>Figura 26. Número óptimo de clusters</i> | 58 |
| <i>Figura 27. Clustering particional.</i> | 59 |
| <i>Figura 28. Clustering jerárquico</i> | 59 |
| <i>Figura 29. Preparación del PEBD previo al tratamiento. Tamizaje.</i> | 76 |
| <i>Figura 30. Pesaje de reactivos para la elaboración del medio mineral.</i> | 76 |
| <i>Figura 31. Incubación de las cepas puras en el medio mineral con PEBD durante el período de Adaptación.</i> | 77 |
| <i>Figura 32. Turbidez de 0.5 de la escala de Mac Farland al final del período de adaptación.</i> | 77 |
| <i>Figura 33. Tabla de Espectroscopía Infrarroja.</i> | 82 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----------|
| <i>Tabla 1. Microorganismos capaces de degradar el Polietileno de baja densidad</i> | <i>13</i> |
| <i>Tabla 2. Señales de absorción en espectros FTIR.....</i> | <i>18</i> |
| <i>Tabla 3. Peso inicial y final del PEBD sometido a tratamiento biológico y % de variación de peso</i> | <i>41</i> |
| <i>Tabla 4. Comparación de la composición de los medios inoculados en relación al blanco</i> | <i>49</i> |
| <i>Tabla 5. Resumen de Varianza Explicada de los 5 primeros PC</i> | <i>50</i> |
| <i>Tabla 6. Componentes Principales (PC).....</i> | <i>53</i> |

RESUMEN

En la presente investigación se emplearon cepas de *Pseudomona aeruginosa* y *Aspergillus brasiliensis* para analizar la actividad de biodegradación *in vitro* sobre polietileno de baja densidad. El principal objetivo de este trabajo es establecer la relación existente entre las variables por el efecto de los microorganismos degradadores en el espectro de absorción a través de técnicas estadísticas multivariantes, para lo cual, primero se determinó la reducción de peso del polietileno post tratamiento; también se realizó un análisis FTIR para determinar la variación del espectro generado luego de la biodegradación, en comparación con un blanco; finalmente se empleó técnicas estadísticas multivariantes como el análisis de componentes principales (ACP) y el análisis de conglomerados, para determinar la relación existente entre la longitud de onda de absorción que genera cada microorganismo en el espectro. Se obtuvo como resultado un porcentaje de pérdida de peso bajo, ya que el polietileno tratado con *A. brasiliensis* presentó una pérdida de peso de 0,97%, mientras que el polietileno de baja densidad (PEBD) tratado con *Ps. aeruginosa* presentó una pérdida de peso del 1,52%. La comparación de los espectros FTIR, arrojó presencia de grupos funcionales carbonilo y éter en el espectro del PEBD tratado con la bacteria, cosa que no ocurrió con el polietileno tratado con el hongo, el cual no presentó ninguna variación en el espectro. En cuanto al ACP, se consideraron 3 componentes para este estudio, los cuales representan el 76,4% de la varianza observada. Se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,42, el cual indica que las variables poseen una correlación positiva y están asociadas de manera directa. El análisis de conglomerados determinó que las variables se asociación en tres grupos bien diferenciados de acuerdo a sus características comunes.

Palabras clave: biodegradación, polietileno de baja densidad, *Pseudomona aeruginosa*, *Aspergillus brasiliensis*, FTIR, análisis de componentes principales (ACP).

ABSTRAC

In the present investigation, strains of *Pseudomona aeruginosa* and *Aspergillus brasiliensis* were used to analyze the biodegradation activity on low density polyethylene. The main objective of this work is to establish the relationship between the variables by the effect of the degrading microorganisms on the absorption spectrum through multivariate statistical techniques, for which, first, the weight reduction of polyethylene post treatment was determined; Finally, multivariate statistical techniques such as principal component analysis (PCA) and cluster analysis were used to determine the relationship between the wavelength of absorption generated by each microorganism in the spectrum. A low percentage of weight loss was obtained as a result, since the polyethylene treated with *A. brasiliensis* presented a weight loss of 0.97%, while the low-density polyethylene (LDPE) treated with *Ps. aeruginosa* presented a weight loss of 1.52%. Comparison of the FTIR spectra showed the presence of carbonyl and ether functional groups in the spectrum of the LDPE treated with the bacteria, which did not occur with the polyethylene treated with the fungus, which did not show any variation in the spectrum. As for the PCA, 3 components were considered for this study, which represent 76.4% of the observed variance. A correlation coefficient of 0.42 was obtained, which indicates that the variables have a positive correlation and are directly associated. The cluster analysis determined that the variables are associated in three well-differentiated groups according to their common characteristics.

Key words: biodegradation, low density polyethylene, *Pseudomona aeruginosa*, *Aspergillus brasiliensis*, FTIR, principal component analysis (PCA)

CAPÍTULO 1

EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

INTRODUCCIÓN

Se considera que mundialmente la producción anual de plásticos supera los 300 millones de toneladas. Productos como papeles de envoltura, bolsas plásticas, envases, juguetes, entre otras, son elaborados con estos polímeros, los cuales, al ser desechados fácilmente, perduran en el ambiente, debido a que el proceso natural de degradación tarda alrededor de 150 años, ocasionando de esta manera un problema de contaminación ambiental (Orihuela y Arone, 2020).

Entre las propiedades que presenta el polietileno de baja densidad (0,92 – 0,93 g/cm³) destacan la tenacidad, ductilidad, excelente resistencia química y baja permeabilidad al vapor de agua (Ararat & Murillo, 2016). Debido a sus características de resistencia, no son degradados fácilmente por los microorganismos del suelo (Mangiarotti, 1994).

En los últimos años, la degradación microbiana de los plásticos, se ha considerado como una alternativa para solucionar el problema de la disposición final de estos residuos, presentándose como una opción de bajo costo (Gutiérrez, 2019).

Biodegradación es el proceso mediante cual microorganismos vivos degradan un material, entendiendo por degradación la conversión de un compuesto a fragmentos más pequeños; lo ideal es lograr que el compuesto sea reducido a una sustancia orgánica capaz de incorporarse a los ciclos naturales. Para esto hace uso de microorganismos como bacterias y hongos que ocupan al polietileno como fuente de carbono (Zhang *et al.* 2019).

En el estudio estadístico al contar con muchas variables sobre una muestra, puede ser que parte de las mismas sean redundantes o excesivas (Pérez, 2004), por lo tanto, en este estudio se aplicará métodos multivariantes de reducción de la dimensión como el análisis de componentes principales. Así mismo, las observaciones pueden presentar características comunes, las cuales faculten su clasificación en grupos homogéneos de acuerdo con Pérez (2004), para tal caso, se empleará un análisis de clúster para examinar las relaciones entre las variables.

En la presente investigación se realiza un estudio del efecto de la actividad microbiana de la bacteria *Pseudomona aeruginosa* y el hongo *Aspergillus brasiliensis* en el espectro del polietileno de baja densidad, para determinar qué cambios originan estos microorganismos en el espectro de absorción, y mediante el uso de técnicas estadísticas multivariantes conocer la relación que existe entre las variables.

1.1. Planteamiento del problema

Aproximadamente el 75% del plástico utilizado durante la pandemia de COVID-19 como envases plásticos para alimentos, guantes, botellas de desinfectantes, entre otros, son desechados contaminando las calles de las ciudades, llegando incluso a vertederos, mares y océanos, representando una grave amenaza para los ecosistemas, un problema ya existente desde hace algunos años atrás, pero que se ha incrementado en gran manera debido a la emergencia sanitaria que atraviesa la humanidad (ONU, 2020).

Los polímeros poseen una alta resistencia a la degradación y permanecen en el ambiente por largos períodos de tiempo (Orihuela y Arone Valencia, 2020). Debido a esto, soluciones como el reciclaje y disposición final no son suficientes para eliminar los residuos producidos (Peraza, 2017).

Los microorganismos que poseen capacidad de degradar el polietileno, presentan la facultad de modificar las cadenas de carbón de los polímeros, a cadenas más simples, mediante la descomposición de los derivados de petróleo como parte de su metabolismo (Castro, 2014). Por lo tanto, se considera a la biodegradación como una posible solución al problema de acumulación de plásticos en el ambiente (Uribe *et al.* 2010).

El proceso de biodegradación de los polímeros puede involucrar daño mecánico a los componentes del polímero debido al crecimiento bacteriano, efectos directos de las enzimas sobre la integridad del polímero y efectos ocasionados por productos metabólicos que pueden cambiar el pH o las condiciones redox (Lynd, 2001).

Por lo que, surge la necesidad de conocer el grado de impacto que sufre el polietileno de baja densidad por la acción microbiana.

1.2. Pregunta de investigación

¿Qué cambios generan los microorganismos biodegradadores en el espectro del polietileno de baja densidad?

1.3. Justificación de la Investigación

En las últimas décadas, el polietileno (PE) representa el 60% de la producción total de plástico a nivel mundial, además, abarca hasta un 64% de los plásticos sintéticos que se desechan en un corto período de tiempo después de su uso; ocasionando así una gran contaminación ambiental por la alta resistencia a la degradación que presentan estos polímeros (Kunrele *et al.* 2019).

Es por esto que se han explorado alternativas amigables con el ambiente para lidiar con las cantidades de residuos plásticos procedentes de las actividades del hombre y minimizar los impactos negativos en la naturaleza (Ararat y Murillo, 2016).

Por lo tanto, conociendo esta necesidad se han realizado estudios de biodegradación de plásticos como una alternativa viable, siendo preciso investigar sobre las variables que intervienen en la degradación biológica de los polímeros.

1.4. Limitaciones

Dentro del trabajo de investigación, se presenta una limitación en cuanto al estado de pandemia que está atravesando la humanidad, mismo que ha limitado la disponibilidad de los laboratorios de ciencias de la vida de la universidad, debido a los protocolos de bioseguridad y restricciones impuestas.

Otra limitación importante es la contaminación cruzada que se puede dar dentro de los laboratorios, debido a los trabajos experimentales de otros estudiantes.

1.5. Objetivos

1.5.1. *Objetivo General:*

Establecer la relación que existe entre las variables por el efecto de los microorganismos degradadores en el espectro del polietileno de baja densidad a través de técnicas estadísticas de análisis multivariante determinando la existencia de la variación del mismo.

1.5.2. *Objetivos Específicos:*

- Caracterizar los microorganismos mediante técnicas microbiológicas para la identificación taxonómica de los mismos.
- Determinar la variación del espectro generado por el F-TIR y la reducción de peso del polietileno sometido a tratamiento, estableciendo la diferencia de los resultados obtenidos antes y después del proceso.
- Aplicar el modelo estadístico de análisis de componentes principales, a través del uso de software, determinando la relación existente entre la longitud de onda que genera cada microorganismo en el espectro.

1.6. Hipótesis

Al someter las perlas de polietileno a cepas de microorganismos distintos como hongos y bacterias, así que cada microorganismo atacará al polietileno de distinta manera presentando variaciones en el espectro.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1. Estado del Arte

Para abordar el tema de la contaminación generada por los plásticos se recopila información con respecto a diversas alternativas para la biodegradación de polietileno tales como:

Según Espinoza (2018) en su trabajo titulado “Evaluación de la degradación de polietileno de baja densidad mediada por diferentes especies de hongos”, evaluaron la biodegradación de polietileno de baja densidad (LDPE) utilizando seis especies distintas de hongos: *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Cladosporium sp.*, *Trichoderma harzianum*, *Penicillium sp.* y *Pleurotus ostreatus*. La muestra fue sometida a un tratamiento de envejecimiento térmico antes de ser incubado con los microorganismos. La incubación se realizó en periodos de 30, 60 y 90 días. Posteriormente, se registró la pérdida de masa del polietileno luego del tratamiento. Un análisis FTIR mostró que no hubo mayor alteración en la estructura molecular del polímero.

De acuerdo con Quinchía y Maya (2015) en su investigación “Degradabilidad de Polietileno de Baja Densidad –LDPE utilizando *Pycnoporus sanguineus* UTCH”, analizaron el potencial de degradación del LDPE, mediante la actividad del hongo *Pycnoporus sanguineus*. Para ello se utilizó el polietileno de baja densidad como sustrato de crecimiento en fase sólida. El polímero incubado fue evaluado por un periodo de 6 meses. La verificación de la biodegradación se realizó por medio de pruebas de gravimetría y la identificación de variaciones en la superficie del polímero por medio de Microscopia Electrónica de Barrido (SEM). Se registraron los cambios presentados en los grupos funcionales del LDPE evaluados mediante espectroscopía infrarroja (FTIR). Los resultados alcanzados presentaron que la variación en el peso de las láminas alcanzó un 0,66 (\pm

0,051). Las imágenes FTIR muestran una diferencia entre las muestras con inóculo y las del blanco, observándose un incremento en la intensidad de las bandas entre 1200-1300 cm^{-1} , lo que se atribuye a productos de oxidación que indican la biodegradación del polietileno. Las imágenes SEM muestran cavidades y fracturas que sugieren inserción del hongo en el polímero.

Considerando el estudio de Gutiérrez (2018), titulado “Influencia de factores ambientales de crecimiento microbiano en la degradación de polietileno de baja densidad por la bacteria *Pseudomona aeruginosa* en Huancayo” a través de biodegradación, examinó la influencia de factores ambientales como crecimiento microbiano, pH y temperatura en la degradación de PEBD. La bacteria se aisló de muestras de agua. Se consideró al polietileno como principal fuente de alimento de las cepas aisladas, controlando las condiciones de pH y temperatura para su óptimo desarrollo. Finalmente, se evidenció crecimiento de colonias bacterianas identificadas como *Pseudomonas aeruginosa*, verificando que poseen la capacidad de crecer en condiciones mínimas degradando el polietileno. Las condiciones óptimas para la biodegradación se dieron a un pH de 8 y una temperatura de 25°C.

Cáceres (2011) en la investigación, “Biodegradación bacteriana de polietileno de baja densidad, bajo condiciones controladas en biorreactores Air Lif”, experimentó la capacidad de las bacterias: *Pseudomonas sp*, *Edwarsiella sp.* y *Alcaligenes sp* aisladas del botadero la Moyuna, para degradar el PEBD, utilizando biorreactores de tipo air lift en un sistema sumergido, siendo el polietileno la única fuente de carbono y se trabajó con un rango de pH de 6,4 – 8,3 y a temperaturas de 24-30 °C en medio acuoso. Para verificar la biodegradación se observó la pérdida de peso del PEBD al finalizar el tratamiento (7 días) y se analizó cambios en la estructura del polímero. Se obtuvo como resultado que existe una mayor disminución de peso del PEBD sometido a tratamiento con respecto al blanco, presentado una mayor tendencia a disminuir el peso al final de

la operación para concentraciones de 50, 100 y 150 mg/L. También se visualizó un incremento en el peso en las concentraciones de 100 y 200 mg/L esto se le atribuye a la formación de biopelículas en la superficie del polímero.

Kunlere, Fagade y Nwadike, para el año 2019 publican “*Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by certain indigenous bacteria and fungi*”: En su estudio, reporta evidencia de biodegradación exitosa por dos especies fúngicas (*Aspergillus flavus MCP5* y *Aspergillus flavus MMP10*) y ocho especies bacterianas (*Acinetobacter sp. MGP1*; *Bacillus sp. MGP1*; *Pseudomonas sp. MMP1*; *Bacillus sp. MMP5*; *Staphylococcus sp. MMP10*; *Bacillus sp. MGP1*; *Micrococcus sp. MMP5* y *Bacillus sp. MMP10*). El estudio de biodegradación se verificó mediante métodos gravimétricos y espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR). Revelando que estos microorganismos habían utilizado el LDPE como única fuente de carbono.

En base a la Tesis de Gutiérrez (2019): “Biodegradación de polietileno de baja densidad utilizando hongos, bacterias y consorcios microbianos aislados del botadero municipal de Tacna”, describe el aislamiento y la actividad de biodegradación de cepas identificadas como: *Bacillos sp*, *Acinetobacter sp*, *Pseudomonas sp*, *Flavobacterium sp*, *Micrococcus sp*, *Rhodotorula sp*, *Penicillium vanoranjei*, *Aspergillus sp*, *Saccharomyces cereviceae*, en un periodo de 70 días de incubación. La degradación del polietileno de baja densidad fue evidenciada mediante microfotografía SEM, observándose un porcentaje promedio de pérdida de peso de 2,88%.

La investigación de Vargas (2013) titulada “Biodegradabilidad de polietileno tereftalato y de oxopolietileno, a nivel de laboratorio, por la acción de bacterias nativas presentes en humus de lombriz, caballo y gallina” analiza la degradación en un periodo de 35 días utilizando para ello las bacterias aisladas del humus. Al finalizar el test, se obtuvo un porcentaje de biodegradación de

10,89% de polietileno tereftalato. En cuanto al porcentaje de biodegradación del oxopolietileno, se obtuvieron buenos resultados en el test de degradación presentando así un 39,99%.

De acuerdo con el artículo de Méndez *et al.* (2007), “Aislamiento y caracterización de micromicetos biodegradadores de polietileno”, indica que se aislaron 20 cepas de hongos del relleno sanitario. La actividad biodegradadora se determinó con la técnica de Kavelman y Kendrick, a temperaturas entre 20 y 30 °C y a pH de 4,5 a 8,0. Como resultado se obtuvo que las cepas poseen mayor capacidad de biodegradación de polietileno a 30 °C, siendo 6,5 el pH óptimo y la cepa de mayor rendimiento pertenece a la cepa *Aspergillus flavus*.

Según el estudio de Vimala y Mathew (2016) titulado “*Biodegradation of Polyethylene using Bacillus subtilis*” busca métodos para mejorar la tasa de biodegradación del polietileno por medios físicos y biológicos. Mediante el uso de luz UV como medio físico de pretratamiento descubrieron que mejora la actividad microbiana para digerir los polímeros. Además, *Bacillus subtilis* produjo compuestos tensioactivos que potencian el proceso de biodegradación. Las películas de polietileno (18u espesor) tratadas con *Bacillus subtilis* más la incorporación de un biosurfactante (surfactina) obtuvieron una variación de peso de 9,26% en 30 días.

En base a Butron (2020), que aporta con su investigación: “Capacidad de Biodegradación de *Pseudomona aeruginosa* frente al polietileno de baja densidad”, se aisló la bacteria de desechos plásticos obtenidos del botadero de Cancharani y su adaptación se realizó en un medio mineral con partículas de PEBD. La capacidad degradativa se determinó a temperaturas de 25 y 35 °C con un pH de 5 y 7, durante 30 días. Se obtuvo como resultado un porcentaje de 21,7% y 27,3% de pérdida de peso a una temperatura de 25°C y 35°C respectivamente a un pH de 7.

De acuerdo con el artículo de Jamil *et al.*, (2017), titulado: “Biodegradation of polyethylene by bacterial strains isolated from Kashmir Cave, Buner, Pakistan”, prueba la capacidad de las cepas bacterianas identificadas como *Serratia sp.*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus sp.* y *Stenotrophomonas sp.* para degradar el polietileno de baja densidad (LDPE) durante un periodo de incubación de un mes. Se evaluó la biodegradación en términos de crecimiento de microorganismos, cambios en la estructura química del LDPE por FTIR y cambios en la estructura física del LDPE por microscopía electrónica de barrido. Se obtuvo un máximo de crecimiento de 107×10^5 UFC mL^{-1} a 28 °C. La espectroscopía mostró degradación debido a la formación de nuevos compuestos evidenciada en la aparición y desaparición de picos en el espectro del LDPE sometido a tratamiento y la microscopía mostró adherencia de bacterias con mucho daño mecánico y erosión en la superficie de películas plásticas incubadas con consorcios bacterianos.

En base al trabajo de titulación de Cedeño y Meriño (2020) titulado: “Valoración In Vitro de la Biodegradación de polietileno de baja densidad mediante hongos filamentosos aislados del relleno sanitario de Pichacay”, se evalúa la biodegradación del LDPE a través de aislados fúngicos cuyos géneros se identifican como: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma* y *Mucor*; en un periodo de 90 días. Se valoró la capacidad biodegradadora mediante la pérdida de peso del polietileno y un análisis FTIR del mismo. Los porcentajes de biodegradación de los aislados fúngicos fueron: *Fusarium-RSZ1M13* (5,94%), *Aspergillus-RSZ4M6* (5,16%) y *Trichoderma J1* (4,98%). Los espectros FTIR del LDPE evidenciaron cambios en la naturaleza química del polímero, lo que se le atribuye a la biodegradación por efecto de los aislados fúngicos.

Considerando la investigación de Uribe *et al.* (2010), en su artículo “Biodegradación de polietileno de baja densidad por acción de un consorcio microbiano aislado de un relleno sanitario,

Lima, Perú”, describe el aislamiento y la actividad de biodegradación de microorganismos sobre polietileno de baja densidad. Se aislaron 6 cepas entre ellas *Pseudomonas sp.*, *Penicillium sp.*, *Rhodotorula sp.*, *Hyalodendron sp.* y una levadura no identificada. Se evidenció la capacidad de degradación del consorcio microbiano a través de cambios en el espectro IR del polímero con respecto al blanco, identificándose una reducción del índice carbonilo (83,89 % a pH 7 y 4,08% a pH 5,5) y de terminaciones con dobles enlaces (19,77% a pH 7). Además, se determinó el porcentaje de peso perdido por el polietileno sometido a tratamiento observándose una disminución de 5,4% a pH 7 y 4,8% a pH 5,5.

De acuerdo con Santacoloma *et al.* (2019) en su artículo “Evaluation of the biodegradation of polyethylene, polystyrene and polypropylene, through controlled tests in solid suspension with the fungus *Aspergillus flavus*” indica que la cepa fúngica sembrada en dos tipos de agar (YGC y SDA) se puso en contacto con los tres tipos de plástico. Se alcanzaron óptimos resultados para la degradación del polímero, obteniendo que el polímero incubado en el agar YGC, posee un 23,6% de disminución de masa.

En la investigación de Zhang *et al.* (2019), “Biodegradation of polyethylene microplastic particles by the fungus *Aspergillus flavus* from the guts of wax moth *Galleria mellonella*”. El hongo, *Aspergillus flavus* PEDX3, se obtuvo del contenido intestinal de la polilla de la cera *Gallería mellonella*. Los resultados indicaron que el polietileno de alta densidad (HDPE) se degradó a MPP con menor peso molecular después de 28 días de incubación. Se comprobó la biodegradación mediante los resultados obtenidos por análisis FTIR, los cuales mostraron la aparición de grupos carbonilo y grupos éter en el espectro del polietileno tratado, validando la degradación del PE.

2.2. Bases Teóricas

2.2.1. Biodegradación de Polietileno

Avances en temas biotecnológicos indican que la biodegradación de plástico es el método más efectivo, además se considera el método más seguro y económico para la sociedad (Boerger *et al.* 2010).

En la actualidad las investigaciones se centran en microorganismos y enzimas extracelulares capaces de alterar las propiedades físicas y químicas del polietileno, incluso utilizándolo como única fuente de carbono, facilitando los procesos de degradación de los desechos plásticos presentes en la naturaleza. El proceso de la biodegradación es lento. Se ha demostrado que muchos microorganismos poseen la capacidad de degradar plásticos. El desarrollo de estos microorganismos depende de factores como pH, temperatura, disponibilidad de minerales, humedad y la capacidad de adaptarse a diferentes fuentes de carbono (Uribe *et al.* 2010).

2.2.2. Fases en la degradación del plástico por microorganismos.

La biodegradación del plástico empieza en la deterioración la cual involucra actividad microbiana sobre la superficie del polímero, el desgaste, altera las propiedades físicas, químicas y mecánicas del plástico; luego ocurre la biofragmentación, donde los polímeros se transforman a compuestos más sencillos como oligómeros, dímeros e incluso monómeros por acción de las enzimas secretadas por los microorganismos; la penúltima etapa es la asimilación, que consiste en la integración de los compuestos derivados del polímero al metabolismo celular del microorganismo y por último la mineralización que implica el proceso de excreción de metabolitos

completamente oxidados, como nitrógeno molecular, dióxido de carbono y agua (Dussud y Ghiglione, 2014).

2.2.3. Microorganismos con capacidad de degradar plásticos

En base a Acuña (2017) se informa que el polietileno de baja densidad es degradado por 63 géneros de microorganismos entre hongos y bacterias, considerando los diversos factores que intervienen en la biodegradación, es decir, que por lo menos dos tercios de todos los géneros de microorganismos (148 especies) poseen capacidad degradativa frente al polietileno. En la Tabla 1, se presentan distintos géneros y especies tanto de bacterias como de hongos, capaces de degradar el polietileno de baja densidad.

Tabla 1.

Microorganismos capaces de degradar el polietileno de baja densidad

| DOMINIO | GÉNERO | ESPECIE |
|------------------|----------------------------|----------------------|
| BACTERIAS | | <i>baumannii</i> |
| | | <i>ursingii</i> |
| | | <i>sp.</i> |
| | <i>Acanthopleurobacter</i> | <i>Pedís</i> |
| | | <i>denitrificans</i> |
| | <i>Achromobacter</i> | <i>versicolor</i> |
| | | <i>sp.</i> |
| | <i>Bacillus</i> | <i>aerius</i> |

| | | |
|---------------|---------------------|--------------------|
| | | <i>pumilus</i> |
| | | <i>cereus</i> |
| | <i>Enterobacter</i> | <i>Sp.</i> |
| | <i>Listeria</i> | <i>Sp</i> |
| | | <i>sp</i> |
| | <i>Pseudomonas</i> | |
| | | <i>fluorescens</i> |
| | <i>Streptomyces</i> | <i>Sp.</i> |
| | | <i>sp.</i> |
| | <i>Aspergillus</i> | <i>niger</i> |
| | | <i>flavus</i> |
| HONGOS | <i>Acremonium</i> | <i>kiñiense</i> |
| | <i>Candida</i> | <i>sp.</i> |
| | | <i>sp.</i> |
| | <i>Penicillium</i> | |
| | | <i>pinophilum</i> |

Fuente: Sintetizado de (Acuña, 2017) (p.18)

Los organismos con capacidad para degradar realizan procesos de digestión, asimilación y metabolización de un compuesto polimérico (Gutierrez, 2018).

De acuerdo con Madigan *et al.* (2015), los hongos como *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, entre otros poseen la capacidad de adaptarse y sobrevivir a condiciones mínimas de nutrientes, bajo pH y humedad, lo cual genera buenos resultados en la biodegradación. Sin embargo, la biodegradación de polietileno usando bacterias provoca mejores niveles de degradación a largo plazo, tras una mejor adopción de las condiciones del entorno y crecimiento microbiano.

2.2.4. *Aspergillus brasiliensis*

Aspergillus brasiliensis es un hongo filamentoso primero conocido como *Aspergillus niger*, fue rebautizado en 2010; se encuentra en el grupo de los aspergillus negros, cuyas características para su identificación son: cabezas conidiales de tonos negro a negro grisáceo, son globosas, radiadas o divididas formando columnas de cadenas de conidios irregulares o bien definidas. Los conidióforos son de color hialino a café, típicamente lisos o en pocas especies ligeramente granulares, de paredes robustas (Sáez *et al.* 2002).

Esta nueva especie de hongo filamentoso se utiliza en la industria de la fermentación para producir enzimas hidrolíticas como amilasas o lipasas, y ácidos orgánicos, como ácido cítrico y ácido glucónico (Varga *et al.* 2007).

En relación a la taxonomía, se clasifica dentro del reino *Fungi*, filum *Ascomycota*, clase *Eurotiomycetes*, orden *Eurotiales*, familia *Aspergillaceae*, género *Aspergillus*, y finalmente especie *brasiliensis*.

Las colonias de *A. niger* crecen rápidamente, al principio el micelio es color blanco o amarillento y conforme madura toma una coloración oscura; el reverso de la colonia parece una tela gamuzada de color gris-amarillento, muy representativo de esta especie (Sáez *et al.* 2002).

Es recomendable adicionar antibióticos para restringir el crecimiento de microorganismos bacterianos contaminantes. La temperatura de crecimiento óptima es 20-28°C durante 5-7 días. Para obtener la esporulación, es mejor dejar las placas durante los 7 días completos (WickhamLaboratories, 2017).

2.2.5. *Pseudomona aeruginosa*

Pseudomona aeruginosa es una bacteria gram-negativa, pertenece a la familia *Pseudomonaceae*. Es un bacilo recto o ligeramente curvado con un tamaño de 0,5-1 µm de diámetro y de 1,5-5 µm de largo, móvil gracias a la presencia de un flagelo polar. *P. aeruginosa* se puede aislar de muestras de suelo, aguas contaminadas, así como de plantas y animales. Esta bacteria es capaz de utilizar una enorme variedad de compuestos orgánicos como sustrato para crecer, capacidad que le permite colonizar nichos en los que son escasos los nutrientes (Hardalo y SC Edberg, 1997).

En ambientes acuosos esta bacteria se adhiere a superficies, produciendo una especie de agregado llamado biopelícula; las biopelículas tienen una estructura muy compleja, en la que se pueden distinguir canales por los que se intercambian oxígeno y otros sustratos con la fase acuosa (Costerton *et al.* 1994). *P. aeruginosa* tiene diversas aplicaciones biotecnológicas, sobre todo en el área ambiental. Es uno de los pocos organismos capaces de degradar alcanos de cadena ramificada; que produce biosurfactantes que son útiles para la limpieza de suelos contaminados con hidrocarburos o con metales pesados; y que produce enzimas como la lipasa, con distintas aplicaciones potenciales (Soberón, 2017).

La bacteria *Pseudomona aeruginosa* puede crecer entre 20 y 43 °C y al crecer en altas temperaturas se diferencia del resto de especies de *Pseudomonas*. Su cultivo en placas de agar posee un olor dulce característico y el crecimiento óptimo se da en temperaturas entre 30-37°C.

2.2.6. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía infrarroja analiza y obtiene datos acerca de la absorción y emisión de moléculas que están dentro de la materia y se clasifican en dos tipos, la espectroscopía de masa y la espectroscopía de tipo vibracional este método cataloga el estado somático del individuo analizado, ya que el espectro evidencia la composición de las células (Aparicio *et al.* 2012).

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es una técnica analítica disponible para sondear materiales poliméricos, con la unión de un interferómetro infrarrojo a un microscopio equipado con detectores especializados, la espectroscopía FTIR se ha empleado para examinar áreas microscópicas en polímeros (Bhargava *et al.* 2003).

Al exponer muestras de moléculas a la radiación infrarroja estas absorben selectivamente la radiación de longitudes de onda específicas, provocando el cambio del momento dipolar de las moléculas de las muestras. Como resultado, los niveles de energía vibracional de las moléculas de muestra se transfieren del estado fundamental, al estado excitado (Birkner y Wang, 2014).

El espectro de la muestra se calcula a partir del interferograma que es el resultado de la detección de la señal y contiene toda la información de la muestra en todas las longitudes de onda a partir de técnicas rápidas de transformación de Fourier con algoritmos matemáticos elaborados (Schmitt y Flemming, 1998).

2.2.6.1. El espectro de absorción como método para identificar los cambios en la estructura del polietileno sometido a biodegradación

El análisis espectral se fundamenta en el estudio de los espectros para identificar los elementos que componen una determinada sustancia. El espectro es característico del átomo o molécula que lo ha producido. Los resultados analíticos se asocian a una base de datos de longitudes de onda de absorción, de modo que el espectro resultante se puede analizar con la ayuda de tablas (Tabla 2) que correlacionan las frecuencias de las bandas de vibración con grupos funcionales (Moore, 2016).

Tabla 2.

Señales de absorción en espectros FTIR

| Frecuencia (cm-1) | Descripción |
|--------------------------|---|
| 3300-3400 | Grupos OH unidos a H de alcoholes, fenoles y ácidos orgánicos |
| 2920-2930 | C-H estiramiento de estructuras de alquilo |
| 1660-1600 | Aromático y olefínico C-C, C-O en carboxilo; amida (I), cetona y grupos de quinonas |
| 1550 | Amidas II, aromáticas C-C |
| 1450 y 1380 | OH de fenoles, COO-, -CH ₃ , amida II |
| 1260-1200 | Amida III o éteres aromáticos C-O-C |
| 1070-1030 | -C-O-C de carbohidratos, éteres aromáticos, agrupaciones Si-o-c |

Fuente: Tomada de (Amir *et al.* 2010)

2.2.6.2. ATR para aplicaciones FTIR

La Reflectancia Total Atenuada (ATR) es un método de muestreo que introduce luz en una muestra para obtener información estructural y de composición. La ATR es una de las tecnologías más usadas para la espectroscopía FTIR (Mettler Toledo, s.f.). El objetivo de usar la ATR es que permite analizar muestras sólidas y líquidas de forma ordenada, lo que faculta la medición de prácticamente cualquier sustancia. Uno de los primeros usos de la ATR fue obtener los espectros infrarrojos de muestras de polímeros (Milosevic *et al.* 1995).

La ATR emplea un material de sensor óptico que presenta un alto índice de refracción para permitir el reflejo interno del sensor. La intensidad del espectro FTIR dependerá fundamentalmente del número de reflejos. La profundidad restringida de penetración de la energía infrarroja en la muestra que está en contacto con el sensor ATR permite registrar espectros FTIR de gran calidad (Mettler Toledo, s.f.).

2.2.6.3. Cálculo de la segunda derivada en espectros FTIR

La segunda derivada se presenta invertida del espectro original, lo que permite evidenciar las bandas no definidas, por lo tanto, proporciona información complementaria (Díaz, 2018).

Para calcular la segunda derivada de un espectro FTIR se emplea el algoritmo *Savitzky-Golay*, que consiste en emplear un ajuste sucesivo de subconjuntos de datos puntuales adyacentes con un bajo grado polinomial por mínimos cuadrados a la aproximación lineal (Mata et al. 2017).

2.2.7. Análisis de Componentes Principales (ACP) como método de reducción de variables.

El Análisis de Componentes Principales (ACP) es un método estadístico que permite simplificar la complejidad de espacios muestrales con muchas dimensiones a la vez, a través de un estudio de varianzas-covarianzas entre las variables. Tiene como fin conservar la información más relevante reduciendo el

número de variables, formando otras de menor dimensión a las que se conocen como componentes principales (Jolliffe y Cadima, 2016).

Supóngase que existe una muestra con n individuos cada uno con p variables (X_1, X_2, \dots, X_p), es decir, el espacio muestral tiene p dimensiones. ACP permite encontrar un número de factores subyacentes ($z < p$) que explican aproximadamente lo mismo que las p variables originales. Donde a cada una de estas z nuevas variables se le da el nombre de componente principal. En síntesis, el método ACP permite condensar la información aportada por múltiples variables en solo unas pocas componentes (Amat, 2017).

2.2.7.1. Interpretación de las componentes principales

En el *Principal Component Analysis* (PCA), el vector que forma el primer componente principal (Z_1) sigue la dirección en que las observaciones varían más (flecha roja, Fig. 1). La proyección de cada observación sobre esa dirección equivale al valor de la primera componente para dicha observación. En cambio, la segunda componente (Z_2) sigue la segunda dirección en la que los datos muestran mayor varianza y que no está correlacionada con la primera componente, ya que sus direcciones son perpendiculares (Amat, 2017).

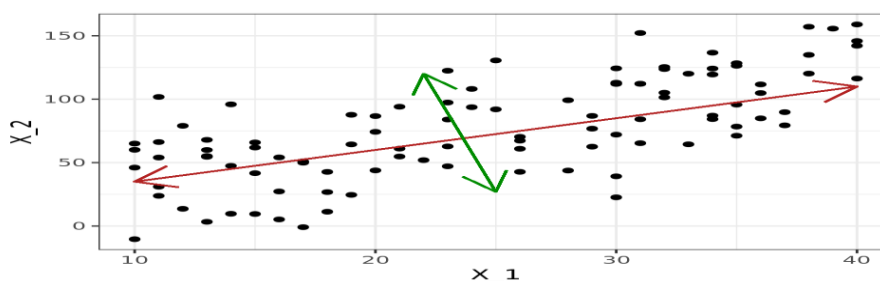


Figura 1. Interpretación geométrica de las CP.

Fuente: Tomado de (Amat, 2017)

2.2.7.2. Plano principal y círculo de correlación

Cada patrón característico puede ser representado como un punto en el espacio P' , gracias a los valores de las componentes que actúan como coordenadas. La nube de puntos (Figura 2) se forma cuando se dibujan todos estos puntos con respecto a dos ejes (Restrepo *et al.* 2007).

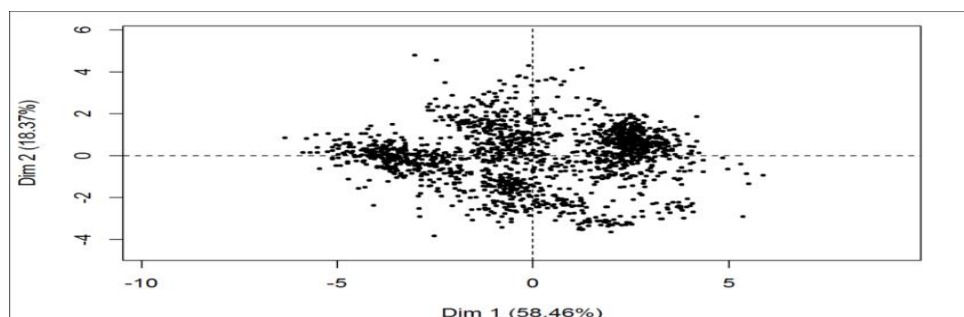


Figura 2. Plano principal (Nube de puntos).

Fuente: Figura tomada de (Bazan, 2016) (p. 41)

A cada variable original también se le puede asignar un punto en el espacio P' , cuyas coordenadas corresponden a los valores de correlación entre dicha variable y las variables transformadas; en consecuencia, a través de la cercanía entre una y otra se puede visualizar el grado de correlación entre las características originales (Restrepo *et al.* 2007).

En el círculo de correlación (Figura 3), si X^j y $X^{j'}$ están cercanas entre sí, entonces se presenta una correlación fuerte y positiva, si el ángulo es cercano a 90° no existe correlación entre las variables; y existe una correlación fuerte y negativa si X^j y $X^{j'}$ están opuestas al vértice (Haro *et al.* 2020).

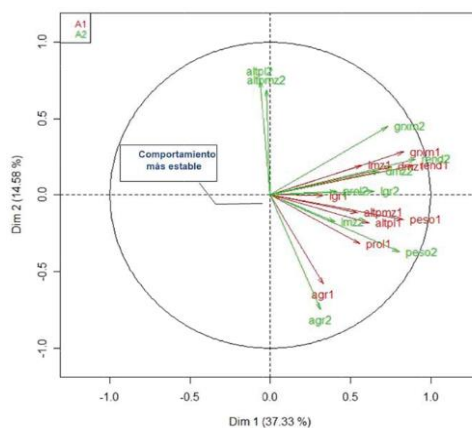


Figura 3. Círculo de correlación.

Fuente: Figura tomada de (Zuliani et al. 2018) (p.85)

Se coloca el círculo de correlación sobre el plano principal para interpretar las componentes principales de manera adecuada (Restrepo *et al.* 2007).

2.2.8. Análisis Clúster

El análisis clúster, también llamado análisis de conglomerados, pertenece a las técnicas estadísticas multivariantes de clasificación automática de datos (Pérez, 2004). Esta técnica sitúa las observaciones en determinados clústeres, los cuales no son conocidos de antemano, pero el objetivo es formar conglomerados lo más homogéneos dentro de sí y lo más heterogéneos entre sí (Uriel y Aldás, 2005).

El análisis de conglomerados inicia estimando la similitud entre los objetos, mediante la asociación de las variables. Luego, establece un protocolo para comparar los grupos en virtud de las similitudes. Finalmente, se decide cuántos conglomerados se conforman (Pérez, 2004).

El análisis de conglomerados es una técnica descriptiva que no utiliza la estadística para llevar a cabo el proceso de clasificación, por lo que, se considera una técnica de aprendizaje no

supervisado (Peña, 2002). Se centra más bien en describir la realidad que está analizando, mostrando las peculiaridades de los grupos alcanzados (Cabarcos, 2015).

-Distancia Euclidiana

Se da el nombre de disimilaridad entre dos individuos i y j a una medida, indicada por $d(i,j)$, que mide el grado de semejanza o desemejanza, entre ambos objetos o individuos, en relación de un cierto número de características cuantitativas y/o cualitativas. El valor de $d(i,j)$ es siempre un valor no negativo, y cuanto mayor sea este valor, mayor será la diferencia entre los individuos i y j (Núñez y Escobedo, 2011).

-Número de Conglomerados

El número de posibles agrupaciones que se pueden formar con N objetos con los cuales se pretende crear k grupos, lo denotamos por $S(N,k)$ y verifica la siguiente ecuación en diferencias (Larrañaga *et al.* 2015):

$$S(N, k) = kS(N - 1, k) + S(N - 1, k - 1)$$

Tipos de Clustering

1. Clustering particional

El propósito del clustering particional es obtener una división de los objetos en conglomerados de tal forma que todos los objetos pertenezcan a alguno de los k clústeres posibles y que por otra parte los clústeres sean disjuntos (Larrañaga *et al.* 2015). El método de clustering particional más utilizado es el método de *k-medias*.

-Algoritmo *K-means*

K-means es un algoritmo de clasificación no supervisada (clusterización) que agrupa objetos en (k) grupos basándose en sus características. El agrupamiento se realiza minimizando la suma de distancias cuadráticas entre cada objeto y el centroide de su grupo (Lim *et al.* 2020). El algoritmo consta de los siguientes pasos (McQueen, 1967):

- 1) Se debe seleccionar el número de clústeres (K), como el centroide inicial
- 2) Los puntos cercanos al centroide se asignan a un clúster
- 3) Se recalcula el centroide de cada clúster hasta que el centroide no cambie

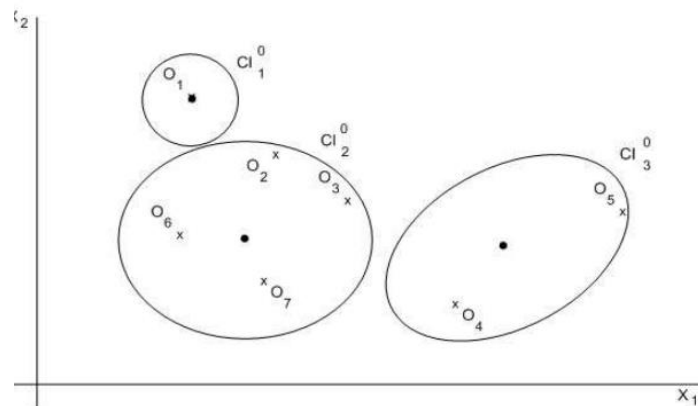


Figura 4. Clustering particional. Método McQueen de *k-means*

Fuente: Tomado de (Larrañaga *et al.* 2015) (p. 6)

2. Clustering jerárquico

Este método consiste en la agrupación de objetos de forma sucesiva (Flores, 2017). Los métodos jerárquicos construyen una estructura en la que los elementos se agrupan en subconjuntos

cada vez mayores hasta que todos pertenecen al mismo conjunto, de esta forma, se muestra las relaciones de proximidad que existen entre los elementos (Tan *et al.* 2006).

Se puede definir dos tipos de clustering jerárquico dependiendo de la dirección en la que el algoritmo ejecute el agrupamiento (Tan *et al.* 2006):

- a) Aglomerativo (ascendentes): Inician con tantos conglomerados como objetos, luego se recalculan las distancias entre los grupos y se unen parejas de grupos más similares. Al final del proceso el clúster formado contiene todos los objetos (Flores, 2017).
- b) Divisivo (descendentes): Es lo contrario del aglomerativo. Inicia con un gran clúster que engloba todos los objetos y luego se va dividiendo de acuerdo al grupo más heterogéneo (Flores, 2017).

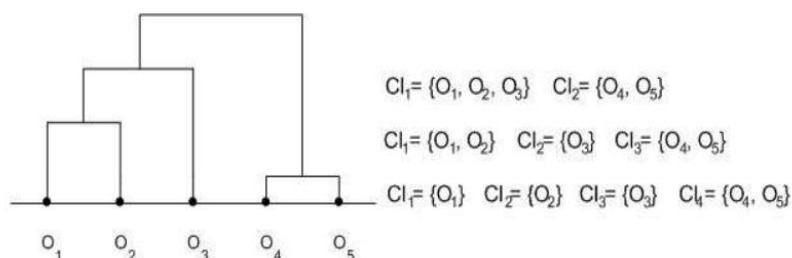


Figura 5. Dendrograma resultado de la clasificación ascendente jerárquica.

Fuente: Tomado de (Larrañaga *et al.* 2015) (p.7)

2.3. Definición de términos

2.3.1. Polietileno de baja densidad (LDPE)

Es un hidrocarburo de alto peso molecular obtenido por la polimerización a altas presiones del gas etileno. Posee una estructura molecular ramificada y pertenece a la familia de los

termoplásticos (Trujillo, 2012). Su peso molecular es de 100.000-300.000 [g/gmol] y su densidad es de 0,90-0,94 [g/cm³] (Moreno, 2006). Es un sólido más o menos flexible y ligero según el grosor, que por sus características y bajo precio se utiliza mucho en envasado (Franquet, 2005).

2.3.2. Degradación de polímeros

La degradación de polímeros se da por reacciones que reducen el grado de polimerización generando efectos de envejecimiento como cambios en la estructura y en la superficie del polímero, pérdida de las propiedades mecánicas, disminución en el peso molecular del polímero, pérdida de aditivos y plastificantes y producción de radicales libres (Miranda, 2015).

El cambio de las propiedades físicas en los polímeros se da por procesos de ruptura de enlaces entre los monómeros de la cadena principal del polímero (Xin *et al.* 2018).

2.3.3. Degradación química

La degradación química se da por exposición de los polímeros a sustancias como ácidos, bases, solventes y gases reactivos (Miranda, 2015). Los hidrocarburos saturados presentan una gran estabilidad química frente ácidos y bases. Se presentan dos tipos de degradación química: la reacción por etapas y en cadena (Su, 2009).

2.3.4. Degradación mecánica

La degradación inducida mecánicamente tiene que ver con los efectos macroscópicos que llevan a la fractura y la deformación producidos por el influjo de fuerzas, así como los cambios químicos inducidos por los esfuerzos mecánicos. En los polímeros, la fabricación (mezclado, molido, laminación, estirado, etc.) y los procesos de modificación (corte, serruchado, limado, torneado, etc.) imponen tensiones y deformaciones (Posada, 2012).

2.3.5. Degradación térmica

La degradación térmica consiste en la rotura de enlaces de las cadenas del polímero por las temperaturas elevadas, experimentando cambios químicos sin la intervención de otras sustancias. La estabilidad térmica de los polímeros depende de dos factores: el ablandamiento del material al aumentar la temperatura, el cual es un proceso reversible; y la descomposición irreversible de la sustancia debido al calor (Posada, 2012).

2.3.6. Biodegradación

La biodegradación es un proceso que descompone un material por medio de la acción enzimática de los microorganismos, convirtiéndolo en dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4), agua (H_2O), entre otros componentes orgánicos (Su, 2009).

2.3.7. Biopelícula

Una biopelícula es un sistema microbiano organizado (Betancourth *et al.* 2004). Se forman cuando los microorganismos flotantes encuentran una superficie para adherirse. Se trata de una unidad hermética, englobada en polisacáridos extracelulares (Sarduy y González 2016).

CAPÍTULO 3

MARCO METODOLÓGICO

3.1. Nivel de Investigación

La presente es una investigación Descriptiva de tipo correlacional, cuya finalidad es determinar el grado de relación que existe entre las variables

Primero se miden las variables y luego, mediante pruebas estadísticas, se estima la correlación (Arias, 2012).

3.2. Diseño de Investigación

La investigación presenta un Diseño de Campo, de tipo explicativo, ya que no se manipulará ninguna variable.

El investigador obtiene la información, pero no altera las condiciones existentes (Arias, 2012).

3.3. Población y muestra

3.3.1. Población:

Se trata de una población de tipo accesible, la misma que representa la porción finita de la población objetivo (polietileno de baja densidad).

Se trata de una población a la que se tiene acceso y de la cual se extrae una muestra representativa (Martínez, 2020).

3.3.2. Muestra:

La muestra es un subconjunto representativo y finito que se extrae de la población accesible (Arias, 2012). Muestra: pellets de PEBD

3.3.3. Muestreo:

El muestreo a emplearse en la investigación será un Muestreo estratificado aleatorio antes y después del tratamiento, el mismo que permitirá reducir errores muestrales en la población.

Consiste en dividir la población en subconjuntos cuyos elementos posean características comunes, es decir, estratos homogéneos en su interior. Posteriormente se escoge al azar en cada estrato (Arias, 2012).

3.4. Variables

3.4.1. Variables Independientes

- Microorganismos (Hongo-Bacteria)
- Tiempo de tratamiento

3.4.2. Variables Dependientes

- Variación de peso de las partículas de polietileno
- Espectros (picos o bandas) obtenidos en diferentes longitudes de onda característicos del polietileno de baja densidad

3.4.3. Variables Intervinientes

- pH, se procederá a bloquear esta variable interviniente al trabajar con un pH único
- Temperatura, esta variable se procederá a bloquear trabajando a temperaturas óptimas para el desarrollo de cada microorganismo.

3.4.4. Variables Extrañas

- La genética y metabolismo que presentan los hongos y bacterias

3.5. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

La técnica empleada para la obtención de datos es la Observación, tanto de tipo estructurada utilizando bitácoras, como no estructurada utilizando como instrumentos cámara fotográfica y el equipo FTIR. También se aplica la técnica Documental, a través de recopilación bibliográfica y su respectivo análisis de contenidos.

3.6. Técnicas de procesamiento y análisis de datos

Los datos que se obtengan serán sometidos a clasificación, donde se separarán los resultados obtenidos del tratamiento de bacterias y hongos, utilizando tablas, gráficos, posteriormente se realizará el análisis de los datos mediante un Análisis de Componentes Principales (ACP), empleando para tal efecto el software *RStudio*.

3.7. Protocolo: Microorganismos utilizados

En el presente estudio se trabajó con una cepa ATCC 27853 de *Pseudomona aeruginosa* y la cepa ATCC 16404 de *Aspergillus brasiliensis* obtenidas del cepario de la Universidad Politécnica Salesiana, las mismas que al ser cepas puras, sólo se procedió a resembrarlas en agar nutritivo para la bacteria y en agar papa-dextrosa (PDA) para el hongo filamentoso, luego del periodo de incubación se observó las características macroscópicas del crecimiento en placa Petri. Para la observación microscópica se realizó Tinción de Gram a la bacteria *Ps. aeruginosa* y una tinción con azul de lactofenol mediante la técnica de impronta a *A. brasiliensis*, la misma que permite observar al microscopio las hifas de hongos filamentosos sin dañarlos.

3.8. Elaboración de Medios de cultivo

Se preparó medios de cultivo como son agar nutritivo (AN), caldo nutritivo (CN) y medio mineral modificado (MMM), este último se preparó reproduciendo el protocolo utilizado por Butron (2020): 3,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 1,8 g KH_2PO_4 ; 0,02 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,03 g

Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O; 0,01 g CaCl₂·2H₂O; 0,5 g NaCl; 0,3 g NH₄Cl y 1 ml de solución de oligoelementos por litro que incluye 0,20 g MnSO₄; 0,029 g H₃BO₃; 0,022 g ZnSO₄·7H₂O; 1,0 g Na₂MoO₄, trazas de Co (NO₃)₂ y trazas de CuSO₄ disuelto en 500 ml de agua.

3.9. Tratamiento del polietileno de baja densidad (PEBD)

Las perlas de polietileno de baja densidad (pellets) fueron obtenidas de un proveedor de plástico local, las mismas que pasaron por un molino para ser trituradas y posteriormente fueron tamizadas hasta obtener una dimensión de 2 mm de diámetro.

Para la desinfección de los pellets de PEBD previo a la inoculación se procedió a lavarlas con etanol al 70 % durante 30 minutos y se irradió con luz UV por un periodo de 30 minutos.

3.10. Adaptación del metabolismo de cepas puras en medios sintéticos con polietileno de baja densidad

En el presente trabajo experimental se utilizó *Aspergillus brasiliensis*, para el tratamiento fúngico, y la bacteria utilizada fue *Pseudomonas aeruginosa*, los mismos que se trabajaron de manera separada.

Para iniciar el proceso se esterilizaron matraces de 50 ml de capacidad y se rotularon de la siguiente manera: P1, P2, P3, P4, P5, y P6 (Arenas, 2018).

De acuerdo con (Butron, 2020), la cepa pura de *Pseudomonas aeruginosa* se inoculó en el matraz P1 con 2,5 ml de caldo nutritivo (CN) más 2,5 de medio mineral (caldo de crecimiento), se colocó en la incubadora a 37 °C por 72 horas. Transcurrido este tiempo, se tomó 4 ml del matraz P1 y se colocó en el matraz P2 que contenía 1 ml de caldo de crecimiento y 0,002 g de PEBD. Este matraz se colocó en el orbital a 35 rpm y a 37 °C de temperatura por 72 horas. Transcurrido el lapso de tiempo de incubación del matraz P2, se tomaron 3 ml y se inoculó en el matraz P3 con 2 ml de caldo de crecimiento, más 0,004 g de PEBD. Este nuevo matraz se colocó en el orbital a 35

rpm y a 37°C por 72 horas. Transcurrido los tres días se tomaron 2 ml del P3 y se inoculó en el matraz P4 con 3 ml de caldo de crecimiento y 0,006 g. de PEBD. Este matraz se colocó nuevamente en la incubadora a 35 rpm a la misma temperatura por 72 horas. Al cabo de 3 días, se tomó 1 ml del P4 y se colocó en el nuevo matraz P5 que contenía 4 ml de caldo de crecimiento con 0,008 g de PEBD. Se llevó este nuevo matraz a incubar a las mismas condiciones anteriores. Finalmente se tomó una alícuota de 0,5 ml del matraz P5 y se colocó en el matraz P6 con 4,5 ml de medio con 0,009 g de PEBD. Colocando el matraz nuevamente en la incubadora a 37 °C, con 35 rpm por 72 horas, observándose el crecimiento y turbidez cada día.

Se realizó el mismo procedimiento con la cepa de *Aspergillus brasiliensis*, pero se trabajó a una temperatura de incubación de 28 °C.

Para finalizar se tomó 1 ml del último ensayo y se realizó diluciones seriadas para las siembras microbiológicas en agar nutritivo para bacteria y agar papa dextrosa para hongos, se incubó en una estufa a una temperatura de 37 °C y 28 °C por 24- 72 horas respectivamente. Se observó el crecimiento de colonias para la confirmación de desarrollo microbiano.

3.11. Prueba de la Biodegradación del PEBD

Esta prueba determina la variación directa de la masa o peso del polietileno de baja densidad que ha sido expuesto a las condiciones de biodegradación (Butron, 2020).

Se procedió a inocular la cepa adaptada tomando 2 ml que se inocularon con 10 ml de medio de crecimiento y 0,002 g de PEBD en un nuevo matraz estéril y se llevó a incubación a 37°C por una semana hasta obtener una turbidez de 0,5 de la escala de Mac Farland.

Se rotuló y pesó nuevos matraces estériles. Posteriormente se enceró y se agregó 0,01 g de PEBD a cada matraz y se agregó 4 ml de medio mineral modificado (MM) cuyo pH se ajustó a 7.

Se inoculó a cada uno de los matraces con 1 ml de la cepa adaptada y fueron llevados al orbital a 30°C de temperatura para *Ps. aeruginosa* y a 28°C para *A. brasiliensis*, se programó a 35 rpm por un periodo de 30 días conjuntamente con los controles. Como controles o blancos se utilizaron matraces con polietileno sin cepas microbianas únicamente con el medio mineral. Semanalmente se observó la turbidez de los medios la misma que indica crecimiento bacteriano.

Además, se agregó 3,75 gramos de agar-agar a 250 ml de medio mineral para solidificar el medio. Luego se inoculó con las cepas adaptadas tanto bacteriana como fúngica y se adicionó 1% de polietileno por caja Petri, es decir 0,2 g. Como blancos se emplearon los medios solidificados con PEBD sin cepas. Tanto los blancos como los tratamientos fueron llevados a incubación por 30 días a 28°C temperatura ideal para el crecimiento fúngico y a 30°C temperatura óptima para el crecimiento bacteriano.

3.12. Desinfección del PEBD luego del tratamiento y determinación del peso seco del polietileno residual

Pasado los 30 días de incubación se realizó un proceso de desinfección para eliminar la biopelícula generada en la superficie del PEBD. Para tal efecto se separó el material plástico del medio y se sumergió en etanol al 70% durante 30 minutos, luego se lavaron con una solución de sodio dodecilsulfato al 2% durante 1 hora, seguido de un lavado con agua destilada estéril por 10 minutos, finalmente se dejó secar en una estufa a 50°C por toda la noche.

Para obtener el porcentaje de pérdida de peso, las muestras de PEBD se pesaron en una balanza analítica con cuatro cifras de precisión y se aplicó la siguiente fórmula (Butron, 2020):

$$\%p\acute{e}rdida = \frac{(W_{inicial} - W_{final})}{W_{inicial}} \times 100 \text{ (Kyaw et al., 2012)}$$

3.13. Análisis FTIR

El análisis de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier se realizó en el laboratorio de cromatografía de la Universidad Politécnica Salesiana, en un espectrofotómetro FTIR de marca *Thermo Scientific*, en un intervalo espectral de $4000 - 650 \text{ cm}^{-1}$. El instrumento cuenta con una resolución espectral fija de 4 cm^{-1} y trabaja en el modo de Reflectancia Total Atenuada (ATR).

Se utilizó la espectroscopía FTIR como método para identificar los cambios en la estructura del polietileno, y la formación o desaparición de grupos funcionales en el PEBD sometido a tratamiento.

Para la región de los grupos funcionales, se analizó el espectro infrarrojo (IR) que va de 1200 a 3600 cm^{-1} y para la región de la huella digital los espectros que van desde 600 a 1200 cm^{-1} (Uribe *et al.* 2010).

También se realizó un análisis FTIR a los medios de cultivo líquidos en donde ocurrió la biodegradación, en comparación a los medios antes del tratamiento. Se prepararon cuatro réplicas de cada período de incubación (15, 30 y 60 días) para su análisis espectroscópico FTIR.

Una vez adquiridos todos los espectros FTIR (espectros en crudo), se les aplicó un tratamiento de normalización mediante normalización de la escala, donde se relaciona la absorbancia a una longitud de onda determinada que va de 0 a 1 y correcciones de línea base, esta última consiste en realizar un ajuste cuadrático del espectro $Y(x)$, usando mínimos cuadrados, proceso que lo realiza el software OMNIC del equipo FTIR. Se trabajó con un espaciado de datos de 16, luego se aplicó la segunda derivada a cada espectro como se puede apreciar en la Figura 6.

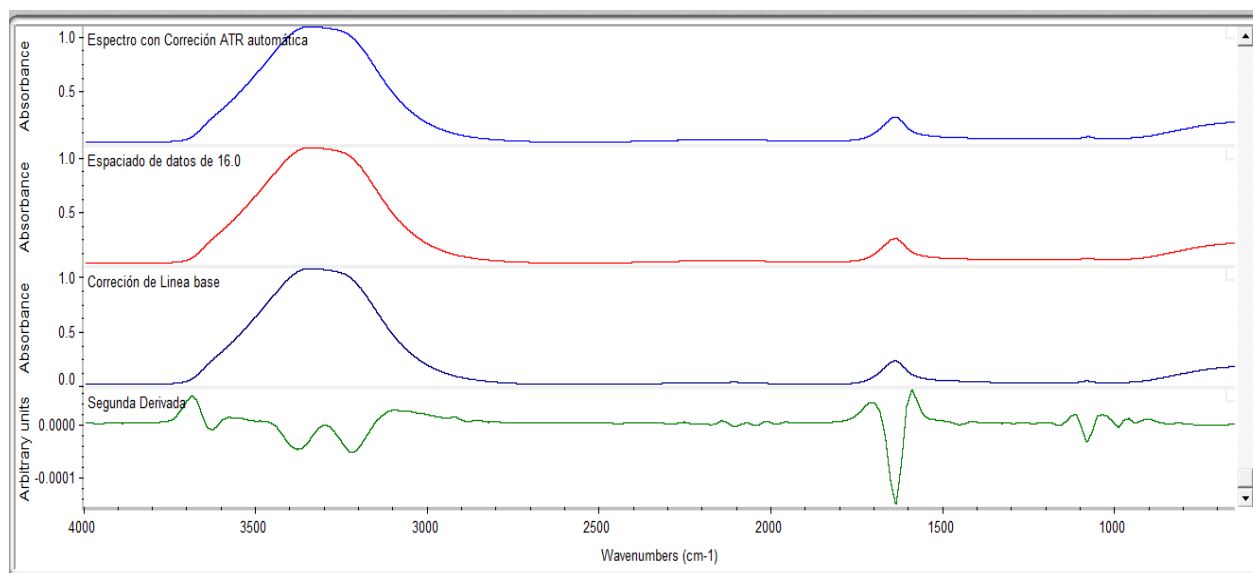


Figura 6. Tratamiento de normalización del espectro.

Fuente: El Autor

Los datos se descargan del software en formato csv.text. Posteriormente se realizó una tabla de Excel tomando únicamente los valores correspondientes a los rangos de longitudes de onda de interés, los mismos que se utilizarán como datos de entrada para la aplicación del método estadístico de ACP.

3.14. Modelo estadístico

Una de las principales herramientas para reducir la dimensionalidad de un gran número de variables y a su vez agrupar los datos de acuerdo a características similares entre las variables son las técnicas estadísticas multivariantes, como el análisis por componentes principales (ACP) o técnicas de clasificación como el análisis de conglomerados (Polanco, 2016).

3.14.1. Análisis de Componentes Principales (ACP)

Las longitudes de onda de interés de los espectros FTIR, se analizaron a través del método multivariado de Análisis de Componentes Principales (ACP) con el fin de reducir la

dimensionalidad de las variables (longitudes de onda), para tal efecto se empleó el software *RStudio*.

El ACP se origina en el análisis exploratorio de datos, cuyo fin es la reducción del número de variables (dimensión). Las componentes se determinan mediante combinación lineal de las variables originales (Alcón y Lloret, 2015).

Para comprobar que las correlaciones entre las variables son distintas de cero, se aplicó el test de *Bartlett*, el cual es un análisis de homogeneidad de varianzas, que verifica si el determinante de la matriz R es distinto de uno y contrasta (Ferrelli *et al.* 2019):

$$\begin{cases} H_0: |R| = 1 \\ H_a: |R| \neq 1 \end{cases}$$

El test a valores altos rechaza la hipótesis nula, ya que la matriz de correlaciones no es la matriz identidad (Muhammad, 2020).

Para analizar los supuestos de multicolinealidad. Se planteó las siguientes hipótesis:

$H_0 =$ Las variables son linealmente independientes (No existe relación lineal entre ellas)

$H_a =$ Las variables son linealmente dependientes (Existe relación lineal entre ellas)

Para calcular las componentes principales de un set de datos X con n observaciones y p variables, primero se debe estandarizar las variables para que tengan media 0 y desviación estándar 1 (Amat, 2017).

Se utiliza la representación gráfica de las observaciones en el plano principal para identificar las similitudes entre los mismos; también, se emplea el círculo de correlaciones, el mismo que muestra la representación gráfica de la correlación entre las variables, para lo cual se analiza el ángulo que se forma entre éstas.

Se empleó el coeficiente de correlación de Pearson para conocer el grado de correlación existente entre los componentes obtenidos por el ACP.

El coeficiente de correlación de Pearson es un test que mide la relación estadística entre dos variables continuas. El coeficiente puede tomar un rango de valores de +1 a -1. Un valor de 0 significa que no hay asociación entre las dos variables. Un valor mayor a 0 indica una asociación positiva y un valor menor a 0 indica asociación negativa (Vinuesa, 2016).

3.14.2. Análisis de Clúster

En el presente estudio se aplicará un análisis clúster, donde la variable respuesta Y no se tiene en cuenta ya que el objetivo no es predecir Y sino extraer información, para identificar subgrupos.

El análisis clúster se realizó de igual manera mediante el software *RStudio*. La similaridad entre los datos se midió mediante *Distancia Euclidiana*. Para aplicar este modelo se debe especificar el número de clústeres (k) necesarios para el estudio, en función de la métrica usada, en este caso se usó la métrica *Elbow method*, la misma que se basa en el estadístico de la suma de errores al cuadrado (SSE) y su fin es encontrar el punto donde la SSE cambia marginalmente.

Una vez especificado el número óptimo de clústeres con los que se va a trabajar, se aplicó un *Clustering particional* utilizando para ello un algoritmo de *k-medias*, el mismo que busca maximizar el peso entre conglomerados y minimizar el peso dentro de los grupos. Cada clúster se asocia con un punto central o centroide, y se busca que los puntos cercanos al centroide se asignen a un clúster respectivo.

También se realizó un *Clustering jerárquico* para evaluar el análisis realizado anteriormente y verificar si existe alguna estructura que tal vez *k-medias* no consideró y que se pueda visualizar mediante jerarquía.

CAPÍTULO 4.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización de Cepas

Se observó las características macroscópicas del crecimiento en placa Petri. La cepa de *Pseudomona aeruginosa*, presentó desarrollo de colonias de color blanquecino amarillento (Fig.7). Mientras que *Aspergillus brasiliensis* al inicio del crecimiento presentaba colonias de color blanco, pero a medida que completaba su desarrollo las colonias se tornaron de color negro con una apariencia gamuzada (Figura 8).

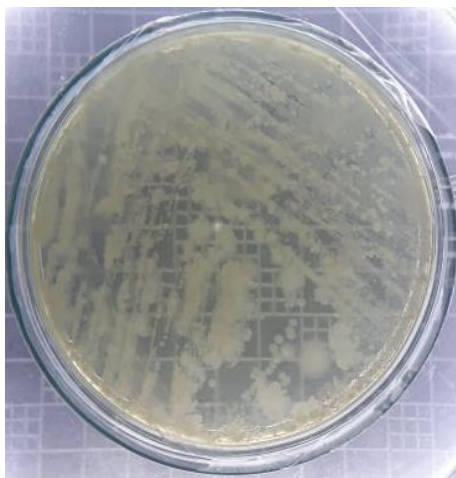


Figura 7. Cultivo de cepa ATCC de *Ps. aeruginosa*
Fuente: Autor

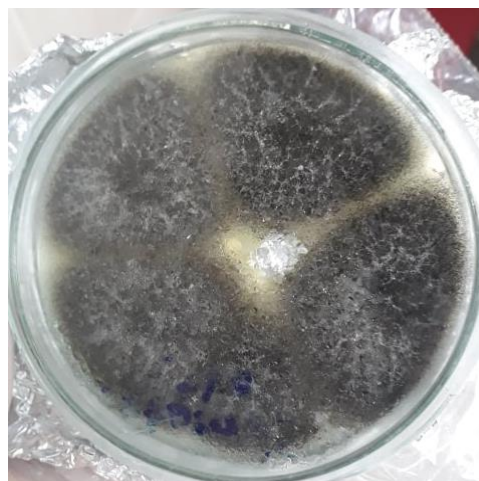


Figura 8. Cultivo de cepa ATCC de *A. brasiliensis*
Fuente: Autor

La cepa bacteriana fue sometida a tinción de Gram, dando como resultado una coloración rosada al observarla en el microscopio (Figura 9), es decir que se identifica como bacteria Gram-negativa, lo cual confirma que las cepas tienen la característica de ser *Pseudomona*.



Figura 9. Tinción de Gram de Ps. aeruginosa.

Fuente: El Autor

Por otro lado, *Aspergillus brasiliensis* fue sometido a tinción con azul de lactofenol, la misma que se emplea para observar al microscopio las estructuras de hongos filamentosos. Con un lente de Max 40, se logró observar gran cantidad de hifas, es decir micelios completos, así como también conidióforos lisos, conidios globosos y vesículas globosas las cuales se apreciaban densas debido a la acumulación de colonias negras.

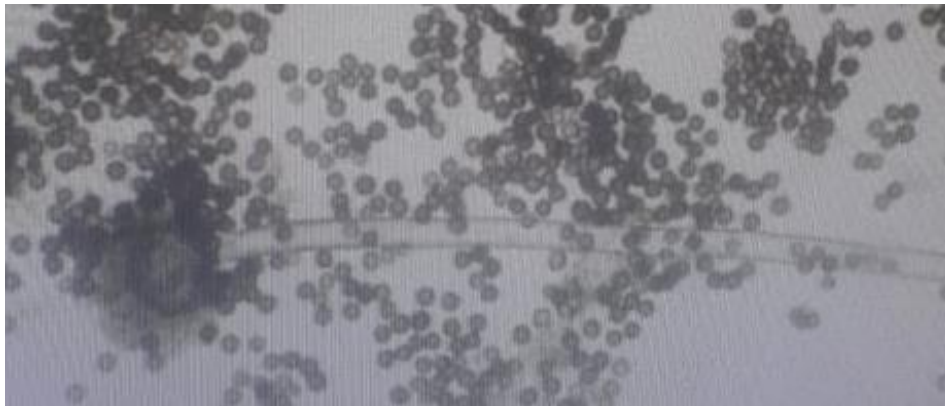


Figura 10. A. brasiliensis observado al microscopio.

Fuente: El Autor

4.2. Proceso de adaptación de las cepas en medios con polietileno de baja densidad

En el proceso de adaptación del metabolismo tanto de *Ps. aeruginosa* como de *A. brasiliensis* en medios minerales con polietileno de baja densidad, se pudo observar un ligero aumento en la turbidez del medio, lo cual es sinónimo de incremento de biomasa dentro del caldo de cultivo. Esto se verificó al momento de sembrar el inóculo adaptado en placas con agar las mismas que presentaron desarrollo de colonias.

4.3. Observación del período de biodegradación

La biodegradación se evaluó transcurrido 30 días donde se inoculó las cepas adaptadas en el medio mineral que contenía polietileno como única fuente de carbono. En la primera semana se observó un ligero incremento en la turbidez de los medios tratados tanto con *Pseudomona* como los tratados con *Aspergillus*, los controles se mantuvieron intactos, sin variación en la turbidez ni contaminación. En la segunda semana los medios incrementaron la turbidez, los inoculados con cepas de *Ps. aeruginosa* presentaban una turbidez mayor en comparación con los tratados con *A. brasiliensis*. Sin embargo, una de las muestras tratadas con *Aspergillus*, presentó la formación de un cúmulo de color negro en el medio mineral, el mismo que correspondía a una pequeña colonia del hongo, resultado que coincide con Espinoza (2018), donde explica que la colonia formada verifica que el microorganismo es capaz de crecer en las condiciones mínimas del medio.

En los controles la turbidez del medio mineral permaneció constante a lo largo del período de incubación. En la tercera semana la turbidez se mantuvo, no se observó incremento de la misma. Finalmente, en la cuarta semana la turbidez de las muestras aumentó ligeramente en el Anexo B. se puede apreciar la tabla de registro de las observaciones semanales del período de biodegradación, donde se explica con más detalle el avance del proceso.

4.4. Determinación del porcentaje de pérdida de peso del polietileno biodegradado

Se procedió a aplicar la fórmula proporcionada por Kyaw et al. (2012) y se obtuvo el porcentaje de la diferencia de peso del polietileno tratado con *Ps. aeruginosa* y del tratado con *A. brasiliensis* con respecto al peso inicial.

Como se observa en la Tabla 3, se obtuvo como resultado que el polietileno de baja densidad (PEBD) tratado con *A. brasiliensis* presentó un porcentaje de pérdida de peso de 0,97%; y el polietileno tratado con *Ps. aeruginosa* presentó 1,52% de pérdida de peso, siendo este último, el tratamiento que obtuvo el mejor resultado en cuanto a la variación de peso de las muestras de PEBD con respecto al blanco.

Tabla 3.

Peso inicial y final del PEBD sometido a tratamiento biológico y % de variación de peso

| Peso inicial PEBD (g) | Peso final PEBD (g) | Muestra | % pérdida de peso | % Promedio |
|-----------------------|---------------------|---------------------------|-------------------|------------|
| 0.0105 | 0.0104 | M1 <i>A. brasiliensis</i> | 0.95 | |
| 0.0104 | 0.0102 | M2 <i>A. brasiliensis</i> | 1.92 | 0.9725 |
| 0.0098 | 0.0097 | M3 <i>A. brasiliensis</i> | 1.02 | |
| 0.0105 | 0.0105 | M4 <i>A. brasiliensis</i> | 0 | |
| 0.0097 | 0.0095 | M1 <i>Ps. aeruginosa</i> | 2.062 | |
| 0.0098 | 0.0097 | M2 <i>Ps. aeruginosa</i> | 1.02 | 1.5205 |
| 0.01 | 0.0097 | M3 <i>Ps. aeruginosa</i> | 3 | |
| 0.0103 | 0.0103 | M4 <i>Ps. aeruginosa</i> | 0 | |
| 0.0105 | 0.0105 | Control bac. | 0 | 0 |
| 0.01 | 0.01 | Control hon. | 0 | |

De acuerdo con Shah *et al.* (2008), la determinación de pérdida de peso no es un indicador fiable para el estudio de biodegradación de polímeros, ya que la variación de peso puede ser consecuencia de pérdidas durante el lavado e incluso según Espinoza (2018) puede aumentar su masa debido a los restos de material biológico (biofilms) adheridos a la superficie y por acumulación de agua en el polietileno. Por tal razón se consideró evaluar la biodegradación a través de un análisis FTIR, no sólo del polietileno, sino también de los medios en los que se realizó el proceso de biodegradación, ya que Shah *et al.* (2008) afirma que gran parte de la masa perdida del polímero corresponde a erosión superficial y no a bioasimilación.

4.5. Análisis FTIR

4.5.1. Análisis FTIR del PEBD antes y después de la biodegradación

La Figura 11, muestra el espectro característico del polietileno de baja densidad sin ser sometido a un tratamiento biológico, donde se observan picos o bandas, en las longitudes de onda de 2847 cm^{-1} y 2914 cm^{-1} ; de acuerdo con lo que indica Serrano (2018), estas bandas se localizan entre $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$, en cuya región se identifican las vibraciones de extensión C-H de los grupos metilo y metileno. También se observan bandas en las longitudes de onda de $718,92\text{ cm}^{-1}$ que corresponde al balanceo del grupo metileno; y las bandas que se encuentran en la longitud de onda de $1462,65\text{ cm}^{-1}$, corresponden a vibraciones de flexión del CH generados en la columna vertebral de la cadena larga del PEBD, como se puede apreciar en la tabla informativa presentada en el Anexo C.

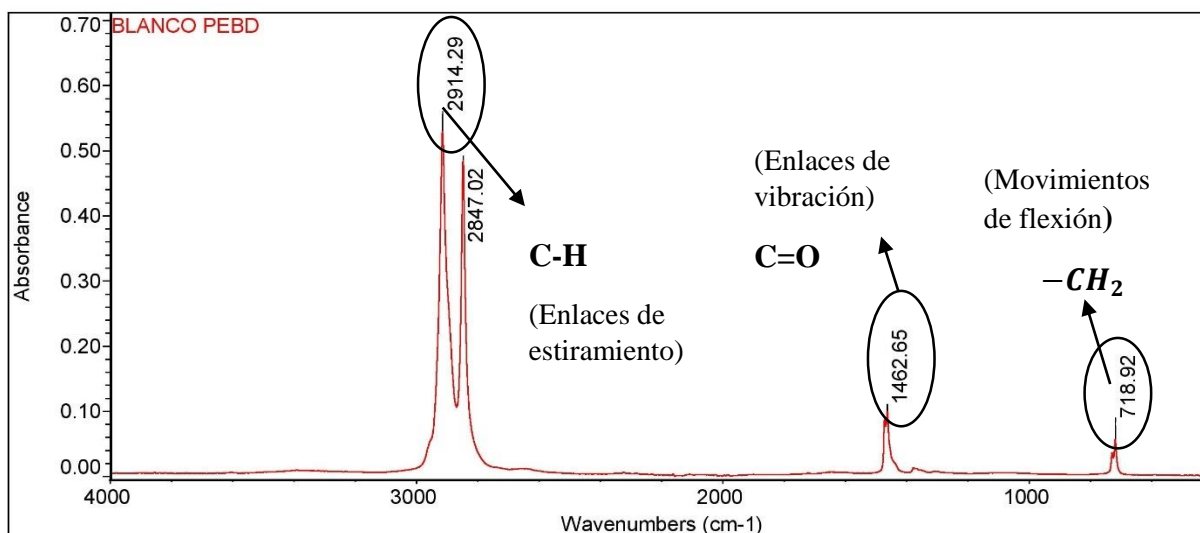


Figura 11. Espectro IR del Blanco del polietileno de baja densidad

Nota: Se puede observar en el gráfico las diferentes bandas de absorción del espectro IR que corresponden al PEBD sin tratamiento.

Fuente: El Autor

El polietileno sometido a tratamiento de biodegradación con *Ps. aeruginosa*, presentó ligeros cambios en su espectro de absorción al mostrar tres pequeños picos en las longitudes de onda de 3391 cm^{-1} , 1645 cm^{-1} y 1056 cm^{-1} (Figura 12). De acuerdo con Ren et al. (2019) el nuevo pico de absorción generado a 1645 cm^{-1} corresponde a grupos carbonilo (C=O) y la banda generada en la longitud de onda de 1056 cm^{-1} , corresponde a grupos éter (-COC-).

La presencia de grupos carbonilo y éter indican la ruptura o formación de nuevos enlaces, los mismos que podrían promover la oxidación del polietileno (Ren et al. 2019), lo que concuerda con Shah et al. (2008) que manifiesta que el mecanismo principal para la biodegradación del PE incluye la oxidación o hidrólisis por enzimas para crear grupos funcionales que mejoren su hidrofilia.

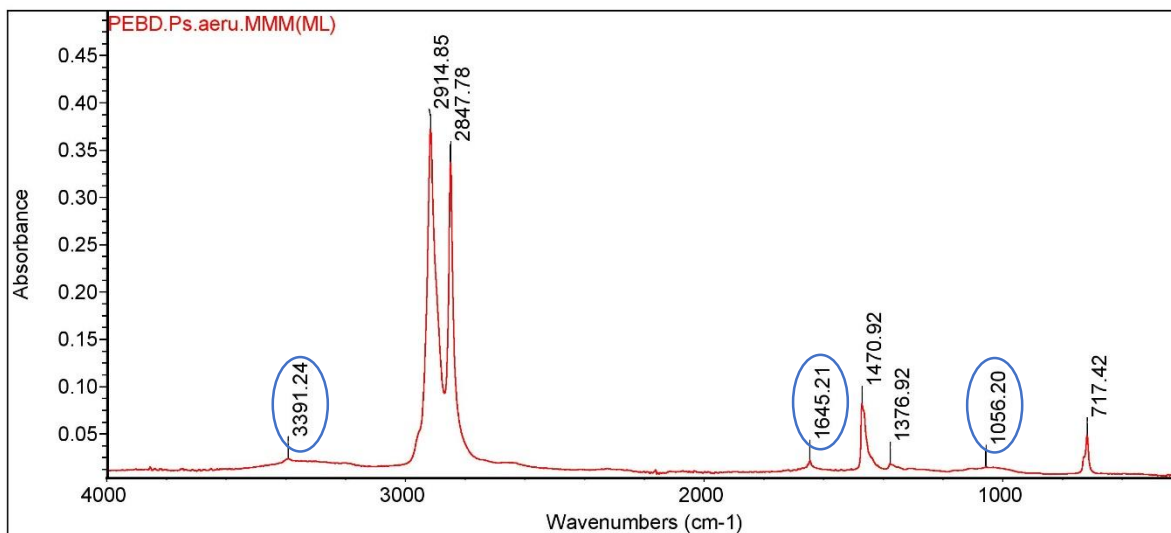


Figura 12. Espectro IR del PEBD sometido a tratamiento con *Ps. aeruginosa*.

Nota: Se observa la aparición de 3 nuevos picos que corresponden a la formación de nuevos grupos funcionales

Fuente: El Autor

En el espectro IR del polietileno tratado con *A. brasiliensis*, no se observó alteración en la estructura molecular del polímero, ya que el espectro de la muestra no presentó la formación de nuevos grupos funcionales con respecto al blanco (Figura 13 y 14).

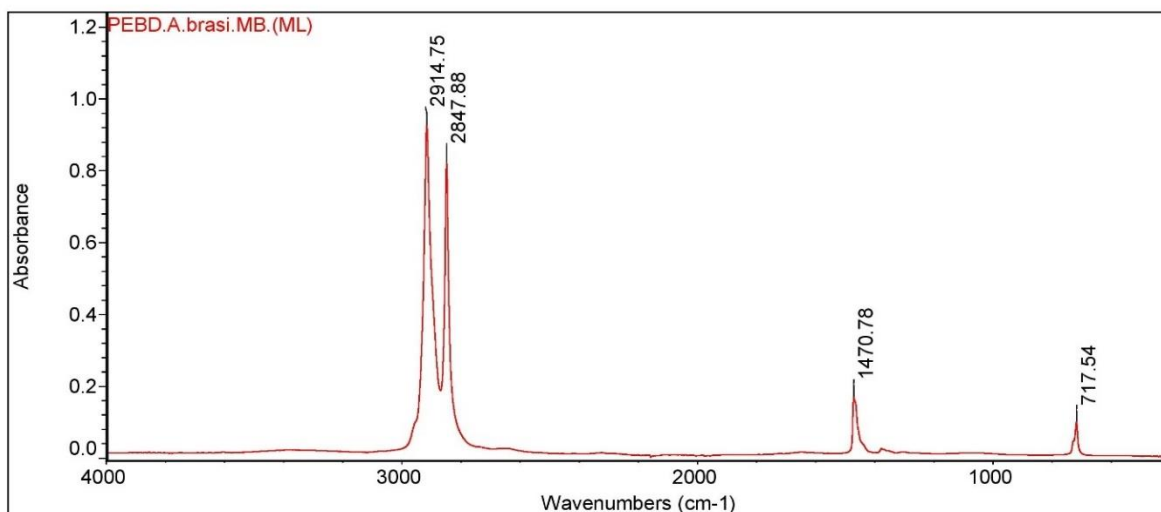


Figura 13. Espectro IR del PEBD tratado con *A. brasiliensis*.

Nota: El PEBD no presenta la formación de nuevos grupos funcionales.

Fuente: El Autor

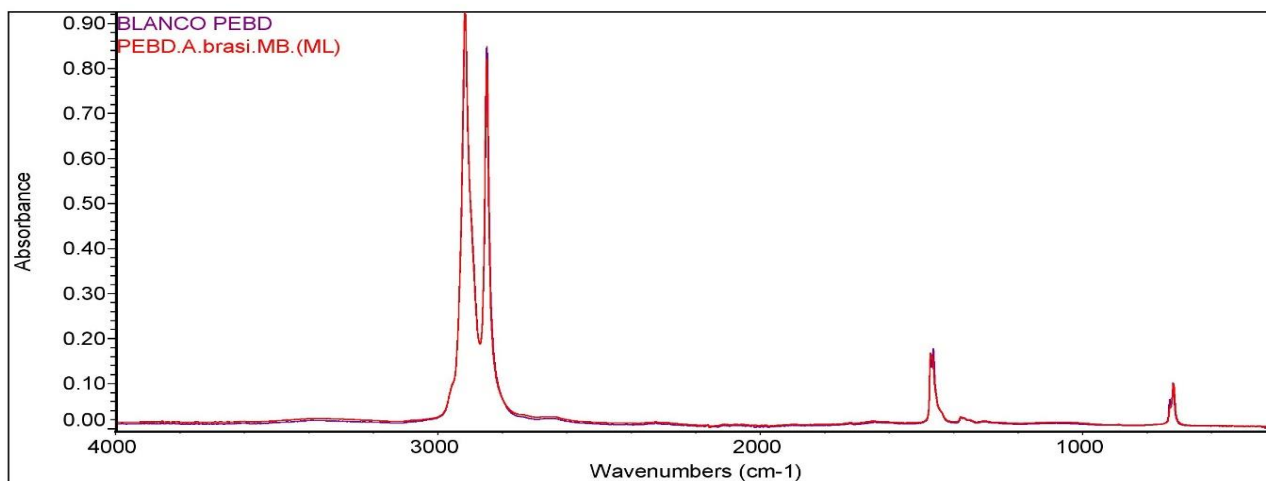


Figura 14. Comparación del espectro de PEBD tratado con *A. brasiliensis* en relación al blanco.

Nota: Como se puede observar el espectro del polietileno sometido a degradación biológica es idéntico al espectro del PEBD sin tratar. **Fuente:** Autor

4.5.2. Análisis FTIR de los medios de cultivo líquidos antes y después de la biodegradación

A fin de tener una noción de la actividad metabólica de los microorganismos, se analizó mediante espectroscopía infrarroja (FTIR) los medios de cultivo acuosos en donde se desarrolló el test de biodegradación, para determinar si los microorganismos empleados en la investigación utilizaron el polímero como sustrato y fuente de alimento.

El blanco del medio de cultivo líquido presenta 3 bandas de absorción en los siguientes números de onda: $3352,34\text{ cm}^{-1}$, $1636,73\text{ cm}^{-1}$ y $610,23\text{ cm}^{-1}$ (Figura 15). De acuerdo con Moore (2016) el enlace OH, del agua, genera una banda muy amplia e intensa entre 3500 y 3200 cm^{-1} , también presenta una banda ancha alrededor de 1636 cm^{-1} , la misma que se debe a vibraciones de estiramiento del enlace H-O-H; por lo tanto, las bandas generadas a $3352,34\text{ cm}^{-1}$ y $1636,73\text{ cm}^{-1}$ indican la presencia de agua en la muestra, lo cual es lógico, ya que se trata de medios de cultivo líquidos.

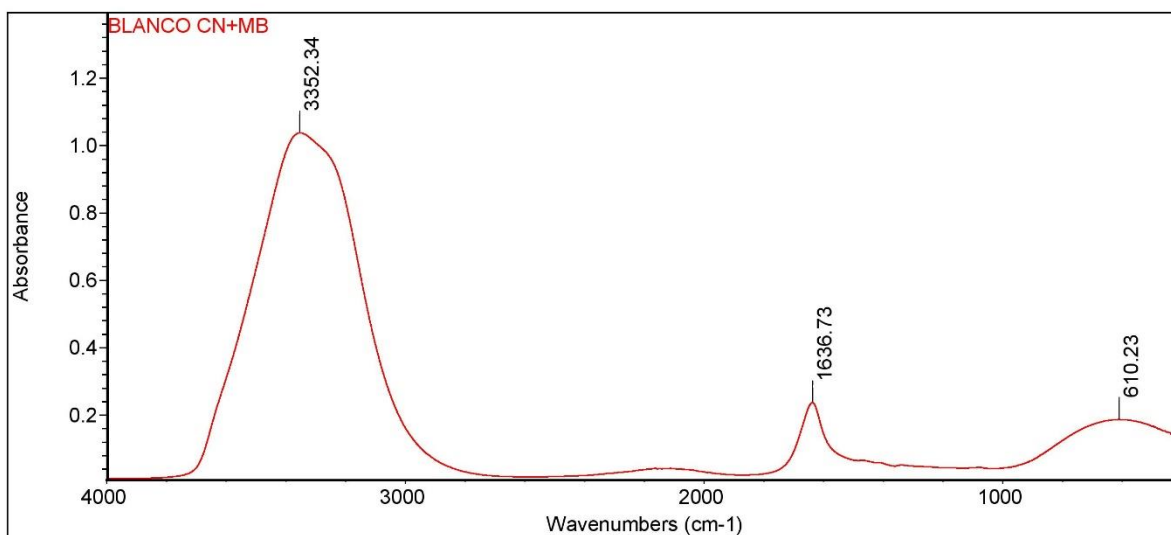


Figura 15. Espectro IR del Blanco del medio de cultivo.

Nota: Presenta 3 bandas principales en las longitudes de onda de: $3352,34\text{ cm}^{-1}$, $1636,73\text{ cm}^{-1}$ y $610,23\text{ cm}^{-1}$

Fuente: Autor

El medio de cultivo acuoso inoculado con *Ps. aeruginosa* presentó una nueva banda ubicada en la longitud de onda de $1076,27\text{ cm}^{-1}$ (Figura 16). De acuerdo con Amir et al. (2010) las señales de absorción en espectros FTIR que se localicen en la frecuencia de $1070\text{ a }1030\text{ cm}^{-1}$, corresponden a grupos funcionales de ésteres y aromáticos.

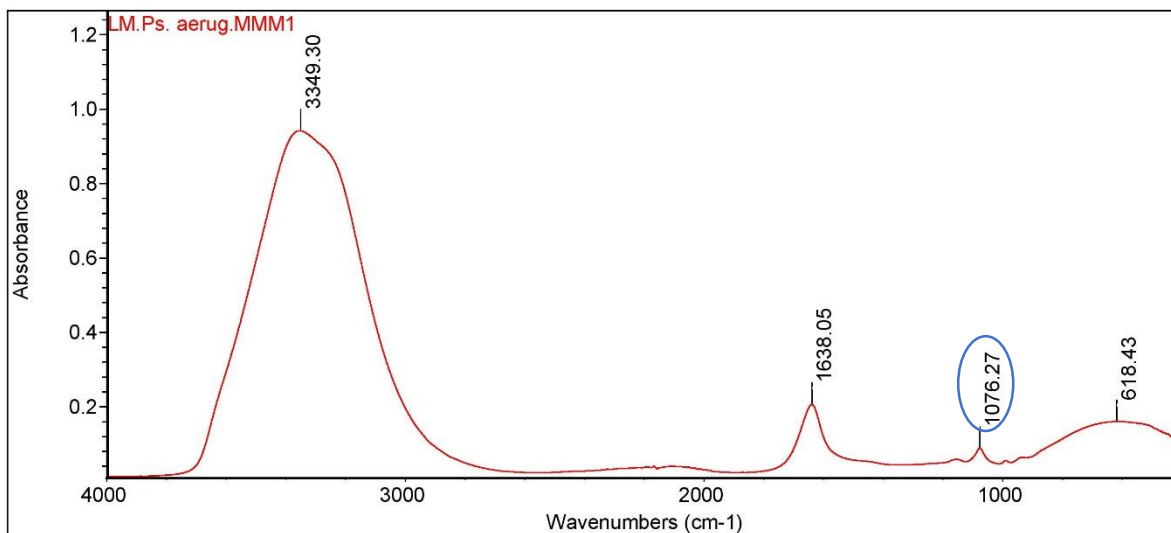


Figura 16. Espectro IR del medio de cultivo inoculado con *Ps. aeruginosa* empleado para la degradación.

Nota: Se visualiza la presencia de una nueva banda a $1076,27\text{ cm}^{-1}$

Fuente: Autor

El espectro del medio de cultivo acuoso inoculado con *A. brasiliensis*, en cambio, no presentó diferencias con respecto al espectro del medio designado como control. La superposición de los mismos revela que los espectros se muestran similares, sin la formación de ninguna nueva banda, como se puede apreciar en la Figura 17.

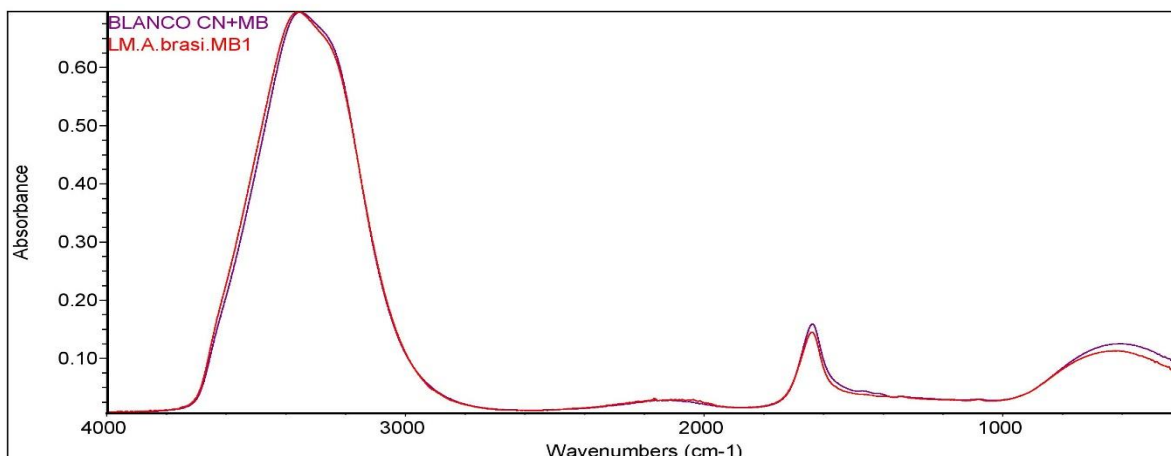


Figura 17. Comparación del espectro del medio inoculado con *A. brasiliensis* en relación con el blanco.

Nota: Se puede apreciar por la superposición de espectros que el medio y el control presentan espectros IR idénticos.

Fuente: Autor

El software *OMNIC Spectra* crea una base de datos a partir de datos espectrales mediante una combinación única de herramientas de identificación espectral, interpretación de algoritmos y documentación científica indexa en el disco duro.

El software guía en la identificación de materiales y la verificación de suposiciones. De esta manera se puede observar el Anexo D, donde el espectro FTIR de los medios reveló varios tipos de productos de oxidación posiblemente formados durante la biodegradación del polietileno como son: aldehídos, alcoholes, ésteres y ácidos.

Como se puede observar en la Tabla 4., el agua de los medios inoculados con los microorganismos disminuyó con respecto al blanco, lo cual supone que los microorganismos utilizaron el agua para su metabolismo. Los compuestos aldehídos y alcoholes aumentaron tanto en el grupo tratado con *Ps. aeruginosa* como con *A. brasiliensis*, en relación con el grupo de control, resultados que coinciden con Ren et al. (2019), el mismo que indica que las diferencias encontradas en la abundancia, sugiere que los compuestos son diferentes.

Tabla 4.**Comparación de la composición de los medios inoculados en relación al blanco**

| Compuesto | % Composición BLANCO | % Composición Medio + <i>Ps.</i> <i>aeruginosa</i> | % Composición <i>Medio + As.</i> <i>brasiliensis</i> |
|--|----------------------------|---|--|
| Agua | 48.71 | 44.28 | 47.18 |
| Poli (vinil alcohol),99.7% hidrolizado | 12.64 | 13.33 | 13.13 |
| Dialdehído succínico, 40% solución en agua | 17.38 | 22.25 | 17.57 |

Fuente: Autor

4.6. Análisis estadístico**4.6.1. Análisis de Componentes Principales (ACP)**

Para el estudio estadístico, se empleó una técnica adecuada para una distribución multivariante como es el análisis de componentes principales (*Principal Component Analysis* -PCA). El PCA, permite “condensar” la información aportada por múltiples variables en solo unas pocas componentes (Amat , 2017).

Se importó la correspondiente tabla de datos desde el archivo de Excel al software *RStudio*, se cuenta con 25 observaciones (filas) y 116 variables (columnas: longitudes de onda).

La prueba de *Bartlett* (Figura 18), indica que con un nivel de significación del 0.05, rechazamos la hipótesis nula de esfericidad, debido a que el valor de p ($p\text{-value} = 2.2e-16$) es menor ($p\text{-value} < 0.05$), lo que quiere decir que es factible aplicar un análisis de componentes principales.

```

Bartlett test of homogeneity of
variances

data:  df
Bartlett's K-squared = 4270.7,
df = 115, p-value < 2.2e-16

```

Figura 18. Prueba de Bartlett realizada en RStudio

Luego de estandarizar las variables para que tengan media 0 y desviación estándar 1, se procedió a realizar el análisis de componentes principales (ACP) mediante el software *Rstudio*, arrojando un total de 25 componentes principales.

El Anexo E, muestra un resumen de la desviación estándar, la proporción de varianza y la proporción de varianza acumulada de los 25 componentes principales, gracias a la cual se puede conocer la importancia que tiene cada componente.

Como se observa en la Tabla 5, la primera componente (PC1), explica el 50% (0,4982) de la varianza observada en los datos, la segunda (PC2) representa el 14% (0,1396), y el tercer componente principal (PC3), explica el 12,6% (0,1262). A partir, de la cuarta componente los valores de varianza no superan por separado el 10% de varianza explicada. Si se emplean las tres primeras componentes principales se conseguiría explicar el 76,4% de la varianza observada.

Tabla 5.

Resumen de Varianza Explicada de los 5 primeros PC

| | PC1 | PC2 | PC3 | PC4 | PC5 |
|--------------------------------|--------|--------|--------|---------|---------|
| Desviación estándar: | 7.6021 | 4.0246 | 3.8255 | 2.93229 | 2.20652 |
| Proporción de Varianza: | 0.4982 | 0.1396 | 0.1262 | 0.07412 | 0.04197 |
| Proporción Acumulada | 0.4982 | 0.6378 | 0.7640 | 0.83811 | 0.88009 |

Fuente: El Autor

El número de componentes necesarios para el estudio se determinó mediante el gráfico de sedimentación que muestra la proporción de varianza explicada. La Figura 19, muestra la representación gráfica de la proporción de varianza explicada de cada componente principal.

La primera componente no engloba toda la información, por lo que es necesario considerar también la segunda y tercera componente.

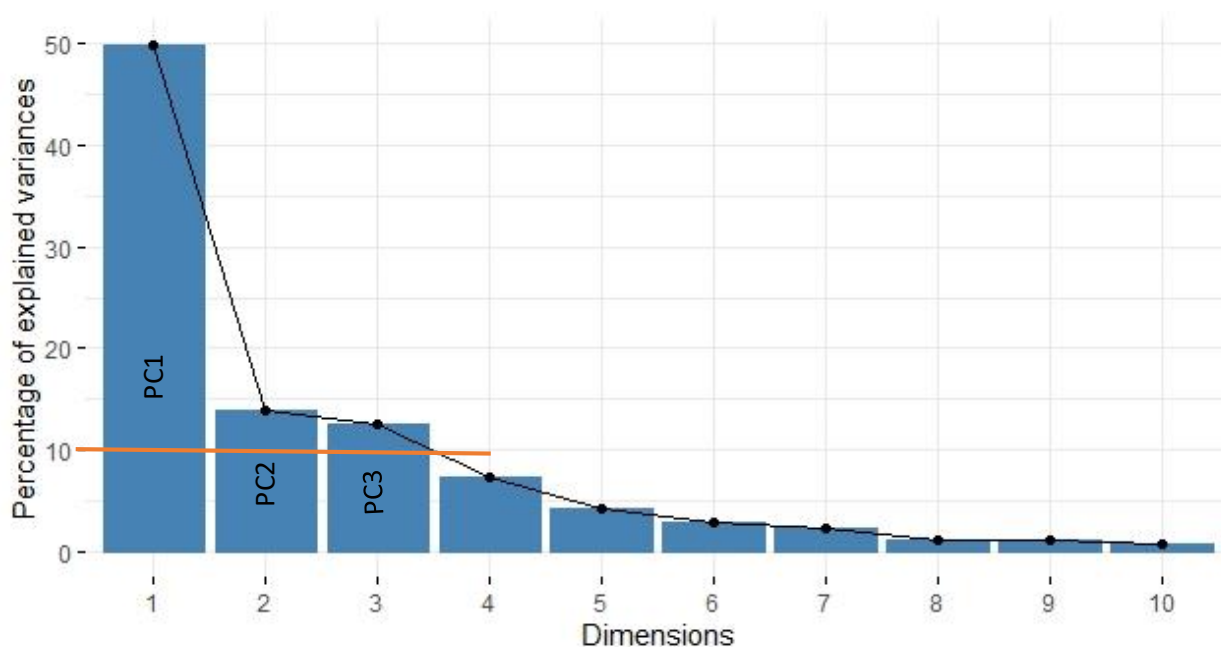


Figura 19 .Gráfico del porcentaje de varianza explicada de los Componentes Principales. Fuente: Autor

En el ACP, se utilizó el gráfico en el plano principal, para identificar las similitudes entre los individuos (observaciones de los medios inoculados con bacteria y hongo en sus diferentes períodos de incubación). Como se puede apreciar en la Figura 20, existe similitud en tres grupos: así, el grupo 1 (color naranja), se caracteriza por contener las observaciones de bacterias con 60 días de incubación; el grupo 2 (color verde) concentra las observaciones de hongos y bacterias de 15 y 30 días de incubación; y el tercero (color azul), lo constituye una sola observación de hongo

con 15 días de incubación, el mismo que como se observa se encuentra alejado con respecto al plano horizontal.

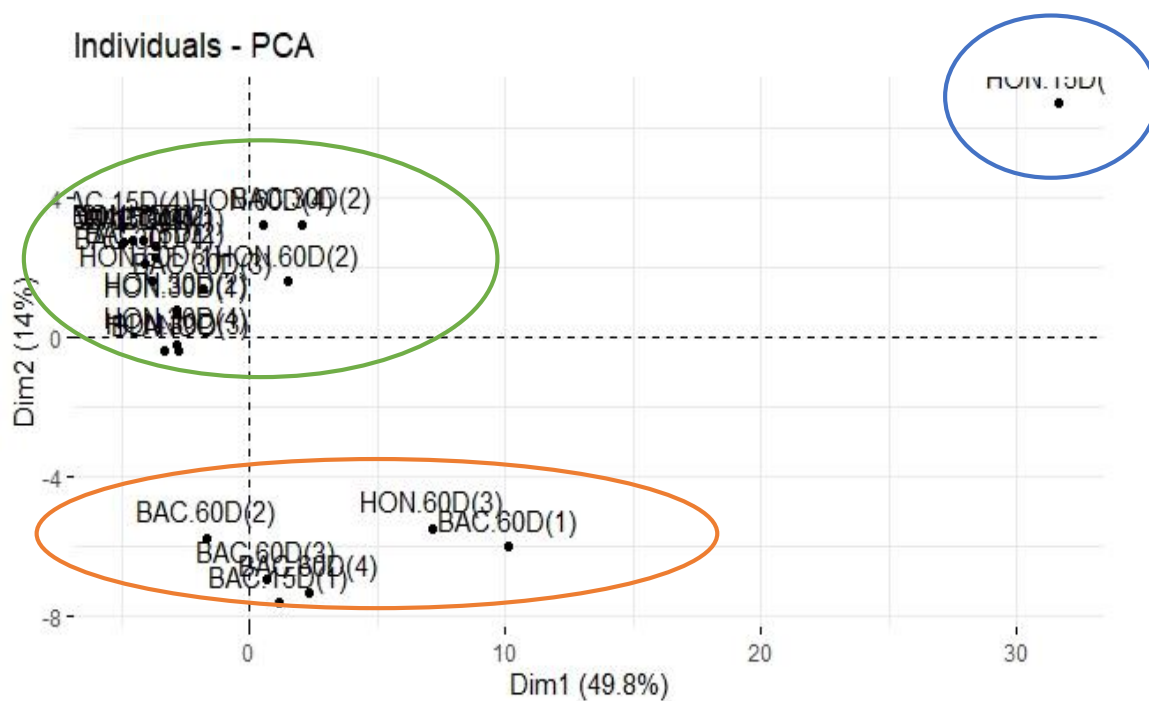


Figura 20. Representación gráfica de la ubicación de los individuos en el plano principal.

Fuente: El Autor

Se puede apreciar en la Figura 21, la representación de las longitudes de onda en el plano principal, lograda al trasponer la base de datos. Los números de longitudes de onda de 1080, 1635, 1111 y 1589 cm^{-1} , son los que más aportan a la varianza, los mismos que según Serrano (2018) pertenecen a la región de huella dactilar la misma que va desde 1500- 600 cm^{-1} .

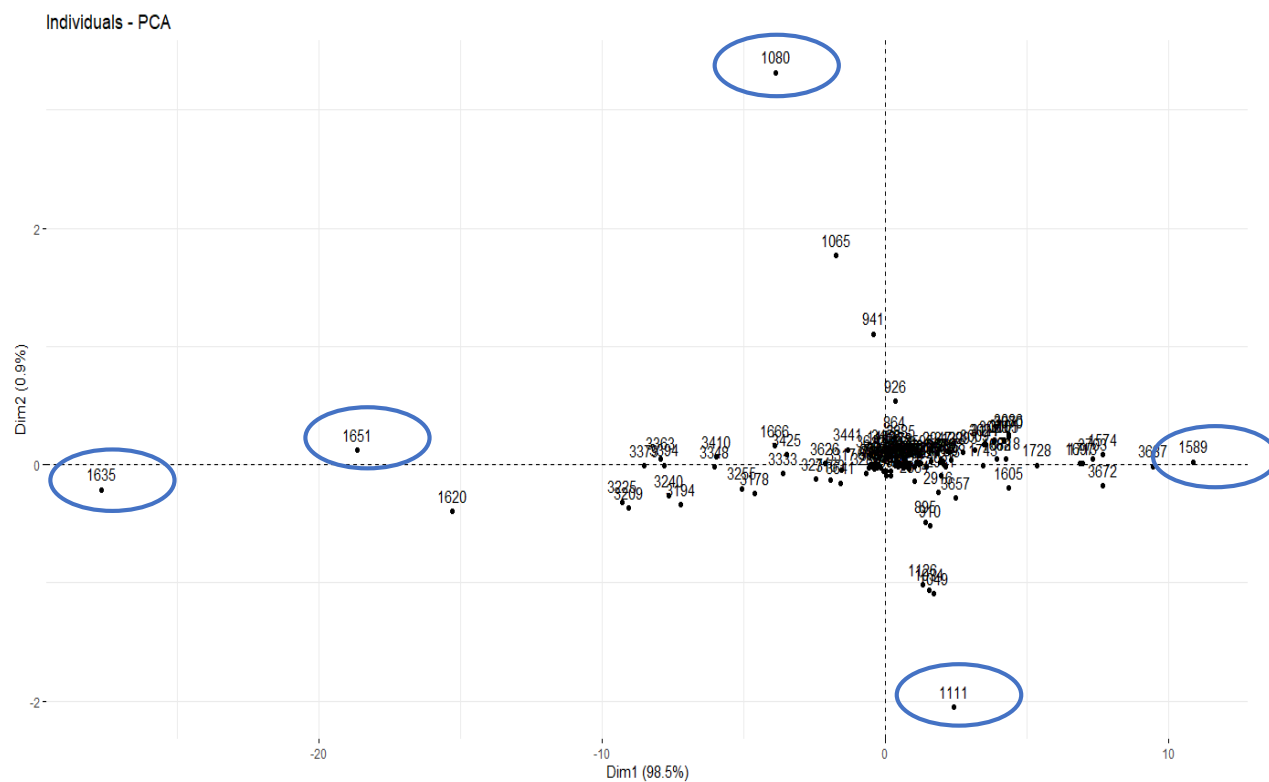


Figura 21. Longitudes de onda representadas en el plano principal.

Fuente: El Autor

Analizando los datos de los tres componentes principales considerados para el estudio se aprecia en la Tabla 6, que el primer componente (PC1) posee valores altos para las observaciones tanto de hongos como de bacterias, por lo cual se puede decir que representa muy bien a los dos tratamientos; ocurre lo mismo para el caso del segundo componente principal (PC2). En cambio, el tercer componente principal (PC3), representa a las observaciones de bacterias, ya que los valores altos se ubican en esta región.

Tabla 6.

Componentes Principales (PC)

| | PC1 | PC2 | PC3 |
|-------------|-------------|-------------|------------|
| BLANCO | -3.31816074 | -0.41998226 | 1.54093508 |
| BAC.15D (1) | 1.15029055 | -7.61859802 | 0.46319409 |
| BAC.15D (2) | -3.70329814 | 2.25516718 | 4.47431941 |

| | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|
| BAC.15D (3) | -4.97436181 | 2.64124076 | 3.67373325 |
| BAC.15D (4) | -5.02130589 | 3.14120213 | 3.67026434 |
| BAC.30D (1) | -3.6601928 | 2.62270328 | -1.72069787 |
| BAC.30D (2) | 2.05301012 | 3.22166381 | 0.53861733 |
| BAC.30D (3) | -1.82375089 | 1.37822412 | -0.24404957 |
| BAC.30D (4) | -4.07433683 | 2.10481619 | 0.08965734 |
| BAC.60D (1) | 10.123806 | -6.0067996 | -6.08455298 |
| BAC.60D (2) | -1.70835844 | -5.75605347 | 1.05648588 |
| BAC.60D (3) | 0.63720608 | -6.92351125 | 2.58982169 |
| BAC.60D (4) | 2.30093401 | -7.32332673 | 6.11824676 |
| HON.15D (1) | 31.6128224 | 6.71100277 | 1.33342168 |
| HON.15D (2) | -4.15323409 | 2.75893763 | 0.57461272 |
| HON.15D (3) | -4.59813193 | 2.74802892 | 3.1953141 |
| HON.15D (4) | -4.89475935 | 2.68598016 | 3.44257945 |
| HON.30D (1) | -2.85843554 | 0.67645026 | -6.87204396 |
| HON.30D (2) | -2.86292182 | 0.77845378 | -6.84375813 |
| HON.30D (3) | -2.76208368 | -0.3875908 | -6.32894597 |
| HON.30D (4) | -2.83900433 | -0.20418725 | -5.8671868 |
| HON.60D (1) | -3.82267991 | 1.60802538 | -0.23426711 |
| HON.60D (2) | 1.52411034 | 1.59523291 | -3.38431353 |
| HON.60D (3) | 7.16753178 | -5.49075234 | 2.74317136 |
| HON.60D (4) | 0.50530488 | 3.20367244 | 2.07544144 |

Fuente: Autor

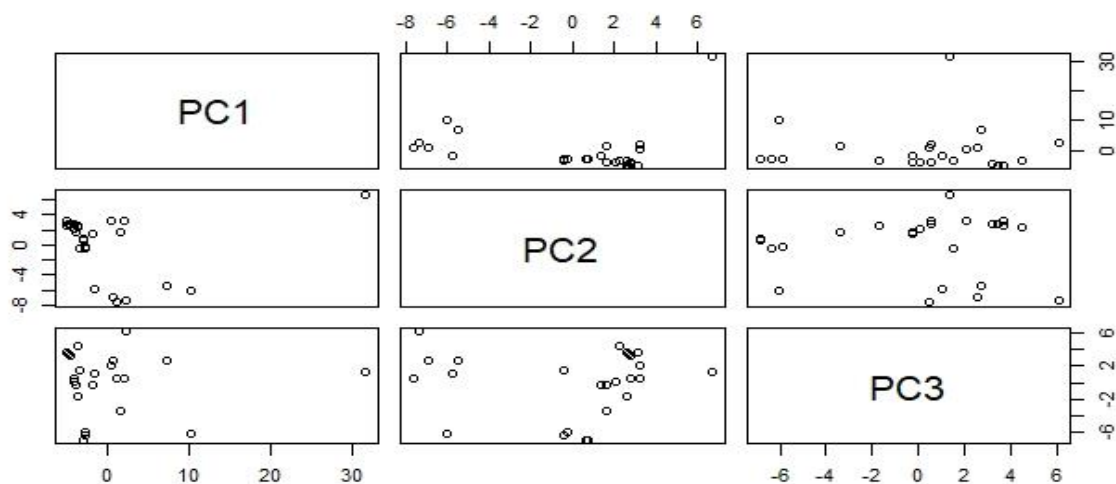


Figura 22. Gráfico de dispersión de las 3 primeras componentes.

Fuente: El Autor

En la Figura 22: Gráfico de dispersión, se puede observar la relación que existe entre las tres componentes consideradas para este estudio, así, la primera componente (PC1), tiene una relación positiva y negativa con la PC2, y de igual forma con la PC3, ya que la distribución de los datos se ubican tanto hacia arriba como abajo del recuadro.

De acuerdo con Amat (2017), la primera componente principal de un grupo de variables es la combinación lineal normalizada de dichas variables que tiene mayor varianza. La Figura 23, muestra la contribución que presentan los individuos a la varianza explicada de la primera componente principal, siendo la observación del hongo de 15 días de incubación el que presenta el mayor aporte.

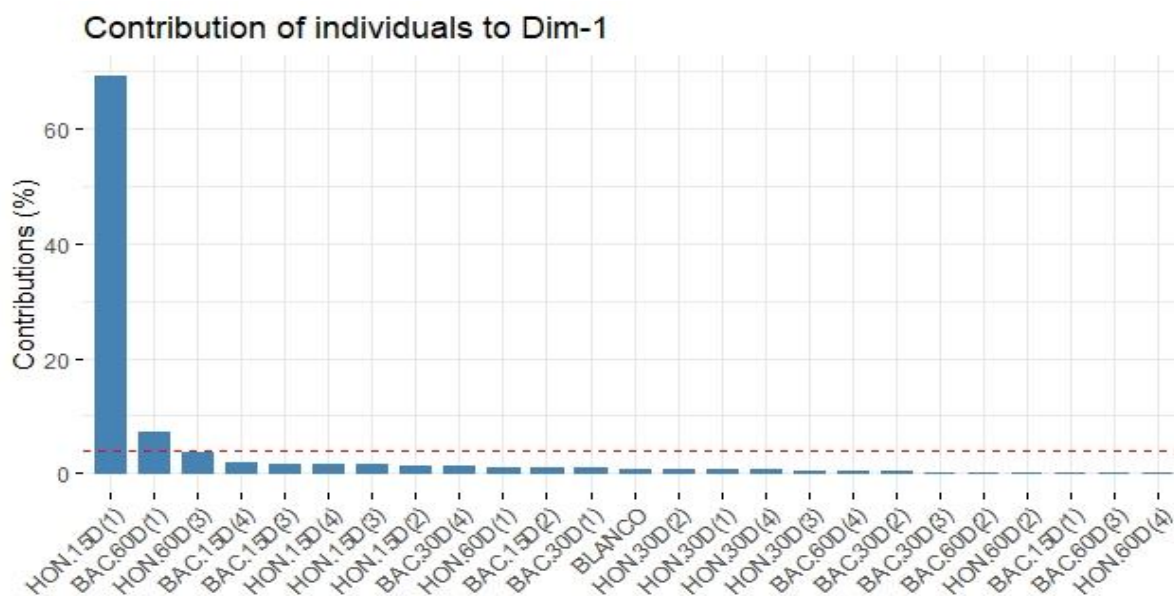


Figura 23. Gráfica de la Contribución de los individuos al PC1.

Fuente: El Autor

La representación de las variables en el círculo de correlación, se utilizó para identificar el nivel de asociación entre las variables (longitudes de onda). Como se observa en el círculo de correlación (Figura 24), el grupo de variables en color naranja poseen una correlación fuerte tanto

positiva como negativamente, encontrándose principalmente los número de onda entre 3672 y 3456 cm^{-1} representando la mayor contribución a la varianza de los componentes principales (1,25). En cambio, las variables en color azul, son las que menos aportan al componente principal (0,25), situándose aquí números de onda como 1080, 1034, 941 cm^{-1} , que al encontrarse cerca del origen contribuyen muy poco a la varianza de los dos primeros componentes.

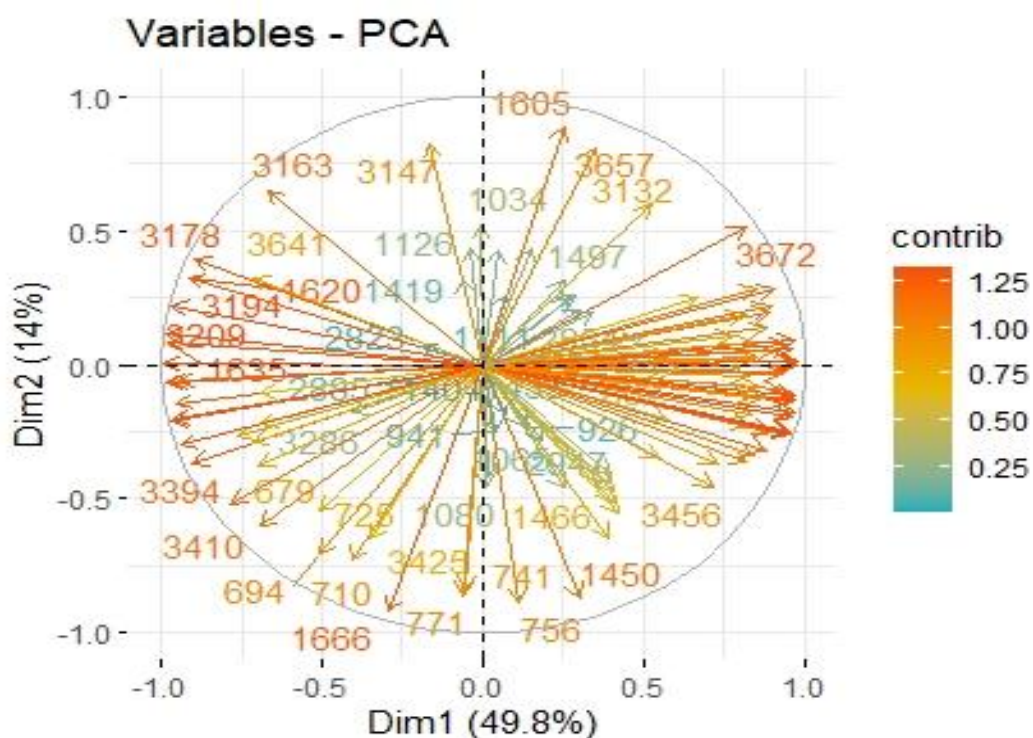


Figura 24. Representación de las variables sobre CP

Correlación de Pearson

Los resultados del test del coeficiente de correlación de Pearson, se puede apreciar en la Figura 26, los mismos que indican cuán asociadas se encuentran las variables entre sí.

```

Pearson's product-moment correlation

data: PC1 and PC25
t = 2.1961, df = 23, p-value = 0.03844
alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 0.02538175 0.69683358
sample estimates:
 cor
0.4163372

```

Figura 25. Correlación de Pearson en RStudio

Según la prueba de hipótesis, al ser el valor de p menor a 0,05, se acepta la hipótesis alternativa ya que sí existe una relación lineal entre los datos. El coeficiente de correlación ($cor = 0,42$), al ser mayor a cero, posee una correlación positiva, por lo tanto, las variables se correlacionan directamente, es decir, que a medida que aumente el valor de una variable, también aumentará el valor de la otra, sucede de igual manera cuando los valores son bajos.

4.6.2. Análisis de Clúster

- Estimación del número óptimo de clústeres

Para conocer el número óptimo de clústeres a considerar en el estudio se interpreta la gráfica obtenida por el método *Elbow*. En la Figura 27, se busca el punto de corte a manera de un codo, donde visualmente indica que es necesario el empleo de tres clústeres.

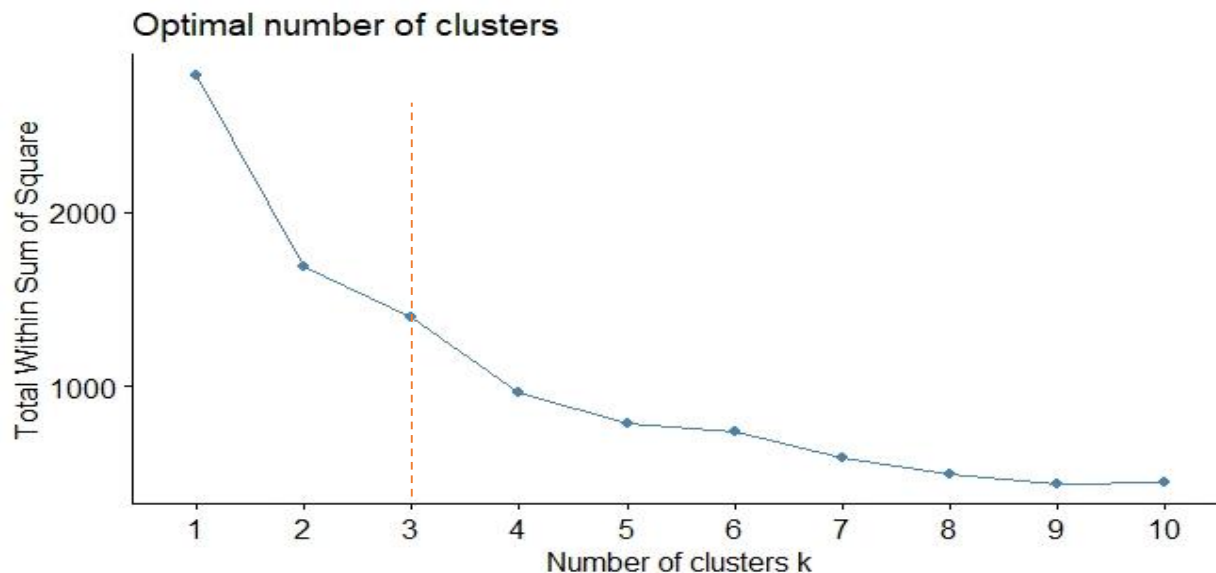


Figura 26. Número óptimo de clusters

- Clustering particional

RStudio arrojó como resultado del *clustering particional*, considerando 3 clústeres ($k=3$), que el primer conglomerado está representado por una sola observación (Hon.15D) como se visualiza en la Figura 28, este objeto puede ser considerado como un caso atípico, ya que no sigue el mismo comportamiento que el resto de observaciones al ubicarse distante de las mismas, esto se puede atribuir a un probable proceso de contaminación de la muestra y/o al corto periodo de incubación. Sin embargo, se eligió incluir esta observación en el análisis, ya que se pretende únicamente conocer cómo se comportan las variables y determinar la asociación entre las mismas.

El segundo grupo (rojo), contiene en su mayoría las observaciones de (Bac.60D.), las mismas que representan los medios donde se incubó el PEBD con *Ps. aeruginosa* por 60 días. Analizando el tercer conglomerado (azul) se puede concluir que existen variables comunes para los dos tipos de tratamientos, ya que este último grupo contiene una mezcla de observaciones tanto de los medios inoculados con bacterias como con hongos para la degradación del PEBD.

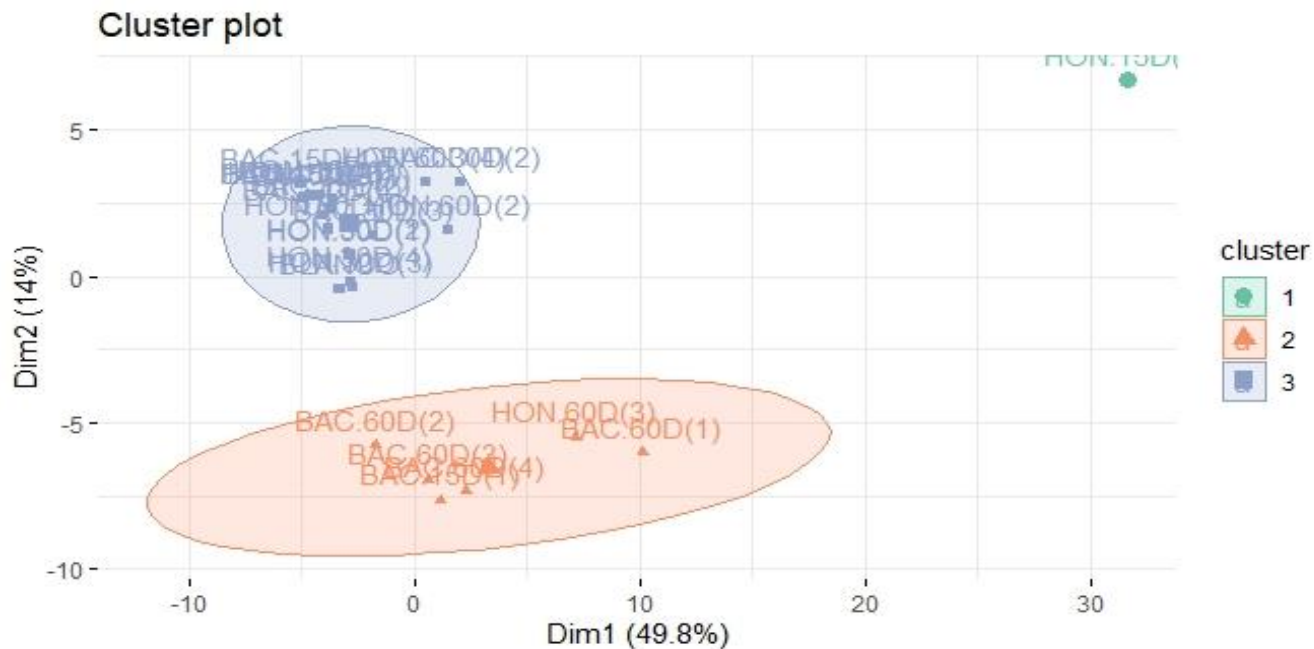


Figura 27. Clustering parcial

-Clustering Jerárquico tradicional

El Clustering jerárquico, produce un conjunto de clústeres anidados organizados como un árbol jerárquico, el mismo que se puede observar mediante un dendograma como se puede apreciar en la Figura 29.

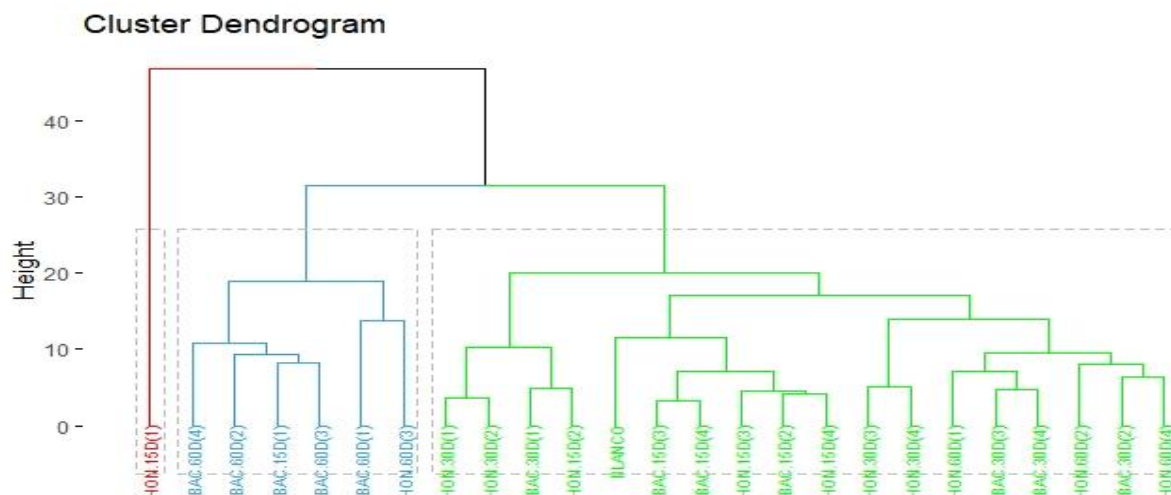


Figura 28. Clustering jerárquico

El dendograma muestra en qué orden se han unido los clústeres y cuál es el grado de proximidad que tienen los grupos que se unen, de esta manera se observa que el individuo denotado como Hongo (15 días) se presenta como un nodo individual, siendo el primer clúster que se une, en el segundo conglomerado (color azul) se encuentran las observaciones de bacterias y el tercer conglomerado en unirse (color verde) está representado por una mezcla de individuos.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

En el presente trabajo, se evaluó el efecto de microorganismos degradadores sobre el polietileno de baja densidad.

En la caracterización microbiológica de las cepas de *Pseudomona aeruginosa* y *Aspergillus brasiliensis*, la observación microscópica mediante tinciones y la macroscópica mediante crecimiento en caja Petri, confirmaron que las cepas obtenidas del cepario de la universidad, pertenecen a la familia *Pseudomona* y *Aspergillus* respectivamente.

Al determinar la reducción de peso del polietileno sometido a tratamiento, se tiene que el polietileno incubado con *A. brasiliensis* presentó un porcentaje de pérdida de peso de 0,97%. Mientras que el polietileno tratado con *Ps. aeruginosa* presentó una pérdida del 1,52%. De acuerdo con estos resultados se concluye que la determinación de la pérdida de peso no es el indicador más fiable de un proceso de biodegradación de polímeros.

La diferencia entre los resultados obtenidos antes y luego de la biodegradación, a través de la variación del espectro generado por el F-TIR son:

Se determinó que existe una variación en el espectro infrarrojo del polietileno biodegradado con *Ps. aeruginosa*, presentando en su espectro tres nuevas bandas generadas en las longitudes de onda de 3391 cm^{-1} , 1645 cm^{-1} y 1056 cm^{-1} , las mismas que se ubican en la región de grupos funcionales carbonilo y éter, que, según Ren et al. (2019), estos grupos se presentan cuando ha ocurrido una reacción de oxidación en la superficie de la película del polietileno.

El polietileno tratado con *A. brasiliensis* no presentó variación del espectro de absorción esto se lo puede atribuir al corto periodo de incubación de acuerdo a la bibliografía revisada.

Se demostró que el medio de cultivo líquido inoculado con *Ps. aeruginosa* presenta cambios en sus espectros apareciendo una nueva banda ($1076,27\text{ cm}^{-1}$) que se encuentra localizado en los grupos que corresponden a ésteres y aromáticos, reflejando el metabolismo de las bacterias durante la biodegradación. En cambio, el medio líquido inoculado con *A. brasiliensis* no presentó cambios en el espectro.

El modelo estadístico de análisis de componentes principales (ACP) aplicado a través del software *RStudio*, considera que los tres primeros componentes explican el 76,4% de la varianza total observada.

Se apreció la similitud entre las variables a través del círculo de correlación, el cual presenta que las longitudes de onda entre 3672 y 3456 cm^{-1} poseen una correlación fuerte tanto positiva como negativamente, siendo las que más aportan a la varianza de las dos primeras componentes.

La representación gráfica de las observaciones en el plano principal, mostró que las observaciones se asocian por sus similares características en tres grupos bien diferenciados, un grupo conformado por las observaciones de bacterias, un segundo grupo que contiene mezclas de observaciones de bacterias y hongos y una última observación de hongo de 15 días que se presenta solo.

Se obtuvo un resultado del coeficiente de correlación de Pearson de 0,42, el mismo que indica que las variables poseen una correlación positiva, por lo tanto, están asociadas directamente entre sí.

El análisis de clúster consideró, un primer conglomerado en el que está presente una sola observación, un segundo conglomerado, en el que está presente la mayoría de las observaciones de los medios inoculados con bacterias y el último que contiene una mezcla de observaciones de medios de cultivo inoculados tanto con bacterias como de hongos.

El primer clúster puede ser considerado como una observación atípica al estar aislado del resto de grupos.

Al someter al polietileno de baja densidad a cepas de microorganismos distintos (*Ps. aeruginosa* y *A. brasiliensis*), cada microorganismo atacó al polietileno de manera diferente. El polietileno tratado con *Pseudomona aeruginosa* presentó un mayor porcentaje de pérdida de peso, además, muestra formación de nuevos grupos funcionales, evidenciando que existe una relación directa entre la pérdida de peso y el aumento o desaparición de grupos funcionales.

5.2. Recomendaciones

Una de las principales recomendaciones es trabajar con un mayor número de muestras, para facilitar el análisis estadístico al proporcionar más observaciones, lo cual brindará al estudio una mayor sensibilidad.

Se recomienda también trabajar con tiempos más largos de incubación de los microorganismos con el PE como única fuente de carbono, para que exista un porcentaje significativo de degradación del plástico.

Realizar un estudio con diferentes géneros y especies de bacterias determinando su porcentaje de degradación.

Se deben controlar variables como temperatura, pH, entre otras variables durante el periodo de biodegradación.

Se recomienda realizar estudios con las enzimas bacterianas relacionadas con la biodegradación del polietileno, para una posible producción industrial de microorganismos transformantes mediante biorreactores.

Referencias

- Acuña, N. R. (2017). *Revisión bibliográfica sobre los microorganismos biodegradadores de polietileno de baja densidad y sus efectos en el material*. Universidad Distrital Francisco de Caldas.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7610.2010.02280.x>
- Alcantára, L. (2009). Recuperado el 2 de Febrero de 2020, de Google:
<http://www.eluniversal.com.mx/notas/577100.html> 18/08/2010
- Alcón, O. y Lloret, E. (2015). *Estudio de la influencia de incorporar conocimiento léxico-semántico a la técnica de Análisis de Componentes Principales para la generación de resúmenes multilingües*. LinguaMÁTICA.
- Amat, J. (06 de 2017). *RPubs by RStudio*. Recuperado el 15 de 10 de 2021, de Análisis de Componentes Principales (Principal Component Analysis, PCA) y t-SNE:
https://rpubs.com/Joaquin_AR/287787
- Amir, S., Jouraiphy, A., Meddich, A., El Gharous, M., Winterton, P. y Hafidi, M. (2010). Structural study of humic acids during composting of activated sludge-green waste: Elemental analysis, FTIR and ¹³C NMR. *Journal of Hazardous Materials*, 177(1-3), 524-529.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.12.064>
- Aparicio M., D., Ariza D., J., Calvo T., M., Daza C., J. y Echávez P., E. (2012). Espectroscopía infrarroja: una técnica alternativa para identificación de microorganismos. *Ciencias y salud Virtual*, 4(1), 123-132.
<https://doi.org/10.22519/21455333.254>
- Ararat, C. y Murillo, E. (2016). Polietileno de baja densidad funcionalizado con un poliéster polioli altamente ramificado maleinizado. *Ingeniería y Ciencia*, 127-144.
<https://doi.org/10.17230/ingciencia.12.23.7>

- Arenas, L. (2018). *Aislamiento y caracterización molecular 16S rRNA de cepas bacterianas con capacidad de biodegradación de PEAD (polietileno de alta densidad) micro contaminante en aguas sintéticas a escala laboratorio* [Tesis de Grado, Universidad Católica de Santa María]. Repositorio Institucional -Universidad Católica de Santa María.
- Arias, F. G. (2012). *El Proyecto de Investigación: Introducción a la metodología científica* (6ta. Edición ed.). Caracas: Episteme.
- Barajas. (2011). *Biodegradación del plástico*. Recuperado el 05 de 11 de 2020, de <http://search.proquest.com>
- Bazan Salazar, V. (2016). Calidad del diesel de Costa Rica entre los años 2006-2010. *Revista Ciencia y Tecnología*, 31(2), 37-51.
<https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/cienciaytecnologia/article/view/25390>
- Betancourth, M., Botero, J., y Rivera, S. (2004). Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. *Colombia Médica*, 35(3), 34-39
<https://www.redalyc.org/pdf/283/28335907.pdf>
- Bhargava, R., Wang, S., y Koenig, J. (2003). FTIR microspectroscopy of polymeric systems. *Advances in Polymer Science*, 163, 137-191.
<https://doi.org/10.1007/b11052>
- Birkner, N. y Wang, Q. (2014). *How an FTIR Spectrometer Operates*. UC Davis ChemWiki.
- Boerger, C., Lattin, G., Moore, S. y Moore, C. (2010). Ingestión de plástico por peces planctívoros en el giro central del Pacífico norte. *Marine Pollution Bulletin*, 60(12), 2275-2278.
[doi:https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.08.007](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.08.007)

- Brunella, T. L. (8 de 19 de 2010). *Polyethylene: discovery and growth*. Recuperado el Febrero de 2020, de <http://www.uhmwpe.unito.it/2003/Trossarelli.pdf> 19/08/2010.
- Butron Pinazo, S. B. (2020). *Capacidad de Biodegradación de Pseudomonas aeruginosa frente al polietileno de baja densidad* [Tesis de Doctorado, Universidad Nacional del Altiplano]. Repositorio Institucional- Universidad Nacional del Altiplano. <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/13475>
- Cabarcos Fernández., M. (2015). *Análisis Cluster. Una aplicación al estudio de índices de bienestar a través de los países*. [Tesis de Grado, Universidad de Coruña]. Repositorio Institucional- Universidade da Coruña. <http://hdl.handle.net/2183/16378>
- Cáceres, O. (2011). *Biodegradación bacteriana de polietileno de baja densidad bajo condiciones controladas en biorreactores AIR LIF*. [Tesis de Grado, Universidad Nacional Agraria de la Selva]. <http://repositorio.unas.edu.pe/handle/UNAS/356>
- Castro, J. (2014). *Evaluación de la bacteria Pseudomona como degradador del polietileno*.
- Cedeño, J. C. y Meriño, J. G. (2020). *Valoración In Vitro de la Biodegradación de polietileno de baja densidad mediante hongos filamentosos aislados del relleno sanitario de Pichacay*. [Tesis de Grado, Universidad Politécnica Salesiana]. Repositorio Institucional-Universidad Politécnica Salesiana. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/18821>
- Costerton, J., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D. y James, G. (1994). *Biofilms, el micronicho personalizado*. J. Bacteriol.
- Deduy Guerra., I. (2019). *Regresión sobre Componentes Principales* [Tesis de Grado, Univerdad de Sevilla]. <https://hdl.handle.net/11441/90005>
- Díaz, C. (2018). *Validez del método de espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) en la determinación de la cantidad de proteína verdadera de la leche de vaca. Majes-Arequipa*.

- [Tesis de maestría, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa].
<http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/9383>
- Dussud, C. y Ghiglione, J. (2014). *Bacterial degradation of synthetic plastics*. Obtenido de
<https://www.sfecologie.org/regard/r63-plastiques-en-mer-dussud-et-ghiglione/>
- Endrizzi, I. (2008). *Clustering of variables around latent components: an application in consumer science*. [Tesis doctoral, Università di Bologna].doi:10.6092/unibo/amsdottorato/667
- Espinoza Arias, L. (2018). *Evaluación de la degradación de polietileno de baja densidad mediada por diferentes especies de hongos*. [Tesis de Pregrado, Universidad San Francisco de Quito]
<http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/7410>
- Ferrelli, F., Brendel, A., Aliaga, V., Piccolo, M. y Perillo, G. (2019). Climate regionalization and trends based on daily temperature and precipitation extremes in the south of the Pampas (Argentina). *Geographical Research Letters*, 1(45), 393-416.
- Flores, A. C. (2017). *Análisis Clúster en Redes con el Entorno de Computación Estadística R*. [Trabajo de Posgrado]. Máster Universitario en Estadística Aplicada.
- Franquet Bernis, J. M. (2005). *Cálculo hidráulico de las conducciones libres y forzadas una aproximación de los métodos estadísticos*.
- Gillow J., F. A. (1997). *Microbial Gas Generation Under Expected Waste Isolation Pilot Plant Repository conditions*. Sandia National Laboratories , Nuevo México.
<https://wipp.energy.gov/library/CRA/CRA-2014>
- Gutiérrez A., A. I. (2019). *"Biodegradación de polietileno de baja densidad utilizando hongos, bacterias y consorcios microbianos aislados del botadero municipal de Tacna"*[Tesis de grado, Universidad Privada de Tacna]. Repositorio Institucional- Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental.

Gutierrez, K. (2018). *Influencia de factores ambientales de crecimiento microbiano en la degradación de polietileno de baja densidad por la bacteria pseudomona aeruginosa en. Huancayo.*

Hakkarainen, M. y Albertsson, A. (2004). Environmental Degradation of Polyethylene. Long Term Properties of Polyolefins. *Advances in Polymer Science*, 169, 177-200.

<https://doi.org/10.1007/b13523>

Hardalo, C. y SC Edberg. (1997). Pseudomonas aeruginosa: assessment of risk from drinking water. *Microbiol*, 23(1), 47-75. <https://doi.org/10.3109/10408419709115130>

Haro, S., Zúñiga, L., Meneses, A. y Escudero, A. (2020). Determinación del comportamiento meteorológico del viento en la provincia de Chimborazo, Ecuador. *Perfiles*, 1(23).

Jamil, S., Zada, S., Khan, I., Sajjad, W., Rafiq, M., Shah, A. y Hasan, F. (2017). Biodegradation of polyethylene by bacterial strains isolated from Kashmir Cave. *Journal of Cave and Karst Studies*, 79(1), 73-80. doi:<https://doi.org/10.4311/2015MB0133>

Jolliffe, I. T. y Cadima, J. (2016). Principal component analysis: a review and recent developments. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering*, 374. doi:<https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0202>

Kumar Sen, S. y Raut, S. (2015). Microbial degradation of low density polyethylene (LDPE). *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 3(1), 462-473. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2015.01.003>

Kunrele, I., Fagade, O. y Nwadike, B. (2019). Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by certain indigenous bacteria and fungi. *Internacional Journal of Environmental Studies*, 428-440. doi:<https://doi.org/10.1080/00207233.2019.1579586>

Lara Porras, A. (2018). *Diseño Estadístico de Experimentos*. España: Universidad de Granada.

- Larrañaga, P., Inza, I. y Moujahid, A. (2015). *Tema 14. Clustering*. Departamento de Ciencias de la Computación e Inteligencia Artificial. Universidad del País Vasco.
<http://www.sc.ehu.es/ccwbayes/docencia/mmcc/docs/t14clustering.pdf>
- Lim , Y., Cheung, Y. K. y Oh, H. (2020). A generalization of functional clustering for discrete multivariate longitudinal data. *Statistical Methods in Medical Research*, 29, 3205-3217.
doi:10.1177/0962280220921912
- Lopez Mateos, F. (1988). *Biodegradabilidad e inhibicion de los polielectrolitos floculantes, Ingenieria Quimica*. No 232.
- Lynd Lee R., W. P. (2001). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 506-577. doi:10.1128
- Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D. y Stahl, D. (2015). *Brock. Biología de los microorganismos*. Pearson, 14 (ed),2-22.
- Mangiarotti, A. C. (1994). *Biodeterioro de materiales plásticos por Microhongos*. . Boletín microbiológico.
- Manos George, G. A. (2000). Catalytic Degradation of High-Density Polyethylene over Different Zeolitic Structures. *American Chemical Society*, 39(5), 1198 - 1202. doi:10.1021
- Martínez, E. (2020). *Estadística*. UAPA.
- Mata, M., Guerrero, C., Rojas, M., Delgado, R., González, C., Sánchez, V., . . . Vázquez, G. (2017). Componentes Principales mediante Espectroscopía FTIR como Técnica de Caracterización Innovadora durante la Diferenciación de Células Madre Pluripotentes a Células Pancreáticas. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica-Scielo México*, 38(1), 225-234.
doi:dx.doi.org/10.17488/RMIB.38.1.17

- McQueen, J. (1967). *Some methods for classification and analysis of multivariate observations*.
Proceeding of the Fifth Berkeley Symposium on Mathematical.
- Méndez, C. R., Vergaray, G., Béjar, V. R. y Cárdenas, K. (2007). Aislamiento y caracterización de micromicetos biodegradadores de polietileno. (F. d. UNMSM, Ed.) *Rev. peru. biol*, 13(3), 203-205.
- Mettler Toledo. (s.f.). *Reflectancia total atenuada (ATR)*. Obtenido de www.mt.com
- Milosevic, M., Sting, D. y Rein, A. (1995). "*Diamond Composite Sensor for ATR Spectroscopy*".
- Miranda, J. L. (2015). "*Reacciones y sus mecanismos en la degradación de polímeros*" [Tesis de Grado-Instituto Politécnico Nacional].
- Montoya, A. y Ochoa, D. (2010). *Consortios Microbianos: una metáfora biológica aplicada a la asociatividad empresarial en cadenas productivas agropecuarias*.
- Moore, E. (2016). Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR): Methods, Analysis, and Research Insights. *Chemical Engineering Methods and Technology*.
- Moreno C., A. (2006). "*Caracterización de ramificaciones de cadena corta y larga en Polietileno*". Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), Saltillo.
- Muhammad, A. (2020). Design of the Bartlett and Hartley tests for homogeneity of variances under indeterminacy environment. *Journal of Taibah University for Science*, 14(1), 6-10.
doi:10.1080/16583655.2019.1700675
- Núñez C., C. y Escobedo L., D. (2011). Uso correcto del análisis clúster en la caracterización de germoplasma vegetal. *Agronomía Mesoamericana*, 22(2). doi:On-line version ISSN 2215-3608
- ONU. (2020). *La marea de plástico causada por el COVID-19 también es un peligro para la economía y la naturaleza*. Conferencia de las Naciones Unidas para el Comercio y el Desarrollo (UNCTAD).

ONU Programa para el Medio Ambiente. (9 de Septiembre de 2018). *ORGANIZACIÓN DE LAS*

NACIONES UNIDAS. Recuperado el 2 de Febrero de 2020, de Google:

<https://www.unenvironment.org>

Orihuela, C. y Arone Valencia, A. (2020). *Biodegradación de polietileno de baja densidad mediante un consorcio microbiano a condiciones anaerobias y aerobias*. Lima-Perú: Universidad Peruana Unión.

Parlamento Europeo. (2018). *Parlamento Europeo*. Recuperado el 2020 de 11 de 28, de

<https://www.europarl.europa.eu>

Peña, D. (2002). *Análisis de datos multivariantes*. Madrid: McGraw-Hill.

Peraza, A. (2017). *studio preliminar de la biodegradación de plásticos por bacterias marinas*.

Universidad de La Laguna.

Pérez, C. (2004). *Técnicas de Análisis Multivariante de Datos. Aplicaciones con SPSS*. Madrid: Pearson Educación S.A.

Polanco, J. M. (2016). El papel del análisis por componentes principales en la evaluación de redes de control de la calidad del aire. *Comunicaciones en Estadística*, 9(2), 271-294.

Posada B., B. (2012). La Degradación de los plásticos. *Revista Universidad Eafit*(94), 67-85.

Quinchía, A. y Maya, S. (2015). *Degradabilidad de Polietileno de Baja Densidad –LDPE utilizando Pycnoporus sanguineus UTCH 03*. Envigado Colombia: Escuela de Ingeniería de Antioquía.

Ren, L., Men, L., Zhang, Z., Guan, F., Tian, J., Wang, B., . . . Zhang, W. (2019). Biodegradation of Polyethylene by Enterobacter sp. D1 from the Guts of Wax Moth Galleria mellonella.

International Journal of Environmental Research and Public Health, 11.

<https://dx.doi.org/10.3390%2Fijerph16111941>

- Restrepo, A., Loaiza, H. y Caicedo, E. (2007). Procedimiento automático de reducción de variables basado en ACP para el reconocimiento de formas con ultrasonido. (U. D. Caldas, Ed.) *Tecnura*, 10(20), 19-30.
- Rojo C., F. (s.f.). *Tablas de Espectroscopía Infrarroja*.
- Sáez , A., Flórez, L. y Cadavid, A. (2002). Caracterización xde una cepa nativa de *Aspergillus niger* y Evaluación de la producción de ácido cítrico.
- Sánchez Mangas, A. (2012). *Análisis de Componentes Principales: Versiones dispersas y robustas al ruido impulsivo (Tesis)*. Leganes: Universidad Carlos III de Madrid.
- Santacoloma L., S., Buitrago G., M., Lamus M., V., Asprilla A., S., Ruíz T., J. y Villegas M., L. (2019). Evaluation of the biodegradation of polyethylene, polystyrene and polypropylene, through controlled tests in solid suspension with the fungus *Aspergillus flavus*. (U. T. Pereira, Ed.) *Scientia et Technica*, 24(3). doi:ISSN 0122-701
- Sarduy B., L. y Gonzáles D., M. E. (2016). La biopelícula: una nueva concepción de la placa dentobacteriana. *Medicentro Electrónica*, 20(3).
- Schmitt, J. y Flemming, H. (1998). FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. *International Biodeterioration and Biodegradation*. doi:10.1016/S0964-8305
- Serrano M., J. (2018). *Espectroscopía Infrarroja: Aplicaciones*.
- Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., & Ahmed, S. (2008). Microbiological degradation of plastics: A comprehensive review. *ELSEVIER*, 246-265.
doi:10.1016/j.biotechadv.2007.12.005
- Soberón, G. (2017). *Pseudomona aeruginosa*. México: Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Speight, J. (2011). *Handbook of Industrial Hydrocarbon Processes*.

- Su, K. D. (2009). Molecular Structure and Tensile Properties Change of Crosslinked Polyethylene Pipes during Oxidative Degradation Process. *Polymer*, 33, 520-524.
- Tan, P. N., Steinbach, M. y Kumar, V. (2006). *Introduction to Data Mining*. Addison-Wesley.
- Trujillo Mejía, R. F. (2012). *Hidrocarburos: manejo seguro* (4a ed.). Ediciones, Ed.
- Uribe, D., Giraldo, D., Gutiérrez, S. y Merino, F. (2010). Biodegradación de polietileno de baja densidad por acción de un consorcio microbiano aislado de un relleno sanitario. *Rev.peru.biol. Versión Online*, 17(1), 133-136. doi:ISSN 1727-9933
- Uriel, E. y Aldás, J. (2005). *Análisis Multivariante Aplicado*. Madrid: Thomson.
- Valencia, A. (1993). EL impacto del ambiente sobre la degradacion de materiales. En A. Valencia, *Seminario sobre la declaracion y evaluacion del impacto ambiental*. Medellin.
- Varga, J., Kocsubé, S., Tóth, B., Frisvad, J. C., Perrone, G., Susca, A., . . . Samson, R. A. (2007). *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriata black. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57. doi:10.1099/ijms.0.65021-0
- Vargas Meza, F. M. (2013). *Biodegradabilidad de Polietileno Tereftalato y de Oxopolietileno, a nivel de laboratorio, por la acción de bacterias nativas presentes en hunus de lombriz, caballo y gallina*. Obtenido de <http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/6261>
- Vertus, D., Henriquéz, J. y Ruiz, M. (2017). *Biodegradación bacteriana de polietileno y propuesta de aplicación para Cerro Patacón*.
- Vimala, P. y Mathew, L. (2016). Biodegradation of Polyethylene Using Bacillus Subtilis. *Procedia Technology*(24), 232-239. doi:<https://doi.org/10.1016/j.protecy.2016.05.031>
- Vinuesa, P. (2016). *Correlación: Teoría y práctica*. CCG-UNAM. Obtenido de <http://www.ccg.unam.mx/~vinuesa/>

WickhamLaboratories. (25 de 08 de 2017). *FACT SHEET. Aspergillus brasiliensis*. Obtenido de <https://wickhamlabs.co.uk/technical-resource-centre/fact-sheet-aspergillus-brasiliensis/>

Xin, X., Yu, G., Chen, Z., Wu, K., Dong, X. y Zhu, Z. (2018). Effect of Polymer Degradation on Polymer Flooding in Heterogeneous Reservoirs. *Polymers*, 10(857).

doi:10.3390/polym10080857

Zhang, J., Gao, D., Li, Q., Zhao, Y., Li, L., Lin, H. y Bi, Q. (2019). Biodegradation of polyethylene microplastic particles by the fungus *Aspergillus flavus* from the guts of wax moth *Galleria mellonella*. *Science of the Total Environment*.

doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135931>

Zuliani, P., Defacio, R., Lavalle, A. y Bramardi, S. (2018). Comparación de técnicas de análisis multivariado mediante simulación para caracterización de recursos fitogenéticos en función de caracteres susceptibles a interacción genotipo-ambiente. *FAVE. Sección ciencias agrarias*, 17(1).

<https://doi.org/10.14409/fa.v17i1.7651>

ANEXOS

Anexo A. REGISTRO FOTOGRÁFICO



Figura 29. Preparación del PEBD previo al tratamiento. Tamizaje.

Fuente: Autor



Figura 30. Pesaje de reactivos para la elaboración del medio mineral

Fuente: Autor



Figura 31. Incubación de las cepas puras en el medio mineral con PEBD durante el período de Adaptación.

Fuente: Autor

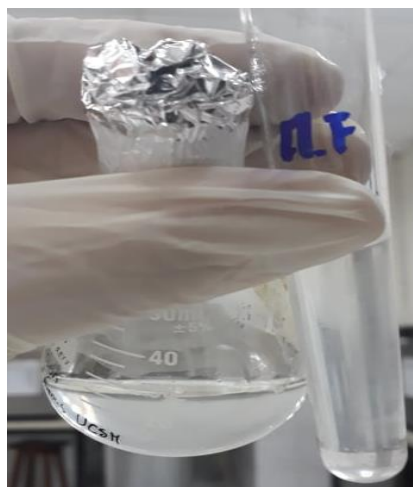


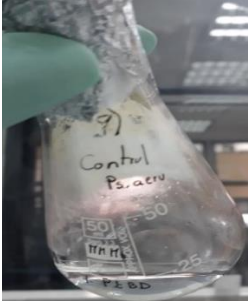
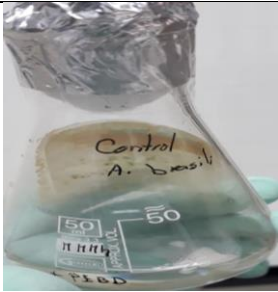
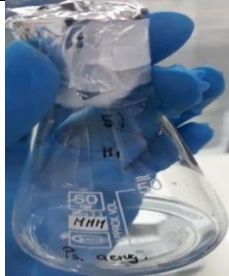
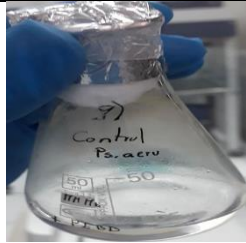





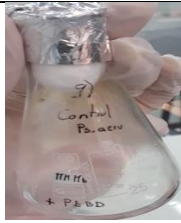
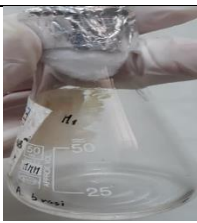
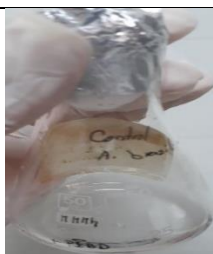
Figura 32. Turbidez de 0.5 de la escala de Mac Farland al final del período de adaptación.


Fuente: Autor

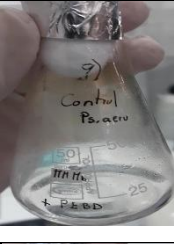
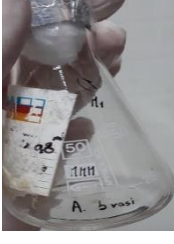

**Anexo B. REGISTROS SEMANALES DE OBSERVACIÓN DEL PERIODO DE
BIODEGRADACIÓN**

| Semana 1. Fecha: 11/08/2021 | | |
|--|---|---|
| Muestra | Observaciones | Registro fotográfico |
| Ps. aeruginosa (Ps. + MMM + PEBD) | A una semana de incubación a 35 °C y 35 rpm, el medio presenta un ligero incremento de la turbidez |  |
| A. brasiliensis (A. brasi. + MMM+PEBD) | A una semana de incubación a 28 °C, se observa un ligero incremento en la turbidez del medio. |  |
| Control bac. | El blanco utilizado contiene el medio mineral más PEBD, y fue incubado a las mismas condiciones, 35°C y 35 rpm. El mismo que a la semana de incubación no presentaba variación. |  |
| Control hon. | El blanco del medio mineral modificado (MMM) no presenta contaminación, ni alteración de la turbidez. |  |

| Semana 2. Fecha: 16/08/2021 | | |
|-----------------------------|--|---|
| Muestra | Observaciones | Registro fotográfico |
| Ps. aeruginosa | A la segunda semana de incubación, el medio se observó ligeramente turbio, pero perdió volumen significativamente, lo cual se le atribuye a la evaporación debido a la temperatura de 35°C. Se añadió 4 ml de medio. |  |
| Control bac. | El blanco también presentaba evaporación por lo que se le atribuye a la temperatura. Se añade más de medio mineral. No presenta contaminación. |  |
| A. brasiliensis | El medio aumentó su turbidez, se aprecia crecimiento fúngico, ya que se observa la presencia de un cúmulo flotante de color negro en el medio de cultivo correspondiente a pequeñas colonias del hongo. |  |
| Control hon. | Se observa el medio translúcido sin alteración de la turbidez, ni contaminación. |  |

| Semana 3. Fecha: 25/08/2021 | | |
|------------------------------------|---|---|
| Muestra | Observaciones | Registro fotográfico |
| Ps. aeruginosa | A la tercera semana del test de biodegradación, el medio mantiene la turbidez que presentaba en la anterior semana. |  |
| Control bac. | El blanco se encuentra sin contaminación, pero se aprecia una disminución del volumen del medio. |  |
| A. brasiliensis | A la tercera semana de incubación el medio mantiene la misma turbidez, pero su volumen se aprecia reducido. |  |
| Control hon. | Se observa el medio translúcido sin alteración de la turbidez, ni contaminación. |  |

| Semana 4. Fecha: 01/09/2021 | | |
|------------------------------------|--|---|
| Muestra | Observaciones | Registro fotográfico |
| Ps. aeruginosa | A la última semana del test de biodegradación, el medio presenta un ligero aumento de la turbidez, y se aprecia reducción del volumen del medio. |  |

| | | |
|----------------------------|---|---|
| Control bac. | El blanco se encuentra sin contaminación, y se aprecia translúcido. |  |
| A. brasiliensis | En la última semana del test de biodegradación, ha aumentado la turbidez del medio. No presenta contaminación. |  |
| Control hon. (MMM+PEBD) | Se observa el medio translúcido sin variación de la turbidez, ni contaminación. Presenta reducción del volumen del medio por evaporación del mismo. |  |

Anexo C: TABLA DE INTERPRETACIÓN DE ESPECTROS IR

TABLA IR-I ALCANOS


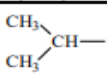
| Grupo | Nº de onda (cm ⁻¹) | Intensidad [mol ⁻¹ ·l·cm ⁻¹] | Origen | Notas |
|---|--------------------------------|---|------------------------------------|--|
| (1) -CH ₃ | 2970~2950 | ch 70 | v _{as} -CH ₃ | 2830~2815 (ε 35~75) en -OMe, ausente en -OEt. 2730~2820 (ε 15~21) en -NMe, ausente en -NEt. 2820~2710 en metilendioxi. Doblete en gem-dimetilos (ver (5)-(7)). Junto a carbonilos ver (11)-(13). |
| | 2880~2860 | m 30 | v _s -CH ₃ | |
| | 1470~1450 | m < 15 | δ _{as} -CH ₃ | |
| (2) -CH ₂ - | 1385~1365 | ch 15 | δ _s -CH ₃ | 1445 en ciclopentanos, 1450 en ciclohexanos. Se desplaza por hiperconjugación (ver (14)-(16)). Presente cuando n≥4. Ocasionalmente como doblete en sólidos. Mas alto a menor n. Propilo 743~734; Etilo 790~770. El -CH ₂ - también tiene bandas de flexión en ~1300 (ε≈1). Los espectros de sólidos con cadenas largas y grupos polares terminales (ácidos, ésteres, amidas) muestran una serie de bandas regulares entre 1350~1180. |
| | 2935~2915 | ch 75 | v _{as} -CH ₂ - | |
| | 2865~2845 | ch 45 | v _s -CH ₂ - | |
| | 1470~1445 | m 8 | tijera -CH ₂ - | |
| (3)  | 2890 | débil | v CH | sin uso práctico |
| | 1340 | débil | δ CH | |
| (4) -(CH ₂) _n -O- | 742~734 | | rocking de -CH ₂ - | corresponde a la banda en 720 de (2). |
| (5)  | 1170 | ch, mas débil que el doblete de 1380 (ε≈15). | esqueleto | Un doblete en 1380 sugiere grupos gem-dimetilo; la confirmación se realiza por la vibración del esqueleto (5)-(7). |
| | 1145 | ch " | " | Hombro en 1145 de la de 1170. |

Figura 33. Tabla de Espectroscopía Infrarroja.

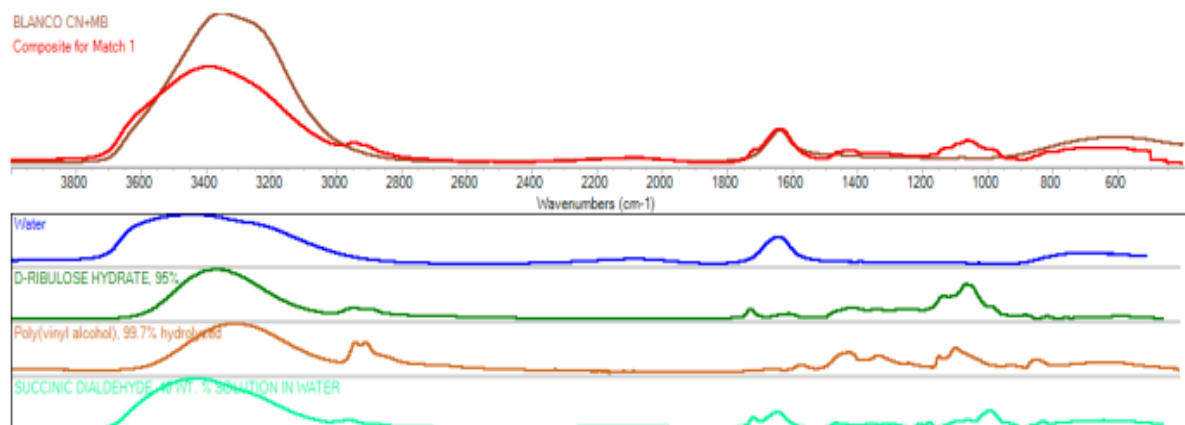
Nota: Tabla Informativa sobre los grupos funcionales presentes en los diferentes números de onda de los espectros IR.

Fuente: (Rojo C.)

Anexo D. RESULTADOS DEL ANÁLISIS MULTICOMPONENTE REALIZADO POR EL SOFTWARE OMNIC SPECTA.

Anexo D1. Análisis multicomponente del medio usado como blanco.

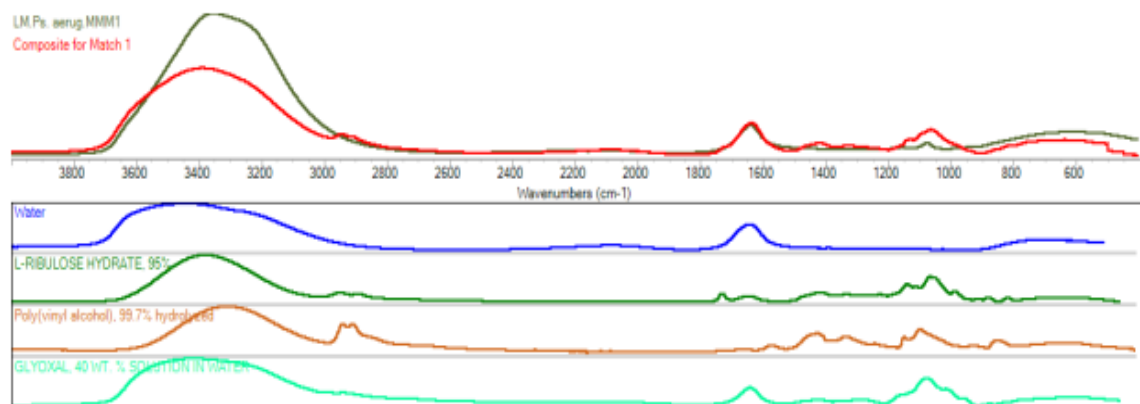
Multi-Component Search Results



| | Match | Title | Cumulative | Composite % | Folder | Filename | Index |
|---|-------|---|------------|-------------|---|---------------------------------------|-------|
| 1 | 59.52 | Water | 41.39 | 48.71 | HR Aldrich Solvents | c:\my documents\omnic\libs\sea428.lbd | 123 |
| | | D-RIBULOSE HYDRATE, 95% | 54.03 | 21.27 | HR Aldrich Alcohols and Phenols | c:\my documents\omnic\libs\sea414.lbd | 450 |
| | | Poly(vinyl alcohol), 99.7% hydrolyzed | 57.29 | 12.64 | HR Spectra Polymers and Plasticizers by ATR - corrected | c:\my documents\omnic\libs\sea465.lbd | 73 |
| | | SUCCINIC DIALDEHYDE, 40 WT. % SOLUTION IN WATER | 59.52 | 17.38 | HR Aldrich Aldehydes and Ketones | c:\my documents\omnic\libs\sea415.lbd | 444 |

Anexo D2. Análisis multicomponente del medio inoculado con *Ps. aeruginosa*

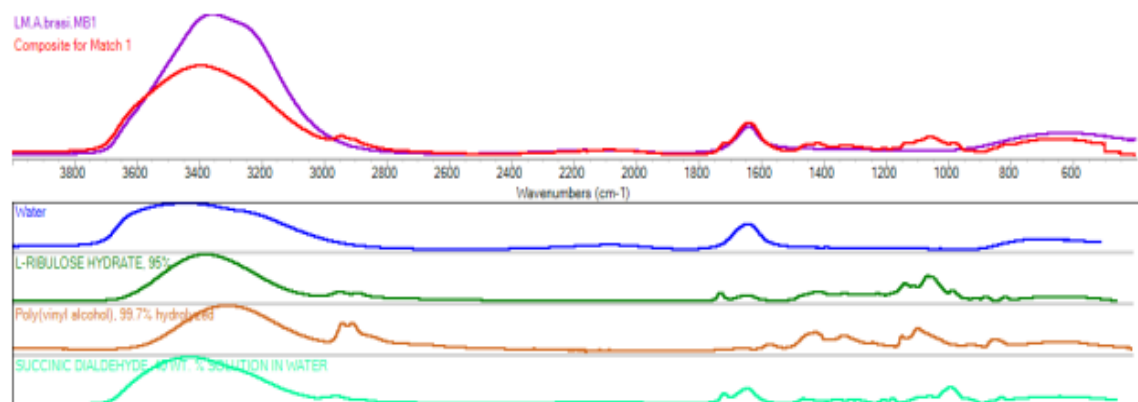
Multi-Component Search Results



| | Match | Title | Cumulative | Composite % | Folder | Filename | Index |
|---|-------|---------------------------------------|------------|-------------|---|--|-------|
| 1 | 59.98 | Water | 41.36 | 44.28 | HR Aldrich Solvents | c:\my documents\omnic\libs\s ea428.lbd | 123 |
| | | L-RIBULOSE HYDRATE, 95% | 52.70 | 20.14 | HR Aldrich Alcohols and Phenols | c:\my documents\omnic\libs\s ea414.lbd | 451 |
| | | Poly(vinyl alcohol), 99.7% hydrolyzed | 56.96 | 13.33 | HR Spectra Polymers and Plasticizers by ATR - corrected | c:\my documents\omnic\libs\s ea465.lbd | 73 |
| | | GLYOXAL, 40 WT. % SOLUTION IN WATER | 59.98 | 22.25 | HR Aldrich Aldehydes and Ketones | c:\my documents\omnic\libs\s ea415.lbd | 442 |

Anexo D3. Análisis multicomponente del medio inoculado con *A. brasiliensis*

Multi-Component Search Results



| | Match | Title | Cumulative | Composite % | Folder | Filename | Index |
|---|-------|---|------------|-------------|---|---------------------------------------|-------|
| 1 | 59.91 | Water | 42.22 | 47.18 | HR Aldrich Solvents | c:\my documents\omnic\libs\sea428.lbd | 123 |
| | | L-RIBULOSE HYDRATE, 95% | 54.23 | 22.12 | HR Aldrich Alcohols and Phenols | c:\my documents\omnic\libs\sea414.lbd | 451 |
| | | Poly(vinyl alcohol), 99.7% hydrolyzed | 57.75 | 13.13 | HR Spectra Polymers and Plasticizers by ATR - corrected | c:\my documents\omnic\libs\sea465.lbd | 73 |
| | | SUCCINIC DIALDEHYDE, 40 WT. % SOLUTION IN WATER | 59.91 | 17.57 | HR Aldrich Aldehydes and Ketones | c:\my documents\omnic\libs\sea415.lbd | 444 |

Anexo E. TABLA RESUMEN DE VARIANZA EXPLICADA DE LOS PC

Tabla E7.

Resumen de Varianza Explicada de los PC

| | PC1 | PC2 | PC3 | PC4 | PC5 | PC6 | PC7 | PC8 | PC9 | PC10 | PC11 | PC12 |
|--------------------------------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|
| Desviación estándar: | 7.6021 | 4.0246 | 3.8255 | 2.93229 | 2.20652 | 1.83973 | 1.64550 | 1.21191 | 1.1191 | 0.97743 | 0.89151 | 0.85645 |
| Proporción de Varianza: | 0.4982 | 0.1396 | 0.1262 | 0.07412 | 0.04197 | 0.02918 | 0.02334 | 0.01266 | 0.0108 | 0.00824 | 0.00685 | 0.00632 |
| Proporción Acumulada | 0.4982 | 0.6378 | 0.7640 | 0.83811 | 0.88009 | 0.90926 | 0.93261 | 0.94527 | 0.9561 | 0.96430 | 0.97115 | 0.97747 |

| | PC13 | PC14 | PC15 | PC16 | PC17 | PC18 | PC19 | PC20 | PC21 | PC22 | PC23 | PC24 |
|--------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Desviación estándar: | 0.75067 | 0.63252 | 0.59068 | 0.52213 | 0.50824 | 0.48102 | 0.3884 | 0.33149 | 0.31778 | 0.27468 | 0.24328 | 0.20458 |
| Proporción de Varianza: | 0.00486 | 0.00345 | 0.00301 | 0.00235 | 0.00223 | 0.00199 | 0.0013 | 0.00095 | 0.00087 | 0.00065 | 0.00051 | 0.00036 |
| Proporción Acumulada | 0.98233 | 0.98578 | 0.98879 | 0.99114 | 0.99337 | 0.99536 | 0.9967 | 0.99761 | 0.99848 | 0.99913 | 0.99964 | 1.00000 |

| | PC25 |
|--------------------------------|-----------|
| Desviación estándar: | 2.356e-15 |
| Proporción de Varianza: | 0.000e+00 |
| Proporción Acumulada | 1.000e+00 |

Anexo F. LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------|---|
| PE | Polietileno |
| PEBD/ LDPE | Polietileno de baja densidad |
| ACP | Análisis de Componentes Principales |
| ATR | Reflectancia Total Atenuada |
| FTIR | Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier |
| PC/ CP | Componente principal |
| % | Porcentaje |
| H_0 | Hipótesis nula |
| H_a | Hipótesis alternativa |
| g | Gramo |
| mg | Miligramo |