



UNIVERSIDAD NACIONAL DE JULIACA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AMBIENTAL Y FORESTAL



BIODEGRADACIÓN DE POLIESTIRENO
EXPANDIDO MEDIANTE *Pseudomonas* sp. AISLADAS
DEL BOTADERO DE RESIDUOS SÓLIDOS
DE LA CIUDAD DE AZÁNGARO

Bach. Karem Candy Condori Alvarez

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE:
INGENIERO AMBIENTAL Y FORESTAL

Asesor

Dr. Wile Mamani Navarro

Co-asesor:

MSc. Ebed David Paredes Rodriguez



Juliaca - 2020



UNIVERSIDAD NACIONAL DE JULIACA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AMBIENTAL Y FORESTAL



BIODEGRADACIÓN DE POLIESTIRENO
EXPANDIDO MEDIANTE *Pseudomonas* sp. AISLADAS
DEL BOTADERO DE RESIDUOS SÓLIDOS
DE LA CIUDAD DE AZÁNGARO

Bach. Karem Candy Condori Alvarez

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE:
INGENIERO AMBIENTAL Y FORESTAL

Asesor

Dr. Wile Mamani Navarro

Co-asesor:

MSc. Ebed David Paredes Rodriguez



Juliaca - 2020

UNIVERSIDAD NACIONAL DE JULIACA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL
Y FORESTAL



BIODEGRADACIÓN DE POLIESTIRENO
EXPANDIDO MEDIANTE *Pseudomonas sp.* AISLADAS DEL
BOTADERO DE RESIDUOS SÓLIDOS DE LA CIUDAD DE
AZÁNGARO

Bach. Karem Candy Condori Alvarez

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO AMBIENTAL Y
FORESTAL

Asesor: **Dr. Wile Mamani Navarro**

Co-asesor: **MSc. Ebed David Paredes Rodriguez**

Juliaca – Perú

2020

Condori K. (2020). *Biodegradación de poliestireno expandido mediante Pseudomonas sp. aisladas del botadero de residuos sólidos de la ciudad de Azángaro*. (Tesis de ingeniería). Universidad Nacional de Juliaca. Juliaca.

AUTOR: Karem Candy Condori Alvarez

TÍTULO: Biodegradación de poliestireno expandido mediante *Pseudomonas sp.* aisladas del botadero de residuos sólidos de la ciudad de Azángaro.

PUBLICACIÓN: Juliaca, 2021

DESCRIPCIÓN: Cantidad de páginas (108 pp)

NOTA: Tesis Escuela profesional de ingeniería Ambiental y Forestal —
Universidad Nacional de Juliaca.

CÓDIGO: 03-00006-02/C746

NOTA: Incluye bibliografía.

ASESOR: Dr. Wile Mamani Navarro

PALABRAS CLAVE:

Biodegradación, *Pseudomonas sp.*, poliestireno expandido.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE JULIACA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AMBIENTAL Y
FORESTAL
BIODEGRADACIÓN DE POLIESTIRENO EXPANDIDO
MEDIANTE *Pseudomonas* sp. AISLADAS DEL BOTADERO DE
RESIDUOS SÓLIDOS DE LA CIUDAD DE AZÁNGARO
TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO AMBIENTAL Y
FORESTAL

Presentada por:

Bach. Karem Candy Condori Alvarez

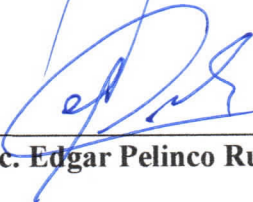
Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Presidente de jurado



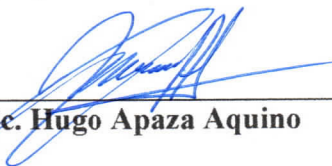
Dr. Gustavo Miguel Pacheco Pacheco

Jurado (Secretario)



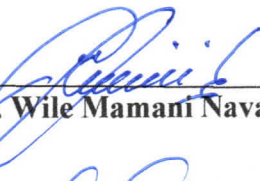
MSc. Edgar Pelinco Ruelas

Jurado (Vocal)



MSc. Hugo Apaza Aquino

Asesor



Dr. Wile Mamani Navarro

Co-asesor



MSc. Ebed David Paredes Rodriguez

DEDICATORIA

- *A papito Dios por el amor que me muestra día a día.*
- *A mis bellos padres, Teodoro Edgar Condori Arpi y Lady Norma Alvarez Calcina, porque gracias a ellos estoy en esta etapa de mi vida, por la paciencia, amor y por alentarme para terminar la investigación.*
- *A mis hermanos, por sus palabras de aliento y compañía.*

AGRADECIMIENTO.

- *A Dios por la sabiduría y las infinitas bendiciones que me da en mi vida.*
- *A mis padres por haberme apoyado hasta esta etapa de mi vida.*
- *Al Dr. Wile Mamani Navarro por compartir sus conocimiento y tiempo brindado*
- *Al MsC. Ebed Paredes Rodriguez por apoyarme, por su paciencia y su tiempo brindado.*
- *A la MVz. Luz, Eliana Céspedes Rodriguez, por su guía, por compartir sus conocimientos, por la paciencia que me tuvo en la ejecución de mi proyecto y en principal por la amistad brindada.*
- *Al Blgo. Joel Zapana Estrada por el apoyo y tiempo brindado en laboratorio.*

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN	XII
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
1.1. Formulación del problema.....	3
1.2. Objetivos de la investigación científica.....	4
1.3. Justificación.....	4
CAPÍTULO II.....	6
REVISIÓN DE LA LITERATURA CIENTÍFICA	6
2.1. Antecedentes	6
2.2. Bases teóricas	9
2.2.1. Plásticos.....	9
2.2.2. Poliestireno expandido	11
2.2.3. Disposición de los residuos sólidos en la región Puno.....	12
2.2.4. Disposición de los residuos sólidos en la ciudad de Azángaro	12
2.2.5. Plásticos en el botadero municipal de Azángaro.....	12
2.2.6. Degradación de polímeros	13
2.2.7. Género <i>Pseudomonas</i>	15
2.3. Marcos conceptuales o glosario.....	20
2.3.1. Poliestireno expandido (EPS).....	20
2.3.2. Biodegradabilidad	20
2.3.3. <i>Pseudomonas</i>	21
2.3.4. Pruebas bioquímicas.....	21

2.3.5. Tinción de gram.....	21
2.3.6. Medio de cultivo.....	21
2.3.7. Absorbancia.....	21
CAPÍTULO III	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1. Ámbito de estudio	22
3.2. Población y muestra	23
3.2.1. Población de estudio.....	23
3.2.2. Tamaño de muestra	23
3.2.3. Selección de muestra	23
3.3. Hipótesis de la investigación científica	23
3.3.1. Hipótesis general	23
3.3.2. Hipótesis específicas	23
3.4. Identificación de variables.....	24
3.5. Técnicas de recolección de datos	24
3.6. Obtención de la información	24
3.6.1. Materiales y equipos.....	24
3.6.2. Reactivos	25
3.7. Metodología.....	25
3.7.1. Aislamiento bacteriano de <i>Pseudomonas</i> sp. presentes en el poliestireno expandido procedente del botadero municipal de la ciudad de Azángaro.	25
3.7.2. Determinación de la pérdida de masa del poliestireno expandido en contacto con las <i>Pseudomonas</i> sp. aisladas en laboratorio de la UNAJ	27
3.7.3. Determinación del crecimiento de las <i>Pseudomonas</i> sp. con el poliestireno expandido	29

CAPÍTULO IV	33
RESULTADOS Y DISCUSIONES	33
4.1. Aislamiento e identificación de <i>Pseudomonas</i> sp. del botadero de residuos sólidos de la ciudad de Azángaro.	33
4.2. Pérdida de masa del poliestireno expandido	37
4.3. Crecimiento de las <i>Pseudomonas</i> sp. aisladas expuestas a poliestireno expandido.....	46
CAPÍTULO V	52
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	52
5.1. Conclusiones	52
5.2. Recomendaciones.....	53
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	54
ANEXOS	63

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Métodos y técnicas utilizadas para estudiar la biodegradación mediante bacterias del género <i>Pseudomonas</i>	20
Tabla 2 Modelo de diseño experimental de la prueba gravimétrica.....	28
Tabla 3 Modelo de diseño experimental del crecimiento de masa de <i>Pseudomonas</i> sp.	30
Tabla 4 Resultado de pruebas bioquímicas	34
Tabla 5 Presencia de <i>Pseudomonas</i> sp. aisladas a los 15, 30, 45 y 60 días a la temperatura de 4 °C.....	38
Tabla 6 Presencia de <i>Pseudomonas</i> sp. aisladas a los 15, 30, 45 y 60 días a temperatura ambiente.	40
Tabla 7 Presencia de <i>Pseudomonas</i> sp. aisladas a los 15, 30, 45 y 60 días a la temperatura de 37 °C.....	42
Tabla 8 Pérdida de masa al día 15	72
Tabla 9 Pérdida de masa al día 30	72
Tabla 10 Pérdida de masa al día 45	73
Tabla 11 Pérdida de masa al día 60	74
Tabla 12 Estadísticos descriptivos de la pérdida de masas del poliestireno expandido.....	74
Tabla 13 Pruebas de normalidad de la pérdida de masa.....	75
Tabla 14 Prueba de esfericidad de Maucly de pérdida de pesos	75
Tabla 15 Pruebas de efectos intra-sujetos de pérdida de pesos.	76

Tabla 16 Comparaciones por parejas de las pérdidas de pesos considerando los factores temperatura a 4°C con ausencia y presencia de <i>Pseudomonas</i>	76
Tabla 17 Comparaciones por parejas de las pérdidas de pesos considerando los factores temperatura ambiente en ausencia y presencia de <i>Pseudomonas</i>	77
Tabla 18 Comparaciones por parejas de las pérdidas de pesos considerando los factores temperatura a 37°C en ausencia y presencia de <i>Pseudomonas</i>	79
Tabla 19 Prueba de supuestos de la pérdida de pesos al día 15.....	80
Tabla 20 Pruebas de efectos intra-sujetos de pérdida de pesos al día 15.	80
Tabla 21 Pruebas de efectos inter-sujetos de la variable pérdida de masa al día 15	81
Tabla 22 Resultados de la lectura de absorbancias a temperatura de 4°C.....	82
Tabla 23 Resultado de lectura de absorbancias a temperatura ambiente.	82
Tabla 24 Resultados de absorbancias a temperatura de 37 °C.	82
Tabla 25 Estadísticos descriptivos de absorbancias	83
Tabla 26 Prueba de normalidad de absorbancias.....	83
Tabla 27 Prueba de esfericidad de Mauchly.....	84
Tabla 28 Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error (a).....	85
Tabla 29 Prueba de efectos intrasujeto.	85
Tabla 30 Prueba de efectos inter-sujetos.	86
Tabla 31 Comparaciones por parejas a 4°C.	86
Tabla 32 Comparaciones por parejas a temperatura ambiente.	88

Tabla 33 Comparaciones por parejas a 37°C. 90

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Estructura y polimerización del poliestireno expandido.....	10
Figura 2 Observaciones de las pruebas bioquímicas.	36
Figura 3 Pérdida de masa de poliestireno expandido a 4°C.	37
Figura 4 Pérdida de masa de poliestireno expandido a temperatura ambiente de laboratorio.	39
Figura 5 Pérdida de masa de poliestireno expandido a 37 °C.	41
Figura 6 Eficiencia de biodegradación del poliestireno expandido a 4°C, temperatura ambiente y 37°C.....	42
Figura 7 Absorbancias promedio a 4 °C a los días 0, 15, 30, 45 y 60.....	46
Figura 8 Absorbancia promedio a temperatura ambiente a los días 0, 15, 30, 45 y 60.....	48
Figura 9 Absorbancias promedio a 37 °C a los días 0, 15, 30, 45 y 60.....	49
Figura 10 Muestras del botadero municipal trasladadas a laboratorio.....	63
Figura 11 Toma de muestras en el botadero municipal cerrado de la ciudad de Azángaro.	63
Figura 12 Suspensión de poliestireno expandido del botadero en una solución salina.	64
Figura 13 PH de caldo palleroni y temperatura de incubación de para el aislamiento de la <i>Pseudomonas</i> sp.	64
Figura 14 Diferentes medios de cultivo para las <i>Pseudomonas</i> sp. en la identificación bacteriana.	65

Figura 15 Cepas aisladas de <i>Pseudomonas</i> sp. en medio de enriquecimiento.	65
Figura 16 Preparación de muestras para la prueba gravimétrica.	66
Figura 17 Pesaje del poliestireno expandido y control de presencia de <i>Pseudomonas</i> sp. .	66
Figura 18 Preparación y distribución del medio mínimo de sales.....	67
Figura 19 Muestras con cepas aisladas preparadas para el corrido en el espectrofotómetro a las tres temperaturas.....	67
Figura 20 Medición de las muestras en el espectrofotómetro.	68
Figura 21 Lectura de espectrofotómetro y muestra a temperatura ambiente de laboratorio.	68
Figura 22 Producción de piocianina y pioverdina en agar centrímide, control de presencia de <i>Pseudomonas</i> sp. al día 15 a 4 °C de la prueba gravimétrica.	69
Figura 23 Presencia de <i>Pseudomonas</i> sp. aisladas al día 30 a 4 °C en la prueba gravimétrica.	69
Figura 24 Observación en microscopio a 40X de las <i>Pseudomonas</i> sp. aisladas en tinción gram.	70
Figura 25 Observación en microscopio a 40X de <i>Pseudomonas</i> sp. a 4 °C en el día 60 de la prueba gravimétrica.....	70
Figura 26 Muestras de presencia de cepas al día 0 y cepas al día 60 después de la exposición a los 4 °C.....	71
Figura 27 Cepas expuestas a temperatura ambiente y 37 °C.....	71

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1 Panel fotográfico.....	63
ANEXO 2 Tablas y análisis estadístico de la pérdida de masa del poliestireno.....	72
ANEXO 3 Tablas y análisis estadístico de los resultados del crecimiento bacteriano en medio mínimo de sales	82

RESUMEN

La generación excesiva de desechos de poliestireno expandido resulta ser una preocupación ambiental, ya que este compuesto no se deteriora con facilidad en el medio ambiente, es por ello que la investigación tuvo como objetivo, determinar la eficiencia de biodegradación del poliestireno expandido mediante *Pseudomonas* sp. aisladas del botadero municipal de la ciudad de Azángaro, por lo que se aisló a la bacteria de residuos del polímero obtenido en el botadero municipal, realizando la identificación a través de pruebas bioquímicas y tinción gram, seguidamente se determinó la pérdida de peso del poliestireno expandido, mediante el factor de la variabilidad de masas del polímero; el crecimiento de las *Pseudomonas* sp. en presencia y ausencia del poliestireno expandido en un medio mineral se determinó a través de la lectura de absorbancias en un espectrofotómetro. Obteniendo como resultados el aislamiento e identificación de las *Pseudomonas* sp. del polímero procedente del botadero municipal, además se logró porcentajes de biodegradación de 0.97% a 4 °C, 2.59% a 25 °C y 1.61% a 37 °C en un periodo de 15 días de exposición; así mismo el crecimiento de las *Pseudomonas* sp. en presencia del polímero más medio líquido de sales fue mayor a los 37 °C. Finalmente se concluye que es posible obtener *Pseudomonas* sp. del botadero de residuos sólidos de la ciudad de Azángaro, la cual es eficiente en la biodegradación del poliestireno expandido a 25 °C en un periodo de 15 días expuesta únicamente al polímero, además su crecimiento mejora en un medio líquido de sales con poliestireno expandido.

Palabras clave: Biodegradación, *Pseudomonas* sp., poliestireno expandido.

ABSTRACT

The excessive generation of expanded polystyrene waste turns out to be an environmental concern, since this compound does not deteriorate easily in the environment, that is why the research had as objective, to determine the efficiency of biodegradation of the expanded polystyrene by means of *Pseudomonas* sp. isolated from the municipal dump of the city of Azángaro, so the bacteria was isolated from the polymer residues obtained in the municipal dump, making the identification through biochemical tests and gram staining, then it was determined the weight loss of expanded polystyrene, by the factor of the mass variability of the polymer; the growth of *Pseudomonas* sp. in the presence and absence of expanded polystyrene in a mineral medium was determined through the reading of absorbances in a spectrophotometer. Obtaining as results the isolation and identification of the *Pseudomonas* sp. from the polymer coming from the municipal dump, it was also achieved percentages of biodegradation of 0.97% at 4 °C, 2.59% at 25 °C and 1.61% at 37 °C in a period of 15 days of exposure; likewise the growth of the *Pseudomonas* sp. in presence of the polymer plus liquid medium of salts was higher than 37 °C. Finally it is concluded that it is possible to obtain *Pseudomonas* sp. from the solid waste dump of the city of Azángaro, which is efficient in the biodegradation of the expanded polystyrene at 25 °C in a period of 15 days exposed only to the polymer, besides its growth improves in a liquid medium of salts with expanded polystyrene.

Keywords: Biodegradation, *Pseudomonas* sp., expanded polystyrene

INTRODUCCIÓN

La producción mundial de poliestireno es de 3 millones de toneladas anuales, siendo la industria de envases y bienes de consumo, responsables del 54% de la producción total; seguida por el sector de la construcción con un 46% (Grote & Silveira, 2015), en consecuencia el uso de este compuesto ha ido incrementado gradualmente, ocasionando mayor contaminación al medio ambiente (Alania & Pérez, 2017; Hyun *et al.*, 2020), de esta manera termina en vertederos sanitarios y botaderos de residuos sólidos sin control que van formando grandes volúmenes de este compuesto, el cual se propaga fácilmente por la acción eólica, como consecuencia genera la contaminación ambiental (Schmidt, Cioffi, Voorwald, & Silveira, 2011).

Por esta razón surge la necesidad de buscar alternativas para la degradación del poliestireno expandido; considerando que la mayoría de los plásticos que se producen y se utilizan hoy en día, son derivados de los hidrocarburos, así mismo se ha demostrado la existencia de bacterias con capacidad de degradación de polímeros (Rivera, Augusto, Gándara, & Ortigoza, 2015), es por ello que en la búsqueda de procesos biodegradativos utilizando microorganismos como las bacterias, se requiere estudiar individuos que contengan la capacidad de metabolizar dicho compuesto recurriendo a él como fuente de carbono (Giros, Salah, Bertrand, & Caron, 1991). Las bacterias del género *Pseudomonas* son especies capaces de utilizar un amplio rango de compuestos orgánicos e inorgánicos, tienen la capacidad de vivir a diversas condiciones ambientales (Kerstens *et al.*, 1996; Palleroni, 1992), además crecen rápidamente y presentan gran habilidad para metabolizar una amplia variedad de sustratos, incluyendo compuestos orgánicos tóxicos como hidrocarburos alifáticos y aromáticos (Ruiz, 2007).

Por consiguiente el presente trabajo tiene como objetivo general; determinar la eficiencia de biodegradación del poliestireno expandido mediante *Pseudomonas* sp. aisladas del botadero municipal de la ciudad de Azángaro y como objetivos específicos; aislar *Pseudomonas* sp. presentes en el poliestireno expandido procedente del botadero municipal de la ciudad de Azángaro; determinar la pérdida de peso del poliestireno expandido en contacto con las *Pseudomonas* sp. aisladas en laboratorios de la UNAJ y determinar el crecimiento de las *Pseudomonas* sp. aisladas en contacto con el poliestireno expandido.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A nivel global el poliestireno expandido es considerado como un material eterno (López & Laines, 2013). Este compuesto tarda más de 500 años en descomponerse cuando no existe mucha presencia de oxígeno (Arriola & Velásquez, 2013); su utilización es muy común en la sociedad, lamentablemente este suele terminar en botaderos sin tener ningún tratamiento previo o en rellenos sanitarios (Thanh, 2018), dificultando el proceso de reciclaje y transporte, por ser un desecho voluminoso (Layedra, Galeas, & Guerrero, 2015). Actualmente, el poliestireno (PS) es uno de los plásticos más utilizados en muchas industrias; por lo tanto, degradar el PS se convierte en un problema global crítico (Hong *et al.*, 2020). El poliestireno expandido en los rellenos sanitarios, genera espacios de aire que no permiten una compactación óptima de todos los residuos, reduciendo de este modo el tiempo de vida del relleno sanitario (Téllez, 2012).

En el Perú el poliestireno expandido, es uno de los residuos que más espacio necesita en los rellenos sanitarios y botaderos, debido a que el país solo cuenta con 54 rellenos sanitarios de los 200 que el país necesita (MINAM, 2020), es por ello que estos compuestos terminan en botaderos, calles, ríos y posteriormente se quedan en el mar causando muerte de componentes bióticos y abióticos en diferentes ecosistemas del país (Delgado, 2018). Por esto se debe considerar la necesidad de disponer materiales que puedan ser desechables y que generen el menor impacto ambiental; en conclusión que no comprometan la salud humana (Layedra *et al.*, 2015).

La ciudad de Azángaro produce al día 2.21% de poliestireno expandido (tecnopor) del total de residuos sólidos de la ciudad, prevaleciendo de manera considerable en el botadero municipal, de esta manera genera problemas en la compactación y almacenamiento (Municipalidad Provincial de Azángaro, 2018). Así mismo este compuesto se encuentra presente en los pastizales y ecosistemas acuáticos de la ciudad, generando aspectos negativos ambientales tanto para la ganadería y biota acuática del río Azángaro, ya que forma parte de la cadena alimenticia por medio de los micro-plásticos.

1.1. Formulación del problema

1.1.1. Problema general

¿Qué porcentaje de biodegradación se obtendrá del poliestireno expandido a partir de *Pseudomonas* sp. aisladas del botadero de residuos sólidos de la ciudad de Azángaro?

1.1.2. Problemas específicos

¿Cómo se puede obtener *Pseudomonas* sp. que biodegraden el poliestireno expandido?

¿Cuántos gramos será la pérdida de peso del poliestireno expandido en contacto con las *Pseudomonas* sp. aisladas en laboratorio?

¿Cuánto será el crecimiento de las *Pseudomonas* sp. aisladas del botadero municipal expuestas al poliestireno expandido?

1.2. Objetivos de la investigación científica

1.2.1. Objetivo general

Determinar la eficiencia de la biodegradación del poliestireno expandido mediante *Pseudomonas* sp. aisladas del botadero municipal de la ciudad de Azángaro.

1.2.2. Objetivos específicos

- Aislar *Pseudomonas* sp. presentes en el poliestireno expandido procedente del botadero municipal de la ciudad de Azángaro.
- Determinar la pérdida de peso del poliestireno expandido en contacto con las *Pseudomonas* sp. aisladas en laboratorio de la UNAJ.
- Determinar el crecimiento de las *Pseudomonas* sp. aisladas en contacto con el poliestireno expandido

1.3. Justificación

Debido a que el poliestireno expandido es un polímero considerado como un material que perdura bastante tiempo en el ambiente, terminando su ciclo de uso en botaderos municipales (López & Laines, 2013), afectando a diversos ecosistemas como cuerpos acuáticos, zonas urbanas y rurales por la mala disposición que se le da al terminar su tiempo de uso (Hong *et al.*, 2020).

En ese sentido el concepto degradación del PS surge como un intento de considerar la importancia que desempeñan las bacterias como medidas de tratamiento para biodegradar los plásticos como es el poliestireno expandido, considerando que la mayoría de las bacterias para la degradación plástica se puede encontrar en vertederos, suelos y ambientes marinos; entre ellas se identifica a las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* (Syranidou *et al.*, 2017). Por lo que la presente investigación se realizó para aportar aspectos teóricos sobre la biodegradación del poliestireno

expandido (tecnopor) mediante *Pseudomonas* sp. aisladas del botadero municipal de la ciudad de Azángaro.

De esta manera se quiere aportar a la búsqueda de alternativas de solución para la degradación del poliestireno expandido, así como la biodegradación por microorganismos, de modo que las bacterias de especies del género *Pseudomonas* son usados para procesos de biorremediación por derrame de petróleo, ya que tienen la capacidad de utilizar como parte de su metabolismo al carbono (Mayz & Manzi, 2017). Además las *Pseudomonas*, son bacterias que se caracterizan por sobrevivir a temperaturas de 4 °C a 42 °C (Fauci, Kasper, Araiza, & Harrison, 2009). Por ello afirmamos que la investigación nos permite evaluar cuál es el efecto de las *Pseudomonas* sp. del botadero municipal de la ciudad Azángaro en el poliestireno expandido, para poder utilizar como medio de biorremediación en botaderos municipales controlados, de esta manera reducir impactos generados a la salud y disminuir aspectos negativos en el ambiente, así como en el suelo, por la abundancia de volumen y tiempo de degradación del material, como en el aire por la emisión de gases en la incineración del mismo y agua, por la perturbación a la biota acuática, además podría ayudar a reducir costos en el tratamiento de los residuos sólidos en rellenos sanitarios y restauración de áreas degradadas por plásticos.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LA LITERATURA CIENTÍFICA

2.1. Antecedentes

Hong *et al.* (2020), realizaron un estudio con la finalidad de examinar la degradación del poliestireno expandido (PS) usando *Pseudomonas* sp. aisladas de los intestinos de larvas de *Zophobas atratus*, a través de microscopia electrónica, de esta manera se midieron los cambios en la composición atómica y cambio químico de hidrofobicidad a hidrofilia, en la que tuvo como resultados, el nivel de expresión génica de la serina hidrolasa (SH) en *Pseudomonas* sp., además el crecimiento de la cepa DSM 50071 aumentó durante la degradación del polímero, de esta manera confirmaron la biodegradación de poliestireno expandido mediada por enzimas. Finalmente, la importancia de estos hallazgos va más allá del descubrimiento de una nueva función de *Pseudomonas* sp. en el intestino de las súper lombrices, destacando una posible solución para la biodegradación del poliestireno expandido.

Hyun *et al.* (2020), efectuaron un estudio denominado “evaluación de la eficiencia de biodegradación de cuatro tipos de plásticos por *Pseudomona aeruginosa* aislada del extracto intestinal de superworms”, en el que mostraron el poder biodegradativo de la *Pseudomonas aeruginosa* en la despolimerización eficiente de poliestireno (PS), sulfuro de polifenileno PPS, polietileno (PE) y polipropileno (PP), comparando las tasas de biodegradación de mencionados plásticos, en consecuencia, reportan que el polietileno

se biodegrada más rápido y el polipropileno más lento, obteniendo una pérdida de peso de poliestireno del 0.098%/día; además reportaron que la tasa de crecimiento bacteriano podría verse influenciada por la composición y las propiedades de las moléculas intermedias producidas durante la biodegradación plástica, debido a que pueden suministrar energía y precursores celulares útiles.

Jiaojie, *et al.* (2020), investigaron la biodegradación rápida de perlas de plástico de sulfuro de polifenileno por *Pseudomonas* sp., en el que mostraron que la biodegradación fue eficiente para el sulfuro de polifenileno expuesto a *Pseudomonas* sp.; a través de perlas de plástico de 300 µm de diámetro para la medición de la biodegradación del polímero por la bacteria, en un período de 10 días, dado que realiza observaciones a las superficies del polifenileno a través de microscopia SEM, resultando que las muestras expuestas a *Pseudomonas* sp. en comparación a las muestras control eran significativamente más pequeñas, con un promedio de aproximadamente 15 veces menor de diámetro, además mencionan que la tasa de crecimiento de *Pseudomonas* sp. parece estar estrechamente asociado con la tasa de despolimerización del plástico.

Alonso *et al.* (2016), reportaron en su estudio denominado degradación de poliestireno y polipropileno con microorganismos de vermicompost, en la que determinaron si los microorganismos contenidos en humus de lombriz de tierra servirían para la biodegradación de poliestireno y polipropileno; mediante una evaluación de la pérdida de peso en el tiempo, obteniendo como resultados la velocidad de degradación específica en el nivel I, II y III del poliestireno expandido con 0.16%, 0.21% y 0.27% de pérdida de peso por mes respectivamente; y del polipropileno 0.16%, 0.16% y 0.22% de pérdida de peso por mes respectivamente, finalmente encontraron a las bacterias del género *Pseudomonas* entre los microorganismos que podrían haber ocasionado la biodegradación del polipropileno y poliestireno.

Rivera *et al.* (2015) realizaron un estudio sobre bacterias hidrocarbonoclasticas biodegradantes de poliestireno expandido, con la intención de determinar la capacidad de biodegradar el poliestireno expandido aislando cepas bacterianas de aceite crudo del suelo y agua contaminados por hidrocarburos, procedentes de Coatzacoalcos, Veracruz, México. Entre los géneros identificados se reportaron a las *Pseudomonas*. Su

crecimiento fue observado mediante un espectrofotómetro Spectronic 20 Milton Roy Company a 450 nm., además en la fase estacionaria agregaron 0.5 mL de poliestireno previamente tratado con solventes orgánicos, como fuente de carbono. Finalmente reportaron la tasa de crecimiento de la bacteria del género *Pseudomonas* sp. con y sin poliestireno expandido de 0.005 y 0.002 respectivamente; en consecuencia, mencionan que *Pseudomonas* sp. presentan capacidad biodegradativa sobre el poliestireno expandido.

Barbarán, Cabanillas, & Rubio (2018), determinaron el porcentaje de biodegradación de polietileno tereftalato (PET) por acción de *Pseudomona aeruginosa*, en condiciones de laboratorio, por medio del método de pérdida de peso, inoculando concentraciones de *Pseudomona aeruginosa* de 18×10^7 UFC, 36×10^7 UFC y 9×10^8 UFC para periodos de tiempo de 15, 25 y 35 días, de esta manera concluyen que el mejor tratamiento es la aplicación de 9×10^8 UFC de *Pseudomona aeruginosa* durante un periodo de 35 días en el que se logró una biodegradación del 19.93% de polietileno tereftalato.

Alania & Pérez (2017), presentaron en su estudio “efecto de la temperatura en el crecimiento de dos cepas ATCC de *Pseudomonas* sp. expuestas a polipropileno” por lo que evaluaron el crecimiento a dos temperaturas de dos cepas ATCC (American Type Culture Collection) de *Pseudomonas* sp. N° 9027 y N° 10145, expuestas a polipropileno, mediante el cambio de la absorbancia (DO) en función al tiempo (semanas). Obteniendo como resultado, que el comportamiento cinético de las dos cepas ATCC 9027 y ATCC 10145 frente a la presencia y ausencia del polipropileno a los 37 °C fue mayor. De esta manera concluyeron que ambas cepas ATCC expuestas a polipropileno a una temperatura de 37 °C presentan un mejor crecimiento.

Gutierrez (2018), realizó una investigación cuyo objetivo era analizar y determinar la influencia de los factores, crecimiento microbiano y pH a diferentes temperaturas (20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C y 40 °C) para la degradación del polietileno de baja densidad, por lo que realizó la toma de muestras de agua y sometió a las cepas ante el polietileno como principal fuente de alimento a condiciones controladas de pH y temperatura, así mismo identificó colonias de *Pseudomonas aeruginosa* y que a 25 °C resultó ser mayor

el crecimiento (3.5×10^6 UFC) a 72 horas; de esta manera mostró la capacidad degradativa de la bacteria ante el polietileno de baja densidad.

Butron (2020), evaluó la capacidad de biodegradación de *Pseudomonas aeruginosa* frente al polietileno de baja densidad, de esta manera aisló a la bacteria de residuos plásticos del botadero de Cancharani en la ciudad de Puno e identificó taxonómicamente en base a características macroscópicas, además adaptó la cepa bacteriana en un medio mineral con partículas de polietileno de baja densidad; determinando la capacidad biodegradativa a temperaturas de 25 °C y 35 °C con pH de 5 y 7, durante 30 días, obteniendo como resultados el 21.7% y 27.3% de pérdida de peso a 25 °C y 35 °C respectivamente a pH de 7. Por lo que demostró que las *Pseudomonas aeruginosa* presenta capacidad de biodegradación en un rango de temperatura de 25 °C - 35 °C.

Ccallo & Sacaca (2020), investigaron sobre la biodegradación de plásticos por *Pseudomonas*, en la que realizaron una revisión bibliográfica sobre los mecanismos, métodos y técnicas para la biodegradación de plásticos por *Pseudomonas*. De esta manera demuestran que estas bacterias tienen la capacidad de asimilar los plásticos, convirtiéndolos de polímeros a monómeros debido a que estos microorganismos generan enzimas que inician la biodegradación de los plásticos, además se adaptan a diferentes condiciones bióticas y abióticas con mayor facilidad que otras bacterias, en consecuencia, concluyen que la técnica de pérdida de peso es la más factible para su aplicación.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Plásticos:

Son polímeros sintéticos, que se caracterizan por presentar moléculas de masa elevada, formados por unidades más pequeñas denominados monómeros, se van repitiendo y enlazándose unas a otras (Wade, 2012). Los plásticos se obtienen por procesos químicos que conllevan a formar estructuras más complejas que los compuestos naturales debido a que se forman enlaces entre las moléculas constitutivas formando largas cadenas y a estos materiales les llamamos “macromoléculas o polímeros” (Quintero, 2013).

Un polímero es un compuesto que consiste en un conjunto de moléculas de cadena larga, cada molécula está hecha de unidades repetitivas que se conectan entre sí. Puede haber miles de millones de unidades en una sola molécula de polímero (Groover, 2007). El término se deriva de las palabras griegas “poly” que significa muchos y meros que significa “parte”. La mayoría de los polímeros se basan en el carbono, por consiguiente son considerados sustancias químicas orgánicas. Sin embargo, el grupo también incluye un número de polímeros inorgánicos (Groover, 2007; Wade, 2012).

Poliestireno: El poliestireno es un material transparente sólido, formado por la polimerización de muchas moléculas de estireno (benceno y etileno del petróleo) (Schmidt *et al.*, 2011). Es un polímero termoplástico que se obtiene de la polimerización del estireno (Eubeler, Bernhard, Knepper, & Knepper, 2010).

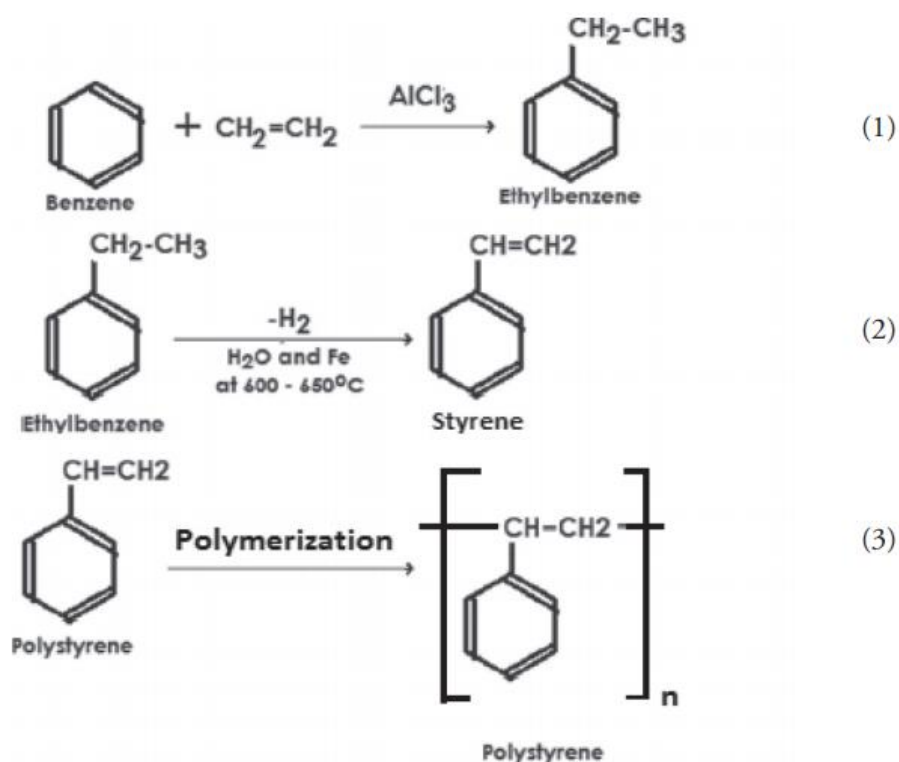


Figura 1 Estructura y polimerización del poliestireno expandido.

FUENTE: Subramanian, 2015.

2.2.2. Poliestireno expandido

Es un producto altamente utilizado en el sector industrial, debido a su maleabilidad y economía puede ser usado en envases, embalajes y construcción, sin embargo, ello no es justificante para el uso indiscriminado que se le ha dado pues su degradación es tan lenta que puede llegar a permanecer en el ambiente durante cientos de años antes de ser incorporados de manera total a la naturaleza (León, Albero, & Cruz, 2007). El poliestireno (PS) es uno de los principales residuos plásticos acumulados en el medio ambiente (Yang, Wang, & Xia, 2020).

Como todos los plásticos, el poliestireno proviene del petróleo del cual se obtiene una sustancia llamada estireno (monómero) este se polimeriza con agua y un agente expansor para obtener el poliestireno expandible o expandido (EPS) (Eubeler *et al.*, 2010), el cual es la materia prima en la industria de la transformación de los artículos para el sector de la construcción, embalaje y envase, entre otras aplicaciones diversas, por sus características de aislante acústico, térmico, de inocuidad y por su baja absorción de agua (Ramos, 1988).

Según Subramanian (2015), el poliestireno es un polímero termoplástico con estructura lineal. Es un producto convencionalmente atáctico y amorfo, por lo tanto transparente. Al igual que otras resinas, el PS es relativamente inerte a los productos químicos inorgánicos (Torres, 2016).

- a) Propiedades físicas: Los productos y artículos acabados en poliestireno expandido (EPS) se caracterizan por ser extraordinariamente ligeros, aunque resistentes (Solis, 2005).
- b) Propiedades químicas: El poliestireno expandido es estable frente a muchos productos químicos. Si se utilizan adhesivos, pinturas disolventes y vapores concentrados de estos productos, hay que esperar un ataque de estas sustancias (Ossa, 2009).
- c) Propiedades biológicas: El poliestireno expandido se caracteriza por su escasa participación en los procesos biológicos, además es poco probable que sea atacado por microorganismos del suelo. Los productos de PS cumplen con las

exigencias sanitarias, seguridad e higiene; por lo que puede ser utilizado con total garantía en la fabricación de artículos de embalaje destinados al contacto alimenticio (Arriola & Velásquez, 2013).

2.2.3. Disposición de los residuos sólidos en la región Puno

Se realiza a cielo abierto, de tal modo que se esparcen en el terreno, contaminando el suelo, el subsuelo y mantos acuíferos convirtiéndolos en plataformas estériles. El problema de los residuos sólidos urbanos se genera principalmente por el incremento de la utilización de envases sin retorno y de un solo uso en los últimos años. Estos embalajes conocidos como “no retornables” son altamente tóxicos, plásticos halogenados como el policloruro de vinilo (PVC) y no halogenados como el polipropileno (PP) o de constitución mixta. El hecho es que el tiempo de degradación de estos materiales oscila entre los 10 y 800 años (Machaca, Choque, & Flores, 2013).

2.2.4. Disposición de los residuos sólidos en la ciudad de Azángaro

La generación per cápita de residuos sólidos domiciliarios en la localidad de Azángaro es de 0.63 kg/hab./día, con una generación estimada total de 20 ton/día. La disposición de residuos sólidos se hace mediante un vertido directo de las unidades de recolección y traslado de los residuos sólidos provenientes del distrito de Azángaro (Gerencia de servicios municipales y gestión ambiental, 2019).

2.2.5. Plásticos en el botadero municipal de Azángaro

La generación de plásticos en la ciudad de Azángaro es el 12.66 %, representando grandes porcentajes el plástico duro, plásticos PET (tereftalato de polietileno) y tecnopor (poliestireno expandido). Los plásticos PET presentan actividades de reciclaje que se realizan en el botadero municipal, sin embargo el tecnopor no presenta ningún tipo de reciclaje, ni tratamiento el cual este viene a representar un 2.21% según su estudio de caracterización de residuos (Municipalidad Provincial de Azángaro, 2019).

2.2.6. Degradación de polímeros

Es un proceso dirigido a modificar la estructura del polímero, para hacerlo vulnerable y perecedero; es decir, que desaparezca como residuo (Limon, 2001). La degradación de un material sintético es un proceso complejo, causado por la escisión de determinados enlaces químicos (Sáenz, 2006).

Tipos de degradación: Según Limón (2001), la degradación de los polímeros es causada principalmente, por reacciones que producen el rompimiento de los enlaces en las macromoléculas. Según el modo de iniciación de los procesos está el que sea de diferente origen (Gutierrez, 2013) de esta manera la degradación puede ser; física (por efecto de radiaciones de energía alfa y foto degradación), química, ambiental (por intemperismo) y biológica (biodegradación) (Norella, Lopez, Francisco, & Santander, 2018).

- a) Degradación mecánica. Cuando se producen cambios macroscópicos por efecto de fuerzas de corte, si se aplica una tensión suficientemente elevada al material polimérico, se pueden producir rupturas en los enlaces de las cadenas moleculares, que inician las reacciones de degradación (Sáenz, 2006).
- b) Degradación térmica: Se presenta cuando el polímero experimenta cambios químicos, después de ser sometido a temperaturas altas sin la intervención simultánea de otro compuesto. Sin embargo, suelen ser los aditivos o impurezas presentes en el material, los que se descomponen por efecto de la temperatura y reaccionan con la matriz (Norella *et al.*, 2018; Treviño, 2016). Es difícil distinguir entre una degradación térmica y una termoquímica, debido a que los materiales poliméricos son raramente “químicamente puros” (Treviño, 2016).
- c) Degradación por radiación de energía alfa: Es inducida por radiación electromagnética (rayos X o Y) y radiación de partículas (*alfa*, neutrones, productos de fusión), no es específica de la absorción (Treviño, 2016). Las radiaciones son capaces de generar reactivos intermedios, generalmente iones

y radicales libres en el sustrato polimérico, que producen alteraciones significativas en la matriz del material (Sáenz, 2006).

- d) Foto degradación: Se refiere a los cambios físicos y químicos producidos por la radiación con luz UV o visible. Para que el grado de conversión sea realmente significativo y la luz ultravioleta o visible sea absorbida por el material, debe poseer grupos cromóforos; es decir, capaces de absorber dicha radiación. Estos grupos pueden formar parte de la propia molécula o permanecer en el sustrato en forma de aditivos (Sáenz, 2006). Generalmente dichos grupos absorben radiación, en una escala de longitudes de onda menores de 400 nm (Treviño, 2016).
- e) Degradación química: Es inducida por reactivos químicos (ácidos, bases y disolventes). En muchos casos, se observa una serie de conversiones químicas de los compuestos presentes en el material (Limón, 2001); sin embargo este modo de iniciación del proceso de degradación necesita una energía de activación muy alta, por lo que generalmente sólo se observan grados de conversión significativos, si el proceso se produce a temperaturas elevadas (Sáenz, 2006).
- f) Degradación ambiental: Los materiales poliméricos sufren un deterioro cuando están expuestos a la acción de la luz solar, en combinación con otras variables climáticas como cambios de temperatura, humedad ambiental, viento y contaminación. Este deterioro puede manifestarse superficialmente por modificaciones tanto del color como de pérdida de brillo pero, generalmente afecta también a las cadenas moleculares (Gutierrez, 2013).
- g) Degradación biológica o biodegradación: Es la transformación bioquímica de los compuestos por la acción de microorganismos. La biodegradación de un compuesto ocurre debido a la actividad de varias enzimas (Hong *et al.*, 2020; Hyun *et al.*, 2020), que son producidas por los microorganismos (Norella *et al.*, 2018). El material polimérico sirve como fuente para la obtención de carbono (Kyaw, Champakalakshmi, Sakharkar, Lim, & Sakharkar, 2012). En

el proceso de biodegradación los microorganismos se incrementan, alcanzando la máxima población de heterótrofos totales a los 30 días y de hidrocarbonoclasticos a los 60 días, resultado que puede ser explicado porque el hidrocarburo como fuente de carbono puede sostener la población microbiana (Enrique, Rodríguez & Rubiños, 2003). Existen microorganismos aislados del suelo que son capaces de degradar varios tipos de plásticos, como es el caso de las *Pseudomonas* sp. (Jiaojie *et al.*, 2020)

2.2.7. Género *Pseudomonas*:

Las bacterias de este género son capaces de utilizar un amplio rango de compuestos orgánicos e inorgánicos, capaces de vivir a diversas condiciones ambientales (Hyun *et al.*, 2020; Palleroni, 1992), algunas bacterias de este grupo producen pigmentos fluorescentes de colores amarillo-verdosos, fácilmente solubles en agua (Meyer *et al.*, 2002). Estos pigmentos actúan como sideróforos, moléculas cuya función es capturar el hierro del medio necesario para el metabolismo del microorganismo. Presentan una amplia versatilidad metabólica que se traduce en su capacidad para utilizar sustratos muy variados como fuente de carbono (Hong *et al.*, 2020; Hoyle & Costerton, 1991; Hyun *et al.*, 2020; Jiaojie *et al.*, 2020). Las *Pseudomonas* son gram negativas, generalmente móviles y presentan uno o varios flagelos polares, aunque también se han descrito flagelos laterales más cortos. Son de metabolismo respiratorio, nunca fermentativo, aunque pueden producir ligeras cantidades de ácido a partir de la glucosa en aerobiosis (Butron, 2020).

- A. Clasificación taxonómica: Se encuentra clasificado en el dominio Bacteria, phylum Proteobacteria, clase Gammaproteobacteria, orden Pseudomonadales y familia Pseudomonaceae (Whitman, 2011). El género *Pseudomonas* incluye casi 200 especies diferentes (Fauci, Kasper, Araiza, & Harrison, 2009).
- B. Etimología: Pseudomonada literalmente significa falsa unidad, derivado del griego “pseudo” falso y “monas” una sola unidad (Brenner, Krieg, & Staley, 2005; Whitman, 2011).
- C. Características: Las *Pseudomonas* son bacilos gram negativos, rectos o ligeramente curvados (0.5-0.8 μm x 1-3 μm), generalmente son móviles gracias a

sus flagelos polares que poseen aunque en algunas cepas poseen flagelos laterales (Hassett *et al.*, 2002). Normalmente son oxidasa positivos, catalasa positivos y aerobios estrictos, aunque recientemente se han descrito *Pseudomonas* formadoras de biopelículas que pueden utilizar el nitrato como aceptor de electrones (Dobbins, 2010).

- D. Hábitat: Se encuentran principalmente en el suelo, en los compuestos orgánicos de descomposición, en la vegetación y en el agua, estos microorganismos tienen muchos factores estructurales, toxinas y enzimas, gracias a su metabolismo tienen una cierta facilidad de adaptación que les permite adecuar su hábitat donde se encuentren para utilizar diferentes fuentes como el carbono o el nitrógeno para su nutrición (Dobbins, 2010). La mayoría de las infecciones causadas por *Pseudomonas* son oportunistas donde la especie que más se encuentra en los aislados clínicos es *Pseudomonas aeruginosa* (Fauci, Kasper, Araiza, & Harrison, 2009; Kersters *et al.*, 1996).
- E. Condiciones de crecimiento: Crecen con facilidad en los medios de cultivo y produce en ocasiones un olor dulzón a uvas (Ren *et al.*, 2008), crecen entre 4 °C y 42 °C, aunque su temperatura óptima de crecimiento es de 35 °C - 37 °C. (Palleroni, 1992). El pH es un factor químico importante, ya que puede afectar principalmente a las poblaciones de *Pseudomonas* y la biodisponibilidad de las fuentes de carbono y energía (Butron, 2020). Este factor se constituye como uno de los indicadores del proceso de biorremediación y aunque las *Pseudomonas* se pueden adaptar fácilmente a condiciones extremas, estas cepas microbianas tienen un determinado rango de tolerancia. A pH extremadamente alcalinos o extremadamente ácidos la biodegradación se hace lenta. El rango óptimo para la biodegradación está entre 6–8 pH. Sin embargo, para mantener una mejor capacidad degradante, por periodos de tiempo prolongados, el pH debe ser neutro, entre 7.4 – 7.8, evitando al máximo las fluctuaciones (Gómez *et al.*, 2008).
- F. Supervivencia ambiental de las *Pseudomonas*: Estas bacterias, necesitan simples requerimientos nutricionales que posee el rango de compuestos del carbono, además presentan gran adaptabilidad genética y metabólica (Ruiz, 2007); estas bacterias pueden vivir en diversos tipos de ambientes acuáticos y terrestres;

esencialmente en cualquier hábitat con un rango de temperatura de 4 °C - 42 °C, a un pH comprendido entre 4 y 8, a su vez que contenga compuestos orgánicos o complejos (Palleroni, 1992). El estrés por nutrientes induce a las *Pseudomonas* algunos cambios morfológicos y bioquímicos que en condiciones limitantes de crecimiento (Hyun *et al.*, 2020), la bacteria expresa mecanismos de protección, permitiendo a las células sobrevivir a desafíos ambientales (Aguirre, 2015).

- G. Nutrición de las *Pseudomonas* sp.: Esta bacteria se caracteriza por ser parte del grupo de bacterias no fermentadores debido a que tienen en común la incapacidad de fermentar lactosa, sin embargo tienen la capacidad de utilizar fuentes de carbono, nitrógeno, acetato y amoníaco, de esta manera obtienen energía de la oxidación de azúcares (Strateva & Yordanov, 2009), los macronutrientes de mayor importancia metabólica para la bacteria se encuentran en fuentes de carbono (C); considerando que este compuesto se encuentra en los hidrocarburos a través de sus componentes proporcionan a la bacteria la energía necesaria para la fabricación de compuestos celulares y productos metabólicos (dióxido de carbono, agua, enzimas) (McDougald, Rice, Weichart, & Kjelleberg, 1998); el nitrógeno (N), es un elemento necesario para la producción de aminoácidos, proteínas, enzimas, ácidos nucleicos y otros componentes que constituyen la estructura celular de la misma; mientras tanto el fósforo (P) es requerido para la síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos en los procesos de reproducción y degradación; sin embargo el potasio (K) es requerido por una gran cantidad de enzimas y de esta manera catalizar diferentes reacciones (Maroto & Rogel, 2004).
- H. Capacidad metabólica del microorganismo: Con referencia a la biomasa, se debe tener en cuenta la cinética de crecimiento del microorganismo obteniendo mayor rendimiento metabólico en la fase exponencial, debido a que el aumento de esta es un indicador del proceso de biorremediación (Leahy & Colweel, 2019). La conformación genética de *Pseudomonas* es muy versátil; por poseer operones, elementos móviles como transposones y plásmidos (Chakrabarty, 1976), que permiten la transferencia de los genes, por lo tanto, la rápida adaptación frente a la presencia de agentes contaminantes nuevos en un ecosistema en particular (Hoekstra, 1988; Hong *et al.*, 2020; Jiaojie *et al.*, 2020).

I. Bioseguridad para el manejo de *Pseudomonas* sp.

- Prevención y control

Desinfectantes: Como control y manejo de la bacteria en laboratorio, podemos encontrar como desinfectantes, al hipoclorito de sodio (1%), etanol (70%), glutaraldehído (2%), formaldehído, alcohol isopropílico al 4%, así mismo de debe considerara que algunas especies de *Pseudomonas* han mostrado resistencia a desinfectantes como, el cloro, las cloraminas, el ozono y el yodo (Khalifa, Moissenet, Thien, & Khedher, 2011).

La inactivación física de la bacteria para un mejor control de contaminación de muestras y nivel de exposición a estas cuando se trabaja en laboratorio, es por ello que con calor húmedo a 121 °C o con calor seco a 170 °C - 250 °C durante 15 a 30 minutos, logras la inactivación (Sangorrin, 2014). Es necesario considerar que hay cepas multirresistentes cuando se expone a carbenicilinas, cefalosporinas, ceftazidima y ciprofloxacino (Khalifa *et al.*, 2011).

- Buenas prácticas de higiene: El lavado de manos con agua y jabón líquido al comenzar y finalizar la jornada laboral, después de quitarse los guantes y tras el contacto con elementos contaminados; evitar el contacto de las manos con los ojos, la nariz o la boca; evitar la exposición de heridas abiertas, cubriéndolas con apósitos estériles e impermeables. Utilización de ropa de trabajo y equipos de protección individual adecuados. Retirarse o quitarse cuanto antes la ropa o calzado húmedo o mojado (Montero, 2012).

- Seguridad en laboratorio: Los principales riesgos son la inoculación accidental, la inhalación de aerosoles infecciosos, la ingesta accidental o el contacto dérmico directo. Las muestras o especímenes más peligrosos son: los hemocultivos, la orina, el esputo, las muestras de tejidos blandos, las secreciones del tracto respiratorio inferior, los exudados de heridas y las muestras de agua. Se requieren las prácticas y la contención de un nivel 2 de bioseguridad, se debe evitar o reducir al mínimo el empleo de material cortante o punzante, además del uso de guantes impermeables en caso de contacto con muestras contaminadas (Montero, 2012).

J. Eficiencia de biodegradación: Existen varias técnicas y metodologías para determinar la eficiencia de biodegradación (Ccallo & Sacaca, 2020) de manera directa como indirecta, entre las recomendadas se encuentra a la medición de la cinética de la población bacteriana (Purisaca & Quevedo, 2015). En la Tabla 1 se muestra técnicas y métodos para estudiar la biodegradación mediante bacterias del género *Pseudomonas*.

Según Herrera (2013), para determinar la masa celular, se evalúa el crecimiento de una población bacteriana aplicando métodos directos de conteo de la población, medida del peso seco, medida del peso húmedo, medida del volumen, determinación del contenido de N o bien por métodos indirectos como turbidimetría a través de espectrofotometría u otros equipos.

Así mismo una de las formas de medir la biomasa y determinar las fases de crecimiento, es a través de una metodología que relacione dicha biomasa con una magnitud física tal como la absorbancia de luz (Niño, 2009), por medio de un espectrofotómetro, en el cual la luz atraviesa un tubo conteniendo el cultivo bacteriano (Herrera, 2013). El cambio entre la intensidad de luz que incide en el cultivo (I_0) y la transmitida (I) se registra en el espectrofotómetro como absorbancia (A) o densidad óptica (D.O.), valor derivado del log del cociente entre I_0 y la de la luz transmitida por la suspensión, $A = \log I_0/I$ (Aquiahuatl & Perez, 2004; Gutiérrez *et al.*, 2017).

La medición de la turbidez se presenta en una muestra, debido a que las células presentes en el medio líquido dispersan la luz que atraviesa la solución (Niño, 2009). A medida que la concentración celular aumenta, el cultivo se hace más turbio y se reduce la cantidad de luz transmitida que alcanza la célula fotoeléctrica (dicha intensidad se detecta como corriente en un galvanómetro) (Niño, 2009; Purisaca & Quevedo, 2015), con un espectrofotómetro se puede realizar la medición de la misma, siendo sus unidades fotométricas, el klett y la densidad óptica (DO), respectivamente (Gutiérrez *et al.*, 2017).

Tabla 1: Métodos y técnicas utilizadas para estudiar la biodegradación mediante bacterias del género *Pseudomonas*.

Microorganismo	Método	Técnica	Condiciones de biodegradación	Biodegradación (%)	Referencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pérdida de peso	M. O	25 °C y 35 °C, pH 5 – 7, mg 0.021 – 0.024, 30 días, LDPE	27.30%	(Butron, 2020)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Pérdida de peso	SEM, FT-IR	60°C, 24h por 10 días, 2g de PE y PPS	10%	(Jiaojie <i>et al.</i> , 2020)
<i>Pseudomonas putida</i>	----- -	M.O. MS-MS	25°C – 35°C, pH 6-8, MSM, 7 días, 5 g de PP	51.50%	(Yang <i>et al.</i> , 2020)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Pérdida de peso	SEM	25°C, 27 °C, MSM, 70 días, 6g de LDPE	6.54%	(Gutiérrez, 2019)

FUENTE: Ccallo & Sacaca (2020).

2.3. Marcos conceptuales o glosario

2.3.1. Poliestireno expandido (EPS)

Es un plástico que se obtiene a partir de la transformación del poliestireno expandible el cual es un polímetro en forma de perlas o esferas con tamaños que varían de 0.2 a 3.0 mm. Estas perlas contienen un gas expansor que permite su transformación, el agente expansor es el gas pentano, debido a que posee un bajo punto de ebullición (Ossa, 2009).

2.3.2. Biodegradabilidad

Capacidad de un material de descomponerse en dióxido de carbono, metano, agua y componentes orgánicos o biomasa, en el cual el mecanismo predominante es la acción enzimática de microorganismos. En general, un polímero es biodegradable si su degradación resulta de la acción natural de microorganismos como bacterias, hongos y algas (Ruiz, 2006).

2.3.3. *Pseudomonas*

Son bacterias mesófilas y criófilas debido a que sobreviven temperaturas entre 4 °C y 42 °C, este género puede llegar a utilizar más de 100 componentes distintos como fuente de carbono (Madigan & Martinko, 2006).

2.3.4. Pruebas bioquímicas

Es una prueba de confirmación de cepas bacterianas utilizadas para la motilidad, catalasa, oxidasa, carbono, aminoácidos, nitratos (Pramila, Padmavathy, Vijaya, & Mahalakshmi, 2012), los aislados bacterianos seleccionados se identifican mediante la caracterización bioquímica como la catalasa, oxidasa, indol, rojo de metilo, triple azúcar de hierro, utilización de citrato, ureasa, reducción de nitrato y prueba de fermentación de carbohidratos (Arenas, 2018).

2.3.5. Tinción gram

Es una técnica de coloración que nos ayuda a la identificación de bacterias en la se puede apreciar con más definición la morfología de los microorganismos, tamaño y diversidad (Gutierrez, 2013).

2.3.6. Medio de cultivo

Es una mezcla de determinadas sustancias con o sin gelificación que dentro de él crecen los microorganismos, los cuales son extraordinariamente diversos en sus características fisiológicas y requerimientos nutricionales, en condiciones naturales, los nutrientes requeridos para sintetizar su material celular, generar energía y efectuar su fundamento son tomados del ambiente (Gonzales, 2019).

2.3.7. Absorbancia

Absorbancia o densidad óptica (D.O.), valor derivado del porcentaje de transmisión, correspondiente al log del cociente entre la intensidad de luz incidente sobre la suspensión (I_0) y la de la luz transmitida por la suspensión (I). $A = \log I_0/I$ (Herrera, 2013).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ámbito de estudio:

Se encuentra ubicado en el distrito de Azángaro de la provincia de Azángaro en la región Puno, se caracteriza por presentar un clima húmedo y frío, con una temperatura media anual que oscila entre 4.5 °C y 6 °C; se registran ocurrencias diarias de temperaturas de congelación. El promedio máximo de precipitación total por año es de 750 mm y el mínimo de 500 mm. Se ha estimado que la evapotranspiración potencial por año varía entre la cuarta parte y la mitad del promedio de precipitación pluvial total por año (Municipalidad Provincial de Azángaro, 2018).

Zona de estudio: Se realizó en el botadero cerrado de la municipalidad provincial de Azángaro, se encuentra ubicado a 8 km de la ciudad, ubicado al sur oeste de la ciudad, en la comunidad San Martín (N 8242400 E 389500, N 8243000 E 389500, N 8 242400 E 389500, N 8243000 E 389500) a una altitud de 4000 m.s.n.m. Este botadero empezó a operar a partir del año 2006, presentando un área total de cuatro (4) hectáreas (Municipalidad Provincial de Azángaro, 2018).

3.2. Población y muestra

3.2.1. Población de estudio

En la investigación se manejó como población a las planchas de poliestireno expandido (EPS) de uso comercial.

3.2.2. Tamaño de muestra:

Se trabajó con 1 g de poliestireno expandido comercial para la determinación de la pérdida de peso de mencionado material y para la determinación del crecimiento bacteriano con 0.2 g de poliestireno expandido.

3.2.3. Selección de muestra:

Las muestras se seleccionaron utilizando la metodología no probabilística por conveniencia, debido a que se trabajó con características específicas en las muestras del poliestireno expandido ya que debe ser de uso comercial, a su vez la elección no ha sido por el uso de fórmulas de probabilidad, sino por decisión del investigador.

3.3. Hipótesis de la investigación científica:

3.3.1. Hipótesis general:

En razón de que las *Pseudomonas* sp. catabolizan compuestos aromáticos es probable que las *Pseudomonas* sp. aisladas provenientes del botadero municipal de la ciudad de Azángaro logren la biodegradación del poliestireno expandido.

3.3.2. Hipótesis específicas:

Considerando que las *Pseudomonas* sp. se encuentran presentes en botaderos municipales es probable aislar bacterias *Pseudomonas* sp. del poliestireno expandido procedente del botadero municipal de la ciudad de Azángaro.

Considerando al poliestireno expandido como única fuente de carbono para las *Pseudomonas* sp. aisladas es probable que el poliestireno expandido pierda masa en el transcurso del tiempo en contacto con las *Pseudomonas* sp. aisladas.

Considerando que la pérdida de masa del poliestireno expandido se ve afectado por la presencia de *Pseudomonas* sp. aisladas es probable que el crecimiento bacteriano sea mayor con poliestireno expandido en comparación a sin poliestireno expandido.

3.4. Identificación de variables

a) Variables independientes

Pseudomonas sp. aisladas

Temperatura

b) Variables dependientes

Biodegradación de poliestireno expandido

c) Variables intervinientes

Contenido de humedad en laboratorio

3.5. Técnicas de recolección de datos:

Para la recolección de los datos de las muestras bacterianas del botadero se trabajó mediante la técnica de observación realizando el llenado de fichas de recolección de datos, para el aislamiento de las bacterias *Pseudomonas* sp. se utilizó la metodología de Butron (2020); Gutierrez (2013); Uribe, Giraldo & Gutiérrez (2010). Además, para la identificación de la *Pseudomonas* sp. se utilizó la técnica de tinción de gram observando en microscopio las características de la *Pseudomonas* sp y pruebas bioquímicas. Así mismo para determinar la eficiencia de biodegradación del poliestireno expandido utilizando la metodología de pérdida de pesos del poliestireno expandido mediante la balanza analítica centesimal.

3.6. Obtención de la información

3.6.1. Materiales y equipos

Culer, bolsas simplex, guantes de ensayo, barbijos de tipo 3M, matraz erlenmeyer, envases herméticos de vidrio, probetas de vidrio, vasos precipitados, pipetas, placas petri, planchas de tecnopor (Palmosa-PIT31), porta objetos, cubre objetos, asa bacteriológica, tiras de pH, jeringas graduadas, espátula, luna reloj, termómetro ambiental, cuenta colonias (Kert), incubadora horizontal (Incucell), autoclave, refrigerador, microscopio óptico, balanza analítica diezmilésima (Kern), cuenta colonias (Kert CM-1), espectrofotómetro (Único 4802 UV/VIS), destilador modelo Basic/ph4.

3.6.2. Reactivos

Cloruro de sodio (NaCl, 85%), agar centrímide, glicerina, agar nutritivo, medio de enriquecimiento para *Pseudomonas* sp., cristal violeta, lugol, alcohol 96%, acetona, safranina, peróxido de hidrógeno (3%), agar TSI, agar MacConkey, agar úrea y agar base sangre.

Reactivos McFarland: Ácido sulfúrico (H₂SO₄ al 1 %) 19.9 mL y cloruro de bario (BaCl₂ al 1.175 %) 0.1 mL (Aquiahuatl & Perez, 2004).

Reactivos caldo Palleroni: Fosfato ácido di sódico (Na₂HPO₄) 0.04685 g/mL, fosfato diácido de potasio (KH₂PO₄) 0.04488 g/mL, cloruro de sodio (NaCl) 0.0085 g/mL, cloruro de amonio (NH₄Cl) 0.001 g/mL, sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO₄ 7 H₂O) 0.0005 g/mL, citrato de amonio férrico (C₆H₁₁FeNO) 0.00005 g/mL, cloruro de calcio (CaCl₂) 0.000005 g/mL y agua destilada según (Guzmán, 2002; Pérez, Camacho, Gomez, & Cantero, 2008).

Reactivos medio mínimo de sales para *Pseudomonas* sp.: Sulfato de amonio ((NH₄)SO₄) 100 g/mL, nitrato de sodio (NaNO₃) 100 g/mL, fosfato ácido de potasio (K₂HPO₄) 100 g/mL, cloruro de potasio (KCl) 100 g/mL, sulfato de magnesio (MgSO₄) 20 g/mL y suplementado con 10 g/mL de levadura (Alania & Pérez, 2017; Butron Pinazo, 2020; Jiaojie *et al.*, 2020; UNAM, 2010).

3.7. Metodología:

3.7.1. Aislamiento bacteriano de *Pseudomonas* sp. presentes en el poliestireno expandido procedente del botadero municipal de la ciudad de Azángaro.

- a. **Toma de muestra en campo:** Se realizó en el botadero cerrado en la comunidad San Martín de la ciudad de Azángaro en el mes de agosto del 2019; las muestras se tomaron en tres sectores del botadero municipal cerrado de la ciudad de Azángaro, buscando residuos de poliestireno expandido que presenten condiciones de deterioro y consorcios bacterianos, a profundidades de 3 a 5 cm de altura (Butron, 2020; Narváez, Flórez & Gómez, 2008), seguidamente las muestras se colocaron dentro de bolsas con cierre hermético añadiendo porciones de tierra para mantener la humedad, posteriormente fueron trasladadas a laboratorio (Gutiérrez, 2019; Uribe

et al., 2010) de microbiología de la Universidad Nacional de Juliaca. Como se muestra en la figura 10 y figura 11 de anexos 1.

- b. Preparación de material y medios de cultivo:** Se preparó el ambiente de laboratorio, precedido por la desinfección y esterilización de todo el material a utilizar de acuerdo a las normas microbiológicas, seguidamente se preparó caldo palleroni, esterilizando mediante un autoclave a 121 °C por 15 minutos, en la que se realizó la mezcla de 0.04685 g de fosfato ácido di sódico (Na_2HPO_4), 0.04488 g de fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4), 0.0085 g de cloruro de sodio (NaCl), 0.001 g de cloruro de amonio (NH_4Cl), 0.0005 g de sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) en 90 mL de agua destilada, separando 10 mL de agua destilada para la solución con 0.00005 g de citrato de amonio férrico ($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{FeNO}$) y 0.000005 g cloruro de calcio (CaCl_2), para la esterilización por filtración. (Guzmán, 2002; Pérez *et al.*, 2008).
- c. Aislamiento bacteriano:** Se suspendió 5 g de poliestireno expandido del botadero en una solución salina (NaCl al 0.85%) (Gutierrez, 2013; Mayz & Manzi, 2017; Uribe *et al.*, 2010); como muestra la figura 12 en anexos 1, seguidamente se realizó la siembra en 10 mL de caldo palleroni y se incubó por treinta días a una temperatura de 37 °C, transcurrido el tiempo para el aislamiento de bacterias se procedió a sembrar por estrías en placas con agar cetrímide a partir del caldo palleroni (Gutierrez, 2013; Guzmán, 1987), se realizó la incubación de placas a 30 °C por 48 horas. Transcurridas las 48 horas, se procedió a sembrar las cepas en caldo nutritivo para posteriormente incubarlas nuevamente a 30 °C por 48 horas. Se realizó resiembras en agar nutritivo para obtener las *Pseudomonas* puras (Caviedes, 2010); como se muestra la figura 13, en la sección anexos 1.
- d. Identificación de *Pseudomonas* sp.:** Previo a la identificación bacteriana se prepararon los medios de cultivo, después de 24 y 48 horas se realizaron las observaciones para la identificación bacteriana realizando la prueba de catalasa, producción de piocianina en agar centrímide, reacción en siembra en agar TSI, coloración de colonias en agar MacConkey (Quiliche, Cortez, Rodríguez, Silva, & Huayna, 2016), producción de ureasa en agar urea, hemólisis en siembra de agar base sangre y la observación mediante microscopio óptico de la forma y coloración de la bacteria en tinción gram (Callicó *et al.*, 2004).

3.7.2. Determinación de la pérdida de masa del poliestireno expandido en contacto con las *Pseudomonas* sp. aisladas en laboratorio de la UNAJ:

- a. **Preparación de cepas aisladas:** Después de aislar la bacteria a partir de cultivos positivos crecidos en agar centrímide, se inocularon colonias de *Pseudomonas* sp. (Alania & Pérez, 2017) en medio mínimo de sales a 37 °C por una semana hasta obtener una suspensión bacteriana equivalente a 1.5×10^8 UFC/mL (Aquiahuatl & Perez, 2004), el mismo que fue utilizado para la incorporación de la inoculación.
- b. **Preparación de muestras:** Se realizó el pesaje de 1 g de poliestireno expandido, seguidamente se colocaron dentro de envases herméticos de vidrio, se dispuso en el autoclave por 15 minutos a 121 °C, para la eliminación de cualquier agente biológico en las muestras. A partir de las cepas preparadas aisladas del anterior procedimiento, se inocularon dentro de las porciones de poliestireno expandido presentes en un envase hermético (Alonso *et al.*, 2016; Daviran, 2017; Mauricio & Meza, 2013; Uribe *et al.*, 2010; Velasco Urdiales, 2017).
- c. **Pruebas gravimétricas:** Se realizaron mediante el pesaje inicial en una balanza analítica centesimal de las muestras registrándolas como pesaje día cero; por consiguiente las muestras se distribuyeron a 4 °C, 37 °C y temperatura ambiente, por sesenta (60) días, realizando el pesaje de todas las muestras, en periodos de quince (15) días (Gutierrez, 2013). Además en cada periodo se realizó repiques en agar centrímide de este modo se controló la supervivencia de la bacteria, finalmente se realizó la observación microscópica óptica al día 60 (Alonso *et al.*, 2016; Daviran, 2017; Velasco, 2017).
- d. **Determinación de la pérdida de peso:** Después de 60 días se realizó el pesaje final, de esta manera se aplicó la variabilidad de masas, para obtener la pérdida de peso del poliestireno expandido, en la que se utilizó la ecuación 1:

$$\% \text{porcentaje de pérdida} = \frac{(W_{inicial} - W_{final})}{W_{inicial}} \times 100 \quad (1) \text{ (Kyaw et al., 2012)}$$

e. **Control de la presencia de *Pseudomonas* sp.:** Se realizó repiques en agar centrífide, en tres placas y una muestra control para lograr la observación de la presencia y ausencia de colonias, considerando la valoración de bajo (+), moderado (++), abundante (+++), muy abundante (++++) y ausencia (-) (Butron, 2020).

Modelo de diseño experimental: Se trabajó a tres temperaturas; 4 °C, temperatura ambiente de laboratorio y 37 °C de esta manera se expuso a la *Pseudomonas* sp. ante el poliestireno expandido, cada muestra en cuatro repeticiones con dos muestras control, por lo que se realizó el pesaje en el día cero (P₀), día quince (P₁₅), día treinta (P₃₀) día cuarenta y cinco (P₄₅) y día sesenta (P₆₀). Como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2: Modelo de diseño experimental de la prueba gravimétrica

Tratamiento			Variable dependiente: Pesos de los días 0, 15, 30, 45 y 60				
Temperatura (°C)	Variable Independiente	Repeticiones	P0	P15	P30	P45	P60
4	Con presencia de <i>Pseudomonas</i> sp. aisladas	R ₁	O _{1.1}	O _{1.2}	O _{1.3}	O _{1.4}	O _{1.5}
		R ₂	O _{2.1}	O _{2.2}	O _{2.3}	O _{2.4}	O _{2.5}
		R ₃	O _{3.1}	O _{3.2}	O _{3.3}	O _{3.4}	O _{3.5}
		R ₄	O _{4.1}	O _{4.2}	O _{4.3}	O _{4.4}	O _{4.5}
	Control	T ₁	O _{T1.1}	O _{T1.2}	O _{T1.3}	O _{T1.4}	O _{T1.5}
		T ₂	O _{T2.1}	O _{T2.2}	O _{T2.3}	O _{T2.4}	O _{T2.5}
		R ₁	O _{1.1}	O _{1.2}	O _{1.3}	O _{1.4}	O _{1.5}
		R ₂	O _{2.1}	O _{2.2}	O _{2.3}	O _{2.4}	O _{2.5}
Temperatura ambiente.	Con presencia de <i>Pseudomonas</i> sp. aisladas	R ₃	O _{3.1}	O _{3.2}	O _{3.3}	O _{3.4}	O _{3.5}
		R ₄	O _{4.1}	O _{4.2}	O _{4.3}	O _{4.4}	O _{4.5}
		T ₁	O _{T1.1}	O _{T1.2}	O _{T1.3}	O _{T1.4}	O _{T1.5}
		T ₂	O _{T2.1}	O _{T2.2}	O _{T2.3}	O _{T2.4}	O _{T2.5}
	Control	R ₁	O _{1.1}	O _{1.2}	O _{1.3}	O _{1.4}	O _{1.5}
		R ₂	O _{2.1}	O _{2.2}	O _{2.3}	O _{2.4}	O _{2.5}
		R ₃	O _{3.1}	O _{3.2}	O _{3.3}	O _{3.4}	O _{3.5}
		R ₄	O _{4.1}	O _{4.2}	O _{4.3}	O _{4.4}	O _{4.5}
37	Control	T ₁	O _{T1.1}	O _{T1.2}	O _{T1.3}	O _{T1.4}	O _{T1.5}
		T ₂	O _{T2.1}	O _{T2.2}	O _{T2.3}	O _{T2.4}	O _{T2.5}

Análisis estadístico

El análisis estadístico para la prueba gravimétrica del poliestireno expandido en contacto con las *Pseudomonas* sp. aisladas, se trabajó mediante el programa Excel 2016 y IBM SPSS Statistics, por medio del análisis anova factorial de medidas repetidas, considerando como factores a casos de presencia y ausencia de las bacterias *Pseudomonas* sp. expuestos a tres temperaturas; 4 °C, temperatura ambiente de laboratorio y 37 °C, por periodos de tiempo de día cero, día quince, día treinta, día cuarenta y cinco y día sesenta. De esta manera se trabajó con un modelo $3\alpha \times 2\beta \times 5\delta$.

3.7.3. Determinación del crecimiento de las *Pseudomonas* sp. con el poliestireno expandido

Considerando el comportamiento de las *Pseudomonas* sp. y la pérdida de masa del poliestireno expuestas a tres temperaturas, surge la necesidad de evaluar el crecimiento de la bacteria expuesta al poliestireno al día 60 en un medio favorable para la supervivencia de la bacteria, es por ello, que se procedió a determinar el crecimiento de las *Pseudomonas* sp. con el poliestireno expandido en un medio mínimo de sales.

- a. Preparación de cepas aisladas:** A partir de las cepas aisladas del anterior objetivo se inocularon cepas de *Pseudomonas* sp. en un medio mínimo de sales, en 10 tubos de ensayo previamente esterilizados fueron incubadas a 37 °C por una semana hasta obtener una turbidez 0.5 de la escala McFarland (1.5×10^8 UCF/mL) (Malbrán, 2012), este mismo fue utilizado para la incorporación de 2 mL al medio mínimo de sales.
- b. Preparación del medio mínimo de sales:** Se pesó 100 g de sulfato de amonio ((NH₄) SO₄), 100 g de nitrato de sodio (NaNO₃), 100 g de sulfato ácido de potasio (K₂HPO₄), 100 g cloruro de potasio (KCl), 20 g de sulfato de magnesio (MgSO₄) y 10 g de levadura, luego se realizó la mezcla en 1 L de agua destilada hasta llegar a una mezcla homogénea. Seguidamente se añadió 0.2 g de poliestireno expandido triturado (Uribe *et al.*, 2010), para luego realizar la esterilización de las muestras.

c. Preparación de muestras e inoculación: Se añadió 18 mL de medio mínimo de sales en 36 tubos de ensayo, estos fueron divididos en grupos de 18 cada uno, los cuales en 18 tubos de ensayo se agregó 0.04 gramos de poliestireno expandido, de esta manera se procedió al autoclavado del medio (Alania & Pérez, 2017; UNAM, 2010; Uribe *et al.*, 2010) y al grupo restante no se agregó el polímero, como muestra la figura 18; seguidamente se realizó la inoculación con la cepa preparada.

d. Medición de absorbancias: Se realizó la medición de absorbancias (Ab) a cada medio de cultivo mediante un espectrofotómetro a 640 nm. de longitud de onda (Alania & Pérez, 2017; Aquiahuatl & Perez, 2004; Rivera *et al.*, 2015) en el laboratorio de química de la Universidad Nacional de Juliaca. Considerando que la medición se realizó en base a las muestras que contenían el medio mínimo de sales sin poliestireno - sin *Pseudomonas* sp. para cada temperatura, como muestra la figura 15 de anexos 1. Para la primera lectura de las muestras se calibró a la concentración conocida de 1.5×10^8 UFC/mL.

Modelo de diseño experimental: Se trabajó a temperaturas de 4 °C, temperatura ambiente de laboratorio y 37 °C en contacto con el poliestireno expandido, para cuatro casos de exposición del factor *Pseudomonas* a cada temperatura, los cuales son la mezcla de medio mineral sin poliestireno expandido - sin *Pseudomonas* sp., medio mineral sin poliestireno expandido - con *Pseudomonas* sp.; medio mineral con poliestireno expandido - sin *Pseudomonas* sp.; medio mineral con poliestireno expandido - con *Pseudomonas* sp. en tres repeticiones para cada caso, como se muestra en la Tabla 3, realizando cada medición al día 0, día 15, día 30, día 45 y día 60.

Tabla 3: Diseño experimental del crecimiento de masa de *Pseudomonas* sp.

Tratamiento			Variable dependiente: Crecimiento de la masa bacteriana				
Temperatura (°C)	Variable Independiente	Repeticiones	D0	D15	D30	D45	D60
4	sin <i>Pseudomonas</i> sin poliestireno expandido.	R ₁	O _{1.1}	O _{1.2}	O _{1.3}	O _{1.4}	O _{1.5}
		R ₂	O _{2.1}	O _{2.2}	O _{2.3}	O _{2.4}	O _{2.5}
		R ₃	O _{3.1}	O _{3.2}	O _{3.3}	O _{3.4}	O _{3.5}
	<i>Pseudomonas</i>	R ₁	O _{1.1}	O _{1.2}	O _{1.3}	O _{1.4}	O _{1.5}
		R ₂	O _{2.1}	O _{2.2}	O _{2.3}	O _{2.4}	O _{2.5}
		R ₃	O _{3.1}	O _{3.2}	O _{3.3}	O _{3.4}	O _{3.5}

<<continuación>>

	con poliestireno expandido.	R ₃	O _{3.1}	O _{3.2}	O _{3.3}	O _{3.4}	O _{3.5}
	con <i>Pseudomonas</i> sin poliestireno expandido	R ₁ R ₂ R ₃	O _{1.1} O _{2.1} O _{3.1}	O _{1.2} O _{2.2} O _{3.2}	O _{1.3} O _{2.3} O _{3.3}	O _{1.4} O _{2.4} O _{3.4}	O _{1.5} O _{2.5} O _{3.5}
	con <i>Pseudomonas</i> con poliestireno expandido	R ₁ R ₂ R ₃	O _{1.1} O _{2.1} O _{3.1}	O _{1.2} O _{2.2} O _{3.2}	O _{1.3} O _{2.3} O _{3.3}	O _{1.4} O _{2.4} O _{3.4}	O _{1.5} O _{2.5} O _{3.5}
T° ambiente.	sin <i>Pseudomonas</i> sin poliestireno expandido.	R ₁ R ₂ R ₃	O _{1.1} O _{2.1} O _{3.1}	O _{1.2} O _{2.2} O _{3.2}	O _{1.3} O _{2.3} O _{3.3}	O _{1.4} O _{2.4} O _{3.4}	O _{1.5} O _{2.5} O _{3.5}
	sin <i>Pseudomonas</i> con poliestireno expandido.	R ₁ R ₂ R ₃	O _{1.1} O _{2.1} O _{3.1}	O _{1.2} O _{2.2} O _{3.2}	O _{1.3} O _{2.3} O _{3.3}	O _{1.4} O _{2.4} O _{3.4}	O _{1.5} O _{2.5} O _{3.5}
	con <i>Pseudomonas</i> sin poliestireno expandido	R ₁ R ₂ R ₃	O _{1.1} O _{2.1} O _{3.1}	O _{1.2} O _{2.2} O _{3.2}	O _{1.3} O _{2.3} O _{3.3}	O _{1.4} O _{2.4} O _{3.4}	O _{1.5} O _{2.5} O _{3.5}
	con <i>Pseudomonas</i> con poliestireno expandido	R ₁ R ₂ R ₃	O _{1.1} O _{2.1} O _{3.1}	O _{1.2} O _{2.2} O _{3.2}	O _{1.3} O _{2.3} O _{3.3}	O _{1.4} O _{2.4} O _{3.4}	O _{1.5} O _{2.5} O _{3.5}
37	sin <i>Pseudomonas</i> sin poliestireno expandido.	R ₁ R ₂ R ₃	O _{1.1} O _{2.1} O _{3.1}	O _{1.2} O _{2.2} O _{3.2}	O _{1.3} O _{2.3} O _{3.3}	O _{1.4} O _{2.4} O _{3.4}	O _{1.5} O _{2.5} O _{3.5}
	sin <i>Pseudomonas</i> con poliestireno expandido.	R ₁ R ₂ R ₃	O _{1.1} O _{2.1} O _{3.1}	O _{1.2} O _{2.2} O _{3.2}	O _{1.3} O _{2.3} O _{3.3}	O _{1.4} O _{2.4} O _{3.4}	O _{1.5} O _{2.5} O _{3.5}
	con <i>Pseudomonas</i> sin poliestireno expandido	R ₁ R ₂ R ₃	O _{1.1} O _{2.1} O _{3.1}	O _{1.2} O _{2.2} O _{3.2}	O _{1.3} O _{2.3} O _{3.3}	O _{1.4} O _{2.4} O _{3.4}	O _{1.5} O _{2.5} O _{3.5}
	con <i>Pseudomonas</i> con poliestireno expandido	R ₁ R ₂ R ₃	O _{1.1} O _{2.1} O _{3.1}	O _{1.2} O _{2.2} O _{3.2}	O _{1.3} O _{2.3} O _{3.3}	O _{1.4} O _{2.4} O _{3.4}	O _{1.5} O _{2.5} O _{3.5}

Análisis estadístico: Para el análisis estadístico de los datos se trabajó con un diseño factorial mixto debido a la participación de los factores entre sujetos y factores inter sujetos, siendo los factores temperatura, factor casos de *Pseudomonas* y factor tiempo en días. Se realizó el análisis a la varianza de medidas repetidas con más de un factor mediante el programa estadístico SPSS statistics.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Aislamiento e identificación de *Pseudomonas* sp. del botadero de residuos sólidos de la ciudad de Azángaro.

Se registró y se observó las características de las colonias en agar base sangre, agar centrímide, agar MacConkey, agar TSI y agar urea, a 24 y 48 horas juntamente con las muestras control, como muestra la Tabla 4. Así mismo se realizó la identificación de las *Pseudomonas* sp., por medio de cepas positivas en las diferentes pruebas como muestra la figura 2. En la observación microscópica óptica a 40 X dada la tinción gram, se identificó bacterias gram negativas en forma de bacilos y coloración rosada, característico de las *Pseudomonas*, como muestra la figura 24 en la sección anexos 1.

Tabla 4: Resultado de pruebas bioquímicas

Pruebas bioquímicas	Con <i>Pseudomonas</i> sp.		Sin <i>Pseudomonas</i> sp.	Observación
	R-1	R-2	R-1	
Agar base sangre	+	+	-	Presencia de beta hemólisis (Figura 2 a)
Agar centrímide	+	+	-	Color verde azulino en contraste con luz ultravioleta y luz azul (Figura 2 b)
Agar MacConkey	Colonias color blanco	Colonias color blanco	Sin Cambio	Crecimiento de colonias coloración blanquecina (Figura 2 c)
Prueba de catalasa	+	+	-	Presencia de efervescencia (Figura 2 d)
Agar TSI	K/K	K/K	Sin cambio	Superficie y profundidad coloración rojiza, presenta reacción alcalina (no fermentador de azúcares) (Figura 2 e)
Agar urea	+	+	-	Producción de ureasa (rojo fenol) (Figura 2 f)
Tinción gram	Bacilo corto gram negativo	Bacilo corto gram negativo	-	Coloración rosada de las bacterias (Figura 24)
Tinción simple	Bacilo	Bacilo	-	Muestra forma de bacilo en la observación (Figura 24)

En el aislamiento de *Pseudomonas* sp. presentes en el poliestireno expandido procedente del botadero municipal de la ciudad de Azángaro, se pudo encontrar que la observación de las características como; beta hemolisis positivo en agar base sangre, coloración de rojo fenol indicando la producción de ureasa en agar urea, crecimiento de colonias blanquecinas en agar MacConkey, ausencia de producción de azúcares en agar TSI y la presencia de efervescencia ante el peróxido de hidrógeno, estos resultados concuerdan con los reportes de identificación de *Pseudomonas* sp. por Alania & Pérez (2017); Butron (2020); Ruiz (2007); Callicó *et al.* (2004); Quiliche *et al.* (2016); por otro lado Ruiz (2007) reportó que el halo verdoso alrededor de las colonias y la pigmentación en agar sangre es característico de un color gris pálido (Figura 2 a). Además según Alania & Pérez (2017) mencionan que las *Pseudomonas* sp. presentaron un olor a manzana en agar centrímide, lo que en el estudio se evidenció de manera leve; así mismo Quiliche *et al.*

(2016) reportó que las *Pseudomonas aeruginosa* presenta producción de piocianina en agar centrimide y crecimiento en agar urea, sin embargo Villegas, Prado, Ortega, & Zhurbenko (2012) reportaron la presencia de fluorescencia en agar centrimide de las *Pseudomonas aeruginosas* y *Pseudomonas fluorescens*, por lo que se muestra que con las pruebas bioquímicas utilizadas se logra identificar a las *Pseudomonas* sp., los cuales se pueden observar en la figura 2. Además considerando la forma de bacilos y coloración rosada indican que son gram negativas resultados que concuerdan con lo que reportaron Ccallo & Sacaca (2020); Jiaojie *et al.* (2020); Alania & Pérez (2017); Quiliche *et al.* (2016); Uribe *et al.* (2010).

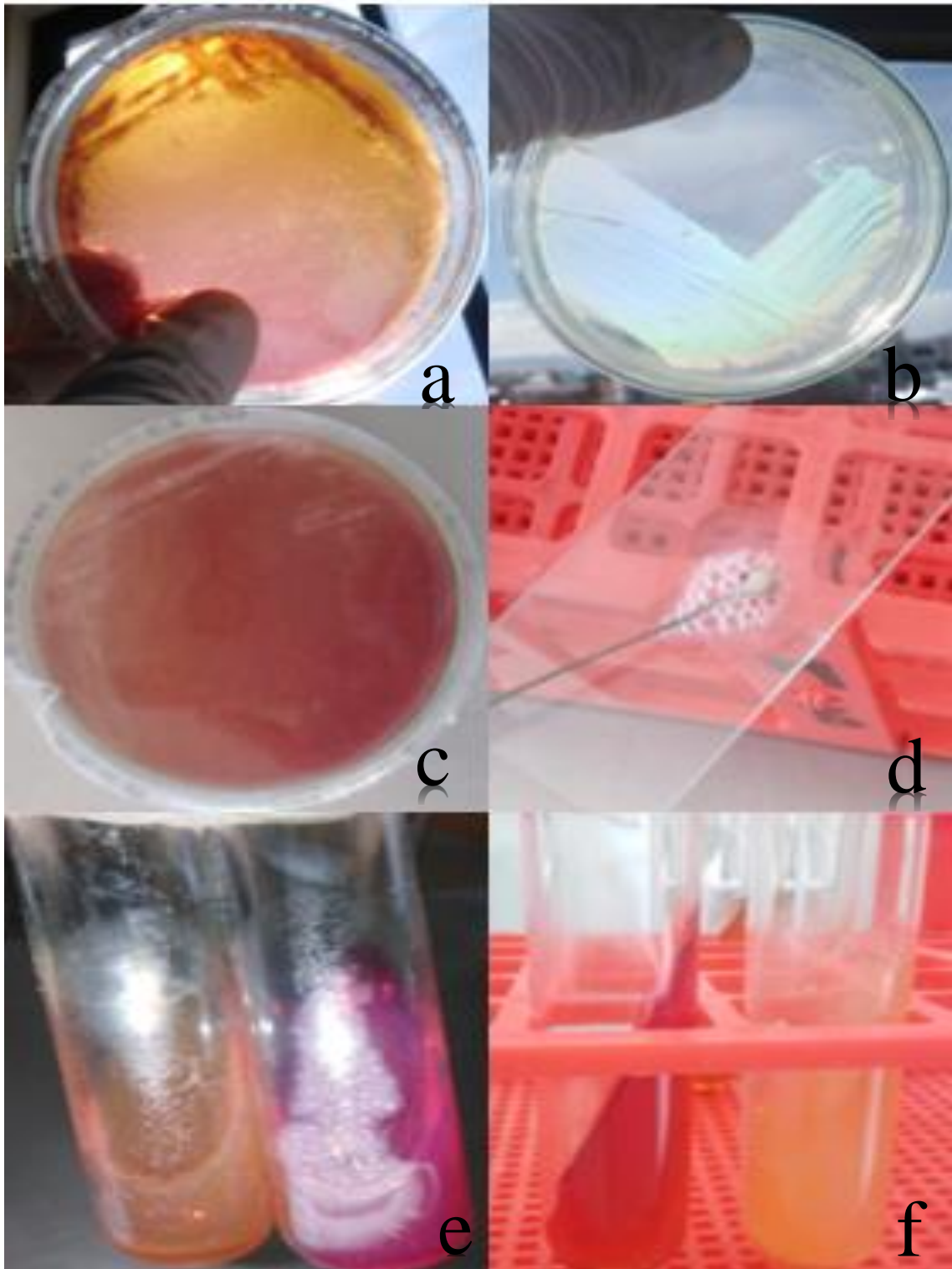


Figura 2. Observaciones de las pruebas bioquímicas; en (a), se muestra el desarrollo de beta hemólisis en agar sangre; en (b), muestra la producción de fluorescencia y piocianina expuesto a luz ultra violeta; en (c), formación de colonias blancas en agar Makconkey; en (d), presencia de efervescencia en la producción de catalasa, en (e), prueba en agar TSI, se muestra coloración rojiza, presenta reacción alcalina (no fermentador de azúcares) K/K en (f), nos muestra la comparación en agar urea de presencia y ausencia de coloración de rojiza.

4.2. Pérdida de masa del poliestireno expandido

La variabilidad de masas durante sesenta (60) días de exposición del poliestireno expandido ante las *Pseudomonas* sp. aisladas, se observó los pesos en periodos de 15 días como muestran las Tablas 8, 9, 10 y 11 en la sección anexos 2, de esta manera se presenta la pérdida de masa de cada muestra a diferentes temperaturas; 4 °C (figura 3), temperatura ambiente (figura 4) y 37 °C (figura 5). Así mismo en la figura 6, se aprecia la comparación de medias de la pérdida de masas para identificar el mayor porcentaje a las diferentes temperaturas, de esta manera considerando los resultados de las Tablas 12, 13 y 14 de los análisis estadísticos en la sección anexos 2, en la que se identificó que hasta el día 15 los resultados son estadísticamente significativos para las tres temperaturas, de esta manera se genera las Tablas 16, 17 y 18 (ver anexos), y se presenta en la ecuación (2) el resultado del modelo estadístico de la pérdida de masa del polímero hasta el día 15.

a. Pérdida de masa a la temperatura a 4 °C: Se procesaron los datos mediante la diferencia de pesos, obteniendo como media de la pérdida de masa de 0.00975 g equivalente a 0.9756 % en 15 días (Tabla 12), considerando a estos datos la variación de las muestras control, como se observa en la figura 3, además se realizó repiques en agar centrífide para observar las cepas en cada periodo, de esta manera tener un mejor manejo de la presencia de *Pseudomonas* sp, como se muestra en la Tabla 5, a su vez se realizó la tinción respectiva para la observación mediante microscopio óptico a 40 X como muestra la figura 24 y 25 de la sección anexos 1.

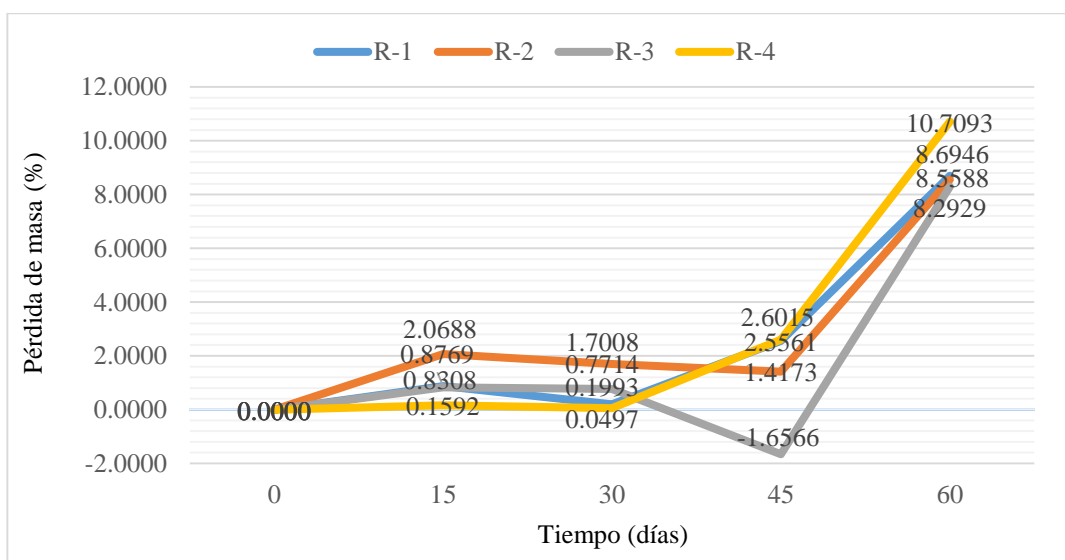


Figura 3. Pérdida de masa de poliestireno expandido a 4°C.

La Tabla 5 muestra la presencia de *Pseudomonas* sp. en agar centrífido a cada periodo de medición de masa a la temperatura de 4 °C, considerando que +, ++, +++, +++++ representa bajo, moderado, abundante y muy abundante respectivamente.

Tabla 5: Observaciones de la presencia de *Pseudomonas* sp. aisladas a los 15, 30, 45 y 60 días a la temperatura de 4 °C.

Placas a 4 °C	Tiempo (lectura a 48 horas)			
	Día 15	Día 30	Día 45	Día 60
R-1	++++	+++	++	++
R-2	++++	++	+	+
R-3	++++	++	+	+
R-4	++++	+++	+	+

La pérdida de masa del poliestireno expandido en contacto con las *Pseudomonas* sp. aisladas es estadísticamente significativa a 4 °C entre el día 0 y el día 15, $p(0.002) < 0.05$ con diferencia de medias (I-J) = 0.011, según la prueba post hoc bonferroni, resultado que guarda relación con los reportes de Alania & Pérez (2017) frente a los efectos de presencia de *Pseudomonas* sp. a la temperatura de 4 °C por 60 días con $p < 0.05$ en la prueba t-student, a diferencia que trabajaron con el polipropileno en medio mínimo de sales y con cepas de laboratorio en un periodo de 60 días, sin embargo en la investigación se logró observar que el poliestireno presentaba pérdidas estadísticamente significativas hasta el día 15, mientras que presenta supervivencia hasta el día 60 como muestra la figura 24 a comparación con la figura 25 de la sección anexos 1, dado que las *Pseudomonas* sp. aisladas del botadero fueron expuestas únicamente al poliestireno expandido como fuente de carbono (Gutiérrez, 2019) de esta manera concordando con Ruiz (2007) quien menciona que las *Pseudomonas* pueden vivir con simples requerimientos nutritivos del rango de compuestos del carbono por adaptabilidad metabólica y genética; estas bacterias responden a cambios ambientales modificando su composición de ácidos grasos de la membrana celular que le permite mantener la homeoviscosidad ante situaciones de estrés y su posterior adaptabilidad (Gómez *et al.* 2008); es decir que las *Pseudomonas* sp. aisladas sobrevivieron a una única fuente de carbono a 4 °C, debido a su composición genética y metabólica (Jiaojie *et al.* 2020). Además un factor que probablemente favoreció a la supervivencia de la bacteria a esta temperatura es la humedad, debido

a que las *Pseudomonas* sp. son bacterias que requieren condiciones mínimas de humedad para su crecimiento porque actúa como medio de transporte de nutrientes y oxígeno a la célula ya que forma parte de su protoplasma bacteriano (Gómez *et al.*, 2008); las bacterias se encontraron por 60 días en el refrigerador y según Jara, Reinoso, Isaza, & Aguinaga (2016) la humedad relativa en el refrigerador de laboratorio se encuentra entre 50 % y 75 %, es importante mencionar que este factor se manejó mediante las muestras control, de manera que se restó la pérdida de masas de las muestras sin *Pseudomonas* sp. a las muestras con *Pseudomonas* sp.

b. Pérdida de masa a temperatura ambiente de laboratorio: Las muestras a esta temperatura presentaron un comportamiento diferente debido a que se identificó que la supervivencia de las *Pseudomonas* sp. aisladas fue hasta el día 30 como muestra la Tabla 6, la pérdida de masa fue de 0.02594 g equivalente a 2.5944% al día 15 y como mayor porcentaje de pérdida de masa 0.07153 g equivalente a 7.1533% al día 30, valores obtenidos de la media al 5% de las repeticiones que muestra la figura 4 en el tiempo; así mismo se consideró a estos datos la variación de las muestras control, además se observó que la pérdida de masa a esta temperatura fue mayor a comparación de los 4 °C y 37 °C, cabe mencionar que la temperatura ambiente osciló entre 22 °C y 28 °C, obteniendo una temperatura promedio de 25 °C; además se realizó repiques en agar centrífide para observar la presencia de las cepas en cada periodo, de esta manera se controló la supervivencia de las *Pseudomonas* sp, como se muestra en la Tabla 6.

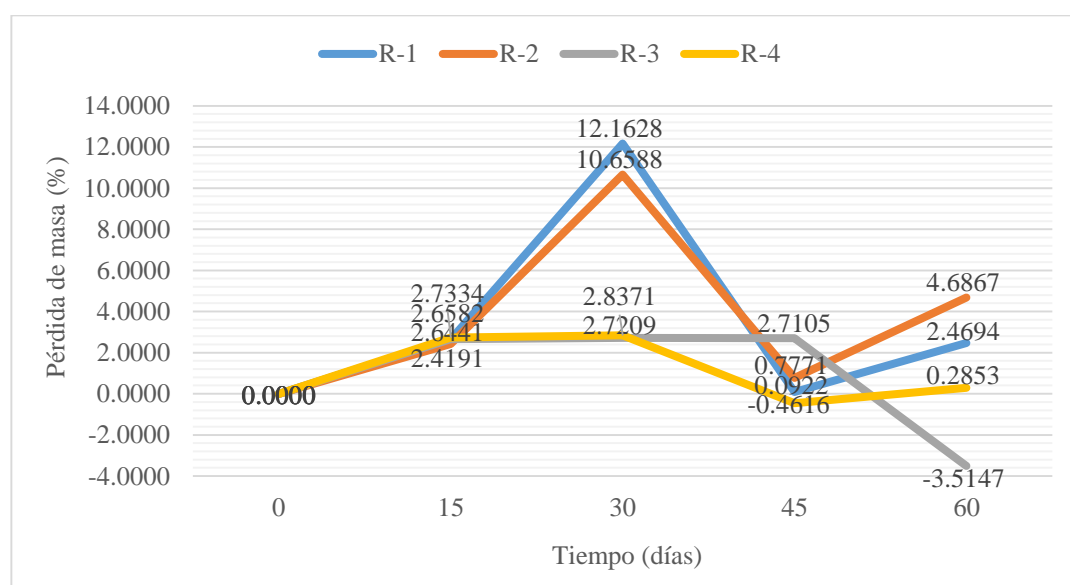


Figura 4. Pérdida de masa de poliestireno expandido a temperatura ambiente de laboratorio.

La Tabla 6, muestra que la presencia de *Pseudomonas* sp. a temperatura ambiente fue hasta el día 30, en cambio para los días 45 y 60 no se evidenció presencia de *Pseudomonas* sp., así mismo en el día 15 se observó abundancia de colonias, sin embargo al día 30 se observó baja presencia de *Pseudomonas* sp., además en la figura 4 se observa que la pérdida de masa sólo se evidenció hasta el día 30; considerando que (+) representa baja presencia de *Pseudomonas* sp., (+++) abundante presencia de *Pseudomonas* sp. y (-) ausencia de la bacteria a 48 horas.

Tabla 6: Observaciones de la presencia de *Pseudomonas* sp. aisladas a los 15, 30, 45 y 60 días a temperatura ambiente de laboratorio.

Placas a T° amb.	Tiempo (lectura a 48 horas)			
	Día 15	Día 30	Día 45	Día 60
R-1	+++	+	-	-
R-2	+++	+	-	-
R-3	+++	+	-	-
R-4	+++	+	-	-

La pérdida de masa del poliestireno expandido entre el día 0 y día 15 como muestra la figura 4, considerando los factores; presencia de *Pseudomonas* sp., tiempo y temperatura ambiente, resultó ser estadísticamente significativa con $p(0.002) < 0.05$, así como la pérdida de masa entre el día 0 y día 30, con $p(0.002) < 0.05$, sin embargo la variabilidad de masas al día 45, resultó no ser estadísticamente significativa con $p(1.00) > 0.05$ según la prueba post hoc bonferroni como muestra la Tabla 17 (anexos), lo que corrobora la presencia de *Pseudomonas* sp. hasta el día 30 como muestra la Tabla 6. Estos valores son mayores en comparación a lo reportado por Chunga y Cieza (2017), con 1.6 % pérdida de masa del poliestireno al día 30 a 25 °C, por otro lado Alonso *et al.*, (2016) obtuvo una pérdida de peso del poliestireno expandido de 0.02% por mes a temperatura ambiente de laboratorio (promedio 25 °C), esta diferencia probablemente se deba a que las *Pseudomonas* sp. utilizadas en estos estudios fueron de humus; más no bacterias desarrolladas en plásticos (Umamaheswari, 2017); además la amplia versatilidad metabólica de la bacteria, la variabilidad de sustratos como fuente de carbono y la concentración bacteriana; son factores influyentes en la capacidad degradativa de la bacteria (Madigan & Martinko, 2006). Así mismo Butron (2020) trabajó con *Pseudomonas* aisladas del botadero

Cancharani de la ciudad de Puno, en la que logró 21.7% de pérdida en 30 días a 25 °C, siendo mayor la pérdida de masa ante el polietileno de baja densidad, lo que concuerda con los resultados de Hyun *et al.* (2020) donde a 25 °C de incubación obtuvo una pérdida de peso del 0.098% por día, para el caso del poliestireno y 0.64 % para el polietileno, de esta manera muestra que las *Pseudomonas* presentan capacidades de biodegradación diferentes para los polímeros, es por ello que las *Pseudomonas* presentan capacidad degradativa ante diferentes compuesto de carbono.

c. Pérdida de masa a temperatura de 37 °C: Las muestras a la temperatura de 37 °C presentaron un comportamiento diferente debido a que se identificó que la presencia de las *Pseudomonas* sp. solo fue hasta el día 15 como muestra la Tabla 7, obteniendo como pérdida de masa promedio de 0.01612 g equivalente a 1.61%, considerando a estos datos la variación de las muestras control al día 15 como se observa en la figura 5, así mismo se observó que la masa del poliestireno expandido después del día 15 fue muy variable.

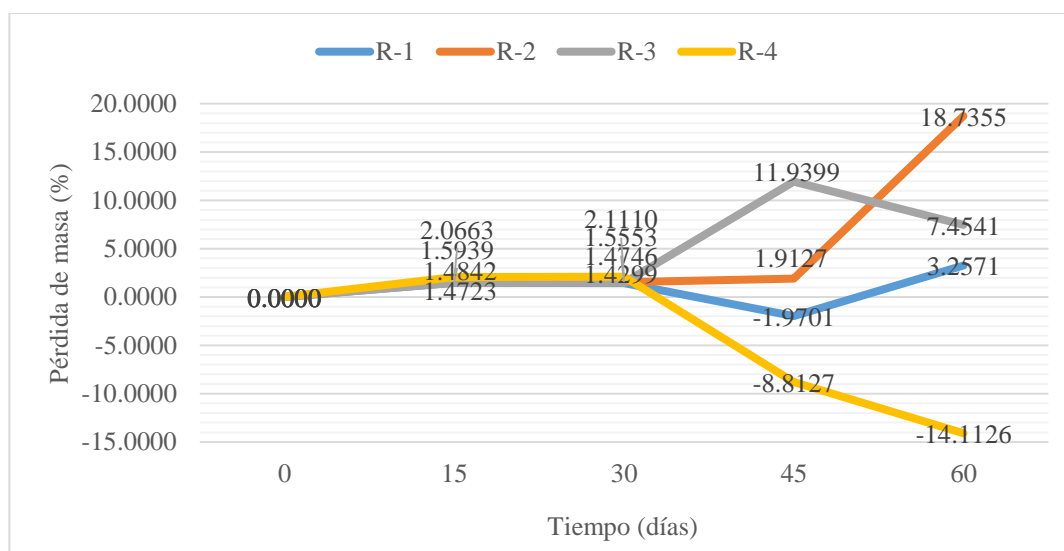


Figura 5. Pérdida de masa de poliestireno expandido a 37 °C.

En el control de la supervivencia de las *Pseudomonas* sp. expuestas al poliestireno expandido, la Tabla 7 muestra los resultados de las cepas positivas después de 48 horas del repique en agar centrímide, de esta manera se identifica la presencia de *Pseudomonas* sp. a 37 °C para el día 15 de medición de masa del polímero y ausencia en los siguientes periodos de medición, considerando que la presencia de las bacterias

se encuentra representado por; baja cantidad de colonias (+) y ausencia de colonias (-).

Tabla 7: Observaciones de la presencia de *Pseudomonas* sp. aisladas a los 15, 30, 45 y 60 días a la temperatura de 37 °C.

Placas a 37 °C	Tiempo (lectura a 48 horas)			
	Día 15	Día 30	Día 45	Día 60
R-1	+	-	-	-
R-2	+	-	-	-
R-3	+	-	-	-
R-4	+	-	-	-

La pérdida de masa del poliestireno expandido en contacto con las *Pseudomonas* sp. aisladas es estadísticamente significativa a temperatura de 37 °C entre el día 15 y día 0, $p(0.000) < 0.05$ con diferencia de medias (I-J) = 0.015, sin embargo, la variabilidad de masas entre el día 30 y día 0, no es estadísticamente significativa con un p valor $(1.00) > 0.05$, según la prueba post hoc bonferroni (ver Tabla 18 de anexos), lo que corrobora la presencia de *Pseudomonas* sp. hasta el día 15 como muestra la Tabla 7. Por otro lado Butron (2020) reportó que la mayor variación de peso frente a los efectos de presencia de *Pseudomonas* sp. es a la temperatura de 35 °C con 27.3 % de pérdida de masa al día 30 ante el polietileno de baja densidad, además realizó un proceso de adaptabilidad de la bacteria al carbono en un medio mínimo de sales minerales mas medio nutritivo, logrando mayor pérdida de masa, aunque según sus análisis sobre los efectos de la temperatura ante la variación del peso no resulta ser estadísticamente significativo con $(p > 0.2731)$, sin embargo en el presente estudio se logró obtener al día 15 un 1.61 % de pérdida de masa frente al poliestireno expandido, considerando que el polietileno es un plástico de menor complejidad que el poliestireno expandido (Hyun *et al.*, 2020), así mismo Alania & Pérez (2017), indicaron que a la temperatura de 37 °C las *Pseudomonas* sp. presentan mayor crecimiento expuesto al polipropileno en un medio mínimo de sales.

Finalmente para determinar la eficiencia de biodegradación se utilizó la ecuación 1, en donde se basa en la pérdida de masa respecto a la masa inicial por cien (100), la figura 6 presenta una comparación de pérdida de peso del poliestireno con *Pseudomonas* al día quince (15), día treinta (30), día cuarenta y cinco (45) y día sesenta (60), realizando una comparación de las pérdidas de masa a las temperaturas de 4 °C, temperatura ambiente (25°C) y 37 °C.

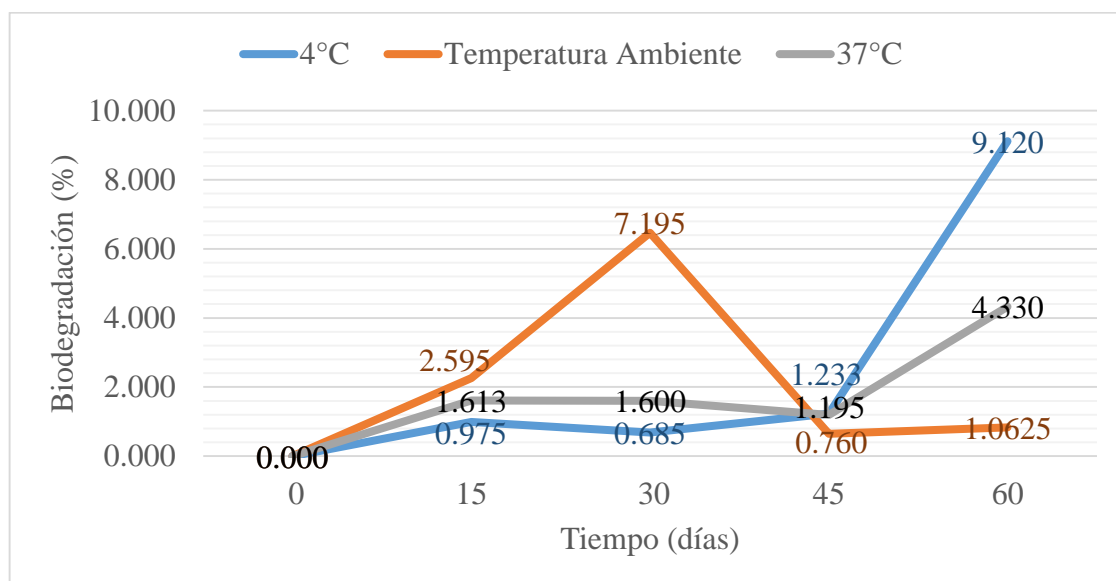


Figura 6 Eficiencia de biodegradación del poliestireno expandido a 4 °C, temperatura ambiente y 37 °C por el periodo de 60 días.

La determinación de la eficiencia de biodegradación del poliestireno expandido mediante *Pseudomonas* sp. aisladas del botadero municipal de la ciudad de Azángaro, resultó con el valor de $p(0.65) > 0.05$ a través de la prueba anova mixto, lo que nos da a entender que hasta el día 60 no es estadísticamente significativa, sin embargo se identificó que la pérdida de masa es estadísticamente significativa sólo hasta el día 15 considerando todos los factores con un $p(0.026) < 0.05$, así mismo a la temperatura de 25 °C presentó la mayor diferencia de medias entre los valores del día 15 (j) y día 0 (i) con $(i-j) = 0.027$ y $p(0.00) < 0.005$. Esto quiere decir que hasta el día 15 a temperaturas de 4 °C, 25 °C y 37 °C las *Pseudomonas* sp. aisladas expuestas al poliestireno expandido como única fuente de carbono influyen a nivel significativo en la pérdida de masa del polímero, en efecto las *Pseudomonas* sp. aisladas a diferentes temperaturas hasta el día 15, biodegradaron al poliestireno expandido y que la mayor pérdida de masa resultó ser

a los 25 °C. Frente a lo mencionado se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna que las *Pseudomonas* sp. aisladas provenientes del botadero municipal de la ciudad de Azángaro logra la biodegradación del poliestireno expandido. Estos resultados son corroborados por Hong *et al.* (2020), Hyun *et al.* (2020) y Alonso *et al.* (2016) quienes trabajaron con $p < 0.005$ a temperatura de 25 °C y reportaron porcentajes similares al de la investigación. En cambio Butron (2020), Alania & Pérez (2017) y Gutiérrez (2019) reportaron que a la temperatura de 37 °C es mayor la biodegradación mediante *Pseudomonas aeruginosa*, al determinar la eficiencia y mejores condiciones ambientales para la bacteria ante los plásticos, es importante mencionar que estos estudios se realizaron exponiendo a las *Pseudomonas* ante el polietileno de baja densidad y polipropileno respectivamente, por lo que las capacidades de biodegradación son diferentes para cada tipo de polímero (Hyun *et al.*, 2020), bajo lo referido anteriormente y al analizar los resultados confirmamos que las *Pseudomonas* aisladas del botadero municipal de la ciudad de Azángaro, presentan eficiencia de biodegradación ante el poliestireno expandido.

Considerando que la variabilidad de masas al día 60 resulta con $p > 0.05$ y que la variabilidad es estadísticamente significativa hasta el día 15 con $p (0.026) < 0.05$, las Tablas 20 y 21 de anexos 2, muestran los valores de la suma de cuadrados de los factores inter-sujetos (temperatura y *Pseudomonas*) e intra-sujetos (pérdida de masas al día 15), de esta manera se presenta la regresión lineal múltiple del diseño experimental de la pérdida de masas en la ecuación 2.

$$Y_{ijk} = 30.2 + 0.001 (T^{\circ}) + 0.006 (Pseudomonas) + 0.001 (Tiempo) + 9.020E-5 (Tiempo*T^{\circ}) + 0.001 (Tiempo*Pseudomonas) + 0.002 (Pseudomonas*T^{\circ}) + 8.731E-5 (T^{\circ} * Pseudomonas * Tiempo) + 0.067 \quad (2)$$

Donde:

i: 1, 2, 3

j: 1, 2

k: 1, 2

$Y_{i,j,k}$: Pérdida de masa correspondiente al nivel (i) del factor temperatura, al nivel (j) del factor casos *Pseudomonas* y al nivel (k) del factor tiempo.

T°_i : Efecto producido debido a la temperatura (4°C, temperatura ambiente y 37°C).

$Pseudomonas_j$: Efecto producido debido a los casos con presencia de *Pseudomonas* y ausencia de *Pseudomonas*.

$Tiempo_k$: Efecto producido debido al tiempo (0 y 15 días).

$(T^{\circ} * Pseudomonas)_{ij}$: Efecto producido debido a la interacción entre la temperatura y casos de *Pseudomonas*

$(Pseudomonas * Tiempo)_{jk}$: Efecto producido debido a la interacción entre casos de *Pseudomonas* y el factor tiempo.

$(T^{\circ} * Tiempo)_{ik}$: Efecto producido debido a la interacción entre el factor temperatura y el factor tiempo.

$(T^{\circ} * Pseudomonas * Tiempo)_{ijk}$: Efecto producido debido a la interacción entre la temperatura, casos de *Pseudomonas* y tiempo.

e_{ijk} : Error producido debido a la interacción entre la temperatura, casos de *Pseudomonas* y el tiempo.

De la ecuación (2), 30.2 es la constante que representa la intersección de los factores intra-sujetos, así mismo 0.001 es el valor de la variabilidad generada por los niveles del factor temperatura; 0.006 es el valor de la variabilidad generada por los casos del factor *Pseudomonas*, 0.001 es el valor de la variabilidad generada por los niveles del factor tiempo, 0.00009020 (9.020e-5) es el valor de la variabilidad generada por los niveles de los factores tiempo interactuando con la temperatura, 0.001 es el valor de la variabilidad de la interacción de los factores tiempo y casos de *Pseudomonas*, 0.002 representa la variabilidad generada por la interacción entre el factor *Pseudomonas* y el factor temperatura, 0.00008731 (8.731e-5) representa el valor de la variabilidad respecto a la media generada debido a la interacción entre todos los factores y 0.067 representa la variabilidad que no es debida a los factores, es decir la suma de cuadrados de los errores producidos de la interacción de los factores.

4.3. Crecimiento de las *Pseudomonas* sp. aisladas expuestas a poliestireno expandido.

Debido a que en la prueba gravimétrica el comportamiento de las *Pseudomonas* sp. aisladas fue variable a los diferentes periodos y temperaturas, se determinó el crecimiento de la bacteria expuesta al poliestireno hasta el día 60 en periodos de 15 días en un medio favorable para la supervivencia de las *Pseudomonas* sp., con y sin poliestireno expandido, de esta manera la lectura en el espectrofotómetro se realizó a través de la medición de absorbancias del medio mínimo de sales sin poliestireno expandido - sin *Pseudomonas*; medio mineral sin poliestireno expandido - con *Pseudomonas*; medio mineral con poliestireno expandido - sin *Pseudomonas* sp. y medio mineral con poliestireno expandido - con *Pseudomonas* sp. por triplicado y en el orden respectivo a temperaturas de, 4 °C como muestra la figura 7, temperatura ambiente muestra la figura 8 y 37 °C como muestra la figura 9.

a. Crecimiento bacteriano a 4 °C

Debido a que la incubadora no presentó regulación a esta temperatura se trabajó en un refrigerador, moderando su temperatura a 4 °C, de esta manera se logró mantener a esta temperatura durante los sesenta días y realizar la lectura de absorbancias en el día cero (0), día quince (15), día treinta (30), día cuarenta y cinco (45) y día sesenta (60), en consecuencia resultó que las muestras con *Pseudomonas* sp. en presencia de poliestireno expandido, presentan mayor crecimiento de masa bacteriana como muestra la figura 7. La medición se realizó por triplicado, tomando como blanco a las muestras sin poliestireno expandido - sin *Pseudomonas* sp., lo que de manera detallada se presenta en la Tabla 22 de anexos 3.

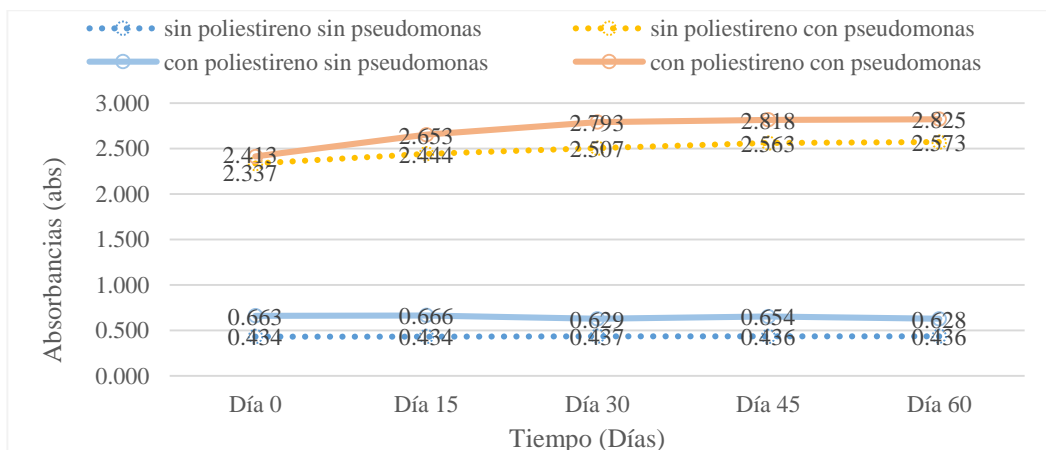


Figura 7. Absorbancias promedio a 4 °C.

El crecimiento de las *Pseudomonas* sp. aisladas expuestas al poliestireno expandido a 4 °C al día 60 es estadísticamente significativa, con $p(0.00) < 0.05$ y diferencia de medias de 0.412 entre la absorbancia del día 60 y absorbancia del día 0, para el medio mineral con *Pseudomonas* sp. - con poliestireno expandido, siendo mayor a comparación del medio mineral con *Pseudomonas* sp. - sin poliestireno expandido ya que resultó con una diferencia de medias de 0.249 y $p(0.00) < 0.05$ por medio de la comparación de pares de la prueba post hoc bonferroni (Tabla 31). Estos resultados guardan relación a lo reportado por Alania y Pérez (2017), con un crecimiento de 1.5 abs en presencia de polipropileno y 1.2 abs en ausencia del polímero con $p(0.00) < 0.05$ a 4 °C por 60 días, sin embargo las autoras trabajaron con cepas comerciales más no bacterias aisladas de un botadero de residuos sólidos, lo que difiere a lo que reporta Umamaheswari (2017) que los aislados bacterianos de residuos del polímero degradan mejor al poliestireno, así mismo la diferencia en la composición química del poliestireno expandido y el polipropileno también genera la variabilidad en la tasa de crecimiento (Hyun *et al.*, 2020). Por otro lado Ren *et al.* (2008) menciona que las *Pseudomonas* crecen en un rango de 10 °C y 42 °C, en este estudio se evidenció un crecimiento a una temperatura menor a 10 °C, lo que es corroborado por Whitman (2011) y Palleroni (1992) que algunas especies de *Pseudomonas* crecen a 4 °C.

b. Crecimiento bacteriano a temperatura ambiente

Esta temperatura fue medida en el laboratorio de microbiología de la Universidad Nacional de Juliaca, en la que se observó que su valor mínimo fue 22 °C y valor máxima 28 °C, de manera que la temperatura promedio de laboratorio fue de 25 °C, en donde las muestras con poliestireno expandido - con *Pseudomonas* sp. presentan mayor densidad óptica y que la tasa de crecimiento al día sesenta 60 presentó 0.520 de variabilidad. La lectura se realizó por triplicado, tomando como blanco a las muestras sin poliestireno expandido - sin *Pseudomonas* sp., como muestra la figura 8 y con mayor detalle se presenta en la Tabla 23 en la sección anexos 3.

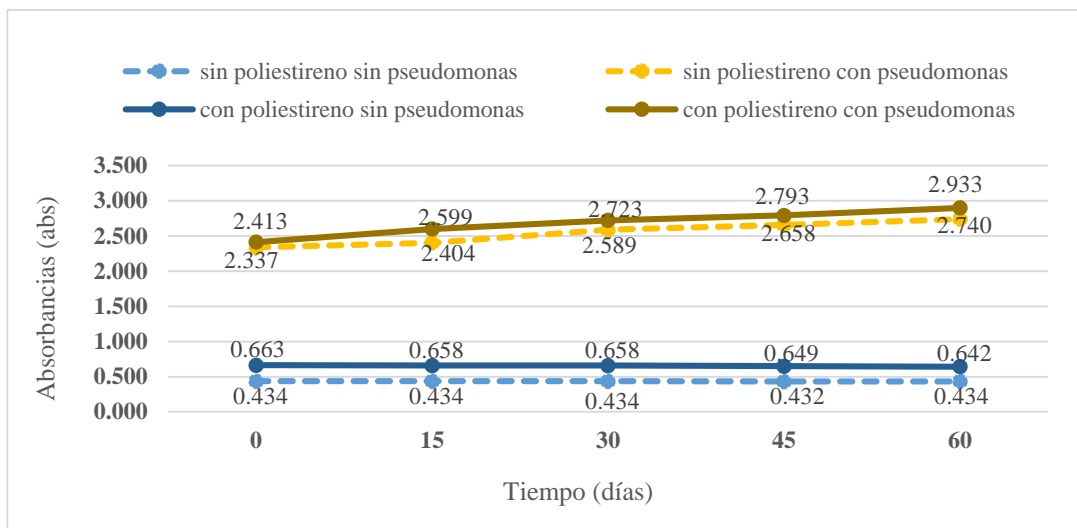


Figura 8. Absorbancia (Ab) promedio a temperatura ambiente en los días 0, 15, 30, 45 y 60.

La tasa de crecimiento de las *Pseudomonas* sp. aisladas expuestas a poliestireno expandido a la temperatura ambiente (25 °C) fue de 0.520 abs., según la diferencia de medias de la prueba pos-hoc bonferroni, siendo estadísticamente significativa con $p(0.00) < 0.05$, entre la absorbancia del día 0 y absorbancia del día 60; sin embargo para el medio mineral con *Pseudomonas* sp. - sin poliestireno expandido, la tasa de crecimiento resultó 0.403 abs., con $p(0.00) < 0.05$ entre la absorbancia del día 0 y absorbancia del día 60, resultado que concuerda con los reportes de Rivera *et al.* (2015) donde la tasa de crecimiento de la bacteria con poliestireno expandido es de 0.005 y sin poliestireno expandido es de 0.002 del género *Pseudomonas* sp. a 30 °C, así mismo Niño (2009) menciona que esta bacteria presenta un crecimiento óptimo entre 25 °C – 40 °C, por lo que reportó 0.08 abs de crecimiento a temperatura ambiente en medio líquido de sales a 10 horas. Por otro lado Hyun *et al.* (2020) obtuvo 6.3×10^6 UFC/mL de *Pseudomona aeruginosa* en 8 días en un medio que contenía 2 g de poliestireno, sin embargo en la investigación se obtuvo una menor concentración equivalente a 1.6×10^8 UFC/mL en 15 días en un medio de sales que contenía 0.2 g de poliestireno, de esta manera la cantidad de poliestireno en un medio líquido de sales es un factor importante a considerar en el crecimiento bacteriano (Gómez *et al.*, 2008; Gutierrez, 2018).

c. **Crecimiento bacteriano a 37 °C:** En la investigación se puede observar que las absorbancias a los días cero (0), quince (15), treinta (30), cuarenta y cinco (45) y sesenta (60), las muestras con poliestireno expandido - con *Pseudomonas* sp. son las que mayor densidad óptica presentaron y que la curva de crecimiento al día 60 fue mayor a comparación con los resultados a 4 °C y temperatura ambiente. Las lecturas se realizaron por triplicado, tomando como blanco a las muestras sin poliestireno expandido - sin *Pseudomonas* sp. Como se muestra en la figura 9 y con mayor detalle en la Tabla 24 de la sección anexos 3.

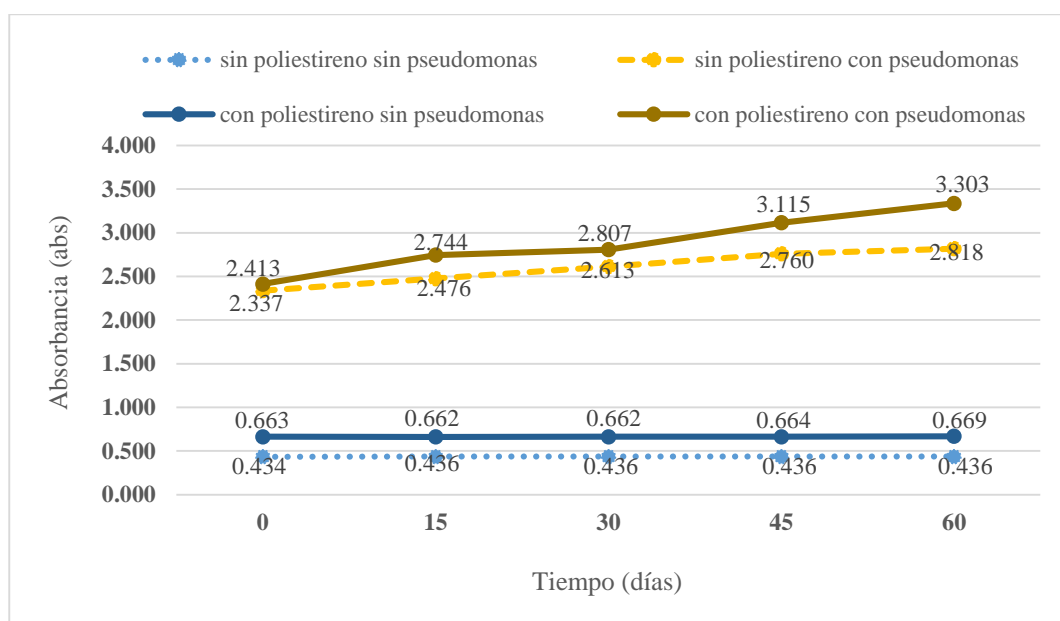


Figura 9: Absorbancias (Ab) promedio a 37 °C en los días 0, 15, 30, 45 y 60.

El crecimiento bacteriano a 37 °C de las *Pseudomonas* sp. aisladas es mayor estadísticamente para el medio mineral con poliestireno expandido - con *Pseudomonas* sp., con un $p(0.00) < 0.05$ y diferencia de medias (I-J) = 0.890 entre la absorbancia del día 60 y absorbancia del día 0 a comparación del medio mineral con *Pseudomonas* sp. - sin poliestireno, con $p(0.00) < 0.05$ y diferencia de medias (I-J) = 0.491 entre la absorbancia del día 60 y absorbancia del día 0, resultados que guardan relación con Yang *et al.* (2020) donde la tasa de crecimiento de la *Pseudomonas* fue 0.20 de absorbancia durante 7 días a 35 °C en medio mineral salino con $p < 0.05$, en cambio este valor es menor a lo reportado por Alania y Pérez (2017) a 37 °C con una tasa de crecimiento del 1.8 de absorbancia al día 60, mediante datos agrupados y modelos mixtos obtuvo un $p < 0.001$, aunque a esta

temperatura tuvo mejor respuesta frente a la presencia y ausencia del polipropileno, así mismo Hyun *et al.* (2020) reportó que el polipropileno presenta menor biodegradación en comparación con el poliestireno, debido a que la tasa de crecimiento bacteriano es influenciada por la composición y las propiedades de las moléculas intermedias producidas durante la biodegradación plástica (Hong *et al.*, 2020; Umamaheswari, 2017). Además la tasa de crecimiento de *Pseudomonas* sp. se encuentra estrechamente asociado con la tasa de despolimerización de los plásticos (Jiaojie *et al.*, 2020).

El análisis límite inferior de la prueba de efectos revela que los factores temperatura, medio salino con y sin poliestireno las absorbancias a los días 15, 30, 45 y 60 en, influyen significativamente con un $p(0.00) < 0.05$ como muestra la Tabla 29, se ejecutó la prueba de normalidad y supuestos (esfericidad y levene) como muestran las Tablas 26, 27 y 28; se evaluó los efectos intra-sujetos y efectos inter-sujetos de los factores ante la variable dependiente, absorbancia, que es equivalente al crecimiento bacteriano; de manera que considerando la suma de cuadrados de los factores, se generó el modelo del diseño experimental de la variable absorbancia como muestra la ecuación (3), donde el modelo estadístico del efecto de los factores inter sujetos (absorbancias en los días 0, 15, 30, 45 y 60) y efecto de los factores entre sujetos (temperatura y *Pseudomonas*), se presenta de manera detallada en las Tablas 29 y 30 de anexos 3, además las Tablas 31, 32 y 33 muestran las comparaciones de pares a través de la prueba pos-hoc bonferroni de manera detallada en la sección anexos.

$$Y_{ijk} = 459.52 + 0.202 (\text{Temperatura}) + 201.709 (\text{Pseudomonas}) + 1.313 (\text{Tiempo}) + 1.542 (\text{Pseudomonas} * \text{Tiempo}) + 0.162 (\text{Temperatura} * \text{Tiempo}) + 0.226 (\text{Temperatura} * \text{Pseudomonas}) + 0.205 (\text{Temperatura} * \text{Pseudomonas} * \text{Tiempo}) + 0.051 \quad (3)$$

Donde:

i: 1, 2, 3

j: 1, 2, 3, 4

k: 1, 2, 3, 4, 5

$Y_{i,j,k}$: Absorbancia correspondiente al nivel (i) del factor temperatura, al nivel (j) del factor casos *Pseudomonas* y al nivel (k) del factor tiempo.

T°_i : Efecto producido debido a la temperatura (4°C, temperatura ambiente y 37°C).

$Pseudomonas_j$: Efecto producido debido a los casos de exposición a *Pseudomonas* (sin *Pseudomonas* y sin poliestireno, sin *Pseudomonas* y con poliestireno, con *Pseudomonas* y sin poliestireno, con *Pseudomonas* y con poliestireno).

$Tiempo_k$: Efecto producido debido al tiempo (0, 15, 30, 45 y 60 días).

$(T^{\circ} * Pseudomonas)_{ij}$: Efecto producido debido a la interacción entre la temperatura y casos de *Pseudomonas*

$(Pseudomonas * Tiempo)_{jk}$: Efecto producido debido a la interacción entre casos de *Pseudomonas* y el factor tiempo.

$(T^{\circ} * Tiempo)_{ik}$: Efecto producido debido a la interacción entre el factor temperatura y el factor tiempo.

$(T^{\circ} * Pseudomonas * Tiempo)_{ijk}$: Efecto producido debido a la interacción entre la temperatura, casos de *Pseudomonas* y tiempo.

e_{ijk} : Error producido debido a la interacción entre la temperatura, casos de exposición *Pseudomonas* y el tiempo.

De la ecuación (3); 459.52 es la constante que representa la intersección de los factores intra-sujetos, así mismo 0.202 es el valor de la variabilidad generada por los niveles del factor temperatura; 201.709 es el valor de la variabilidad generada por los casos del factor *Pseudomonas*, 1.313 es el valor de la variabilidad generada por los niveles del factor tiempo, 0.162 es el valor de la variabilidad generada por los niveles de los factores tiempo interactuando con la temperatura, 1.542 es el valor de la variabilidad de la interacción de los factores tiempo y casos de *Pseudomonas*, 0.226 representa la variabilidad generada por la interacción entre el factor *Pseudomonas* y el factor temperatura, 0.205 representa el valor de la variabilidad respecto a la media generada debido a la interacción entre todos los factores y 0.051 representa la variabilidad que no es debida a los factores, es decir la suma de cuadrados de los errores producidos de la interacción de los factores.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Según la identificación bacteriana, se aislaron *Pseudomonas* sp. del poliestireno expandido procedente del botadero de residuos sólidos de la ciudad de Azángaro, la cual es eficiente en la biodegradación del poliestireno expandido.

De acuerdo a los resultados de la pérdida de peso del poliestireno expandido utilizado como única fuente de carbono para las *Pseudomonas* sp., a temperaturas de 4 °C, 25 °C y 37 °C, el mayor porcentaje de biodegradación fue de 2.59 % a 25 °C en un periodo de 15 días.

Según las curvas de crecimiento a temperaturas de 4 °C, 25 °C y 37 °C, se determinó que el crecimiento de las *Pseudomonas* sp. en un medio líquido de sales, fue mayor en presencia del poliestireno expandido a comparación del medio líquido de sales sin poliestireno expandido, evidenciándose una mayor densidad óptica (3.30 abs) a los 37 °C.

5.2. Recomendaciones

Realizar estudios considerando las temperaturas bajas de la región Puno, de esta manera ampliar el panorama sobre el desarrollo de bacterias nativas de los botaderos municipales y se pueda lograr de manera eficiente la biodegradación de los plásticos.

Realizar el proceso de adaptabilidad al polímero y trabajar con fuente de nutrientes (sales minerales) y energía, de esta manera mejorar la supervivencia de las bacterias al momento de exposición al poliestireno expandido.

Considerar mayor concentración bacteriana en laboratorio, para lograr mayor pérdida de masa del poliestireno expandido usando *Pseudomonas* sp. y seguir ampliando el panorama de alternativas de reducción del poliestireno expandido.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Aguirre, R. (2015). Análisis espectral del lago de Guadalupe, mediante imágenes de satélite y datos in situ. *Investigaciones geográficas*, 86(86), 15–24. <https://doi.org/10.14350/rig.42338>
- Alania, Y., & Pérez, S. (2017). Efecto de la temperatura en el crecimiento de dos cepas ATCC de *Pseudomonas*, expuestas a polipropileno, 1–27.
- Alonso, M., Lozano, A., Madregal, S., Vilte, E., Apaza, M., & Saravia, J. (2016). *Degradación de poliestireno y polipropileno con microorganismos de vermicompost*. Universidad Nacional de Jujuy, San Salvador.
- Aquihuatl, M., & Perez, M. (2004). *Manual de practicas del laboratorio general de Microbiología. Manual de prácticas laboratorio*.
- Arenas, A. (2018). *Aislamiento y caracterización molecular 16rRNA de cepas bacterianas con capacidad de biodegradación de PEAD (Polietileno de alta densidad) Micro contaminante en aguas sintéticas a escala laboratorio*. Universidad Católica de Santa María.
- Arriola, E., & Velásquez, F. (2013). *Evaluación tecnica de alternativas de reciclaje de poliestireno expandido (EPS)*. Universidad del Salvador.
- Barbarán, H., Cabanillas, L., & Rubio, Y. (2018). *Biodegradación de polietileno tereftalato (PET) por acción de Pseudomona aeruginosa, en condiciones de laboratorio*. Universidad César Vallejo. Retrieved from http://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12692/32118/barbaran_sh.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Brenner, D., Krieg, N., & Staley, J. (2005). *Systematic bacteriology. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. https://doi.org/10.1007/0-387-28022-7_9
- Butron, S. (2020). *Capacidad de Biodegradación de Pseudomonas aeruginosa frente al polietileno de baja densidad*. Universidad Nacional del Altiplano. Retrieved from <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/13475>
- Callicó, A., Cedré, B., Sifontes, S., Torres, V., Pino, Y., Callis, A., & Esnard, S. (2004). Caracterización fenotípica y serológica de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccimonitor*.
- Caviedes, D. (2010). *Aislamiento y selección de Pseudomonas sp., y Bacillus sp., promotoras del crecimiento vegetal en cultivo de uchuva (Physalis peruviana L.) con*

- actividad antagónica frente a Fusarium oxysporum*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Ccallo, M., & Sacaca, F. (2020). *Una revisión de la biodegradación de plásticos por Pseudomonas*. Universidad Peruana Unión.
- Chakrabarty, A. (1976). Plasmids in *Pseudomonas*. *Annual Review of Genetics*, 10, 7–30. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.10.120176.000255>
- Daviran, P. (2017). *Biodegradación de la espuma de Poliestireno por la larva del Tenebrio molitor para la producción de abono*. Universidad Cesar Vallejo.
- Delgado, A. (2018). El tecnopor: la amenaza invisible - Clima de cambios PUCP. Retrieved June 24, 2020, from <https://www.pucp.edu.pe/climadecambios/noticias/el-tecnopor-la-amenaza-invisible/>
- Dobbins, J. (2010). Prescott's Microbiology, Eighth Edition. *Journal of Microbiology & Biology Education : JMBE*. <https://doi.org/10.1128/jmbe.v11.i1.154>
- Enrique, J., Rodríguez, R., & Rubiños, L. (2003). Bacterias y hongos hidrocarbonoclastas de rizósfera frijol y maíz, en un suelo contaminado con petróleo. *Terra Latinoamericana*, 21(4), 493–502.
- Eubeler, J., Bernhard, M., & Knepper, T. (2010). Environmental biodegradation of synthetic polymers II . Biodegradation of different polymer groups. *Trends in Analytical Chemistry*, 29(1), 84–100. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.09.005>
- Fauci, A., Kasper, D., Araiza, M., & Harrison, T. (2009). P. de la medicina interna 19 th ed. M. M.-H. (2009). *Harrison. Manual de Medicina* (19e ed.). McGraw-Hill Medical. Retrieved from <https://accessmedicina.mhmedical.com/book.aspx?bookID=2128>
- Gerencia de Servicios Municipales y Gestión Ambiental. (2019). *Estudio de Caracterización de Residuos Sólidos*. Retrieved from <https://muniazangaro.gob.pe/municipalidad/instrumentos-de-gestion/>
- Giros, B., Salah, E., Bertrand, L., & Caron, M. (1991). Cloning and functional characterization of a. *biochemistry*, 195(1,2,3), 149–154. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1302>
- Gómez, S., Gutiérrez, D., Hernández, A., Hernández, C., Losada, M., & Mantilla, P. (2008). Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. *NOVA*, 6(9), 76–84.
- Gonzales, V. (2019). *Capacidad biodegradativa de hongos filamentosos frente al polietileno*. Retrieved from <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/12254>
- Groover, M. (2007). *Fundamentos de manufactura moderna*. (McGraw-Hill/interAmericana editores, Ed.) (Tercera ed). Mexico.

- Grote, Z., & Silveira, J. (2015). Análise energética e exergetica de um processo de reciclagem de poliestireno expandido (isopor). *Revista Mackenzie de Engenharia e Computação*, 9–27.
- Gutiérrez, A., Arellano, B., Gutiérrez, C., Escalera, E., Romero, G., Saucedo, J., Flores, Y. (2017). Química Farmacéutico biológica área farmacéutica manual de laboratorio microbiología general I coordinador, 8. Retrieved from https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/manuales/19Manual_Microbiologia_General1.pdf
- Gutiérrez, A. (2019). *Biodegradación del polietileno de baja densidad utilizando hongos, bacterias y consorcios microbianos aislados del botadero municipal de Tacna*. Universidad Privada de Tacna. Retrieved from <http://repositorio.upt.edu.pe/bitstream/UPT/1269/1/Gutierrez-Alvarez-Ana.pdf>
- Gutierrez, J. G. (2013). Biodegradación de polietileno de baja densidad por consorcios microbianos, 58. Retrieved from https://www.zaragoza.unam.mx/portal/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/biologia/tesis/tesis_gutierrez_pescador.pdf
- 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*. Universidad Continental.
- Guzmán, R. (1987). *Biodegradación de crudo de petróleo en terrarios*. *Environmental Health Perspectives*. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901003>
- Guzmán, R. (2002). Biodegradación de crudo de petróleo en terrarios. *200.62.146.31*, 56. Retrieved from http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Biodegradación+de+crudo+petróleo+en+terrarios#0%5Cnhttp://200.62.146.31/sisbib/2002/escalante_gr/pdf/escalante_gr-TH.3.pdf
- Hassett, D., Cuppoletti, J., Trapnell, B., Lyman, S., Rowe, J., Yoon, S., Ochsner, U. (2002). Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(11), 1425–1443. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(02\)00152-7](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(02)00152-7)
- Herrera, E. (2013). *Fundamentos de Microbiología Predictiva: aplicaciones teóricas y prácticas*. Retrieved from https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/manuales/19Manual_Microbiologia_General1.p

df

- Hoekstra, W. (1988). Release of genetically - engineered microorganisms in the environment: Risk of horizontal genetic-transfer.
- Hong, K., Hyun, L., Hee, Y., Eunbeen, J., Sukkyoo, L., Jiaojie, L., & Dae-Hwan, K. (2020). Biodegradation of polystyrene by *Pseudomonas* sp. Isolated from the Gut of Superworms (Larvae of *Zophobas atratus*). *Environmental Science & Technology*, 54(11), 6987–6996. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c01495>
- Hoyle, B., & Costerton, J. (1991). Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Progress in drug Research. Fortschritte der Arzneimittelforschung. Progres des Recherches Pharmaceutiques*, 37, 91–105. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-7139-6_2
- Hyun, L., Hong, K., Eunbeen, J., Hee, Y., Sukkyoo, L., Jiaojie, L., & Dae-Hwan, K. (2020). Evaluation of the biodegradation efficiency of four various types of plastics by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the gut extract of superworms. *Microorganisms*, 8(9), 1–12. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091341>
- Jara, N., Reinoso, F., Isaza, C., & Aguinaga, A. (2016). Laboratorio de pruebas para artefactos de refrigeración doméstica en el Ecuador . *ResearchGate*, (June). Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/304627346%0ALaboratorio>
- Jiaojie, L., Hong, K., Hyun, L., Hee, Y., Eunbeen, J., Sukkyoo, L., & Dae-Hwan, K. (2020). Rapid biodegradation of polyphenylene sulfide plastic beads by *Pseudomonas* sp. *Science of the Total Environment*, 720, 137616. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137616>
- Kerstens, K., Ludwig, W., Vancanneyt, M., De Vos, P., Gillis, M., & Schleifer, K. (1996). Recent changes in the classification of the pseudomonads: An overview. *Systematic and Applied Microbiology*, 19(4), 465–477. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(96\)80020-8](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(96)80020-8)
- Khalifa, A., Moissenet, D., Thien, H., & Khedher, M. (2011). Les facteurs de virulence de *pseudomonas aeruginosa*: Mécanismes et modes de régulations. *Annales de Biologie Clinique*, 69(4), 393–403. <https://doi.org/10.1684/abc.2011.0589>
- Kyaw, B., Champakalakshmi, R., Sakharkar, M., Lim, C., & Sakharkar, K. (2012). Biodegradation of low density polythene (LDPE) by *Pseudomonas* sp. *Indian Journal of Microbiology*, 52(3), 411–419. <https://doi.org/10.1007/s12088-012-0250-6>
- Layedra, F., Galeas, S., & Guerrero, V. (2015). Estudio de la biodegradación de un material compuesto obtenido con ácido poliláctico (PLA) Reforzado con Fibra corta de abacá

- (Musatextilis). *Revista Politécnica*, 35(3), 1–8.
- Leahy, J., & Colweel, R. (2019). Microbial degradation of hydrocarbons in the ecosystem. *Microbial Action on Hydrocarbons*, 54(3), 343–351. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1840-5_14
- León, R., Albero, M., & Cruz, R. (2007). Síntesis, caracterización y aplicación del ps entrecruzado a partir de residuos de ps. *Iberoamericana de Polímeros*, 8(2), 112–137. <https://doi.org/22390>
- López, C., & Laines, R. (2013). Poliestireno expandido (EPS) y su problemática ambiental. *División Académica de Ciencias Biológicas Universidad Juárez Autónoma de Tabasco*, 63, 64, 65. <https://doi.org/10.19136/kuxulkab.a19n36.339>
- Machaca, E., Choque, M., & Flores, N. (2013). *Plan Regional de Accion Ambiental Puno 2014 - 2021*. Puno. Retrieved from <http://www.regionpuno.gob.pe/descargas/planes/2014-PLAN-REGIONAL-DE-ACCION-AMBIENTAL-PUNO-2014-AL-2021.pdf>
- Madigan, M., & Martinko, J. (2006). citation-41584156. In *Brock biology of Microorganisms* (11th ed., p. 992). Upper Saddle River, NJ, USA.
- Malbrán, C. (2012). Metodo de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución. *Clinical and Laboratory Standars Institute*, 32(2).
- Maldonado, A. (2012). La complejidad de la problemática ambiental de los residuos plásticos : una aproximación al análisis narrativo de política pública en Bogotá. 2012, 1–120.
- Maroto, M., & Rogel, J. (2004). Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos. *Protección Ambiental de Suelos*, 297–305.
- Mauricio, F., & Meza, V. (2013). *Biodegradabilidad de polietileno tereftalato y de oxopolietileno, a nivel de laboratorio, por acción de bacterias nativas presentes en humus de lombriz, caballo y gallina*. Escuela politecnica del ejército. Retrieved from <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/6261/1/T-ESPE-038954.pdf>
- Mayz, J., & Manzi, L. (2017). Bacterias hidrocarburoclásticas del género *Pseudomonas* en la rizosfera de *Samanea saman* (Jacq.) Merr. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(1), 29–37. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.57408>
- McDougald, D., Rice, S., Weichart, D., & Kjelleberg, S. (1998). Nonculturability: Adaptation or debilitation? *FEMS Microbiology Ecology*, 25(1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(97\)00063-9](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(97)00063-9)
- Meyer, J., Geoffroy, V., Baida, N., Gardan, L., Izard, D., Lemanceau, P., Palleroni, N.

- (2002). Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent *Pseudomonads*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 2745–2753. <https://doi.org/10.1128/aem.68.6.2745-2753.2002>
- MINAM. (2019). *Guía para el cumplimiento de la meta 3. El Peruano*. Lima.
- Montero, M. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente: aspectos epidemiológicos, clínicos y terapéuticos, 109. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10803/107902>
- Municipalidad Provincial de Azángaro. (2018). *Plan integral de gestión ambiental de residuos sólidos dela provincia de Azángaro (PIGARS)*. Azángaro.
- Narváez, S., & Gómez, M. (2008). Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos aisladas a partir de sedimentos del Caribe Colombiano. *Bol. Invest. Mar. Cost.*, 37(1006), 61–75. <https://doi.org/0122-9761>
- Niño, L. (2009). Implementación de diferentes técnicas analíticas para la determinación de biomasa bacteriana de cepas *Pseudomonas putida* biodegradadoras de fenol. *Bifurcations*, 45(1), 1–19. <https://doi.org/10.7202/1016404ar>
- Norella, Y., Lopez, A., Francisco, U., & Santander, D. (2018). Biodegradación : una alternativa eficiente para el tratamiento de residuos poliméricos Biodegradation : an efficient alternative for the treatment of polymeric waste.
- Ossa, A. (2009). *Comportamiento mecánico del EPS bajo carga de compresión. La referencia*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Palleroni, N. (1992). Present situation of the taxonomy of aerobic *Pseudomonads*. *Molecular Biology and Biotechnology*, 105–115. Retrieved from [https://books.google.com.pe/books?id=7h_jBwAAQBAJ&pg=PA39&lpg=PA39&dq=Palleroni,+N.+\(1992\).+Present+situation+of+the+taxonomy+of+aerobic+Pseudomonads.+Molecular+Biological+and+biotechnology,+105-115.&source=bl&ots=4TazUMOGVA&sig=ACfU3U1wZMNDPfn3aZ6abZ6woTbov](https://books.google.com.pe/books?id=7h_jBwAAQBAJ&pg=PA39&lpg=PA39&dq=Palleroni,+N.+(1992).+Present+situation+of+the+taxonomy+of+aerobic+Pseudomonads.+Molecular+Biological+and+biotechnology,+105-115.&source=bl&ots=4TazUMOGVA&sig=ACfU3U1wZMNDPfn3aZ6abZ6woTbov)
- Pérez, R., Camacho, M., Gomez, J., & Cantero, D. (2008). Aislamiento y selección de una cepa bacteriana. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 39(1), 9. Retrieved from <https://www.redalyc.org/html/1812/181214889004/>
- Pramila, R., Padmavathy, K., Vijaya, K., & Mahalakshmi, K. (2012). *Brevibacillus parabrevis*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas citronellolis* - Potential candidates for biodegradation of low density polyethylene (LDPE). *Journal of Bacteriology Research*, 4(1). <https://doi.org/10.5897/jbr12.003>
- Purisaca, D., & Quevedo, H. (2015). Eficiencia de la biorremediación de suelos

- contaminados con petróleo por actinobacterias nativas de la provincia de Talara, región Piura, 102. Retrieved from <http://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/UNPRG/430/BC-TES-4111.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Quiliche, J., Cortez, A., Rodriguezl, P., Silva, M., & Huayna, D. (2016). Aislamiento e identificación de *Pseudomonas aeruginosa* potencialmente degradadoras de crudo de petróleo, provenientes de suelos en talleres de automóviles en el Norte Chico. *Infinitum*, 6(1), 63–69.
- Quintero, C. (2013). Reciclaje termo - mecánico del poliestireno expandido (Icopor), como una estrategia de mitigación de su impacto ambiental en rellenos sanitarios.
- Ramos, A., & De María, M. (1988). Ingeniería de los materiales plásticos - Dialnet, (84-86251-85-0). Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=74813>
- Ren, J., Lin, W., Shen, Y., Wang, J., Luo, X., & Xie, M. (2008). Optimization of fermentation media for nitrite oxidizing bacteria using sequential statistical design. *Bioresource Technology*, 99(17), 7923–7927. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.03.027>
- Rivera, H., Augusto, S., Gándara, M., & Ortigoza, P. (2015). Bacterias hidrocarbonoclasticas biodegradantes de poliestireno expandido. *Foresta Veracruzana*, 17(2), 21–28.
- Ruiz, G. (2006). Obtención y caracterización de un polímero biodegradable a partir del almidón de Yuca. *Ingeniería y Ciencia*, 2(1794–9165), 5–28.
- Ruiz, L. (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: aportacion al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. *Universidad de Barcelona, Tesis doct*, 7–9. <https://doi.org/10.1590/S0103-507X2007000400003>
- Sáenz, V. (2006). *Contribución al estudio de la degradación ambiental de poliolefinas fotoestabilizadas*. Riunet. Universitat Politècnica de València, Valencia (Spain). <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/2909>
- Sangorin, A. (2014). Precauciones de aislamiento en la atención sanitaria. *An Pediatr Contin*, 12(6), 340–343. [https://doi.org/10.1016/s1696-2818\(14\)70214-8](https://doi.org/10.1016/s1696-2818(14)70214-8)
- Schmidt, P., Cioffi, M., Voorwald, H., & Silveira, J. (2011). Flexural test on recycled polystyrene, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2011.04.153>
- Solis, C. (2005). *Características del poliestireno expandido KNAUF Therm. Propiedades del EPS KNAUF Therm Th35SE*.
- Strateva, T., & Yordanov, D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 58(9), 1133–1148.

<https://doi.org/10.1099/jmm.0.009142-0>

- Subramanian, N. (2015). *Basics of Polymers* (Momentum P). United States of America: Services Private Ltd., Chennai, India. <https://doi.org/10.5643/9781606505830> Cover
- Syranidou, E., Karkanorachaki, K., Amorotti, F., Franchini, M., Repouskou, E., Kaliva, M., Kalogerakis, N. (2017). Biodegradation of weathered polystyrene films in seawater microcosms. *Scientific Reports*, 7(17991). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18366-y>
- Thanh, B. (2018). Evaluation of biodegradability of polystyrene materials in the managed landfill and soil. *Biological Science*, (October).
- Torres, G. (2016). Estudio del efecto del tipo de poliestireno usado como envase plástico para alimentos sobre la migración global mediante espectroscopia IR-ATR y PCA, 1–97. Retrieved from <http://bdigital.unal.edu.co/55103/7/ginaalexandrotorreslopez.2016.pdf>
- Treviño, N. (2016). Propuesta de gestión para la disposición final de las bolsas plásticas oxobiodegradables de baja densidad presentes en los residuos sólidos urbanos.
- Umamaheswari, M. (2017). GCMS Analysis of *Pseudomonas* sp., mediated degradation of polystyrene available online at www.scholarsresearchlibrary.com Scholars Research Library GCMS Analysis of *Pseudomonas* sp., mediated degradation of polystyrene. *annals of biological research*, 8(April), 8–11. <https://doi.org/ISSN 0976-1233 CODEN>
- UNAM. (2010). *Evaluación de la bacteria Pseudomona como degradador del polietileno*. Mexico.
- Uribe, D., Giraldo, D., & Gutiérrez, S. (2010). Biodegradación de polietileno de baja densidad por acción de un consorcio microbiano aislado de un relleno sanitario, Lima, Perú Biodegradation of low density polyethylene by the action of a microbial consortium isolated from a landfill, Lima, Peru, 17(1), 133–136.
- Velasco Urdiales, M. (2017). “*Biodegradación del polietileno de baja densidad, mediante el uso del lepidóptero Galleria mellonella bajo condiciones térmicas controladas en el 2017.*” Universidad César Vallejo.
- Villegas, M., Prado, I., Ortega, M., & Zhurbenko, R. (2012). Identificación de *Pseudomonas aeruginosa* empleando el método del número más probable. *Revista Peruana de Epidemiología*, 16(2), 131–133.
- Wade, L. (2012). *Química orgánica*. (G. Lopez, B. Gutiérrez, & J. Hernández, Eds.) (Pearson Ed). México: Whitman College.
- Whitman, W. (2011). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. *International journal of*

Pediatric Otorhinolaryngology (Second, Vol. 75). The Firmicutes.
<https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2011.05.009>

Yang, Y., Pratap, R., Song, D., Chen, Q., Zheng, X., Zhang, C., Li, Y. (2020). Synergistic effect of *Pseudomonas putida* II-2 and *Achromobacter* sp. QC36 for the effective biodegradation of the herbicide quinclorac. *Ecotoxicology and environmental safety*, 188(August 2019). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109826>

Yang, Y, Wang, J., & Xia, M. (2020). Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating superworms *Zophobas atratus*. *Science of the total environment*, 708, 135233. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135233>

ANEXOS

ANEXO 1: Panel fotográfico



Figura 10. Muestras del botadero municipal trasladadas a laboratorio.



Figura 11. Toma de muestras en el botadero municipal cerrado de la ciudad de Azángaro.



Figura 12. Suspensión de poliestireno expandido del botadero en una solución salina (NaCl) al 0.85% y primeras cepas en agar centrífide.



Figura 13. PH del caldo Palleroni y temperatura de incubación de para el aislamiento de la *Pseudomonas* sp.

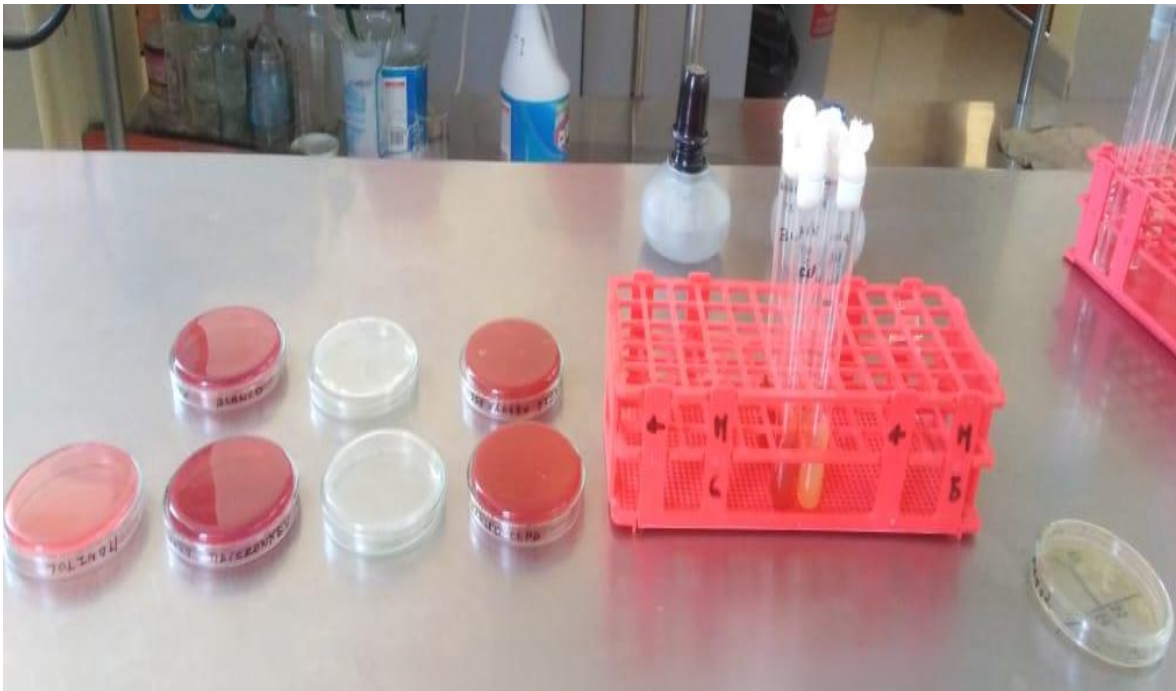


Figura 14. Diferentes medios de cultivo para las *Pseudomonas* sp. en la identificación bacteriana.

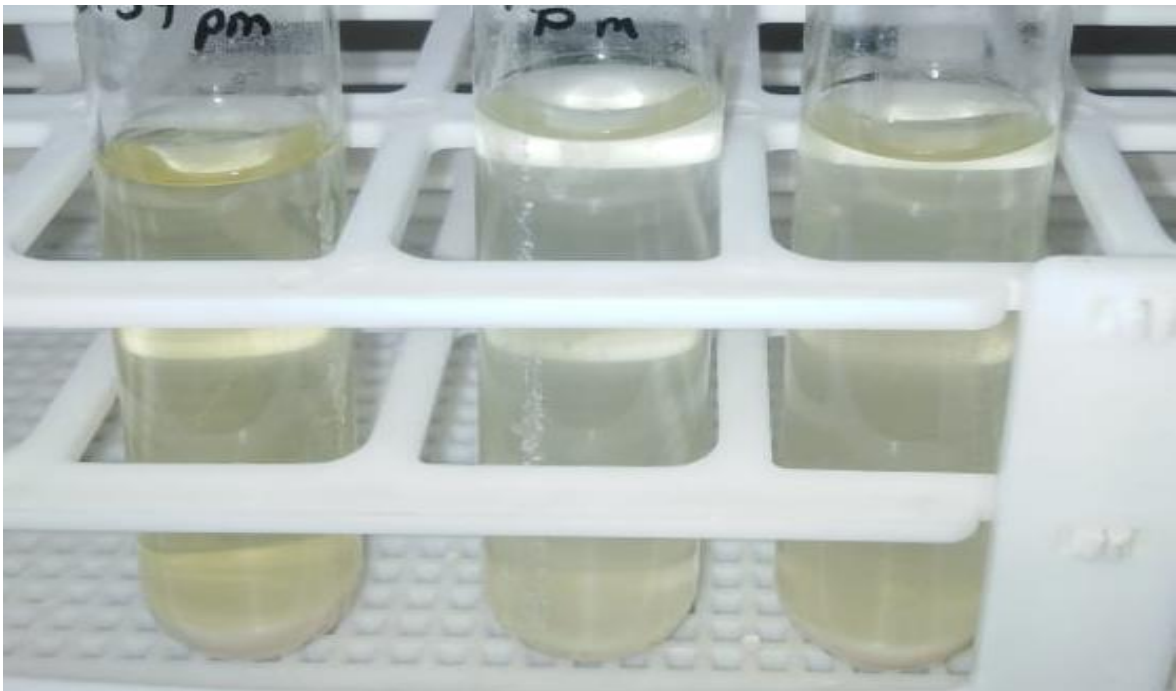


Figura 15. Cepas aisladas de *Pseudomonas* sp. en medio de enriquecimiento.



Figura 16. Preparación de muestras para la prueba gravimétrica.



Figura 17. Pesaje del poliestireno expandido y control de presencia de *Pseudomonas* sp.

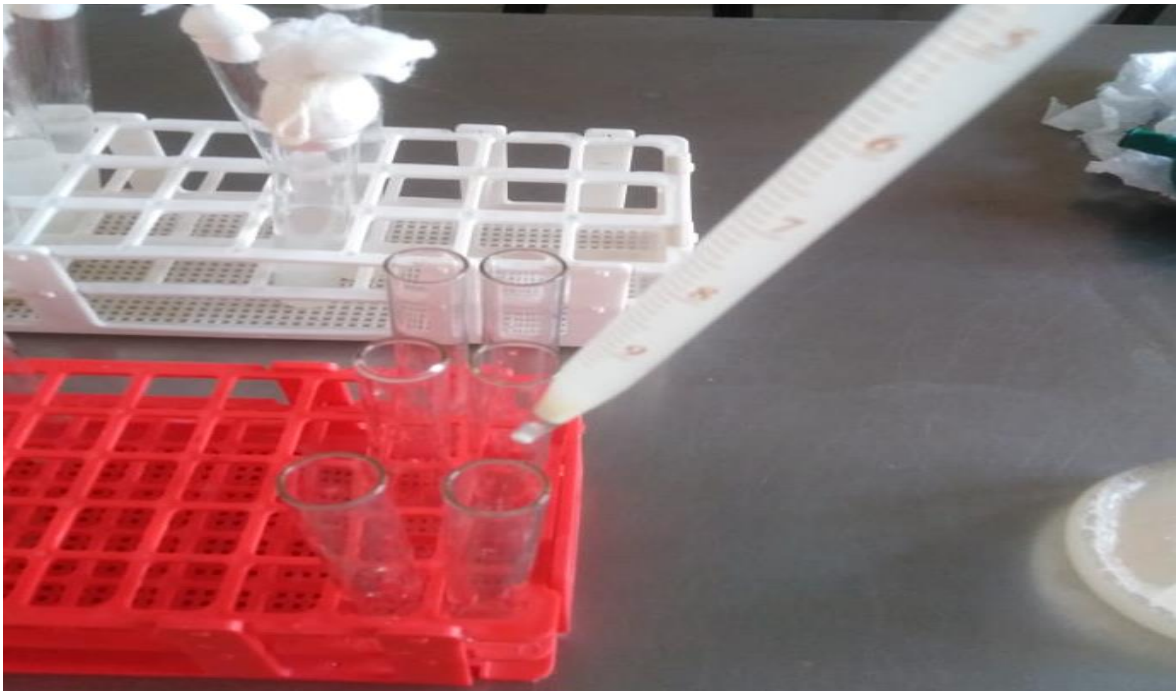


Figura 18. Preparación y distribución del medio mínimo de sales.



Figura 19. Muestras con cepas aisladas preparadas para el corrido en el espectrofotómetro para tres temperaturas.



Figura 20. Medición de las muestras en el espectrofotómetro.



Figura 21. Lectura de espectrofotómetro y muestra a temperatura ambiente de laboratorio.

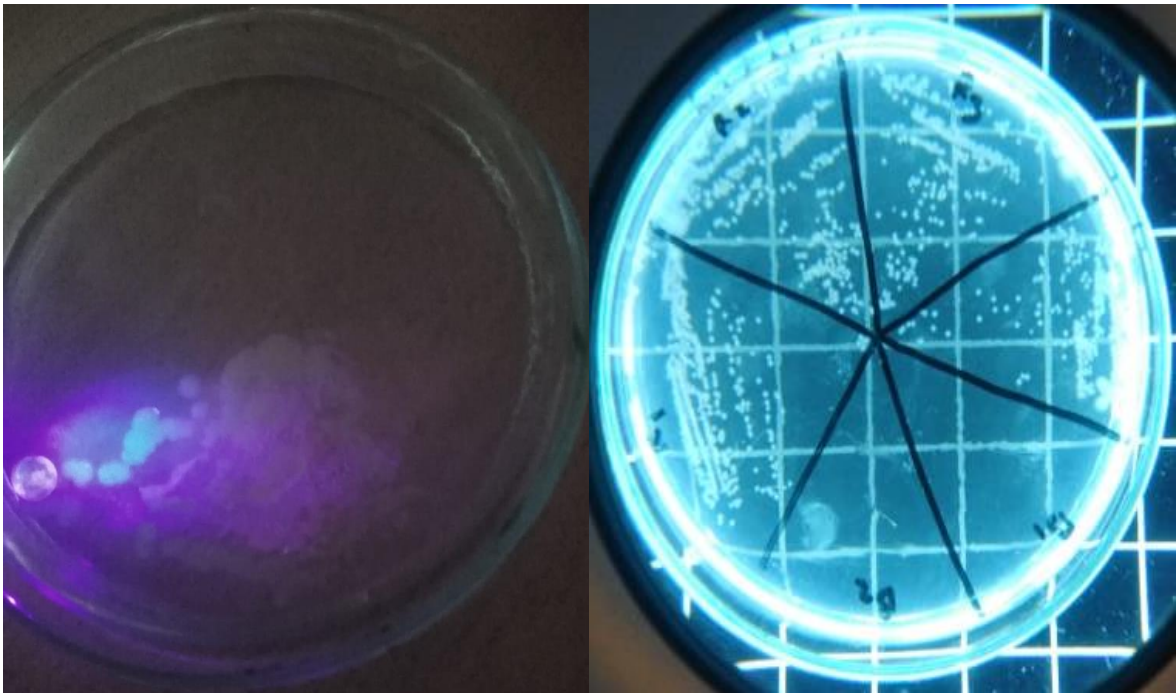


Figura 22. Producción de piocianina y pioverdina en agar centrímide, control de presencia de *Pseudomonas* sp. al día 15 a 4 °C de la prueba gravimétrica.



Figura 23. Presencia de *Pseudomonas* sp. aisladas al día 30 a 4 °C en la prueba gravimétrica.

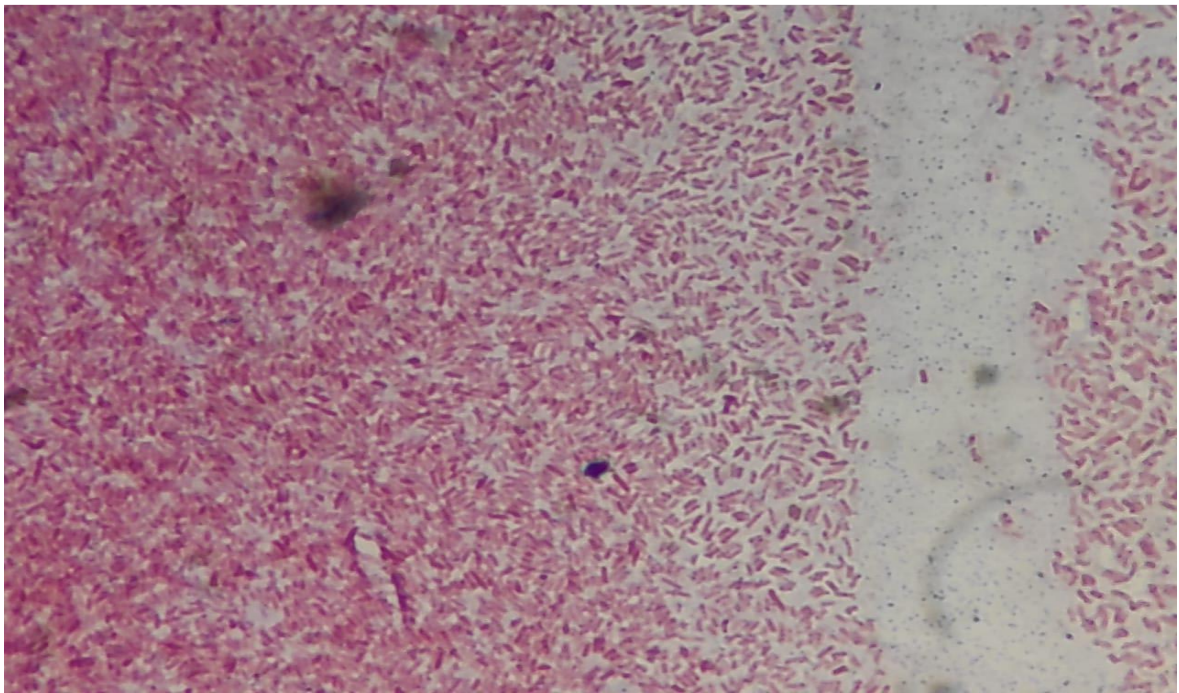


Figura 24. Observación en microscopio a 40X de las *Pseudomonas* sp. aisladas en tinción gram.

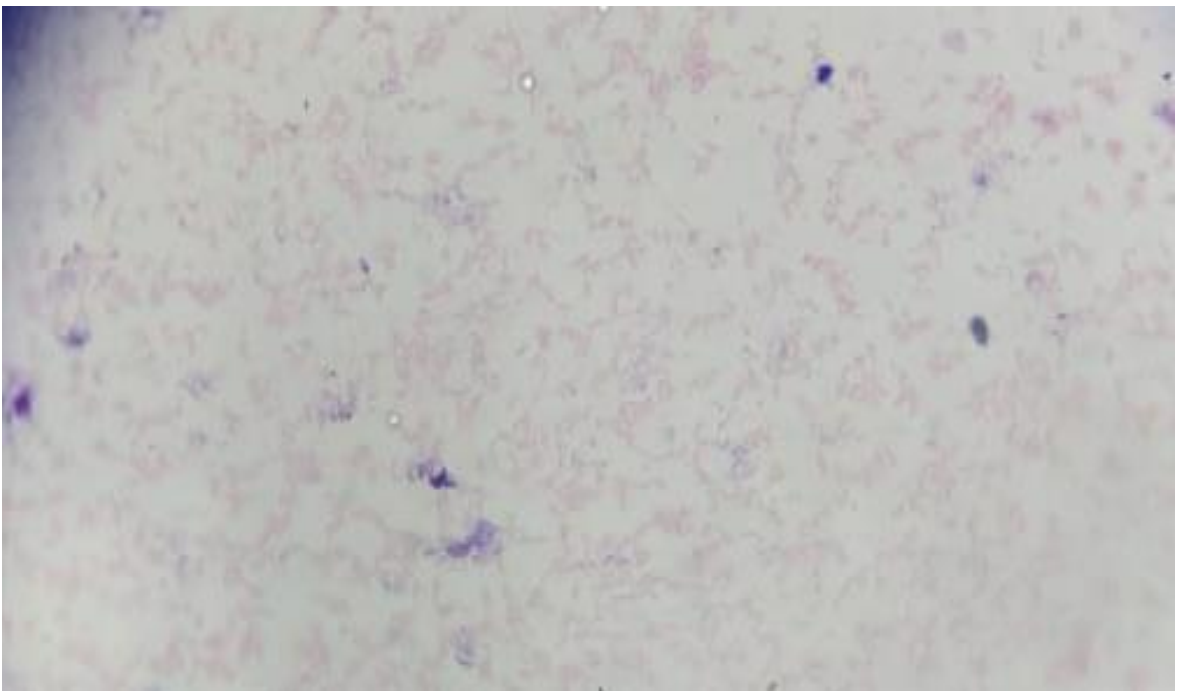


Figura 25. Observación en microscopio a 40X de *Pseudomonas* sp. a 4 °C en el día 60 de la prueba gravimétrica.

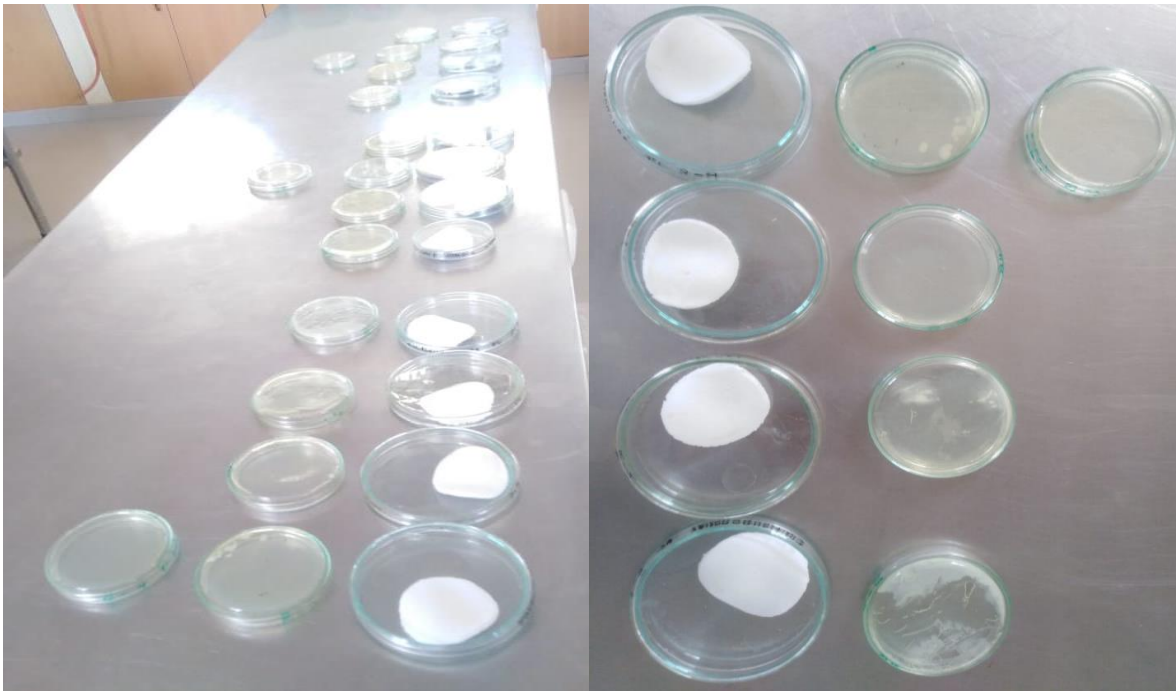


Figura 26. Muestras de presencia de cepas al día 0 y cepas al día 60 después de la exposición a los 4 °C.

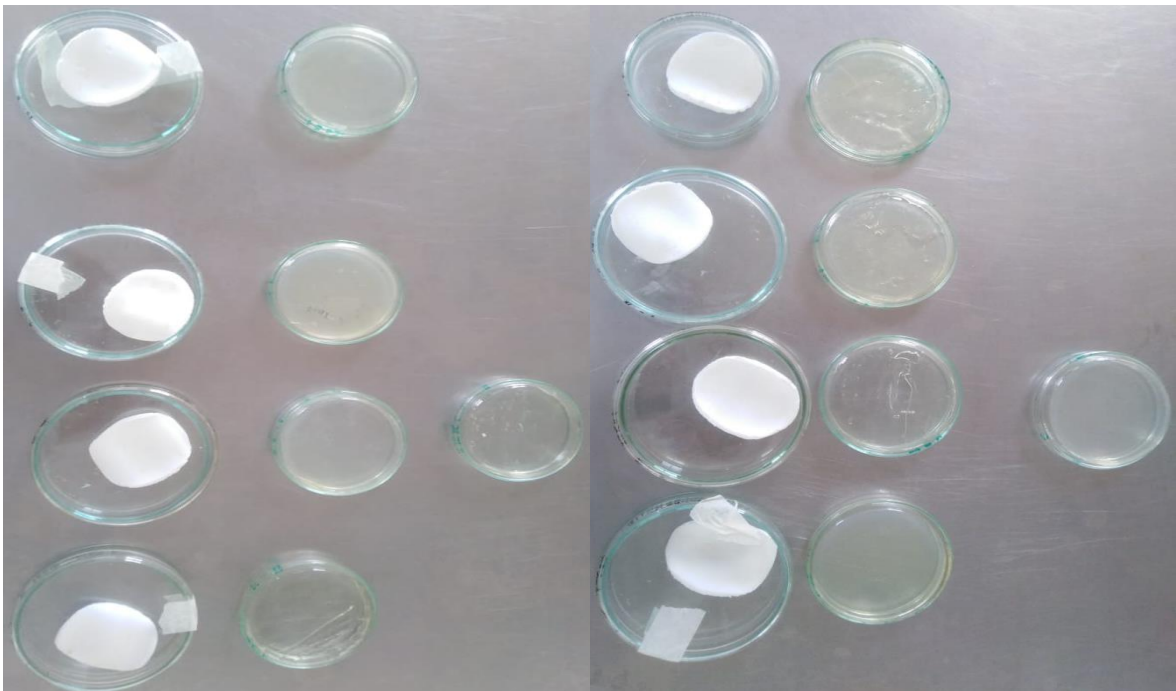


Figura 27. Cepas expuestas a temperatura ambiente y 37 °C

ANEXO 2: Tablas y análisis estadístico de los resultados de la pérdida de masa del poliestireno

Tabla 8: Pérdida de masa al día 15

	Muestras	Peso inicial (g)	Peso día 15 (g)	Pérdida de peso (g)
4°C	R-1	1.0035	0.9937	0.0098
	R-2	1.0054	0.9836	0.0218
	R-3	1.0111	1.0017	0.0094
	R-4	1.0052	1.0026	0.0026
	T-1	1.0233	1.0227	0.0006
	T-2	0.8842	0.8828	0.0014
T° amb.	R-1	1.0306	1.0028	0.0278
	R-2	1.0231	0.9978	0.0253
	R-3	0.9574	0.9314	0.0260
	R-4	0.964	0.9371	0.0269
	T-1	0.9528	0.9522	0.0006
	T-2	0.9885	0.988	0.0005
37°C	R-1	0.9441	0.9313	0.0128
	R-2	1.0352	1.0198	0.0154
	R-3	1.0511	1.0366	0.0145
	R-4	0.8953	0.8779	0.0174
	T-1	0.9188	0.9189	-0.0001
	T-2	0.9799	0.982	-0.0021

Tabla 9: Pérdida de masa al día 30

	Muestras	Peso inicial (g)	Peso día 30 (g)	Pérdida de peso (g)
4°C	R-1	1.0035	1.001	0.0025
	R-2	1.0054	0.9878	0.0176
	R-3	1.0111	1.0028	0.0083
	R-4	1.0052	1.0042	0.0010
	T-1	1.0233	1.0232	0.0001
	T-2	0.8842	0.8833	0.0009
T°amb.	R-1	1.0306	0.9055	0.1251
	R-2	1.0231	0.9143	0.1088
	R-3	0.9574	0.9316	0.0258
	R-4	0.964	0.9369	0.0271

<<continuación>>

37°C	T-1	0.9528	0.9524	0.0004
	T-2	0.9885	0.9894	-0.0009
	R-1	0.9441	0.9318	0.0123
	R-2	1.0352	1.0203	0.0149
	R-3	1.0511	1.0368	0.0143
	R-4	0.8953	0.8776	0.0177
	T-1	0.9188	0.9200	-0.0012
	T-2	0.9799	0.9811	-0.0012

Tabla 10: Pérdida de masa al día 45

	Muestras	Peso inicial (g)	Peso día 45 (g)	Pérdida de peso (g)
4°C	R-1	1.0035	0.9836	0.0199
	R-2	1.0054	0.9969	0.0085
	R-3	1.0111	1.0336	-0.0225
	R-4	1.0052	0.9848	0.0204
	T-1	1.0233	1.0222	0.0011
	T-2	0.8842	0.8968	-0.0126
T° amb.	R-1	1.0306	1.0304	0.0002
	R-2	1.0231	1.0159	0.0072
	R-3	0.9574	0.9322	0.0252
	R-4	0.964	0.9692	-0.0052
	T-1	0.9528	0.9551	-0.0023
	T-2	0.9885	0.9877	0.0008
37°C	R-1	0.9441	0.9642	-0.0201
	R-2	1.0352	1.0169	0.0183
	R-3	1.0511	0.9271	0.1240
	R-4	0.8953	0.9757	-0.0804
	T-1	0.9188	0.9205	-0.0017
	T-2	0.9799	0.9812	-0.0013

Tabla 11: Pérdida de masa al día 60

Tratamiento	Muestras	Peso inicial (g)	Peso día 60 (g)	Pérdida de peso (g)
4°C	R-1	1.0035	0.7947	0.2088
	R-2	1.0054	0.7978	0.2076
	R-3	1.0111	0.8057	0.2054
	R-4	1.0052	0.7760	0.2292
	T-1	1.0233	0.9063	0.1170
	T-2	0.8842	0.7581	0.1261
T°amb.	R-1	1.0306	0.8321	0.1985
	R-2	1.0231	0.8021	0.2210
	R-3	0.9574	0.8180	0.1394
	R-4	0.964	0.7882	0.1758
	T-1	0.9528	0.7777	0.1751
	T-2	0.9885	0.8175	0.1710
37°C	R-1	0.9441	0.8669	0.0772
	R-2	1.0352	0.7983	0.2369
	R-3	1.0511	0.9263	0.1248
	R-4	0.8953	0.9752	-0.0799
	T-1	0.9188	0.9202	-0.0014
	T-2	0.9799	0.8856	0.0943

Tabla 12: Estadística descriptiva de la pérdida de masas del poliestireno expandido

		Media	Media (5%)	Mediana	Varianza	Mínimo	Máximo
biodegradación_15	4°C	0.99	0.9756	0.86	0.637	0.16	2.08
	T° ambiente	2.595	2.5944	2.59	0.012	2.48	2.73
	37°C	1.6125	1.6117	1.605	0.037	1.39	1.85
biodegradación_30	4°C	0.685	0.6633	0.49	0.566	0.05	1.71
	T° ambiente	7.195	7.1533	6.82	27.746	2.61	12.53
	37°C	1.6	1.5978	1.58	0.05	1.35	1.89
biodegradación_45	4°C	1.2325	1.31	1.995	4.059	-1.68	2.61
	T° ambiente	0.76	0.725	0.445	1.754	-0.45	2.6
	37°C	1.195	1.0689	0.06	73.808	-7.89	12.55
	4°C	9.12	9.0694	8.665	1.222	8.39	10.76

<<continuación>>

biodegradación_60	T° ambiente	1.0625	1.1011	1.41	12.117	-3.36	4.8
	37°C	4.33	4.455	5.455	172.734	-12.64	19.05

Tabla 13: Pruebas de normalidad de la pérdida de masa.

	T°	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Día_15	4°C	.304	4	.	.921	4	.543
	T°Ambiente	.339	4	.	.865	4	.280
	37°C	.335	4	.	.772	4	.061
Día_30	4°C	.240	4	.	.901	4	.436
	T°Ambiente	.302	4	.	.802	4	.106
	37°C	.359	4	.	.772	4	.060
Día_45	4°C	.287	4	.	.809	4	.118
	T°Ambiente	.251	4	.	.917	4	.518
	37°C	.197	4	.	.986	4	.936
Día_60	4°C	.380	4	.	.767	4	.055
	T°Ambiente	.171	4	.	.982	4	.916
	37°C	.235	4	.	.970	4	.839

En la Tabla 13 nos muestra la normalidad de la pérdida de masas del poliestireno expandido la prueba Shapiro Willk indica que se cumple el supuesto de normalidad para todos los casos con un p valor mayor a 0.05, por el cual se rechaza la hipótesis nula.

Tabla 14: Prueba de esfericidad de Maucly de pérdida de pesos

Efecto intra-sujetos	W de Mauchly	Aprox. Chi-cuadrado	gl	Sig.	Épsilon ^b		
					Greenhouse -Geisser	Huynh-Feldt	Límite inferior
tiempo_día	.004	56.480	9	.000	.465	.776	.250

La Tabla 14, muestra el supuesto de esfericidad de Mauchly no cumple con W de Mauchly 0.004; gl 9; con un p menor a 0.05. Por consiguiente, se puede utilizar para ajustar los grados de libertad para las pruebas promedio de significación de Huynh-feldt de pruebas de efectos intra-sujetos.

Tabla 15: Pruebas de efectos intra-sujetos de pérdida de pesos.

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta parcial	Parámetro sin centralidad	Potencia observada ^a	
tiempo_día	Huynh-Feldt	.222	3.103	.072	40.770	.00	.773	126.522	1.000
tiempo_día * T°	Huynh-Feldt	.031	6.207	.005	2.882	.02	.324	17.886	.841
tiempo_día * <i>Pseudomonas</i>	Huynh-Feldt	.006	3.103	.002	1.043	.38	.080	3.236	.264
tiempo_día * T° * <i>Pseudomonas</i>	Huynh-Feldt	.008	6.207	.001	.707	.65	.105	4.388	.248
Error(tiempo_día)	Huynh-Feldt	.065	37.240	.002					

FUENTE: Análisis Anova de diseño mixto de medidas repetidas de pesos IBM SPSS 25 Statistics.

En la Tabla 15 mediante la prueba de Huynh-feldt indica que existe diferencias significativas del factor tiempo en la variable pérdida de peso con $F(3.103, 37.24) = 40.770$; p menor a 0.05, $n^2=0.773$), los factores tiempo y temperatura en la variable pérdida de pesos $F(6.207, 37.24) = 2.882$; p menor a 0.05, $n^2=0.324$). También indica que la diferencia no es significativa con las interacciones de los factores Tiempo \times Temperatura \times casos de *Pseudomonas* en la variable pérdida de pesos $F(6.207, 37.24) = 0.707$; p mayor a 0.05, $n^2=0.105$).

Tabla 16: Comparaciones por parejas de las pérdidas de pesos considerando los factores temperatura a 4°C con ausencia y presencia de *Pseudomonas*.

	(I) tiempo	(J) tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig. ^b	95% de intervalo de confianza para diferencia ^b	
						Límite inferior	Límite superior
Con <i>Pseudomonas</i>	1	2	-.011*	.002	.002	-.018	-.004
		3	-.007	.013	1.000	-.053	.038
	2	4	-.007	.022	1.000	-.083	.070
		5	-.213*	.035	.001	-.334	-.091
		1	.011*	.002	.002	.004	.018
Sin <i>Pseudomonas</i>	2	3	.004	.013	1.000	-.042	.049
		4	.004	.023	1.000	-.074	.082
	3	5	-.202*	.036	.001	-.325	-.079
		1	.007	.013	1.000	-.038	.053
		2	-.004	.013	1.000	-.049	.042
3	4	.001	.027	1.000	-.091	.093	
	5	-.205*	.036	.001	-.328	-.083	

<<continuación>>

	4	1	.007	.022	1.000	-.070	.083
		2	-.004	.023	1.000	-.082	.074
		3	-.001	.027	1.000	-.093	.091
		5	-.206*	.030	.000	-.309	-.103
	5	1	.213*	.035	.001	.091	.334
		2	.202*	.036	.001	.079	.325
		3	.205*	.036	.001	.083	.328
		4	.206*	.030	.000	.103	.309
Sin	1	2	-.001	.003	1.000	-.011	.009
<i>Pseudomonas</i>		3	-.001	.019	1.000	-.065	.064
		4	.006	.032	1.000	-.103	.114
		5	-.122	.050	.322	-.294	.051
	2	1	.001	.003	1.000	-.009	.011
		3	.001	.019	1.000	-.063	.064
		4	.007	.032	1.000	-.103	.117
		5	-.121	.051	.351	-.295	.054
	3	1	.001	.019	1.000	-.064	.065
		2	-.001	.019	1.000	-.064	.063
		4	.006	.038	1.000	-.124	.136
		5	-.121	.050	.335	-.294	.052
	4	1	-.006	.032	1.000	-.114	.103
		2	-.007	.032	1.000	-.117	.103
		3	-.006	.038	1.000	-.136	.124
		5	-.127	.043	.113	-.273	.019
	5	1	.122	.050	.322	-.051	.294
		2	.121	.051	.351	-.054	.295
		3	.121	.050	.335	-.052	.294
		4	.127	.043	.113	-.019	.273

FUENTE: Análisis Anova de diseño mixto de medidas repetidas de pesos IBM SPSS 25 Statistics

Tabla 17: Comparaciones por parejas de las pérdidas de pesos considerando los factores temperatura ambiente en ausencia y presencia de *Pseudomonas*.

<i>Pseudomonas</i>	(I) tiempo_d ía	(J) tiempo _día	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig. ^b	95% de intervalo de confianza para diferencia ^b	
						Límite inferior	Límite superior
con <i>Pseudomonas</i>		2	-.026*	.002	.000	-.034	-.019
	1	3	-.072*	.013	.002	-.117	-.026
		4	-.007	.022	1.000	-.083	.070

<<continuación>>

		5	-.184*	.035	.002	-.305	-.062
		1	.026*	.002	.000	.019	.034
	2	3	-.045*	.013	.049	-.090	.000
		4	.020	.023	1.000	-.058	.098
		5	-.157*	.036	.009	-.280	-.034
		1	.072*	.013	.002	.026	.117
	3	2	.045*	.013	.049	.000	.090
		4	.065	.027	.326	-.027	.157
		5	-.112	.036	.085	-.234	.010
		1	.007	.022	1.000	-.070	.083
	4	2	-.020	.023	1.000	-.098	.058
		3	-.065	.027	.326	-.157	.027
		5	-.177*	.030	.001	-.280	-.074
		1	.184*	.035	.002	.062	.305
	5	2	.157*	.036	.009	.034	.280
		3	.112	.036	.085	-.010	.234
		4	.177*	.030	.001	.074	.280
		2	-.001	.003	1.000	-.011	.010
	1	3	.000	.019	1.000	-.064	.065
		4	.001	.032	1.000	-.108	.109
		5	-.173*	.050	.048	-.345	-.001
		1	.001	.003	1.000	-.010	.011
	2	3	.001	.019	1.000	-.063	.065
		4	.001	.032	1.000	-.109	.111
		5	-.173	.051	.053	-.347	.002
		1	.000	.019	1.000	-.065	.064
sin	3	2	-.001	.019	1.000	-.065	.063
<i>Pseudomonas</i>		4	.001	.038	1.000	-.130	.131
		5	-.173*	.050	.049	-.346	.000
		1	-.001	.032	1.000	-.109	.108
	4	2	-.001	.032	1.000	-.111	.109
		3	-.001	.038	1.000	-.131	.130
		5	-.174*	.043	.015	-.320	-.028
		1	.173*	.050	.048	.001	.345
	5	2	.173	.051	.053	-.002	.347
		3	.173*	.050	.049	.000	.346
		4	.174*	.043	.015	.028	.320

FUENTE: Análisis anova de diseño mixto de medidas repetidas de pesos IBM SPSS 25 Statistics

Tabla 18: Comparaciones por parejas de las pérdidas de pesos considerando los factores temperatura a 37°C en ausencia y presencia de *Pseudomonas*.

<i>Pseudomonas</i>	(I) tiempo _día	(J) tiempo _día	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig. ^b	95% de intervalo de confianza para diferencia ^b	
						Límite inferior	Límite superior
Con <i>Pseudomonas</i>	1	2	-.015*	.002	.000	-.022	-.008
		3	-.015	.013	1.000	-.060	.031
		4	-.010	.022	1.000	-.087	.066
		5	-.090	.035	.265	-.211	.032
	2	1	.015*	.002	.000	.008	.022
		3	.000	.013	1.000	-.045	.045
		4	.005	.023	1.000	-.073	.082
	3	5	-.075	.036	.595	-.198	.048
		1	.015	.013	1.000	-.031	.060
		2	.000	.013	1.000	-.045	.045
		4	.004	.027	1.000	-.088	.096
	4	5	-.075	.036	.574	-.197	.047
		1	.010	.022	1.000	-.066	.087
		2	-.005	.023	1.000	-.082	.073
		3	-.004	.027	1.000	-.096	.088
	5	5	-.079	.030	.218	-.183	.024
		1	.090	.035	.265	-.032	.211
		2	.075	.036	.595	-.048	.198
		3	.075	.036	.574	-.047	.197
	Sin <i>Pseudomonas</i>	1	4	.079	.030	.218	-.024
2			.001	.003	1.000	-.009	.011
3			.001	.019	1.000	-.063	.066
4			.002	.032	1.000	-.107	.110
5		-.046	.050	1.000	-.219	.126	
2	1	-.001	.003	1.000	-.011	.009	
	3	.000	.019	1.000	-.064	.064	
	4	.000	.032	1.000	-.110	.111	
3	5	-.048	.051	1.000	-.222	.127	
	1	-.001	.019	1.000	-.066	.063	
	2	.000	.019	1.000	-.064	.064	
4	4	.000	.038	1.000	-.130	.130	
	5	-.048	.050	1.000	-.221	.125	
	1	-.002	.032	1.000	-.110	.107	
	2	.000	.032	1.000	-.111	.110	

<<continuación>>

		3	.000	.038	1.000	-.130	.130
		5	-.048	.043	1.000	-.194	.098
		1	.046	.050	1.000	-.126	.219
	5	2	.048	.051	1.000	-.127	.222
		3	.048	.050	1.000	-.125	.221
		4	.048	.043	1.000	-.098	.194

FUENTE: Análisis anova de diseño mixto de medidas repetidas de pesos IBM SPSS 25 Statistics

La Tabla 18 muestra que considerando los factores tiempos, temperatura de 37°C en los casos **con Pseudomonas** es estadísticamente significativa para la pérdida de pesos de los días 15 y 0, $p(0.000) < 0.05$, diferencia de medias (I-J) = 0.15, todos los pares a esta temperatura no estadísticamente significativa, en los casos **sin Pseudomonas** no son estadísticamente significativas para la pérdida de pesos en todos los pares, $p(1.00) < 0.05$.

Tabla 19: Prueba de supuestos de la pérdida de pesos al día 15

Prueba de esfericidad de Mauchly							
Efecto intra-sujetos	W de Mauchly	Aprox. Chi-cuadrado	gl	Sig.	Greenhouse-Geisser	Épsilon ^b Huynh-Feldt	Límite inferior
Abs_tiempo	1.000	0.000	0	.000	1.000	1.000	1.000
Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error ^a							
		Estadístico de Levene		de gl1	gl2	Sig.	
peso_dia0	Se basa en la media			17,668	5	12	,000
peso_dia15	Se basa en la media			13,289	5	12	,000

FUENTE: Análisis anova de diseño mixto de medidas repetidas de pesos IBM SPSS 25 Statistics.

Se observa en la Tabla 19, el supuesto de esfericidad de Mauchly no cumple con W de Mauchly 1; gl 9; con un p menor a 0.05. Por consiguiente, se puede utilizar para ajustar los grados de libertad para las pruebas promedio de significación de Huynh-feldt de pruebas de efectos intra-sujetos, La prueba de Levene para igualdad de varianzas indica que se cumple este supuesto basándose en la mediana (F entre 17.668 y 13.289, con gl1 de 5; gl2 de 12, con p menor a 0.05).

Tabla 20: Pruebas de efectos intra-sujetos de pérdida de pesos al día 15.

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro sin centralidad	Potencia observada ^a	
tiempo_día	Huynh-Feldt	.001	1	.001	71.675	.000	.857	71.675	1.000
tiempo_día * T°	Huynh-Feldt	9.020E-5	2	4.510E-5	5.203	.024	.464	10.406	.720
tiempo_día * Pseudomonas	Huynh-Feldt	.001	1	.001	69.256	.000	.852	69.256	1.000

<<continuación>>

tiempo_día									
* T° *	Huynh-	8.731E-5	2	4.365E-5	5.036	.026	.456	10.072	.705
<i>Pseudomonas</i>	Feldt								
Error(tiempo_día)	Huynh-	.000	12	8.668E-6					
	Feldt								

FUENTE: Análisis anova de diseño mixto de medidas repetidas de pesos IBM SPSS 25 Statistics.

En la Tabla 20, mediante la prueba de Huynh-feldt indica que existe diferencias significativas del factor tiempo en la variable pérdida de peso con $F(1,12) = 71.675$; $p < 0.05$, $n^2 = 0.857$, los factores tiempo y temperatura en la variable pérdida de pesos $F(2, 12) = 5.203$; $p < 0.05$, $n^2 = 0.464$. También indica que la diferencia es significativa con las interacciones de los factores tiempo \times temperatura \times casos de *Pseudomonas* en la variable pérdida de pesos $F(2, 12) = 5.036$; $p(0.026) < 0.05$, $n^2 = 0.705$, por lo que aceptamos la hipótesis alterna y rechazamos la hipótesis nula.

Tabla 21: Pruebas de efectos inter-sujetos de la variable pérdida de masa hasta el día 15

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro sin centralidad	Potencia observada ^a
Intersección	30.2	1	30.2	5410.87	.000	.998	5410.871	1.000
T°	.001	2	.001	0.132	.877	.022	.265	.066
<i>Pseudomonas</i>	.006	1	.006	1.065	.323	.081	1.065	.158
T° * <i>Pseudomonas</i>	.002	2	.001	0.171	.845	.028	.343	.071
Error	.067	12	.006					

FUENTE: Análisis anova de diseño mixto de medidas repetidas de pesos IBM SPSS 25 Statistics

La Tabla 21 muestra que por los efectos inter sujetos se identificó que la diferencia no es significativa del factor temperatura en las pérdida de peso $F(2,12) = 0.132$; $p > 0.05$; $n^2 = 0.022$, además se identificó que la diferencia no es significativa del factor casos de *Pseudomonas* en la variable pérdida de peso $F(1,12) = 1.065$ con $p > 0.05$; $n^2 = 0.081$. Existe un interacción significativa de los factores temperatura**Pseudomonas* en la variable pérdida de peso, $F(2,12) = 0.171$; $p > 0.05$; $n^2 = 0.028$.

ANEXO 3: Tablas y análisis estadístico de los resultados del crecimiento bacteriano en medio mínimo de sales.

Tabla 22: Resultados de la lectura de absorbancias a temperatura de 4°C.

Muestras	Repeticiones	Día 0	Día 15	Día 30	Día 45	Día 60
Sin <i>Pseudomonas</i> Sin poliestireno	R-1	0.431	0.431	0.435	0.434	0.434
	R-2	0.439	0.439	0.440	0.439	0.440
	R-3	0.433	0.433	0.435	0.434	0.435
Sin poliestireno Con <i>Pseudomonas</i>	R-1	2.323	2.441	2.510	2.596	2.599
	R-2	2.370	2.460	2.500	2.529	2.552
	R-3	2.319	2.431	2.510	2.564	2.567
Con poliestireno Sin <i>Pseudomonas</i>	R-1	0.664	0.669	0.630	0.644	0.620
	R-2	0.660	0.663	0.628	0.659	0.621
	R-3	0.665	0.666	0.628	0.660	0.644
Con <i>Pseudomonas</i> Con poliestireno	R-1	2.465	2.669	2.841	2.875	2.881
	R-2	2.351	2.640	2.750	2.762	2.769
	R-3	2.424	2.650	2.788	2.816	2.825

Tabla 23: Resultado de lectura de absorbancias a temperatura ambiente.

Muestras	Repeticiones	Día 0	Día 15	Día 30	Día 45	Día 60
Sin <i>Pseudomonas</i> Sin poliestireno	R-1	0.431	0.431	0.431	0.430	0.430
	R-2	0.439	0.439	0.439	0.435	0.439
	R-3	0.433	0.433	0.433	0.430	0.433
Sin poliestireno Con <i>Pseudomonas</i>	R-1	2.323	2.460	2.585	2.624	2.765
	R-2	2.370	2.427	2.597	2.680	2.776
	R-3	2.319	2.324	2.585	2.669	2.680
Con poliestireno Sin <i>Pseudomonas</i>	R-1	0.664	0.642	0.650	0.656	0.643
	R-2	0.660	0.657	0.653	0.653	0.640
	R-3	0.665	0.675	0.672	0.638	0.642
Con poliestireno Con <i>Pseudomonas</i>	R-1	2.465	2.627	2.733	2.755	2.876
	R-2	2.351	2.580	2.654	2.776	2.900
	R-3	2.424	2.592	2.781	2.849	2.923

Tabla 24: Resultados de Absorbancias a temperatura de 37 °C.

Muestras	Repeticiones	Día 0	Día 15	Día 30	Día 45	Día 60
Sin <i>Pseudomonas</i> Sin poliestireno	R-1	0.431	0.433	0.433	0.434	0.434
	R-2	0.439	0.439	0.439	0.439	0.439
	R-3	0.433	0.436	0.436	0.436	0.436
Con <i>Pseudomonas</i> Sin poliestireno	R-1	2.323	2.461	2.622	2.772	2.821
	R-2	2.370	2.531	2.614	2.775	2.824
	R-3	2.319	2.436	2.603	2.732	2.810
Sin <i>Pseudomonas</i>	R-1	0.664	0.661	0.655	0.655	0.655

<<continuación>>

Con poliestireno	R-2	0.660	0.662	0.671	0.673	0.690
	R-3	0.665	0.663	0.661	0.663	0.663
	R-1	2.465	2.803	2.822	3.159	3.344
Con <i>Pseudomonas</i> Con poliestireno	R-2	2.351	2.765	2.799	3.145	3.349
	R-3	2.424	2.665	2.800	3.041	3.317

Tabla 25: Estadísticos descriptivos de Absorbancias

		Media	Mediana	Varianza	Mínimo	Máximo	Desv. Desviación
Abs_0	con <i>Pseudomonas</i> con poliestireno						
	4°C	2.4133	2.4240	0.003	2.35	2.47	0.05774
	T° ambiente	2.4133	2.4240	0.003	2.35	2.47	0.05774
Abs_15	37°C	2.4133	2.4240	0.003	2.35	2.47	0.05774
	4°C	2.6530	2.6500	0.000	2.64	2.67	0.01473
	T° ambiente	2.5997	2.5920	0.001	2.58	2.63	0.02442
Abs_30	37°C	2.7443	2.7650	0.005	2.67	2.80	0.07128
	4°C	2.7930	2.7880	0.002	2.75	2.84	0.04571
	T° ambiente	2.7227	2.7330	0.004	2.65	2.78	0.06413
Abs_45	37°C	2.8070	2.800	0.000	2.80	2.82	0.01300
	4°C	2.8177	2.8160	0.003	2.76	2.88	0.05652
	T° ambiente	2.7933	2.7760	0.002	2.76	2.85	0.04934
Abs_60	37°C	3.1150	3.1450	0.004	3.04	3.16	0.06447
	4°C	2.8250	2.8250	0.003	2.77	2.88	0.05600
	T° ambiente	2.9330	2.9230	0.002	2.90	2.98	0.03897
	37°C	3.3033	3.3170	0.002	3.25	3.34	0.04895

Tabla 26: Prueba de normalidad de absorbancias

	<i>Pseudomonas</i>	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	Gl	Sig.
Día 15	sin poliestireno						
	sin <i>Pseudomonas</i>	.466	9	.000	.570	9	.000
	sin poliestireno						
	con <i>Pseudomonas</i>	.234	9	.167	.904	9	.273
	con poliestireno						
	sin <i>Pseudomonas</i>	.300	9	.019	.832	9	.047
Día 30	con poliestireno						
	con <i>Pseudomonas</i>	.222	9	.200*	.914	9	.345
	sin poliestireno						
	sin <i>Pseudomonas</i>	.257	9	.087	.851	9	.077
	sin poliestireno						
	con <i>Pseudomonas</i>	.153	9	.200*	.945	9	.638

<<continuación>>

	con poliestireno sin <i>Pseudomonas</i>	.190	9	.200*	.917	9	.370
	con poliestireno con <i>Pseudomonas</i>	.248	9	.117	.946	9	.645
	sin poliestireno sin <i>Pseudomonas</i>	.192	9	.200*	.903	9	.270
	sin poliestireno con <i>Pseudomonas</i>	.148	9	.200*	.970	9	.896
Día 45	con poliestireno sin <i>Pseudomonas</i>	.220	9	.200*	.949	9	.676
	con poliestireno con <i>Pseudomonas</i>	.331	9	.005	.866	9	.110
	sin poliestireno sin <i>Pseudomonas</i>	.206	9	.200*	.923	9	.421
	sin poliestireno con <i>Pseudomonas</i>	.220	9	.200*	.888	9	.191
Día 60	con poliestireno sin <i>Pseudomonas</i>	.178	9	.200*	.879	9	.152
	con poliestireno con <i>Pseudomonas</i>	.246	9	.123	.853	9	.081

FUENTE: Análisis anova de diseño mixto de medidas repetidas de absorbancias IBM SPSS 25 Statistics.

En la Tabla 26, se muestra la prueba Shapiro willk indica que se cumple el supuesto de normalidad para casos sin *Pseudomonas* sin *Pseudomonas* y con *Pseudomonas* presenta en las absorbancias de casos sin poliestireno y sin *Pseudomonas* presentan un p valor menor 0.05 y en los demás casos presentan un p valor mayor a 0.05, por el cual se acepta la hipótesis nula.

Tabla 27: Prueba de esfericidad de Mauchly

Efecto intra-sujetos	W de Mauchly	Aprox. Chi-cuadrado	gl	Sig.	Greenhouse-Geisser	Épsilon ^b Huynh-Feldt	Límite inferior
Abs_tiempo	.189	37.287	9	.000	.635	1.000	.250

FUENTE: Análisis anova de diseño mixto de medidas repetidas de absorbancias IBM SPSS 25 Statistics.

La Tabla 27 muestra la prueba de supuestos: El supuesto de esfericidad de Mauchly no cumple con W de Mauchly .189; gl 9; con un p menor a 0.05. La prueba de Levenne para igualdad de varianzas indica que se cumple este supuesto basándose en la mediana (F entre 1.002 y 2.211, con gl1 de 11; gl2 de 24, con p menor a 0.05).

Tabla 28: Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error (a).

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Absorbancias día 0	Se basa en la mediana	1.390	11	24	.240
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	1.390	11	10.987	.297
Absorbancias día 15	Se basa en la mediana	1.402	11	24	.235
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	1.402	11	6.517	.344
Absorbancias día 30	Se basa en la mediana	2.211	11	24	.051
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	2.211	11	4.869	.201
Absorbancias día 45	Se basa en la mediana	1.002	11	24	.473
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	1.002	11	7.560	.516
Absorbancias día 60	Se basa en la mediana	1.310	11	24	.278
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	1.310	11	8.029	.358

FUENTE: Análisis anova de diseño mixto de medidas repetidas de absorbancias IBM SPSS 25 Statistics.

Tabla 29: Prueba de efectos intrasujeto.

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro sin centralidad	Potencia observada	
tiempo	Límite inferior	1.313	1	1.313	616.343	.00	.963	616.343	1.00
tiempo * Temperatura	Límite inferior	.162	2	.081	37.955	.00	.760	75.911	1.00
tiempo * <i>Pseudomonas</i>	Límite inferior	1.542	3	.514	241.301	.00	.968	723.902	1.00
tiempo * temperatura * <i>Pseudomonas</i>	Límite inferior	.205	6	.034	16.073	.00	.801	96.438	1.00
Error(tiempo)	Límite inferior	.051	24	.002					

FUENTE: Análisis anova de diseño mixto de medidas repetidas de absorbancias IBM SPSS 25 Statistics

Según la Tabla 29, se observa que existe diferencias significativas en el factor tiempo en la variable absorbancia (F 616.343; p menor a 0.05, $n^2=0.963$), los factores tiempo y temperatura en la variable absorbancias F (2,24)=37.955; p menor a 0.05, $n^2=0.76$), existe diferencias significativas de acuerdo con las interacciones de

los factores tiempo y casos de *Pseudomonas* en la variable absorbancias F (3,24)=241.301; p menor a 0.05, $n^2=0.968$). Además muestra, los efectos intra-sujetos, la prueba límite inferior indica que existe diferencias significativas con las interacciones de los factores Tiempo \times Temperatura \times casos de *Pseudomonas* en la variable absorbancia F (6,24)= 16.073; p menor a 0.05, $n^2=0.801$).

Tabla 30: Prueba de efectos inter-sujetos.

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro sin centralidad	Potencia observada ^a
Intersección	459.524	1	459.524	178327.836	.000	1.000	178327.836	1.000
Temperatura	.202	2	.101	39.107	.000	.765	78.213	1.000
<i>Pseudomonas</i>	201.709	3	67.236	26092.395	.000	1.000	78277.184	1.000
Temperatura * <i>Pseudomonas</i>	.226	6	.038	14.589	.000	.785	87.534	1.000
Error	.062	24	.003					

FUENTE: Análisis anova de diseño mixto de medidas repetidas de absorbancias IBM SPSS 25 Statistics.

La Tabla 30, muestra a los efectos inter sujetos se identificó que: existe diferencias significativas del factor temperatura en las absorbancias F (2,24) =39.107; p menor a 0.05; $n^2=0.765$. Existe diferencias significativas del factor casos de *Pseudomonas* en las absorbancias F (3,24) =26092.395; p menor a 0.005; $n^2= 1.0$. Existe una interacción significativa de los factores temperatura**Pseudomonas* en la variable absorbancia F (6,24) =14.589, p menor a 0.05; $n^2=0.785$.

Tabla 31: Comparaciones por parejas a 4°C.

	(I) Abs_t tiempo	(J) Abs_tie mpo	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	95% de intervalo de confianza para diferencia ^b	
						Límite inferior	Límite superior
	1	2	2.220E-16	.021	1.000	-.066	.066
		3	-.002	.014	1.000	-.046	.042
		4	-.001	.023	1.000	-.073	.070
		5	-.002	.010	1.000	-.032	.028
Sin poliestireno	2	1	-2.220E-16	.021	1.000	-.066	.066
		3	-.002	.021	1.000	-.067	.063
		4	-.001	.023	1.000	-.071	.069
Sin <i>Pseudomonas</i>	3	5	-.002	.018	1.000	-.057	.053
		1	.002	.014	1.000	-.042	.046
		2	.002	.021	1.000	-.063	.067
	4	4	.001	.015	1.000	-.046	.048
		5	.000	.016	1.000	-.048	.048
		1	.001	.023	1.000	-.070	.073
	2	.001	.023	1.000	-.069	.071	

<<continuación>>

		3	-0.001	.015	1.000	-.048	.046
		5	-.001	.023	1.000	-.072	.071
		1	.002	.010	1.000	-.028	.032
	5	2	.002	.018	1.000	-.053	.057
		3	.000	.016	1.000	-.048	.048
		4	.001	.023	1.000	-.071	.072
		2	-.107*	.021	.000	-.172	-.041
	1	3	-.169*	.014	.000	-.213	-.125
		4	-.226*	.023	.000	-.297	-.154
		5	-.249*	.010	.000	-.278	-.219
		1	.107*	.021	.000	.041	.172
	2	3	-.063	.021	.066	-.128	.002
		4	-.119*	.023	.000	-.189	-.049
		5	-.142*	.018	.000	-.197	-.087
Sin		1	.169*	.014	.000	.125	.213
poliestireno		2	.063	.021	.066	-.002	.128
Con	3	4	-.056*	.015	.011	-.103	-.009
<i>Pseudomonas</i>		5	-.079*	.016	.000	-.127	-.031
		1	.226*	.023	.000	.154	.297
	4	2	.119*	.023	.000	.049	.189
		3	.056*	.015	.011	.009	.103
		5	-.023	.023	1.000	-.094	.048
		1	.249*	.010	.000	.219	.278
	5	2	.142*	.018	.000	.087	.197
		3	.079*	.016	.000	.031	.127
		4	.023	.023	1.000	-.048	.094
		2	-.003	.021	1.000	-.069	.063
	1	3	.034	.014	.239	-.010	.078
		4	.009	.023	1.000	-.063	.080
		5	.041*	.010	.002	.012	.071
		1	.003	.021	1.000	-.063	.069
Con	2	3	.037	.021	.891	-.028	.102
poliestireno		4	.012	.023	1.000	-.058	.082
		5	.044	.018	.191	-.010	.099
Sin		1	-.034	.014	.239	-.078	.010
<i>Pseudomonas</i>	3	2	-.037	.021	.891	-.102	.028
		4	-.026	.015	1.000	-.073	.021
		5	.007	.016	1.000	-.041	.055
		1	-.009	.023	1.000	-.080	.063
	4	2	-.012	.023	1.000	-.082	.058
		3	.026	.015	1.000	-.021	.073
		5	.033	.023	1.000	-.039	.104

<<continuación>>

		1	-.041*	.010	.002	-.071	-.012
	5	2	-.044	.018	.191	-.099	.010
		3	-.007	.016	1.000	-.055	.041
		4	-.033	.023	1.000	-.104	.039
		2	-.240*	.021	.000	-.305	-.174
	1	3	-.380*	.014	.000	-.424	-.336
		4	-.404*	.023	.000	-.476	-.333
		5	-.412*	.010	.000	-.441	-.382
		1	.240*	.021	.000	.174	.305
	2	3	-.140*	.021	.000	-.205	-.075
		4	-.165*	.023	.000	-.235	-.095
		5	-.172*	.018	.000	-.227	-.117
Con		1	.380*	.014	.000	.336	.424
poliestireno -		2	.140*	.021	.000	.075	.205
Con	3	4	-.025	.015	1.000	-.072	.022
<i>Pseudomonas</i>		5	-.032	.016	.510	-.080	.016
		1	.404*	.023	.000	.333	.476
	4	2	.165*	.023	.000	.095	.235
		3	.025	.015	1.000	-.022	.072
		5	-.007	.023	1.000	-.079	.064
		1	.412*	.010	.000	.382	.441
	5	2	.172*	.018	.000	.117	.227
		3	.032	.016	.510	-.016	.080
		4	.007	.023	1.000	-.064	.079

FUENTE: Análisis anova de diseño mixto de medidas repetidas de absorbancias IBM SPSS 25 Statistics.

Tabla 32: Comparaciones por parejas a temperatura ambiente.

<i>Pseudomonas</i>	(I) Abs_tiempo	(J) Abs_tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig. ^b	95% de intervalo de confianza para diferencia ^b		
						Límite inferior	Límite superior	
Sin poliestireno - Sin <i>Pseudomonas</i>	1	2	2.220E-16	.021	1.000	-.066	.066	
		3	-8.882E-16	.014	1.000	-.044	.044	
		4	.003	.023	1.000	-.069	.074	
		5	.000	.010	1.000	-.029	.030	
		2	1	-2.220E-16	.021	1.000	-.066	.066
Sin poliestireno - Sin <i>Pseudomonas</i>	2	3	-1.110E-15	.021	1.000	-.065	.065	
		4	.003	.023	1.000	-.067	.073	
		5	.000	.018	1.000	-.054	.055	
		3	1	8.882E-16	.014	1.000	-.044	.044
		2	1.110E-15	.021	1.000	-.065	.065	

<<continuación>>

		4	.003	.015	1.000	-.044	.050
		5	.000	.016	1.000	-.048	.048
	4	1	-.003	.023	1.000	-.074	.069
		2	-.003	.023	1.000	-.073	.067
		3	-.003	.015	1.000	-.050	.044
		5	-.002	.023	1.000	-.074	.069
	5	1	.000	.010	1.000	-.030	.029
		2	.000	.018	1.000	-.055	.054
		3	.000	.016	1.000	-.048	.048
		4	.002	.023	1.000	-.069	.074
	1	2	-.066*	.021	.046	-.132	-.001
		3	-.252*	.014	.000	-.296	-.208
		4	-.320*	.023	.000	-.392	-.249
		5	-.403*	.010	.000	-.433	-.373
	2	1	.066*	.021	.046	.001	.132
		3	-.185*	.021	.000	-.250	-.120
		4	-.254*	.023	.000	-.324	-.184
		5	-.337*	.018	.000	-.391	-.282
	3	1	.252*	.014	.000	.208	.296
Sin poliestireno -		2	.185*	.021	.000	.120	.250
Con <i>Pseudomonas</i>		4	-.069*	.015	.001	-.116	-.022
		5	-.151*	.016	.000	-.199	-.103
	4	1	.320*	.023	.000	.249	.392
		2	.254*	.023	.000	.184	.324
		3	.069*	.015	.001	.022	.116
		5	-.083*	.023	.015	-.154	-.011
	5	1	.403*	.010	.000	.373	.433
		2	.337*	.018	.000	.282	.391
		3	.151*	.016	.000	.103	.199
		4	.083*	.023	.015	.011	.154
	1	2	.005	.021	1.000	-.061	.071
		3	.005	.014	1.000	-.039	.049
		4	.014	.023	1.000	-.057	.085
		5	.021	.010	.355	-.008	.051
	2	1	-.005	.021	1.000	-.071	.061
Con poliestireno -		3	.000	.021	1.000	-.065	.065
Sin <i>Pseudomonas</i>		4	.009	.023	1.000	-.061	.079
		5	.016	.018	1.000	-.038	.071
	3	1	-.005	.014	1.000	-.049	.039
		2	.000	.021	1.000	-.065	.065
		4	.009	.015	1.000	-.038	.056
		5	.017	.016	1.000	-.031	.065

<<continuación>>

Con poliestireno - Con <i>Pseudomonas</i>	4	1	-.014	.023	1.000	-.085	.057
		2	-.009	.023	1.000	-.079	.061
		3	-.009	.015	1.000	-.056	.038
		5	.007	.023	1.000	-.064	.079
	5	1	-.021	.010	.355	-.051	.008
		2	-.016	.018	1.000	-.071	.038
		3	-.017	.016	1.000	-.065	.031
		4	-.007	.023	1.000	-.079	.064
	1	2	-.186*	.021	.000	-.252	-.121
		3	-.309*	.014	.000	-.353	-.265
		4	-.380*	.023	.000	-.451	-.309
		5	-.520*	.010	.000	-.549	-.490
		2	.186*	.021	.000	.121	.252
	2	3	-.123*	.021	.000	-.188	-.058
		4	-.194*	.023	.000	-.264	-.124
		5	-.333*	.018	.000	-.388	-.279
		3	.309*	.014	.000	.265	.353
		2	.123*	.021	.000	.058	.188
	3	4	-.071*	.015	.001	-.118	-.024
		5	-.210*	.016	.000	-.258	-.162
4		.380*	.023	.000	.309	.451	
2		.194*	.023	.000	.124	.264	
3		.071*	.015	.001	.024	.118	
4	5	-.140*	.023	.000	-.211	-.068	
	5	.520*	.010	.000	.490	.549	
	2	.333*	.018	.000	.279	.388	
	3	.210*	.016	.000	.162	.258	
	4	.140*	.023	.000	.068	.211	

FUENTE: Análisis anova de diseño mixto de medidas repetidas de absorbancias IBM SPSS 25 Statistics

Tabla 33: Comparaciones por parejas a 37°C.

	(I) Abs_tie mpo	(J) Abs_tiem po	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig. ^b	95% de intervalo de confianza para diferencia ^b	
						Límite inferior	Límite superior
Sin poliestireno - Sin <i>Pseudomonas</i>	1	2	-.002	.021	1.000	-.067	.064
		3	-.002	.014	1.000	-.046	.042
		4	-.002	.023	1.000	-.073	.069
		5	-.001	.010	1.000	-.031	.028
	2	1	.002	.021	1.000	-.064	.067
		3	-1.776E-15	.021	1.000	-.065	.065

<<continuación>>

		4	.000	.023	1.000	-.070	.070
		5	.000	.018	1.000	-.054	.055
		1	.002	.014	1.000	-.042	.046
	3	2	1.776E-15	.021	1.000	-.065	.065
		4	.000	.015	1.000	-.047	.047
		5	.000	.016	1.000	-.048	.048
		1	.002	.023	1.000	-.069	.073
	4	2	.000	.023	1.000	-.070	.070
		3	.000	.015	1.000	-.047	.047
		5	.001	.023	1.000	-.071	.072
		1	.001	.010	1.000	-.028	.031
	5	2	.000	.018	1.000	-.055	.054
		3	.000	.016	1.000	-.048	.048
		4	-.001	.023	1.000	-.072	.071
		2	-.139*	.021	.000	-.204	-.073
	1	3	-.276*	.014	.000	-.320	-.232
		4	-.422*	.023	.000	-.494	-.351
		5	-.491*	.010	.000	-.521	-.461
		1	.139*	.021	.000	.073	.204
	2	3	-.137*	.021	.000	-.202	-.072
		4	-.284*	.023	.000	-.354	-.214
		5	-.352*	.018	.000	-.407	-.298
		1	.276*	.014	.000	.232	.320
Sin poliestireno -	3	2	.137*	.021	.000	.072	.202
Con <i>Pseudomonas</i>		4	-.147*	.015	.000	-.194	-.100
		5	-.215*	.016	.000	-.263	-.167
		1	.422*	.023	.000	.351	.494
	4	2	.284*	.023	.000	.214	.354
		3	.147*	.015	.000	.100	.194
		5	-.069	.023	.065	-.140	.003
		1	.491*	.010	.000	.461	.521
	5	2	.352*	.018	.000	.298	.407
		3	.215*	.016	.000	.167	.263
		4	.069	.023	.065	-.003	.140
Con poliestireno -		2	.001	.021	1.000	-.065	.067
Sin <i>Pseudomonas</i>	1	3	.001	.014	1.000	-.043	.045
		4	-.001	.023	1.000	-.072	.071
		5	.001	.010	1.000	-.028	.031
		1	-.001	.021	1.000	-.067	.065
	2	3	.000	.021	1.000	-.065	.065
		4	-.002	.023	1.000	-.072	.068
		5	.000	.018	1.000	-.054	.055

<<continuación>>

		1	-.001	.014	1.000	-.045	.043
	3	2	.000	.021	1.000	-.065	.065
		4	-.001	.015	1.000	-.048	.046
		5	.001	.016	1.000	-.047	.049
		1	.001	.023	1.000	-.071	.072
	4	2	.002	.023	1.000	-.068	.072
		3	.001	.015	1.000	-.046	.048
		5	.002	.023	1.000	-.069	.073
		1	-.001	.010	1.000	-.031	.028
	5	2	.000	.018	1.000	-.055	.054
		3	-.001	.016	1.000	-.049	.047
		4	-.002	.023	1.000	-.073	.069
		2	-.331*	.021	.000	-.397	-.265
	1	3	-.394*	.014	.000	-.438	-.350
		4	-.702*	.023	.000	-.773	-.630
		5	-.890*	.010	.000	-.920	-.860
		1	.331*	.021	.000	.265	.397
	2	3	-.063	.021	.066	-.128	.002
		4	-.371*	.023	.000	-.441	-.301
		5	-.559*	.018	.000	-.614	-.504
		1	.394*	.014	.000	.350	.438
Con poliestireno -	3	2	.063	.021	.066	-.002	.128
Con <i>Pseudomonas</i>		4	-.308*	.015	.000	-.355	-.261
		5	-.496*	.016	.000	-.544	-.448
		1	.702*	.023	.000	.630	.773
	4	2	.371*	.023	.000	.301	.441
		3	.308*	.015	.000	.261	.355
		5	-.188*	.023	.000	-.260	-.117
		1	.890*	.010	.000	.860	.920
	5	2	.559*	.018	.000	.504	.614
		3	.496*	.016	.000	.448	.544
		4	.188*	.023	.000	.117	.260

FUENTE: Análisis anova de diseño mixto de medidas repetidas de absorbancias IBM SPSS 25 Statistics



CONSTANCIA

El que suscribe. Director General de Laboratorios y Gabinetes de la
UNIVERSIDAD NACIONAL DE JULIACA.

Hace Constar.

Que la bachiller **CONDORI ÁLVAREZ, Karem Candy**. Ha realizado sus ensayos de laboratorio del proyecto de tesis. "**BIODEGRADACIÓN DE POLIESTIRENO EXPANDIDO MEDIANTE PSEUDOMONAS SP AISLADAS DEL BOTADERO DE RESIDUOS SOLIDOS DE LA CIUDAD DE AZÁNGARO**". En las instalaciones del Laboratorio de MICROBIOLOGÍA 401-B en el periodo octubre-diciembre del 2019.

Así consta en los Registros de atención del laboratorio de Biología, a los cuales me remito.

Por lo cual se expide la presente constancia a solicitud de la interesada para los fines que estime por conveniente.

Juliaca 14 de enero del 2021

UNIVERSIDAD NACIONAL DE JULIACA
DIRECCIÓN GENERAL DE LABORATORIOS Y GABINETES

Dr. José Luis Pineda Tapia
DIRECTOR

