

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Arquitectura e Ingenierías Civil y del Ambiente
Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental



**“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DEGRADATIVA DE CAUCHO DE
UN CONSORCIO MICROBIANO NATIVO BAJO CONDICIONES DE
LABORATORIO, AREQUIPA, 2019”**

Tesis presentada por los Bachilleres

Castañeda Alejo, Sarelia Mirey

Málaga Espinoza, Christian Javier

para optar por el Título Profesional de:

Ingeniero Ambiental

Asesor:

Dr. Armando Jacinto Arenazas Rodríguez

Arequipa – Perú

2019

DICTAMEN DEL BORRADOR DE TESIS



Universidad Católica de Santa María

☎ (51 54) 382038 Fax: (51 54) 251213 ✉ ucsm@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe Apartado: 1350

AREQUIPA - PERÚ

FACULTAD DE ARQUITECTURA E INGENIERÍAS CIVIL Y DEL AMBIENTE
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL
INFORME DICTAMEN BORRADOR DE TESIS

VISTO

EL BORRADOR DE TESIS TITULADO:

*Evaluación de la Capacidad Degradativa de Carcho de un Consorcio Microbiano
Nativo bajo condiciones de Laboratorio, Arequipa, 2019*

Presentado por el (los) Bachiller (es):

- *Sarelia Mirey Castañeda Alejo*
- *Christian Javier Málaga Espinoza*

Nuestro DICTAMEN es:

Favorable

OBSERVACIONES:

Ninguna

Arequipa, 29 de Noviembre del 2019

DICTAMINADOR

Dr. Bgo. Armando Brenza R.
Cod. 2828

DICTAMINADOR

M.Sc. Ing. Jishelyn M. Paredes Zava
Cod. Doc. 3043

DICTAMINADOR

P. Ing. Darly Edinson Cordero Pelle
Cod. 7721

Dedicatoria

A Dios por darme la fuerza para continuar en este proceso, a mis padres por su amor incondicional y su apoyo continuo para terminar esta investigación, he tenido el privilegio de ser su hija, a mis hermanas que a pesar de sus bromas siempre creyeron en mí, a mis profesores y amigos por sus consejos y apoyo moral en esta etapa de nuestras vidas y en especial a la Dra. María Rosario Valderrama por todo su apoyo en este proceso.

Sarelia Mirey Castañeda Alejo

A Dios por brindarme la oportunidad para ser mejor todos los días. A mi familia por el apoyo incondicional en cada etapa de mi vida, a mis amigos por el soporte moral, a mis profesores en especial a la Dra. María Rosario Valderrama por su apoyo incondicional y por haberme brindado la oportunidad de iniciar en el mundo de la investigación.

Christian Javier Málaga Espinoza



Esta tesis fue financiada por el Vicerrectorado de Investigación mediante la resolución N° 25180-R-2018 la cual aprueba el desarrollo del Proyecto “Degradación de caucho a través de un consorcio bacteriano nativo mediante el uso de biorreactores”, por lo que la presente tesis es una parte de dicho proyecto.

Agradecimiento

Al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Católica de Santa María por otorgarnos la subvención económica al proyecto presentado al concurso “Fondo de Investigación 2017” mediante el cual se pudo generar la presente tesis.

A la Dra. María Rosario Valderrama Valencia por su apoyo total desde que nos conoció como alumnos hasta ahora, especialmente por sus consejos y guía para iniciar en este mundo de la investigación.

Al Dr. Gonzalo Dávila del Carpio por siempre estar dispuesto a escuchar nuestras inquietudes y brindarnos su apoyo y guía.

Al Dr. Blgo. Armando Arenazas, a la M. Sc. Ing. Joshelyn Paredes y al M. Sc. Ing. Berly Cárdenas por ser más que profesores, nuestros amigos, quienes nos impulsaron a creer en nosotros mismos y en el potencial que aún nos falta por desarrollar.

A la Reencauchadora RELINO S.A. por su apoyo al momento de conseguir insumos para el trabajo de investigación.

Índice

Resumen	i
Abstract	ii
Introducción	iii
Lista de Abreviaturas	v
Capítulo 1. Planteamiento del Problema	1
1.1. Diagnostico situacional	1
1.2. Formulación del Problema	2
1.3. Justificación	2
1.4. Hipótesis	4
1.5. Variables	4
1.6. Objetivos	4
1.6.1. Objetivo General	4
1.6.2. Objetivos Específicos	4
Capítulo 2. FUNDAMENTO TEÓRICO	6
2.1. Marco Legal	6
2.1.1. Marco Legal Nacional	6
2.1.2. Marco Legal Internacional	7
2.2. Marco Teórico	9
2.2.1. Cepas microbianas nativas	9
2.2.2. Biodegradación	9
2.2.2.1. Capacidad Degradativa	10
2.2.3. Parámetros que influyen la biodegradación	10
2.2.4. Polímeros	11
2.2.5. Caucho	11
2.2.6. Tipos de caucho	12
2.2.7. El caucho utilizado en la producción de llantas	14

2.2.8. Condiciones Climáticas de Socabaya	16
2.3. Marco Histórico	16
2.3.1. Descubrimiento del caucho	16
2.3.2. Proceso de vulcanización	17
2.3.3. La explotación del caucho en la Industria	18
2.3.1. Comercialización del caucho	18
2.4. Antecedentes y Estado del Arte	22
2.4.1. Sistemas de Degradación y Recuperación de NFU	23
2.4.2. Métodos Físicoquímicos de degradación de caucho	23
2.4.3. Métodos Biológicos de degradación de caucho	26
2.4.4. Ensayos para la identificación de la degradación	28
2.4.4.1. Análisis con reactivo de Schiff	28
2.4.4.2. Evolución de la respiración microbiana	29
2.4.4.3. Análisis de imágenes de microscopía electrónica de barrido	30
Capítulo 3. METODOLOGÍA	31
3.1. Tipo de Investigación	31
3.2. Campo de verificación	31
3.3. Determinación de la población, muestra y muestreo	31
3.4. Técnicas e instrumentos para la recopilación de datos	32
3.5. Materiales	33
3.5.1. Material de toma de muestra	33
3.5.2. Material de Vidrio	33
3.5.3. Material de laboratorio	33
3.5.4. Reactivos de Laboratorio	34
3.5.5. Equipos	35
3.5.6. Otros	35
3.6. Métodos	36
3.6.1. Aclimatación de microorganismos con potencial biodegradador de caucho	36
3.6.2. Evaluación de la capacidad degradativa de caucho del consorcio microbiano	37

3.6.3. Identificación molecular del consorcio bacteriano capaz de degradar caucho	41
Capítulo 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4.1. Aclimatación de microorganismos con potencial biodegradador de caucho	42
4.2. Evaluación de la capacidad degradativa del consorcio microbiano	51
4.3. Identificación del consorcio bacteriano capaz de degradar caucho	63
Capítulo 5. Conclusiones y Recomendaciones	69
5.1. Conclusiones	69
5.2. Recomendaciones	70
Bibliografía	71
ANEXOS	90

Índice de Tablas

<i>Tabla 1. Variables</i>	4
<i>Tabla 2. Composición de Neumáticos General (Castro, 2008)</i>	15
<i>Tabla 3. Energía de disociación de enlaces dentro de la matriz de caucho (Adhikari, De, & Maiti, 2000)</i>	25
<i>Tabla 4. Conformación de la batería de pruebas</i>	37
<i>Tabla 5. Porcentaje de Biodegradación</i>	55
<i>Tabla 6. Descripción de la acumulación de degradación de caucho</i>	55
<i>Tabla 7. Comparación de porcentaje de degradación</i>	57
<i>Tabla 8. Resumen de bacterias degradadoras de caucho (Chengalroyen & Dabbs, 2013)</i>	58
<i>Tabla 9. Identificación por Órdenes del consorcio de degradación de caucho</i>	64
<i>Tabla 10. Comparación de Cantidad de Componentes para la fabricación de un neumático (Estados Unidos Patente nº US20170152373A1, 2015)</i>	90
<i>Tabla 11. Concentración de las soluciones</i>	97
<i>Tabla 12. Prueba de Respiración Test de Sturm Prueba 1 (A1)</i>	97
<i>Tabla 13. Prueba de Respiración Test de Sturm Blanco 1 (B1)</i>	98
<i>Tabla 14. Prueba de Respiración Test de Sturm Prueba 2 (A2)</i>	98
<i>Tabla 15. Prueba de Respiración Test de Sturm Blanco 2 (B2)</i>	99
<i>Tabla 16. Prueba de Respiración Test de Sturm Prueba 3 (A3)</i>	99
<i>Tabla 17. Prueba de Respiración Test de Sturm Blanco 3 (B3)</i>	100
<i>Tabla 18. Porcentaje de Biodegradación Acumulativo</i>	101

Índice de Figuras

Figura 1. Isómeros cis- y trans- del caucho natural (Rodgers, 2016)	11
Figura 2. Vulcanización del caucho (Kumar & Nijasure, 1997)	17
Figura 3. Cadena productiva del caucho (Departamento Nacional de Planeación, 2004)	19
Figura 4. Consumo mundial de caucho natural y sintético (Statista, 2018)	20
Figura 5. Detalle de las exportaciones a nivel mundial en el año 2018 (AGRODATAPERU, 2018)	21
Figura 6. Importaciones de caucho en el Perú (AGRODATAPERU, 2018)	21
Figura 7. Extrusora para la recuperación de caucho (Seghar, Asaro, Rolland-Monnet, & Ait Hocine, 2019)	24
Figura 8. Ruta de degradación propuesta por Tsuchii, Suzuki y Takeda (1985)	27
Figura 9. Esquema del Test de Sturm (Shah A. A., Hasan, Shah, Mutiullah, & Hameed, 2012)	29
Figura 10. Diagrama de Flujo de métodos y actividades	32
Figura 11. Prueba de Sturm modificada	38
Figura 12. Esquema de disposición de la prueba	39
Figura 13. Ubicación satelital de la zona de muestreo (Fuente: Google Earth)	43
Figura 14. Llanta sumergida en el río Socabaya	43
Figura 15. Fragmentos de caucho recolectado	45
Figura 16. Placa de cultivo inicial	45
Figura 17. Cultivo de la Colonia N°1	47
Figura 18. Cultivo de la Colonia N°2	47
Figura 19. Cultivo de la Colonia N°3	47
Figura 20. Cultivo de la Colonia N°4	47
Figura 21. Cultivo de la Colonia N°5	48
Figura 22. Tinción de gram 100x	48
Figura 23. Tinción de gram 40x	49
Figura 24. Coloración con reactivo de Schiff	50
Figura 25. Formación de aldehídos y cetonas por degradación del caucho (Linh, y otros, 2017)	50
Figura 26. Microorganismos en la cámara de Neubauer	52
Figura 27. Curva de crecimiento microbiano	52
Figura 28. Sistema de aireación	53
Figura 29. Sistema de degradación	54
Figura 30. Curva de biodegradación de caucho	56
Figura 31. Matriz de caucho sin degradar (izq.) matriz degradada en 1 mes (der.) 102X	61
Figura 32. Matriz de caucho sin degradar (izq.) matriz degradada en 1 mes (der.) 1.40 KX	62
Figura 33. Matriz de caucho sin degradar (izq.) matriz degradada en 1 mes (der.) 5.07 KX	62

<i>Figura 34. Clasificación por Especie</i>	65
<i>Figura 35. Alrededores de la zona de muestreo</i>	92
<i>Figura 36. Llanta en desuso de automóvil</i>	92
<i>Figura 37. Llanta en desuso de bicicleta</i>	93
<i>Figura 38. Presencia de larvas en la superficie y grietas de la llanta</i>	93
<i>Figura 39. Pequeñas fracturas en la superficie de la llanta</i>	94
<i>Figura 40. Perfil del sistema de aireación</i>	95
<i>Figura 41. Sistema completo para evolución de CO₂</i>	95
<i>Figura 42. Sistema de evolución de CO₂ funcionando</i>	96



Índice de Ecuaciones

<i>Ecuación 1. Cantidad Teórica de CO₂</i>	39
<i>Ecuación 2. Producción de CO₂</i>	40
<i>Ecuación 3. Porcentaje de Biodegradación</i>	40



Índice de Anexos

<i>Anexo 1. Comparación de Cantidad de Componentes para la fabricación de un neumático</i>	90
<i>Anexo 2. Fotografías de la zona de muestreo</i>	92
<i>Anexo 3. Fotografías del sistema de degradación</i>	95
<i>Anexo 4. Toma de datos para el test de Sturm</i>	97



Resumen

La presente tesis tiene por finalidad demostrar la presencia de microorganismos capaces de utilizar los compuestos de caucho de las llantas. Se utilizó un consorcio de microorganismos nativo aislado del río Socabaya que fue cultivado por un periodo de 7 meses en medio de sales minerales (MSM) cuya única fuente de carbono fueron trozos de caucho sin pretratamiento, se comprobó la degradación positiva mediante el uso del reactivo de Schiff. Seguidamente se procedió a realizar la medición de la producción de CO₂ utilizando trampas de carbono compuestas de Ba(OH) y un análisis de imágenes de microscopía electrónica de barrido a las piezas de caucho antes y después de pasar por el sistema de degradación. Se obtuvo un 5% de degradación luego de 20 días de funcionamiento en el sistema de trampas de CO₂, así mismo se pudo obtener un consorcio bacteriano compuesto en su mayoría por *Delftia tsuruhatensis*.

Palabras Clave: Biodegradación de caucho, consorcio nativo, Test de Sturm, análisis de metagenómica.

Abstract

The purpose of this thesis is to demonstrate the presence of microorganisms capable of using the rubber compounds of the tires. A consortium of native microorganisms isolated from Socabaya River was used, which was cultivated for a period of 7 months in the middle of mineral salts (MSM) whose only source of carbon was pieces of rubber without pretreatment, positive degradation was verified through the use of Schiff's reagent. Next, the CO₂ production was measured using carbon traps composed of Ba(OH) and scanning electron microscopy images to the rubber parts before and after passing through the degradation system. A 5% degradation was obtained after 20 days of operation in the CO₂ trap system, and a bacterial consortium composed mostly of *Delftia tsuruhatensis* could be obtained.

Key Words: Rubber biodegradation, native consortium, Sturm Test, metagenomic analysis.

Introducción

Desde su descubrimiento hasta nuestros días, el caucho se ha vuelto un elemento indispensable para el desarrollo de nuestras vidas. Muchos de los materiales que utilizamos poseen dentro de su composición este material, por ejemplo, zapatos, guantes, vestidos, etc. Durante “la fiebre del caucho”, entre los años 1850 y 1900, en Estados Unidos la demanda incrementó desde 400 a 60000 toneladas aproximadamente (Salazar Paiva, 2014) para el año 2010 la demanda mundial fue de 10700000 toneladas (Warren-Thomas, Dolman, & Edwards, 2015) y se prevé un aumento de 2.8% en el consumo mundial anual desde el año 2017 al 2015 (Aboelkheir, Visconte, Oliveira, Filho, & Souza Jr, 2019). La mayor parte de esta demanda se utiliza en la fabricación de neumáticos, en el 2008 un 60% del caucho producido fue utilizado para su fabricación (Castro, 2008).

Con el desarrollo de la técnica de vulcanización, se le pudo conferir al caucho mayor dureza y durabilidad lo que favorece su uso en la manufactura de llantas, sin embargo el tiempo de vida útil puede ser de 5 a 10 años (Michelin, 2019), y su degradación natural demora entre 300 y 500 años (Marín, 2012), por lo que actualmente se observa un proceso de acumulación sostenida.

Los métodos de eliminación y reciclaje existentes son aún muy costoso y poco amigables con el medio ambiente (Abraham, Cherian, Elbi, Pothen, & Thomas, 2011). Así mismo la mala gestión en su disposición final, ocasiona que el problema se agrave generando contaminación de agua, aire y suelo, y mediante el contacto con residuos orgánicos, resulta en la generación de focos de infección donde las plagas se concentran llegando a afectar la salud de las poblaciones aledañas (Cardona Gómez & Sanchez Montoya, 2011; Resendiz Tejeda, 2007).

A pesar de que existen normas que regulan su disposición final y que ofrecen una opción para su reutilización, estas medidas no son suficientes para hacer frente a los problemas generados por la acumulación de los Neumáticos Fuera de Uso. Es por lo que es importante desarrollar métodos más eficientes y amigables con el medio ambiente, para el tratamiento del caucho con el fin de contribuir a la solución de los problemas ambientales generados por su mala disposición. Diversos estudios han demostrado la gran capacidad que tiene algunos microorganismos para degradar tanto caucho natural como sintético (Tsuchii, Suzuki, & Takeda, 1985; Nanthini & Sudesh, 2017; Linos,

Steinbüchel, Spröer, & Kroppenstedt, 1999), estos estudios han comprobado que degradación biológica puede brindar una alternativa de bajo costo para la resolución de la acumulación de los productos de caucho.

Por lo tanto, este estudio plantea una solución mediante la degradación del caucho triturado mediado por un consorcio microbiológico nativo de Arequipa, siendo los residuos generados inocuos al medio ambiente y teniendo un potencial de reutilización.



Lista de Abreviaturas

(NH₄)₂SO₄	Sulfato de Amonio
°C	Grados Centígrados
ANRPC	Association of Natural Rubber Producing Countries / Asociación de Países Productores de Caucho Natural
Ba(OH)₂	Hidróxido de Bario
CaCl₂	Cloruro de Calcio
CO	Monóxido de Carbono
CO₂	Dióxido de Carbono
FeSO₄	Sulfato de Hierro
GRM	Global Rubber Markets / Mercados Globales de Caucho
HCl	Ácido Clorhídrico
K₂HPO₄	Fosfato monohidrogenado de potasio
KH₂PO₄	Fosfato dihidrogenado de potasio
m	Metros
M	Molar
MgSO₄	Sulfato de Magnesio
min	Minutos
MINAM	Ministerio del Ambiente
ml	Mililitros
mm	Milímetros
MSM	Medio de Sales Minerales
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
NFU	Neumáticos Fuera de Uso
Nox	Óxidos de Nitrógeno
NTP	Norma Técnica Peruana
p/v	Peso sobre volumen
PRODUCE	Ministerio de la Producción
RPM	Revoluciones por Minuto

SERNANP	Servicio Nacional de Áreas Naturales Protegidas por el Estado
SO2	Dióxido de Azufre
SUNARP	Superintendencia Nacional de los Registros Públicos



Capítulo 1. Planteamiento del Problema

1.1. Diagnostico situacional

La provincia de Arequipa cuenta con más de 210 mil vehículos nuevos registrados en el periodo del 2005 hasta el 2017 en total (SUNARP, 2018), esta cantidad es traducida en casi 844 mil neumáticos (excluyendo neumáticos de repuesto y/o de cambio). Los que, al entrar en desuso, serán almacenados dentro de las casas o desechados junto con los residuos que se generará en la ciudad. Aumentando los lugares de criadero de muchas plagas de insectos y animales considerados vectores de enfermedades (ratas, ratones, mosquitos, etc.). Así mismo aumentando el riesgo de incendios masivos difíciles de ser sofocados y con altos costos ambientales (El Comercio, 2018).

En el Perú existen normas técnicas promulgadas los años 2006 y 2008 que regulan la disposición y reutilización de los neumáticos fuera de uso (NFU) (NTP.900.059, 2006; NTP.900.060, 2008; LEY N°27314, 2000). Las que mayormente están basadas en su reutilización como zapatos, juegos para niños, partes de carreteras, etc., solución que no cubre con toda la cantidad de NFU presentes, ni ayudan a reducir los impactos generados por su acumulación debido a que al final de su vida útil volverán a ser residuos.

Como alternativa, diversas entidades plantearon su uso como combustible en procesos de manufactura, debido a la alta concentración de carbonos que posee lo que lleva a tener un fuego de larga duración, utilizando para dicho fin hornos artesanales en muchos casos carentes de protección, generando cantidades considerables de diversos compuestos químicos tóxicos como CO₂, CO, NO_x, SO₂, y la generación de algunos tipos de aceites (Mena, 2009) lo que significa un grave daño a la salud ambiental local (Stevenson, Stallwood, & Hart, 2008) y que llevó a prohibir el uso de este tipo de materias primas como fuentes combustibles.

Las características de resistencia y durabilidad de las llantas son conferidas mediante un proceso conocido como vulcanización que brindan una forma mucho más estable a las moléculas de caucho mediante la adición de azufre y demás compuestos (Estados Unidos Patente n° 20110301302, 2010). Esto causa que el proceso de degradación natural de una llanta puede tomar entre 300 y 500 años (Marín, 2012), considerándose entonces como un compuesto de alta persistencia en el tiempo y esto sumado a todos los demás problemas antes detallados termina siendo un tema de gran importancia y se hace necesario buscar algún tipo de procedimiento para poder eliminarlas o reducirlas a componentes mucho más simples de degradar.

1.2. Formulación del Problema

Alto tiempo de degradación natural del caucho debido al proceso de vulcanización que sufren las llantas, la inexistencia de datos reportados respecto a la diversidad microbiológica nativa de la ciudad de Arequipa capaz de degradar caucho. Las muestras y experimentos se llevaron a cabo durante el transcurso del año 2018 y 2019.

1.3. Justificación

El crecimiento de la demanda de materiales de caucho, en especial llantas, producen una acumulación cuando llegan al fin de su vida útil. Situación que se agrava año tras año, siendo actualmente un gran reto ambiental y un problema al cual no se le puede encontrar una solución definitiva (Li, Zhao, & Wang, 2011).

Así mismo en el Perú no existe una normativa clara respecto al tratamiento y/o disposición de materiales compuestos por caucho, lo que permite que prácticas como la quema sean soluciones atractivas, sin embargo, la gran liberación de compuesto nocivos para la salud y gases de efecto invernadero pone en riesgo a las comunidades cercanas a los sectores donde se llevan a cabo.

Son muchas las barreras que se deben superar en esta materia, siendo la principal, la gran estabilidad que presentan los polímeros que constituyen el caucho, lo que hace este material resistente en el tiempo y le quita la posibilidad de reciclarlo, no es posible la reutilización del caucho antiguo para la generación de nuevas llantas, debido a que no se ha podido lograr una mezcla homogénea entre estos dos tipos de caucho generando pequeños gránulos en la matriz, lo que luego lleva a la formación de microfracturamientos internos que reducen la eficiencia de las llantas.

Se han desarrollado diversos métodos para intentar desarrollar algunos procesos de reciclaje con estos materiales. En su mayoría basados principalmente en procesos físicos y químicos, como; pirolisis para la generación de nuevos compuestos de hidrocarburos (Tamri, Yazdi, Haghighi, Abbas-Abadi, & Heidarinasab, 2018), reducción del tamaño de partícula para el uso en pavimentos (Villagaray Medina, 2017), degradación química mediante el uso de ácidos (Sadaka, Campistron, Laguerre, & Pilard, 2012), interacción del material con ozono (Iwase, Shindo, Kondo, Ohtake, & Kawahara, 2017; Marchut-Mikołajczyk, Drożdżyński, Januszewicz, Domański, & Wrześniewska-Tosik, 2019) entre otros. Sin embargo, en la aplicación práctica muchos de estos métodos son poco viables debido al alto costo energético y tecnológico que se ve luego traducido en una alta inversión monetaria.

Esto ha hecho que soluciones de bajo costo, como lo son los tratamientos microbianos, se vean como medidas atractivas. Aunque de es difícil hacer una comparación costos, de manera general, podemos decir que la biorremediación es por lo menos diez veces más económica que la incineración (Barrios, 2011). Comparada con otros procesos físicos o químicos el costo de la realización de tratamientos biológicos sigue siendo menor debido al uso de tecnologías de bajo costo.

Así mismo, el uso de estas tecnologías, generalmente no producen compuestos nocivos o tóxicos por lo que no es necesario realizar tratamientos ulteriores a dichos residuos. Siendo una actividad amigable con los ecosistemas y segura en su manipulación

La gran diversidad de microorganismos permite tener diferentes rutas de degradación y mucho conocimiento por ser explorado, que suma particular importancia al reconocer que no se sabe mucho de la diversidad microbiológica y la aplicación de esta en nuestra región.

1.4. Hipótesis

Dado que se puede evidenciar degradación de caucho de neumáticos abandonados, es posible identificar y evaluar la capacidad biodegradativa en laboratorio de consorcios microbianos aislados de suelos y neumáticos de la ciudad de Arequipa.

1.5. Variables

Tabla 1. Variables

Variable	Tipo	Indicador	Unidades
Capacidad de degradación	Dependiente	Curva de degradación	% de degradación
Consortio microbiano	Independiente	Identificación y evaluación del consorcio	CO ₂ producido por cepas de microorganismos identificadas

1.6. Objetivos

1.6.1. Objetivo General

Evaluar la capacidad degradativa de caucho de un consorcio microbiano nativo bajo condiciones de laboratorio.

1.6.2. Objetivos Específicos

- 1) Aclimatar microorganismos con potencial biodegradador de caucho.
- 2) Evaluar la capacidad degradativa del consorcio microbiano en la degradación de caucho.
- 3) Identificar molecularmente el consorcio microbiano capaz de degradar caucho.



Capítulo 2. FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1. Marco Legal

2.1.1. Marco Legal Nacional

Constitución Política del Perú

La Constitución Política del Perú (1993) en su artículo 2, el inciso 22° menciona el derecho fundamental de todas las personas de gozar de un ambiente sano para el desarrollo de la vida.

Ley General del Ambiente N° 28611

Dentro de Ley General del Ambiente (Ley N° 28611, 2005) se puede obtener las medidas adecuadas para la buena gestión del ambiente, del cual todos tenemos derecho, así como los planes de descontaminación y tratamiento de los pasivos ambientales en el Perú.

Normativa para la fabricación de caucho

Las actividades de: Extracción y concentración de caucho o jebe natural, oje, leche capsí, y otras gomas y resinas naturales forestales de uso industrial. Fabricación de cubiertas y cámaras de caucho; recauchutado y renovación de cubiertas de caucho. Fabricación de otros productos de caucho. Se encuentran incluidas en la lista de actividades a fiscalizar dentro del Sistema Nacional de Evaluación de Impacto Ambiental, mismo que se encuentra detallado en la Resolución Ministerial N°157-2011-MINAM. Cabe destacar que las actividades antes mencionadas abarcan todo el proceso de manufactura de productos de caucho y sus derivados (MINAM, 2011).

Existe además la normativa promulgada por el Ministerio de la Producción que tiene por objeto reglamentar el uso de neumáticos de caucho en diferentes tipos de transporte. Norma

que marca pautas sobre la fiscalización a empresas manufactureras de llantas para evitar que los accidentes por errores en la producción ocurran (PRODUCE, 2005).

Normativa enfocada al reúso del caucho

En el Perú existen normas técnicas peruanas del año 2006 y 2008 que regulan su disposición final y reutilización:

- NTP 900.059 (2006): Gestión ambiental. Gestión de residuos. Manejo de neumáticos desechados. Generalidades, generación, recolección, almacenamiento y transporte.
- NTP 900.060 (2008): Gestión ambiental, Gestión de residuos. Manejo de neumáticos desechados. Aprovechamiento energético.
- NTP 900.061 (2008): Gestión ambiental. Gestión de residuos. Manejo de neumáticos desechados. Reaprovechamiento.

Las 3 normas se enfocan en utilizar los NFU como complemento para carpetas asfálticas, para uso en artesanías o como combustible.

2.1.2. Marco Legal Internacional

Los Objetivos de Desarrollo Sostenible (Naciones Unidas, 2019) proponen en el objetivo 11 “Ciudades y Comunidades Sostenibles” lograr que las ciudades y asentamiento humanos lleguen a ser inclusivos, resilientes, seguros y sostenibles, el cual implica la generación de planes que ayuden a que las personas puedan contar con un ambiente sano en el cual desenvolverse; el objetivo 12 “Producción y Consumo Responsables” busca garantizar las formas de consumo de una manera sostenible, logrando así un mejor uso de los recursos, disminuir la contaminación, generando empleos y mejorando la calidad de vida de las personas.

Debido al interés creciente sobre el manejo de los residuos de caucho, en especial de los NFU y los efectos producidos por la mala acumulación, es que diversos países vieron como necesidad imponer normativas, guías y demás instrumentos legales para reducir el impacto ambiental que viene de una mala gestión.

Las llantas en desuso han sido incluidas dentro del Convenio de Basilea (Convenio Internacional que regula el tránsito de materiales peligrosos y su desecho entre naciones), debido a los impactos que estos tienen sobre la salud y los ecosistemas, así como por la dificultad para reciclarlos y desecharlos.

El convenio de Basilea brinda directrices que son las bases de diversas políticas sobre el tratamiento, disposición y técnicas de reutilización en diversos países (Convenio de Basilea, 2011) a continuación se nombran algunos ejemplos de normativas y disposiciones internacionales respecto a dicho tema.

La Guía de Manejo de Llantas Usadas (2006) documento publicado por la Cámara de Comercio de Bogotá y apoyado por la Secretaria Distrital de Ambiental de la Alcaldía de Bogotá, especifica acciones enfocadas a la gestión; la pulverización de las llantas fuera de uso por métodos físicos (fracturamiento mediante criogenización con nitrógeno líquido o el uso de maquinaria) y el uso del material como complemento en la fabricación de asfalto, la quema de las llantas en hornos especiales para su aprovechamiento como fuentes de calor y por último la elaboración de diversas artesanías o construcciones poco elaboradas como bebederos o juegos. La opción de reencaucho se toma como una posibilidad para ampliar la vida útil de llantas, sin embargo, este proceso, así como el producto final deben cumplir especificaciones detalladas dentro de la misma guía.

“Plan de Manejo de Llantas de desecho de las industrias” (Twamisa, 2017) promulgado por el gobierno de Sudáfrica. En dicho documento se hace una revisión total del ciclo de vida de las llantas proponiendo diversas acciones para la reducción, la reutilización, el reciclaje y el uso como material combustible. Brindando además disposiciones sobre cómo realizar estas

actividades, quienes serán los encargados y la posibilidad de generar negocios a partir del reciclaje.

Países como Chile, México, Colombia, España, México, etc. (Magallanes Reyes & Guillén Solari, 2014) también poseen normativas sobre este tema. Enfocadas en su mayoría a la reducción de estos materiales y a su reutilización como materia prima en la fabricación de otros productos, como lo son el césped sintético, zapatos, etc.

2.2. Marco Teórico

2.2.1. Cepas microbianas nativas

Existen una gran diversidad de microorganismos en todos los lugares del mundo, muchos de estos están únicamente en ciertas zonas geográficas, las cuales desempeñan una función importante en cada lugar. Aquellos microorganismos que son aislados de ciertos lugares se conocen como nativos, dentro de estos se puede encontrar: bacterias, hongos, microalgas, etc. (Cruz-Guzmán, 2007).

2.2.2. Biodegradación

Hay gran variedad de metodologías para poder degradar un compuesto, están las que son físicas, químicas o biológicas, estas últimas son llevadas a cabo por seres vivos, los cuales pueden ser microorganismos y macroorganismos. Cada uno de ellos con diversas rutas metabólicas.

La biodegradación está fundamentalmente realizada por los microorganismos encontrados ya sean en suelo o en agua, los cuales tienen diversas rutas metabólicas para tratar los diversos tipos de compuestos a los cuales están expuestos, una de esas es la degradación, la cual se basa principalmente en la transformación de la composición química o física del compuesto (Cruz-Guzmán, 2007).

2.2.2.1. Capacidad Degradativa

A lo largo de los años las bacterias han ido evolucionando, generando así nuevas rutas metabólicas hacia otros sustratos que comúnmente no se degradan. Se espera que el contacto con nuevas sustancias xenobióticas pueda generar nuevas enzimas y/o rutas metabólicas que les permita a los diversos organismos vivos celulares tener acciones sobre estos.

Un ejemplo claro es el pentaclorofenol, un plaguicida utilizado desde 1936 que es degradado por la bacteria *Sphingomona* mediante una modificación de su ruta metabólica ya existente que consiste en la adición de nuevas enzimas y la alteración de la especificidad de las enzimas que posee (Castillo, 2005).

La capacidad degradativa desde el punto de vista ambiental termina siendo la especificidad de algunas bacterias tiene para degradar compuestos xenobióticos no naturales o naturales, que se encuentren en concentraciones altas, sin sufrir ninguna alteración biológica y que además sean capaces de obtener energía a partir de ellos.

2.2.3. Parámetros que influyen la biodegradación

La biodegradación de los polímeros está influenciada por diferentes variables las cuales están principalmente ligadas a la presencia o ausencia de oxígeno (OMI, 2005). Sin embargo, la degradación sin presencia de oxígeno para los polímeros de hidrocarburos tiende a ser más lenta. Para poder acelerar el proceso, se pasa a una etapa de experimentación en laboratorio, donde el investigador va probando diversidad de condiciones de laboratorio, modificando el pH, la temperatura, la agitación, etc.

2.2.4. Polímeros

Los polímeros son moléculas muy largas o también llamadas macromoléculas, que se forman a partir de la unión de partículas más pequeñas. Estas unidades más pequeñas, antes de que se conviertan en un polímero, son conocidas como monómeros. La palabra polímero viene del griego original y su significado es “muchos miembros”. Los polímeros han estado en la tierra de forma natural desde su formación (Saldivar-Guerra & Vivaldo-Lima, 2013)

2.2.5. Caucho

El caucho es un polímero elástico natural proveniente de distintas plantas, destacando la *Hevea brasiliensis*. Se compone de una cadena larga del monómero isopreno y presenta dos isómeros (Figura 1), el cis-poliisopreno y trans-poliisopreno (Rodgers, 2016). También puede ser sintetizado en laboratorio, sin embargo, las características finales del compuesto son diferentes al natural.

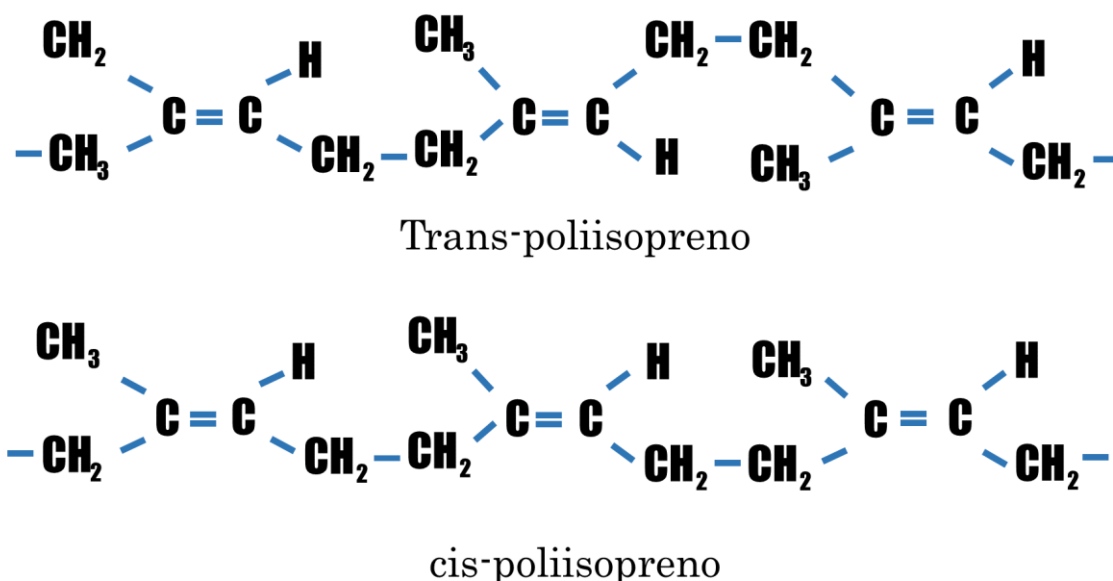


Figura 1. Isómeros cis- y trans- del caucho natural (Rodgers, 2016)

2.2.6. Tipos de caucho

Existen dos tipos de caucho que son utilizados actualmente en la industria:

- a) El caucho natural, proviene de una mezcla compuesta de hidrocarburos de caucho, agua, elementos inorgánicos, proteínas, aminoácidos, azúcares, ácidos orgánicos, lípidos, vitaminas, ácidos nucleicos y alcaloides (Zhang, Huang, Wang, Ding, & Liang, 2018), exudados de diversas plantas siendo la principal la *Hevea brasiliensis*, conocida también como árbol de caucho, planta oriunda de la Amazonía de Perú, Colombia, Brasil y en algunas partes de Bolivia (Aguirre Ríos & Santoyo Cortés, 2013).

Hasta el siglo XIX, Brasil controlaba el mercado de la producción de caucho natural utilizando una política de decomiso de la planta y sus semillas. No fue sino hasta el año 1876 que Henry Wickham pudo realizar con éxito un viaje con 70000 semillas llevadas de Brasil a Inglaterra en calidad de contrabando. Desde 1900 a 1913, el caucho producido en las fincas del Sudeste Asiático y el este de África capturaron la atención global desplazando a Brasil.

Actualmente la planta se encuentra distribuida a través de la mayoría de las zonas tropicales del mundo, siendo las plantaciones principales, el sudeste asiático, Malasia e Indonesia, lugares de donde proceden la gran mayoría del caucho mundial.

Químicamente el caucho natural purificado, es un polímero compuesto por unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno), que al momento de polimerizarse toman dos conformaciones: la primera conocida como poli-cis-isopreno (poli(cis-1,4-isopreno)) conocido también como caucho natural, propiamente dicho. Se forma a partir de la polimerización carbono-carbono de la molécula de isopreno, el principal

uso de este tipo de polímero es en la industria automovilística en la fabricación de llantas.

La segunda configuración que puede tomar se conoce como poli-trans-isopreno (poli(trans-1,4-isopreno)) conocido también como gutta percha. Un isómero producido por unas cuantas plantas como *Palaquium gutta*, *Eucommia ulmoides*, *Euonymus europaeus*, *Couma macocarpa*. La configuración química que posee le confiere características diferentes. Su uso principal es como aislamiento de cables, para la fabricación de cintas transportadoras, objetos decorativos, cobertura de bolas de golf, y en la goma de mascar (Yikmis & Steinbüchel, 2012).

- b) El caucho sintético, fue sintetizado en 1909 por el químico alemán Fritz Hofmann (Thiele & Roessle, 2014) es un polímero similar al caucho natural (poli(cis-1,4-isopreno)). Existieron diversos esfuerzos para poder sintetizar de manera química compuestos similares al caucho, que se vieron impulsados principalmente por el desabastecimiento de este material en la primera y en la segunda guerra mundial. Entre 1948 y 1951 la producción de caucho sintético fue prohibida en Alemania. Se pudo observar así mismo el regreso al caucho natural luego del fin de cada guerra. Actualmente existen diversas formas de producción de caucho sintético, dentro de las cuales se tiene la polimerización de 1,3-butadieno, cloropreno, isobutano, etc. (Kumar & Nijasure, 1997).

Algunos tipos de caucho sintético (Espinoza Anaya, 2008):

- Caucho butílico: es un polímero plástico, con menor flexibilidad al ser comparado con el caucho natural, pero con mayor facilidad para vulcanizar, que se encuentre formado por isobutileno e isopreno (aproximadamente 3% del contenido total).

- Neopreno: polímero formado por monómeros de cloropreno que es sintetizado a partir de etino y al ácido clorhídrico. Posee resistencia al calor y a productos químicos como aceites y petróleos.
- Coroseal: formado por monómeros de cloruro de vinilo polimerizados, no es posible su vulcanización, posee mayor resistencia a la abrasión que el caucho natural en condiciones normales.
- Thiokol: formado de la reacción de cloruro de etileno con polysulfuro sódico (Smith & Cristol, 1972) dando un compuesto similar al caucho que puede ser fácilmente vulcanizado. Muy utilizado como aislante eléctrico.
- Caucho SBR: Formado por la copolimerización de estireno y butadieno es el elastómero más utilizado como caucho sintético (Fernández Garrido, 2014).

2.2.7. El caucho utilizado en la producción de llantas

Para el año 1991 se destinaba un 60% del caucho sintético y un 75% del caucho natural (de la producción mundial en ese año) a la manufactura de llantas (Greek, 1991).

Para poder crear un neumático se debe realizar una mezcla de distintos componentes y ser sometidos a temperaturas, lavados y secados, dependiendo de las características que se busquen dar a las llantas.

Las materias primas más comunes son: caucho (natural y/o sintético), negro de humo, azufre, cementos y pinturas, fibras de rayón y acero, antioxidantes, aceites y grasas, plastificantes, acelerantes y retardantes (Castro, 2008; Carrión Nin, 1999).

En la Tabla 2 se puede observar la composición en porcentaje de peso de los neumáticos de manera general, los porcentajes varían de empresa a empresa, buscando distintas propiedades

de flexibilidad, durabilidad, etc. En el Anexo 1 se puede ver una tabla de comparación de cantidad de componentes para la fabricación de un neumático de la empresa Hankook Tire Manufacturing Co Ltd.

Tabla 2. Composición de Neumáticos General (Castro, 2008)

Componentes	Tipo de Vehículo		Función
	Automóviles	Camiones	
	(% en peso)	(% en peso)	
Cauchos	48	45	Estructural-deformación
Negro humo	22	22	Mejora oxidación
Óxido de zinc	1,2	2,1	Catalizador
Materia textil	5	0	Esqueleto estructural
Acero	15	25	Esqueleto estructural
Azufre	1	1	Vulcanización
Otros	12	-	Juventud

El primer paso es el mezclado de algunas de las materias primas en el Bundary (Carrión Nin, 1999) el caucho natural, que proporciona elasticidad, y el sintético, que proporciona estabilidad térmica, con los aditivos ya mencionados anteriormente, seguido del tratamiento de los cables de acero (enrollamiento, corte, etc.), estos son moldeados con la capa de caucho en una Calandradora (Flores Medina, 2013).

Una vez mezcladas las materias primas, hay tres procesos importantes a seguir (Crespo García, 2014):

- **Confección:** Aquí es donde se realiza la primera etapa del neumático, primero va la lámina de caucho sintético impermeable, sobre un cilindro rotatorio, luego la lona de cables entre dos capas de goma, luego se colocan los aros metálicos y la lona carcasa.
- **Conformación:** En este proceso ya se puede apreciar el neumático como normalmente lo conocemos, debido al inflado de la parte central del tambor, añadido de lonas constituidas por hilos metálicos y finalmente la banda de rodamiento.
- **Cocción:** Este último paso, genera las marcas características que se aprecian en el neumático, se realiza en un molde de cocción donde se realiza la vulcanización y luego este es separado y secado al aire libre.

2.2.8. Condiciones Climáticas de Socabaya

Socabaya cuenta con un clima templado, una temperatura máxima de 22 °C y mínima de 10°C, una humedad promedio de 15%, en cuanto a la precipitación está es variada durante el año, sin embargo, se espera una media anual de 20 mm (Municipalidad Distrital de Socabaya, 2016). El río Andamayo, nace de los ríos Andamayo y Postreros, y toma el nombre de río Socabaya cuando pasa por el distrito del mismo nombre. El caudal es variado en diferentes épocas del año, el cual siempre tiende a aumentar en los meses de diciembre a marzo por las precipitaciones (Machaca Villasante, 2018).

2.3. Marco Histórico

2.3.1. Descubrimiento del caucho

En 1736, el matemático y astrónomo francés Charles De La Condamine, en Ecuador, descubrió una planta que exudaba látex, después de una excursión por la Amazonia. En 1775, F. Aublet nombró a un árbol productor de látex como *Hevea guianensis*, ubicado en Guyana

Francesa, fue así como se usó el término “*Hevea*” por primera vez, basándose en el lenguaje de los indios de las costas del Ecuador, sin embargo, el árbol al cual se referían después fue clasificado como Castilla, generando confusión. En 1876, fue James Collins, quien le atribuye a Charles De La Condamine el descubrimiento de *Hevea*, después de muchos años donde los botánicos y expertos en plantas no se ponían de acuerdo (Uribe, 1947). No se conoce desde cuando se viene extrayendo caucho, ya que cuando Colón llegó, descubrió que los indígenas ya usaban el látex para el uso de zapatos o juguetes (Pastor Molina, 2003).

2.3.2. Proceso de vulcanización

Para el año 1839, Charles Goodyear realizaba un experimento cuando accidentalmente mezcló goma (caucho) con sulfuro y otros ingredientes en una olla caliente, lo que convirtió al caucho en un material firme y resistente, la clave para estas características está en la formación de los puentes de azufre (Figura 2) descubriendo el proceso de vulcanización (Kumar & Nijasure, 1997), dando así un nuevo uso para el caucho extraído, revolucionando la industria (García Morcillo, 1982)



Figura 2. Vulcanización del caucho (Kumar & Nijasure, 1997)

El proceso de vulcanización consiste en la mezcla en caliente de caucho natural con azufre (Gonzáles, Rodríguez, Valentín, Marcos-Fernandez, & Posadas, 2006), las características finales del caucho vulcanizado depende de la materia prima (Velásquez & Giraldo, 2014), el tiempo de contacto con los reactantes, la temperatura, etc. (Gong, Yang, Ke, Wang, & Yao, 2019; Rafei, Ghoreishy, & Naderi, 2009).

2.3.3. La explotación del caucho en la Industria

Desde su descubrimiento la extracción del látex, proveniente del árbol de Hule se llevó de dos maneras, una de ellas mediante la tala del árbol y la segunda bajo la metodología del sangrado o picado.

La primera forma, la tala del árbol, fue cayendo poco a poco debido a que no era rentable, los productores que decidieron invertir en plantaciones y seguir con el método del sangrado fueron los que se quedaron para abastecer la demanda de caucho natural que iba creciendo (Salazar Paiva, 2014).

El primer paso para la explotación por sangrado es delimitar cuáles serán los árboles para usar, se debe hacer un pequeño corte en un ángulo de 32° a una altura de 1.30 m, descendente de izquierda a derecha, el último paso es hacer dos cortes, arriba que es el tope de cuchilla y abajo que es el canal de escurrimiento. Para la recolección del látex se pone una espita en la parte inferior con cuidado de no dañar el árbol. Una vez delimitados los puntos anteriores se procede a hacer la pica, esta consiste en un raspado de la corteza con una profundidad de 1 a 1.5 mm, para asegurar la regeneración de la corteza, es necesario hacer el corte con inclinación para un buen recorrido del látex hace el vaso recolector (Aguirre Ríos & Santoyo Cortés, 2013).

2.3.1. Comercialización del caucho

Desde su descubrimiento hasta el día de hoy, el caucho es usado en distintos procesos para la fabricación de zapatos, llantas, mangos para los vehículos, correas, guantes, preservativos, etc. (Beliczky & Fajen, 2001), como se puede ver en la Figura 3. Sus características especiales hicieron que el mundo se centrara en su extracción, lo que llevó a un cultivo extendido en diversas zonas del mundo donde podría ser transformado a menor costo o con mayor facilidad.

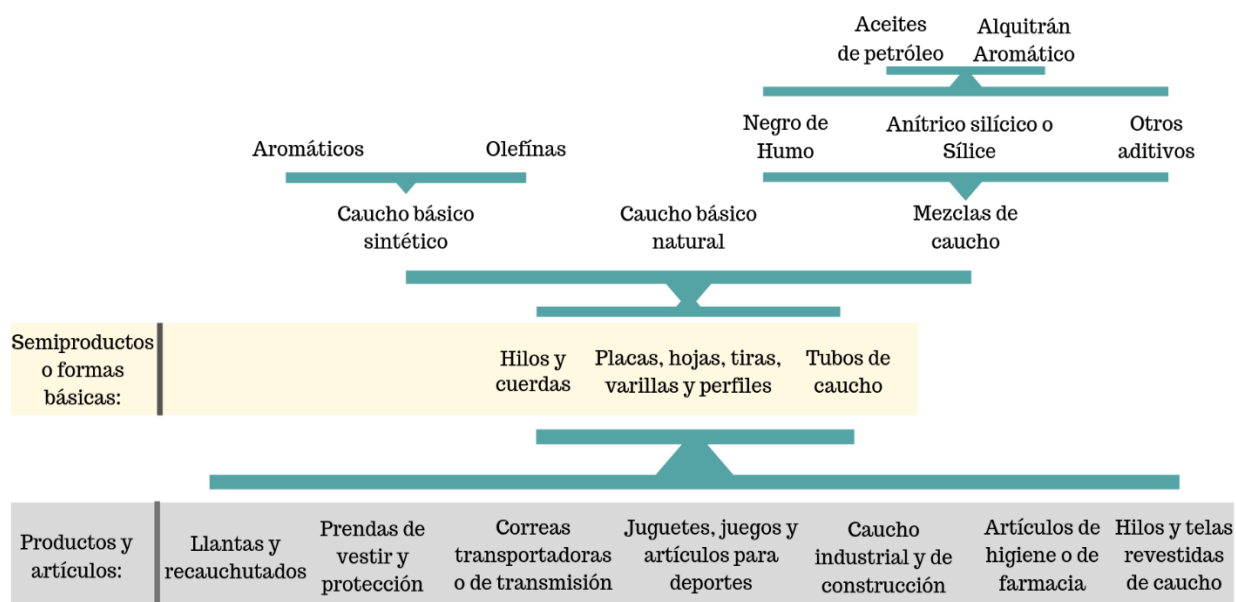


Figura 3. Cadena productiva del caucho (Departamento Nacional de Planeación, 2004)

La transformación del caucho para usarlo en la producción de llantas fue lo que motivó la explotación de la selva amazónica en gran escala, entre los años 1880-1918 (El Comercio, 2014) cuando la explotación del caucho era prometedora, se descubrió las plantaciones de *Hevea* en Asia, que surgieron por las semillas llevadas por H. Wickham, llegando a producir en 1915 el doble de la producción amazónica y antes de 1945, la producción de Asia de caucho llegó a ser el 98% de la producción mundial (García Morcillo, 1982; Ullán de la Rosa, 2004).

Con el paso del tiempo, las mejoras tecnológicas y el avance en el desarrollo industrial, se vio una creciente demanda de caucho, que a su vez se traduce en un consumo mucho mayor tanto de caucho tanto natural como sintético, tal y como se muestra en la Figura 4.

Según la Asociación de Países Productores de Caucho Natural la demanda de caucho natural entre enero y octubre del 2018 fue de 11 696 millones de toneladas (ANRPC, 2018). El caucho sintético en el periodo del 2016-17, aumentó su producción en 11.5% (GRM, 2018).

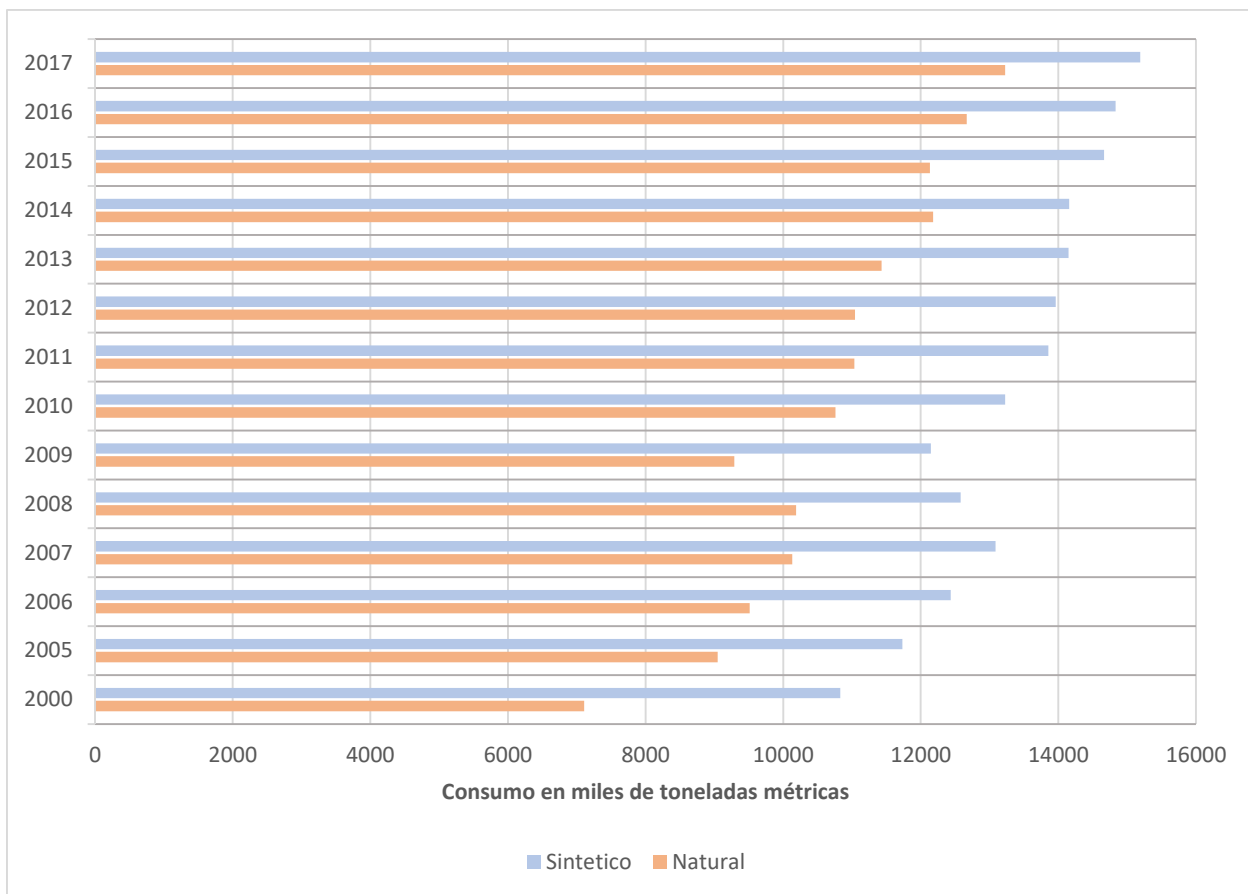


Figura 4. Consumo mundial de caucho natural y sintético (Statista, 2018)

Sin embargo, la oferta se encuentra muy por debajo de la demanda. El vicepresidente senior de desarrollo sostenible y movilidad de Michelin, Nicolas Beaymont, señaló que el sector transporte consume tres cuartas partes de la producción mundial de caucho, para poder solucionar esto, se creó el Proyecto de la Industria de los Neumáticos, un foro para tratar los temas de sostenibilidad de producción de neumáticos (Danigelis, 2018).

En la Figura 5, se muestra como en la actualidad la exportación de caucho se encuentra dominada por el sudeste asiático, en especial Indonesia, seguido por Guatemala, Colombia y Vietnam en menor medida.

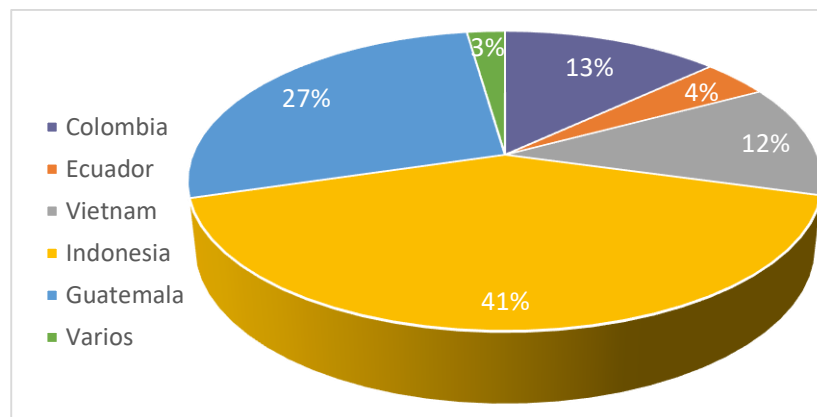


Figura 5. Detalle de las exportaciones a nivel mundial en el año 2018 (AGRODATAPERU, 2018)

El Perú se encuentra catalogado como un país productor de caucho, cuenta con grandes extensiones en la Amazonia destinadas a su cultivo, un ejemplo de explotación y comercialización se encuentra en la Reserva Comunal El Sira, Junín, donde se lleva a cabo el aprovechamiento de caucho por las comunidades nativas, con procesos controlados para evitar la sobre explotación (SERNANP, 2012).

En la Figura 6 se observan las principales empresas de comercialización de caucho en el Perú.

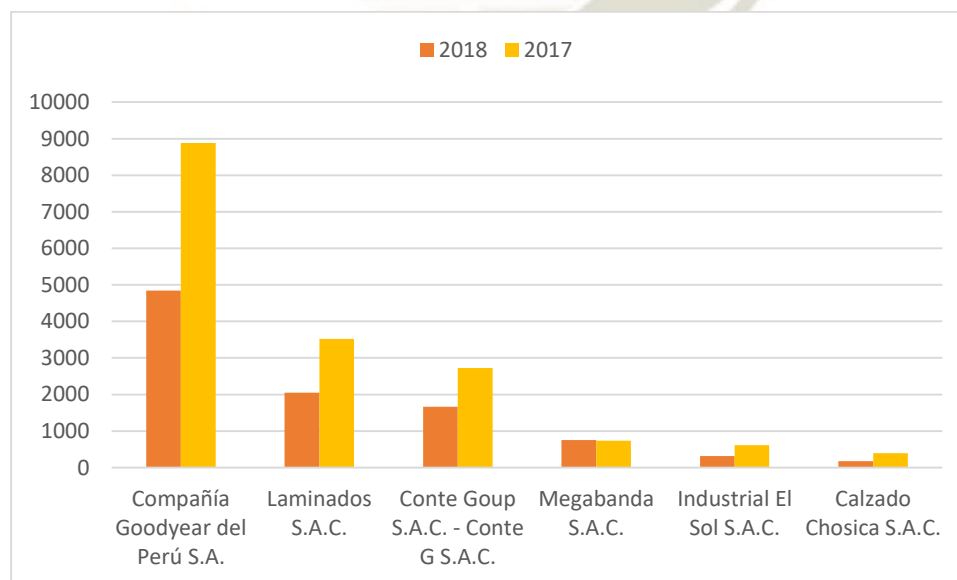


Figura 6. Importaciones de caucho en el Perú (AGRODATAPERU, 2018)

2.4. Antecedentes y Estado del Arte

Antiguamente la disposición final de NFU consistía en dos procesos el soterramiento en vertederos y el apilamiento o acumulación en botaderos especializados. (Reto, Sara, Carleton, & Tishmack, 2015). Estudios posteriores determinaron que ambas metodologías tenían grandes riesgos ambientales y estructurales, lo que países como Costa Rica, Estados Unidos y la unión europea y otros decidieron prohibirlas (European Environment Agency, 2003). Incendios ocurridos en el estado de Ohio en Estados Unidos (Lopes, 2015) y en Madrid, España (BBC, 2016), dieron evidencias de la poca efectividad de las prohibiciones.

Para el caso peruano, no existen normativas claras respecto al desecho de NFU, por lo que es común observar llantas junto con desechos comunes, descartadas en botaderos informales o acumuladas en pilas. Procesos que a su vez derivaron en accidentes como el ocurrido en Lima (El Comercio, 2018) Mismo que derivó en el desplazamiento momentáneo de una gran cantidad de población del distrito de Comas. Así mismo liberaron grandes cantidades de componentes químicos dentro de los que se encuentran metales pesados (Shakya, Shrestha, Tamrakar, & Bhattarai, 2006). Así mismo la acumulación de este tipo de residuos brinda nichos de crecimiento para aves, roedores y mosquitos (Reto, Sara, Carleton, & Tishmack, 2015), los mismos que son vectores de enfermedades.

Existe una relación entre propagación de las enfermedades relacionadas a los mosquitos como lo son del Zika y el Virus del Nilo (Saville & Workman, 2015). Las cavidades de las llantas brindan un ecosistema ideal para mantener la humedad y en temporadas de lluvia pueden empezar agua, permitiendo la proliferación de mosquitos y así mismo el número de contagio de enfermedades.

Se han venido desarrollando nuevos métodos de utilización de llantas, los mismo que incluyen, soporte para construcciones en obras civiles y pavimentos (Eldin & Ahmed, 1993), soportes en arrecifes submarinos (Collins, Jensen, & Mallinson, 2002), usos en canchas

sintéticas, etc. Procesos que permiten dar un segundo uso a las llantas de desecho, sin embargo, debido a la cantidad están no resultan soluciones viables. Así mismo se han investigado en nuevos procesos que garanticen la reducción química o física del compuesto llegando a sus precursores o a nuevos productos con utilidad industrial o con mayor índice de degradación.

2.4.1. Sistemas de Degradación y Recuperación de NFU

Existen diversos métodos reportados para lograr degradar y/o recuperar compuestos de caucho, que pueden ser agrupados según las características de los procesos de involucran en:

- a) Métodos basados en procesos Fisicoquímicos
- b) Métodos basados en procesos biológicos

Estos métodos se enfocan en la degradación de los componentes del caucho, así como en la eliminación del azufre presente en la cadena.

2.4.2. Métodos Fisicoquímicos de degradación de caucho

- **Combustión:** Las llantas de caucho contiene aproximadamente un 90% de materiales orgánicos, los mismo que poseen una alta capacidad calórica llegando a valores de 32.6 mJ/Kg (Adhikari, De, & Maiti, 2000), valores superiores a los del carbón mineral. Es por ello se han utilizado para la generación de electricidad y vapor en centrales, sin embargo, este proceso trae a su vez otro tipo de complicaciones, la principal es la liberación de gases contaminantes como NO_x, SO₄, CO₂, CO y demás gases y partículas asociados a procesos de combustión (Tang Y. , Ma, Lai, Zhou, & Chen, 2013). Nuevas investigaciones se están llevando a cabo utilizando la combustión en atmósferas anóxicas, o utilizando mezclas de gases en lugar de aire, ello con el objetivo de cuantificar y reducir las concentraciones de gases contaminantes desprendido del proceso (Tang Y. , Ma, Lai, & Fan, 2015). La pirólisis han despertado particular interés debido a su reducción en las emisiones de carbono, así

como la generación de diversos otros componentes que pueden ser reutilizados en otros procesos (Wei, y otros, 2019; Liu, y otros, 2018). Sin embargo, el costo operacional y la inversión para este tipo de plantas es alto. (Jahirul, Rasul, Ahmed, & Ashwath, 2012)

- **Recuperación mecánica:** Consiste en la reducción de las llantas desechadas a pequeñas partículas mediante el uso de rodillos especializados a temperaturas altas, cercanas al punto de ebullición del agua, lo que permite homogeneizar y generar nuevas láminas de caucho las que pueden ser utilizadas para la manufactura de nuevos productos (Adhikari, De, & Maiti, 2000).

Recuperación Termo mecánica: Consiste en la aplicación de calor durante la reducción del material, para lo que se utiliza equipamiento especializado (Figura 7), las que consisten de un tornillo giratorio (Seghar, Asaro, Rolland-Monnet, & Aït Hocine, 2019).

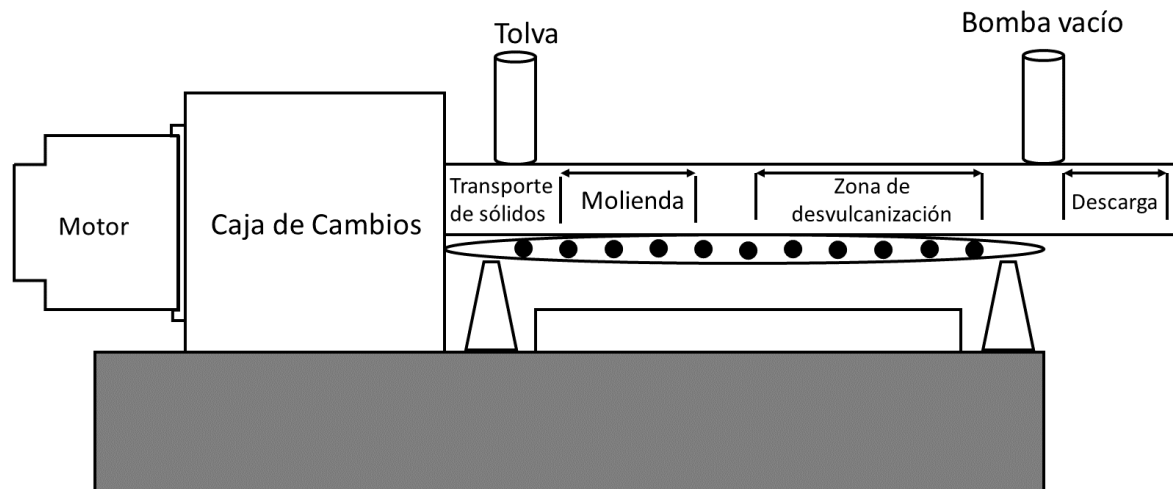


Figura 7. Extrusora para la recuperación de caucho (Seghar, Asaro, Rolland-Monnet, & Aït Hocine, 2019)

Este proceso involucra el uso de calor para el rompimiento de enlaces Carbono-Azufre (C-S), Azufre-Azufre (S-S), intentando dejar la matriz, enlaces Carbono-Carbono (C-C), intacta. Sin embargo, es un proceso particularmente difícil debido a que la energía

necesaria de disociación de los enlaces anteriores es similar, como se puede observar en la Tabla 3.

Tabla 3. Energía de disociación de enlaces dentro de la matriz de caucho (Adhikari, De, & Maiti, 2000)

Tipo de Enlace	Energía de disociación de enlace (kJ/mol)
C-C	370
C-S	310
S-S	270

Finalizando el proceso se obtiene una matriz de caucho que puede ser utilizada para la fabricación de nuevos instrumentos, sin embargo, las características finales son moderadamente diferentes, destacando la pérdida de flexibilidad.

Tratamientos criogénicos: Consiste en la utilización de nitrógeno líquido en partículas de caucho vulcanizado, con la finalidad de poder reducir aún más el tamaño de partícula por molienda, llegando a rangos menores a 0.1 milímetros (Adhikari, De, & Maiti, 2000; Burford, 1981). El proceso finaliza en partículas de pequeño tamaño las mismas que luego pueden ser combinadas con caucho no vulcanizado y formar parte de nuevos materiales, sin embargo, este proceso requiere de maquinarias adicionales, las que permitan una separación y selección de los componentes de acuerdo con su tamaño y una disminución de tamaño antes de iniciar el proceso.

- **Recuperación química:** Consiste en la adición de diversos componentes químicos los que brindándoles las condiciones necesarias terminan rompiendo los enlaces S-S del caucho vulcanizado (Rajan, Dierkes, Joseph, & Noordermeer, 2006). Se utilizan una serie de componentes químicos, con particularidades similares y capaces de reaccionar con el caucho sin romper la cadena principal de carbonos del polímero (Adhikari, De, & Maiti, 2000). La principal barrera a la que se enfrentan estos métodos se encuentra en la viabilidad económica, debido a los costos de los componentes químicos a utilizar. Muchas de estas

reacciones necesitan de condiciones especiales para que puedan darse (temperaturas elevadas y altas presiones), así mismo esto significa un alto costo energético para resultados moderadamente aceptables (Rajan, Dierkes, Joseph, & Noordermeer, 2006). Actualmente se vienen desarrollando nuevos procesos, los mismos que incluyen la adición de nuevos productos químicos además de la combinación con métodos anteriormente descritos (Saputra, Walvekar, Khalid, Shahbaz, & Ramarad, 2019; Dubkov, Semikolenov, Ivanov, Babushkin, & Parmon, 2012). Estas modificaciones hacen del proceso químico una opción viable, principalmente cuando es combinada con métodos termo mecánicos, sin embargo, se necesita de maquinaria especializada, así como personal técnico capacitado capaz de llevar un control pormenorizado de las condiciones de reacción y de funcionamiento del sistema a fin de evitar que el proceso sea vea interrumpido o falle.

2.4.3. Métodos Biológicos de degradación de caucho

Se han reportado diversos microorganismos bacterianos capaces de generar rutas metabólicas utilizando como única fuente de carbono polímeros encontrados dentro de la composición del caucho (Rose & Steinbüchel, 2005; Shah A. A., Hasan, Shah, Kanwal, & Zeb, 2013). Con la llegada del cultivo en placas de agar-látex (Spence & Niel, 1936) se pueden distinguir dos tipos de bacterias. Las primeras son bacterias capaces de formar halos de color blanquecino transparente alrededor de las colonias (Chia, y otros, 2014), mismos que se deben a la capacidad de la cepa de degradar caucho mediante la excreción de enzimas las que descomponen el polímero llegando a componentes menos complejos. Las segundas corresponden a bacterias sin la capacidad de producir halos (Linós A. , y otros, 2000), estas muestran dificultad de crecimiento en agar látex, pero resultan ser las bacterias con mejor desempeño en degradación y necesitan de un contacto directo con el polímero a degradar para expresar crecimiento. En su mayoría son bacterias pertenecientes al filo de actinomicetos (Shah A. A., Hasan, Shah, Kanwal, & Zeb, 2013).

Son diversos los trabajos que han logrado aislar con éxito organismos, en su mayoría de suelo, de botaderos o de llantas expuestas en condiciones ambientales por un prolongado

periodo de tiempo (Imai, Ichikawa, Kasai, Masai, & Fukuda, 2010; Chia, y otros, 2014; Nawong, Umsakul, & Sermwittayawong, 2018), sin embargo, algunos otros han utilizado consorcios (Linós A. , y otros, 2000).

Se desconoce la ruta metabólica utilizada por los organismos, sin embargo, se han hecho diversos análisis de las posibles interacciones biológicas con el compuesto.

Las primeras aproximaciones las brindó Tsuchii, Suzuki y Takeda (1985), el cual propuso una oxidación de la cadena polimérica generando una ruptura y la consecuente conformación de un polímero con un mayor potencial de ser utilizado como fuente de carbono, véase Figura 8.

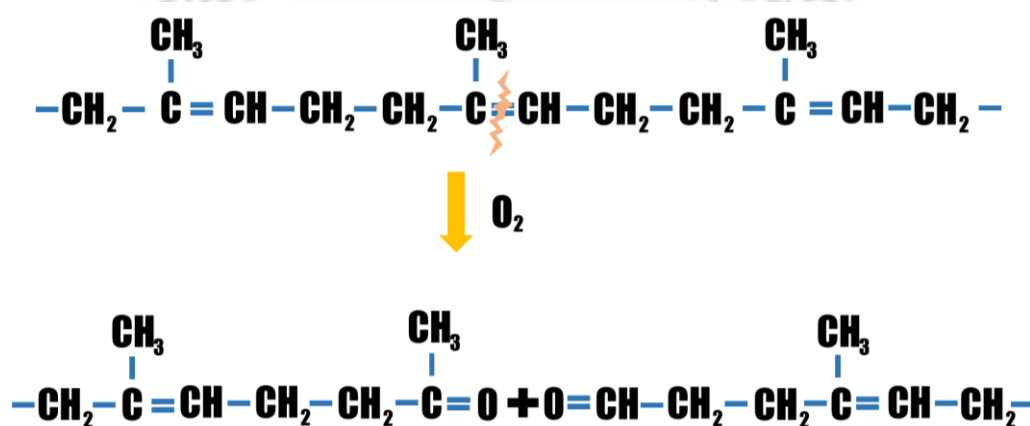


Figura 8. Ruta de degradación propuesta por Tsuchii, Suzuki y Takeda (1985)

Sucesivos estudios permitieron la generación de una ruta de degradación hipotética, pero a mayor detalle, diseñada para los principales organismos degradadores (Rose & Steinbüchel, 2005). En esta última ruta se aplicaron los descubrimientos descritos por Rose y otros (2005) y Brazz y otros (2004) mismos que explicaron la posible degradación de caucho a partir de la acción de enzimas extracelulares excretadas con el objetivo de generar particular con menor complejidad y susceptibles al ataque bacteriano. En este estudio se confirmó lo descrito por Tsuchii, (1985) llegando a una oxidación de las moléculas, al rompimiento de las cadenas poliméricas y a la formación de grupos cetónicos producto del proceso.

Se puede observar la degradación de caucho con algunos de los siguientes métodos:

2.4.4. Ensayos para la identificación de la degradación

2.4.4.1. Análisis con reactivo de Schiff

La degradación de caucho da como componentes finales aldehídos y cetonas (Shah A. A., Hasan, Shah, Kanwal, & Zeb, 2013), los cuales pueden ser medidos mediante indicadores químicos. Para la detección y determinación de los aldehídos se usa el reactivo de Schiff (Bhattacharya, 1954).

Se puede evidenciar de dos maneras: una es coloreando la superficie de la matriz de caucho, esta se realiza sacando un pequeño pedazo de muestra de caucho y se pone en una botella que deberá estar herméticamente cerrada, se agrega 10 ml del reactivo de fucsina y se espera de 10 a 30 minutos, el color púrpura se deberá retirar de la muestra blanco descartando el reactivo en exceso y agregando 10 ml de una solución de sulfito (Linós A. , y otros, 2000; Linh, y otros, 2017).

La segunda manera es coloreando un sobrenadante, si es que se realiza la degradación en medios de cultivo líquido, se colecta una pequeña cantidad de medio, la muestra deberá ser centrifugada a 1000 RPM durante 15 min, luego unas pocas gotas del sobrenadante se mezclan con cloroformo en volúmenes iguales, y se deja secar a temperatura ambiente en un portaobjetos limpio, luego unas pocas gotas del reactivo de Schiff se agregan y se puede observar la formación del color púrpura (Roy, Das, Banerjee, & Bhowmick, Comparative studies on rubber biodegradation through solid-state and submerged fermentation, 2006; Kanwal, Shah, Qayyum, & Hasan, 2015).

2.4.4.2. Evolución de la respiración microbiana

Toda actividad microbiana relacionada a la degradación de componentes libera CO_2 (Puechner, Mueller, & Bardtke, 1995), el cual puede ser medido de distintas maneras, la más conocida es la Evolución de CO_2 que se mide usando el Test de Sturm modificado (Muller, Augusta, & Pantke, 1992). El cual nos da información directa sobre la transformación de la cadena de carbono del polímero en CO_2 (Berekaa, Linos, Reichelt, Keller, & Steinbüchel, 2000). En la Figura 9 se puede ver el esquema para el Test de Sturm.

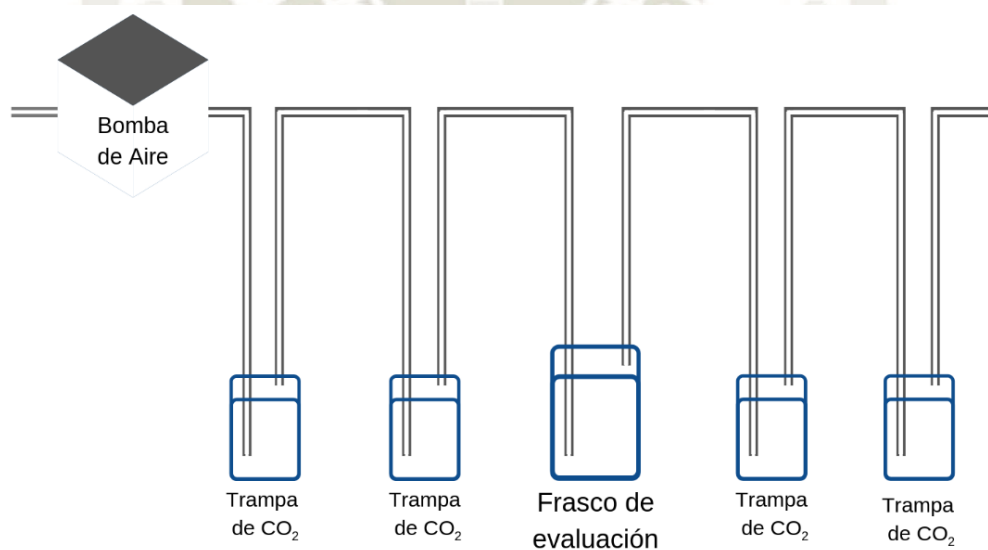


Figura 9. Esquema del Test de Sturm (Shah A. A., Hasan, Shah, Mutiullah, & Hameed, 2012)

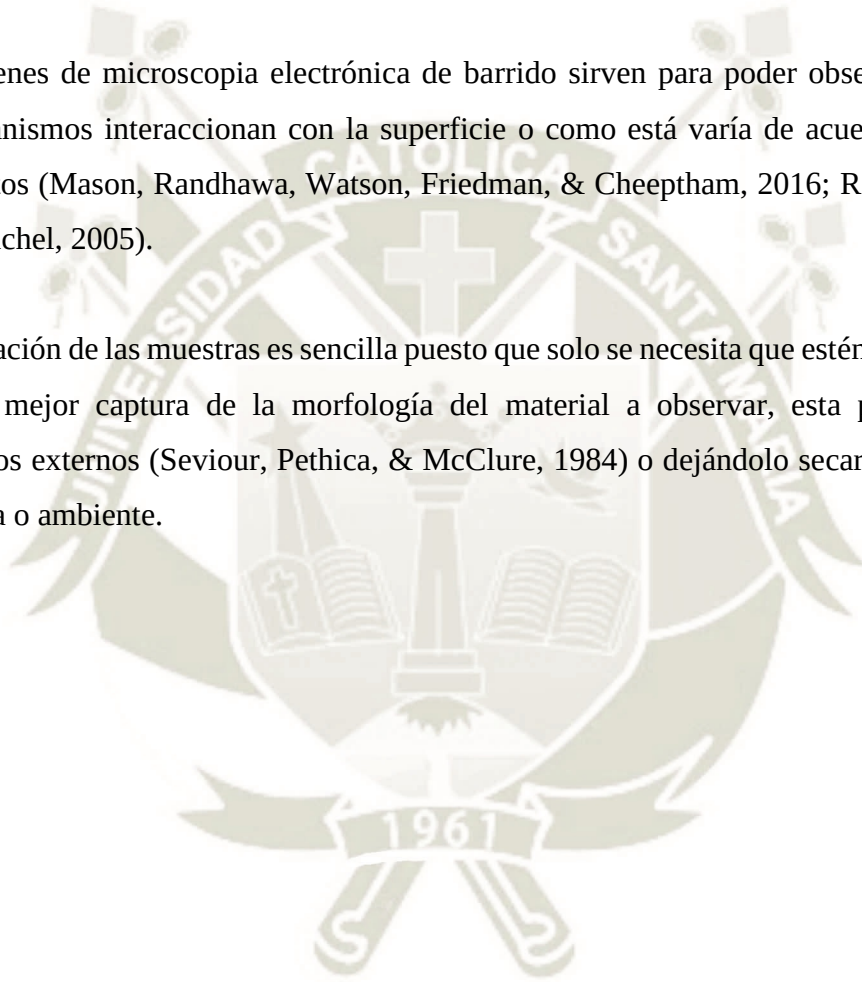
El Test de Sturm es una prueba en presencia de oxígeno (Larson, Hansmann, & Bookland, 1996), por lo que se necesita una bomba de aire y 6 frascos por batería de pruebas. Se empieza con una trampa de CO_2 de hidróxido de sodio (NaOH) al 10 M o 5 M, esta funciona como un depurador de aire evitando que el CO_2 que pueda entrar por acción de la bomba de aire interfiera con el proceso de degradación. Le sigue otra trampa de CO_2 con hidróxido de bario (Ba(OH)_2) a 0.0125 M, su función es ser un control para evidenciar si hay o no paso de CO_2 , después está el frasco de degradación, en el caso de degradación se tiene el medio de cultivo, los microorganismos degradadores y el compuesto que será fuente de carbono. Finalmente le siguen los frascos donde se recolecta el CO_2 producido la degradación bacteriana. El

contenido de los mismos se procede a titular con ácido clorhídrico (HCl) al 0.1 M (Calmon, Dusserre-Bresson, Bellon-Maurel, Feuilloley, & Silvestre, 2000; Nawong, Umsakul, & Sermwittayawong, 2018; ISO 9439, 1999).

2.4.4.3. Análisis de imágenes de microscopía electrónica de barrido

Las imágenes de microscopia electrónica de barrido sirven para poder observar cómo los microorganismos interaccionan con la superficie o como está varía de acuerdo a diversos tratamientos (Mason, Randhawa, Watson, Friedman, & Cheeptham, 2016; Rose, Tenberge, & Steinbüchel, 2005).

La preparación de las muestras es sencilla puesto que solo se necesita que estén deshidratados para una mejor captura de la morfología del material a observar, esta puede ser con compuestos externos (Seviour, Pethica, & McClure, 1984) o dejándolo secar a temperatura controlada o ambiente.



Capítulo 3. METODOLOGÍA

3.1. Tipo de Investigación

Tipo: Observacional No Experimental

Nivel: Descriptivo

3.2. Campo de verificación

La presente investigación se realizó en el laboratorio F-405 de la Universidad Católica de Santa María ubicada en la ciudad de Arequipa.

3.3. Determinación de la población, muestra y muestreo

Población: Consorcio bacteriano del neumático en descomposición seleccionado de los alrededores del río Socabaya.

Muestra: Fragmentos de llanta (Figura 15)

Muestreo: Por Conveniencia

3.4. Técnicas e instrumentos para la recopilación de datos

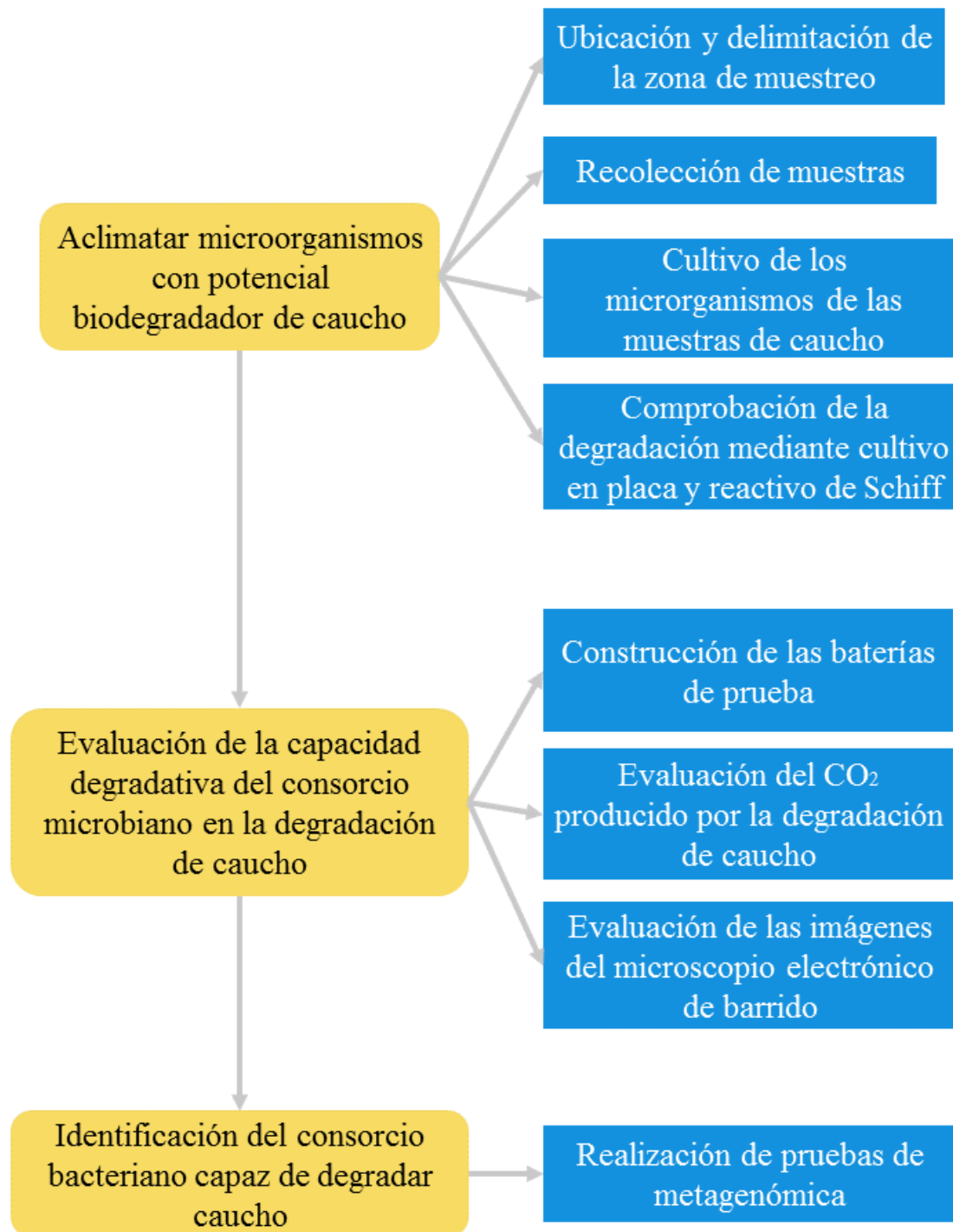


Figura 10. Diagrama de Flujo de métodos y actividades

3.5. Materiales

3.5.1. Material de toma de muestra

- Cooler 25 L
- Navaja
- Frascos de plástico 200 ml
- Gel pack

3.5.2. Material de Vidrio

- Placas Petri de 13"
- Matraces de 100 ml, 250 ml, 500 ml y 1 L
- Pipetas de 1 ml, 2 ml, 5 ml y 10 ml
- Beaker de 100 ml
- Frascos autoclavables de vidrio de 100 ml
- Varillas de vidrio
- Probetas de 50 ml y 100 ml
- Bureta de 50 ml
- Pipetas Pasteur
- Porta objetos
- Cubre objetos
- Embudo
- Bagueta

3.5.3. Material de laboratorio

- Asa de siembra
- Micropipetas de 10 a 100 μ l y de 100 a 1000 μ l
- Parafilm

- Gradillas
- Tubos Eppendorf de 15 ml
- Cintas de pH
- Tapones de jebe
- Mangueras hidráulicas de plástico
- Papel absorbente
- Espátula
- Tips para micropipeta de 10 a 100 μ l y de 100 a 1000 μ l
- Piseta de 500 ml
- Guantes de nitrilo
- Mascarillas
- Aceite de inmersión
- Papel filtro rápido
- Filtros de jeringa (0.2 μ m)
- Cámara de Neubauer

3.5.4. Reactivos de Laboratorio

- Agar Bacteriológico
- Fosfato dihidrogenado de potasio
- Fosfato monohidrogenado de potasio
- Cloruro de sodio
- Cloruro de calcio
- Sulfato de hierro
- Sulfato de amonio
- Sulfato de magnesio
- Extracto de levadura
- Peptona
- Hidróxido de sodio
- Hidróxido de bario

- Ácido Clorhídrico
- Reactivo de Schiff
- Cloroformo
- Cristal violeta
- Safranina
- Lugol
- Alcohol isopropílico
- Agua destilada

3.5.5. Equipos

- Incubadora con agitación orbital TUO-120 MRC
- Incubadora microbiológica J.P. Selecta
- Autoclave Witeg
- Microscopio trinocular con cámara ACCU-SCOPE 3013-LED
- Refrigeradora OSTER
- Balanza analítica Adventure ohaus
- Balanza digital Scale 200 gr (0.01 gr)
- Bomba de aire Marca Marina

3.5.6. Otros

- Taladro
- Extensiones de electricidad
- Google Earth para Windows 10

3.6. Métodos

3.6.1. Aclimatación de microorganismos con potencial biodegradador de caucho

Se reconoció el lugar de muestreo en el río Socabaya basado en la observación de las siguientes características: la presencia de llantas de caucho que se encuentren enterradas o sumergidas de manera parcial o total, presencia de fracturamientos o deformaciones en las superficies de las llantas, la presencia de residuos sólidos en las cercanías, presencia de cuerpos de agua en las zonas aledañas al punto a monitorear, colonización y/o presencia de organismos vegetales o animales adheridos a la llanta. Debido a que existe mayor posibilidad de encontrar microorganismos degradadores en ambientes con presencia o saturación de agua que en ambientes terrestres (Leahy & Colwell, 1990; Krishnaswamy & Ahongsangbam, 2017).

Una vez ubicado el punto de monitoreo se procedió a la recolección de la muestra. Se realizó un corte a la superficie de la matriz de la llanta de caucho, de forma que una pequeña parte fue desprendida, que fue almacenada en frascos de plástico estériles para toma de muestras previamente codificados y depositados en un Cooler con gel pack para mantener la cadena de frío. Finalmente, las muestras fueron conducidas al laboratorio para su procesamiento.

Se preparó un litro de medio de sales minerales (MSM) descrito por Kanwal y otros (2015), el cual se encuentra compuesto por fosfato di hidrogenado de potasio (KH_2PO_4) 0.04 g/L, fosfato mono hidrogenado de potasio (K_2HPO_4) 0.5 g/L, cloruro de sodio (NaCl) 0.1 g/L, cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.002 g/L, sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 0.02 g/L, sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.2 g/L, sulfato de fierro (FeSO_4) 0.001 g/L, con un pH de 7.

Se procedió al cultivo de las muestras recolectadas en el medio antes descrito por un periodo de 7 meses, dentro de los cuales se realizó la comprobación de la degradación mediante el uso del reactivo de Schiff (Shah A. A., Hasan, Shah, Mutiullah, & Hameed, 2012; Rose & Steinbüchel, 2005), para lo que se retiró 100 μl del matraz de degradación y se mezcló con

100 µl de cloroformo, se dejó secar a temperatura ambiente, y se añadió una gota del reactivo. Además, se realizó su cultivo en medio nutritivo (Vorquímica, 1981) con el objetivo de comprobar la presencia microbiana. Se realizó un frotis en las Placas Petri previamente preparadas con medio nutritivo y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Se separaron las diferentes colonias, por su forma de crecimiento, en tubos Eppendorf autoclavados y se procedió a cultivar el contenido de cada vial en agar nutritivo para luego realizar la tinción de gram a cada colonia resultante.

3.6.2. Evaluación de la capacidad degradativa de caucho del consorcio microbiano

De acuerdo con la metodología propuesta en la ISO 9439 (1999) se procedió a la construcción del sistema de evolución de CO₂ mismo que se basó en el diseño propuesto por Shah, Hasan, Shah, Mutiullah & Hameed (2012) y tuvo como objetivo poder evaluar la capacidad degradativa del consorcio microbiano.

Se prepararon 3 baterías de pruebas (3 pruebas y 3 blancos), cada una compuesta por 8 frascos autoclavables de 100 ml y dos matraces de 100 ml divididos en dos grupos (cada grupo compuesto por 4 frascos y un matraz) los mismos que fueron codificados con la conformación especificada en la Tabla 4. Cada sistema fue sellado con tapones de jebe de alta densidad conectados entre sí con varillas de vidrio y mangueras hidráulicas. Se esterilizó el sistema antes de ser puesto en funcionamiento. El caucho triturado fue donado por la empresa Reencauchadora RELINO S.A. y fue tamizado en Tamiz N° 20.

Tabla 4. Conformación de la batería de pruebas

Batería	Trampa de CO ₂	Trampa de CO ₂	Frasco de Evaluación	Trampa de CO ₂	Trampa de CO ₂
Prueba	NaOH	Ba(OH) ₂	Medio MSM, microorganismos, matriz de caucho	Ba(OH) ₂	Ba(OH) ₂

Blanco	NaOH	Ba(OH) ₂	Medio MSM, microorganismos	Ba(OH) ₂	Ba(OH) ₂
---------------	------	---------------------	----------------------------	---------------------	---------------------

Las concentraciones de cada solución están especificadas en la Tabla 11 del Anexo 4, se usaron dos botellas de vidrio de 4 litros para la preparación de las soluciones a usar en toda la prueba, cada una de ellas fue titulada con HCl 1M al inicio del experimento para conocer su concentración exacta.

En la Figura 11 se puede observar la configuración de un sistema de degradación, el que se rellenó de la siguiente manera: cada frasco de la primera columna con NaOH al 5 M, la segunda columna con Ba(OH)₂ al 0.0125 M, la tercera columna corresponde al matraz de evaluación que contuvo los microorganismos junto con el caucho en medio MSM para la prueba o en caso de ser blanco, el caucho y el medio MSM. Finalmente, los frascos de la cuarta y quinta columna fueron rellenados con Ba(OH)₂ 0.0125 M.

Se preparó 600 ml de NaOH 5M, y 8 Litros de Ba(OH)₂ 0.0125 M, siendo estos guardados para todo el proceso de evaluación.

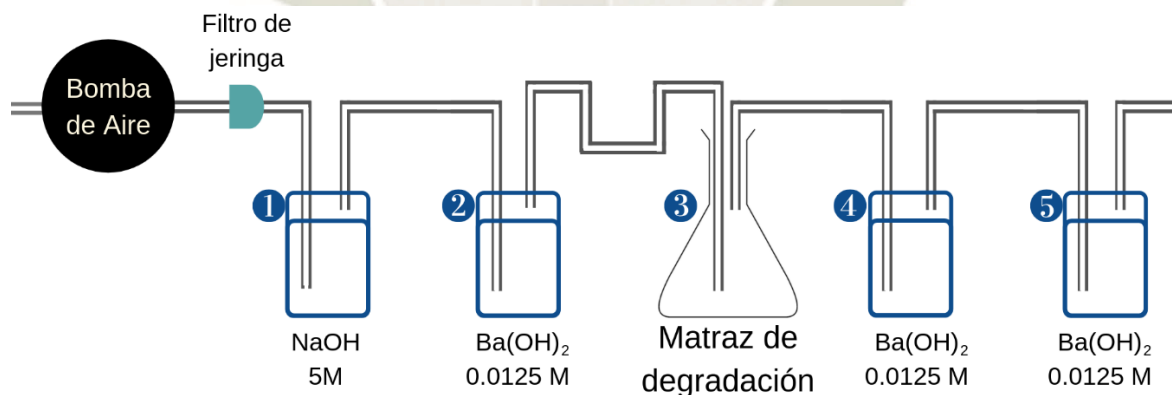


Figura 11. Prueba de Sturm modificada

Se calculó la cantidad teórica de dióxido de carbono (CO₂ Th) presente en el matraz de degradación luego de añadido el caucho, el cual simula la conversión total de carbono orgánico en CO₂. Véase Ecuación 1.

$$CO_2Th = \rho_c \times V_L \times \frac{44}{12}$$

Ecuación 1. Cantidad Teórica de CO_2

Donde:

CO_2Th es la cantidad de CO_2 teórica en mg.

ρ_c es la concentración de carbono orgánico del caucho en el matraz de evaluación en mg/Lt.

V_L es el volumen de la solución de ensayo en litros (Lt).

44 y 12 son la masa molecular del dióxido de carbono y del carbono respectivamente, estos datos sirven para obtener la cantidad de dióxido de carbono a partir del carbono orgánico.

Una vez armadas todas las baterías de pruebas, se ubicó cada prueba dentro de una incubadora con agitación orbital, la cual funcionó a 150 RPM y 35 °C, con una aireación de 50-100 ml/min (ISO 9439, 1999), durante toda la prueba, y una concentración inicial de 1.34×10^7 Bacterias/ml, en la Figura 12 se puede observar la disposición de la prueba final.

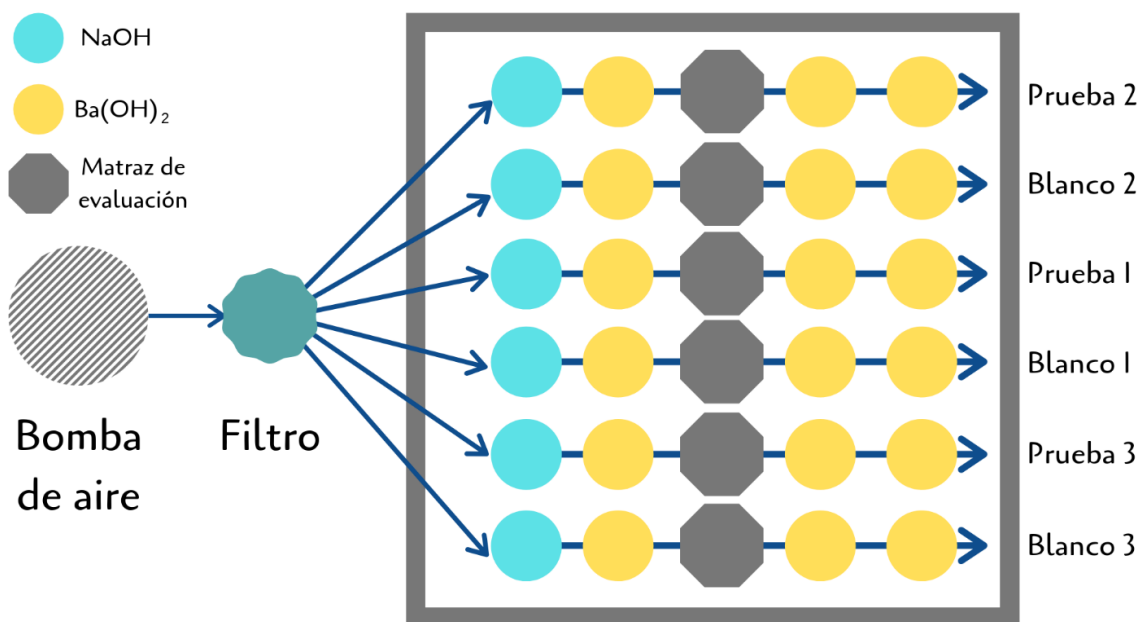


Figura 12. Esquema de disposición de la prueba

Cada 2 días inicialmente y luego cada 5 días el frasco de la cuarta columna fue retirado y reemplazado por los frascos de la quinta columna, y esta última fue renovada con $\text{Ba}(\text{OH})_2$. El frasco retirado fue filtrado y titulado con HCl 0.1M y fenolftaleína, para lo que se tomó una alícuota de 10 ml y el gasto final fue anotado. El procedimiento se hizo tanto para la prueba como para el blanco. Se analizó la producción de CO_2 de acuerdo con la Ecuación 2.

$$m_t = \left\{ \frac{2C_{Ba} \times V_{Ba}}{C_{HCl}} - V_A \frac{V_{Bt}}{V_{Bz}} \right\} C_{HCl} \times 22$$

Ecuación 2. Producción de CO_2

Donde:

m_t es la masa de CO_2 en mg retenida en las trampas de CO_2 .

C_{Ba} es la concentración de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ en mol/Lt.

V_{Ba} es el volumen en ml de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ al inicio.

C_{HCl} es la concentración de HCl en mol/Lt.

V_A es el volumen en ml de HCl usados para la titulación de $\text{Ba}(\text{OH})_2$.

V_{Bt} es el volumen en ml de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ antes de la filtración.

V_{Bz} es el volumen en ml de la alícuota de $\text{Ba}(\text{OH})_2$.

22 es la mitad de la molaridad del CO_2 .

Con el dato de CO_2 retenido, en mg, se procedió a calcular el porcentaje de biodegradación o también conocido como la evolución del CO_2 , de acuerdo con la Ecuación 3.

$$D_m = \frac{\sum m_p - \sum m_B}{\text{CO}_2 Th} \times 100$$

Ecuación 3. Porcentaje de Biodegradación

Donde:

D_m es el porcentaje de biodegradación.

Σm_p es la masa en mg de CO₂ liberado en el matraz de evaluación usado como prueba, desde el comienzo hasta el final.

Σm_B es la masa en mg de CO₂ liberado en el blanco, desde el comienzo hasta el final.

CO_2Th es la cantidad de CO₂ teórica en mg.

Terminada la prueba se procedió a hacer tinción de gram de los matraces de degradación evaluados y a retirar los pedazos de caucho de los matraces de evaluación, los que secaron a temperatura ambiente para su posterior análisis con imágenes de microscopía electrónica de barrido.

Así mismo, durante el periodo de funcionamiento del sistema se cuantifico el crecimiento microbiano mediante conteo de microorganismos en cámara de Neubauer con profundidad de 0.02 mm, dividida en 25 grupos de 16 cuadrados (Bruno, Bartelli, Rodrigues, & Briones, 2018; Baena-Ruano, y otros, 2006), usando el microscopio trinocular ACU-SCOPE 3013-LED en aumento objetivo de 40x y oculares de 15x, en contraste de luz blanca. Para lo que cual se tomó una alícuota de 1 ml cada 2 a 5 días dependiendo de la fase en la que se encontraba el sistema (ISO 9439, 1999).

3.6.3. Identificación molecular del consorcio bacteriano capaz de degradar caucho

De las muestras obtenidas del consorcio bacteriano se realizó la secuenciación de alto rendimiento (secuenciamiento metagenómico) del gen 16S ARNr y un análisis bioinformático en el laboratorio de genética de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín.

Capítulo 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Aclimatación de microorganismos con potencial biodegradador de caucho

Se recolectó muestras en las áreas cercanas al río Socabaya, debido a que la zona cumplía con los parámetros descritos por Linos y otros, (2000) donde mencionan que se puede aislar organismos degradadores de caucho de agua que se encuentre en contacto con llantas por largos periodos de tiempo. Estudios adicionales demostraron la presencia de organismos en tierra contaminada con caucho (botaderos con llantas, botaderos mixtos con residuos sólidos y llantas) (Nawong, y otros, 2018; Srivastva, y otros, 2015). Todos los estudios observados poseen características similares, la presencia de llantas antiguas abandonadas y que poseen algún tipo de contacto con suelo o agua en sus alrededores, y adicionalmente la interacción con residuos o sustratos adicionales por períodos de tiempo prolongado. En la Figura 13 se puede observar la localización del punto de muestreo, al que le corresponden las siguientes coordenadas: latitud $16^{\circ}28'46''$ S y longitud $71^{\circ}32'24''$ O, a 2250 m.s.n.m. El neumático muestreado corresponde a una llanta de bicicleta (Figura 14), donde se evidenció la presencia de fracturas superficiales, las mismas que fueron colonizadas por larvas de insectos, signos de haber estado a la intemperie por un periodo de tiempo prolongado (Figura 38 y Figura 39).

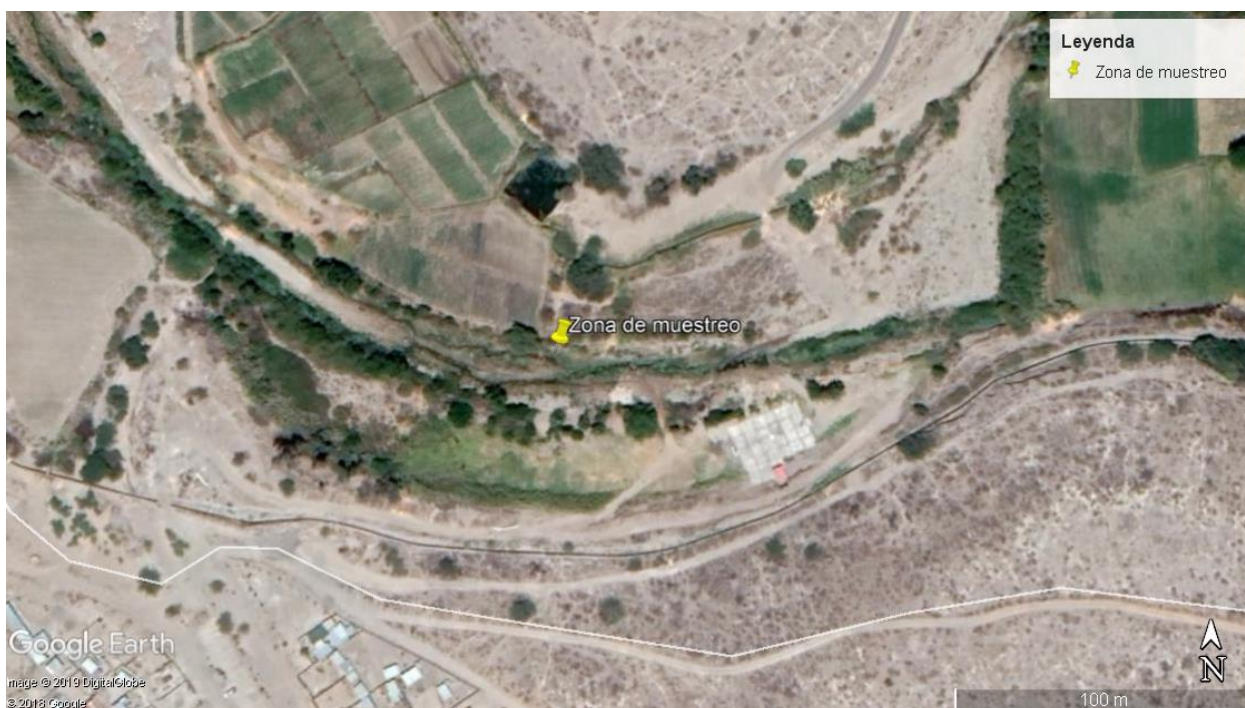


Figura 13. Ubicación satelital de la zona de muestreo (Fuente: Google Earth)



Figura 14. Llanta sumergida en el río Socabaya

Se recolectaron satisfactoriamente dos muestras de caucho, usando una navaja y frascos de plástico estériles. Posteriormente se colocaron en un Cooler con gel packs para conservar en cadena de frío y fueron trasladadas al laboratorio. Las muestras recolectadas fueron sembradas en medio de sales minerales (MSM), durante un periodo de 7 meses, en un agitador magnético (Figura 15).

El uso de MSM se encuentra reportado dentro de normativas internacionales como un medio ideal para el crecimiento de bacterias en procesos de degradación de distintas fuentes de carbono (ISO 9439, 1999). Se ha reportado su uso en la degradación de compuestos como hidrocarburos alifáticos y cíclicos como n-Hexadecano (Mishra & Singh, 2012), fenoles (Kılıç, 2009), organoclorados (Hexa-cloro-ciclohexano) (Kumar D. , 2018), dicloro difenil tricloroetano (Fang, Dong, Yan, Tang, & Yu, 2010), organofosforados (Yañez-Ocampo, y otros, 2009), colorantes (El-Bouraie & El-Din, 2016), caucho (Shah A. A., Hasan, Shah, Kanwal, & Zeb, 2013), etc. Así mismo se han logrado cultivar de manera satisfactoria bacterias degradadoras de caucho mediante el uso de medios de sales minerales suplementados con este compuesto como única fuente de carbono (Linós A. , y otros, 2000; Srivastva, y otros, 2015; Bosco, y otros, 2018). Estudios realizados para la optimización de la degradación de caucho de las cepas bacterianas *Bacillus sp.* y *Bacillus sp.* cepa S10 (Kanwal, y otros, 2015; Lao, de Toledo, & Shim, 2018) demuestran la gran efectividad del medio para el desarrollo de bacterias. Así mismo se ha podido realizar aislamientos exitosos de bacterias degradadoras de caucho con el uso de este medio (Chia, y otros, 2014; Nawong, Umsakul, & Sermwittayawong, 2018).



Figura 15. Fragmentos de caucho recolectado

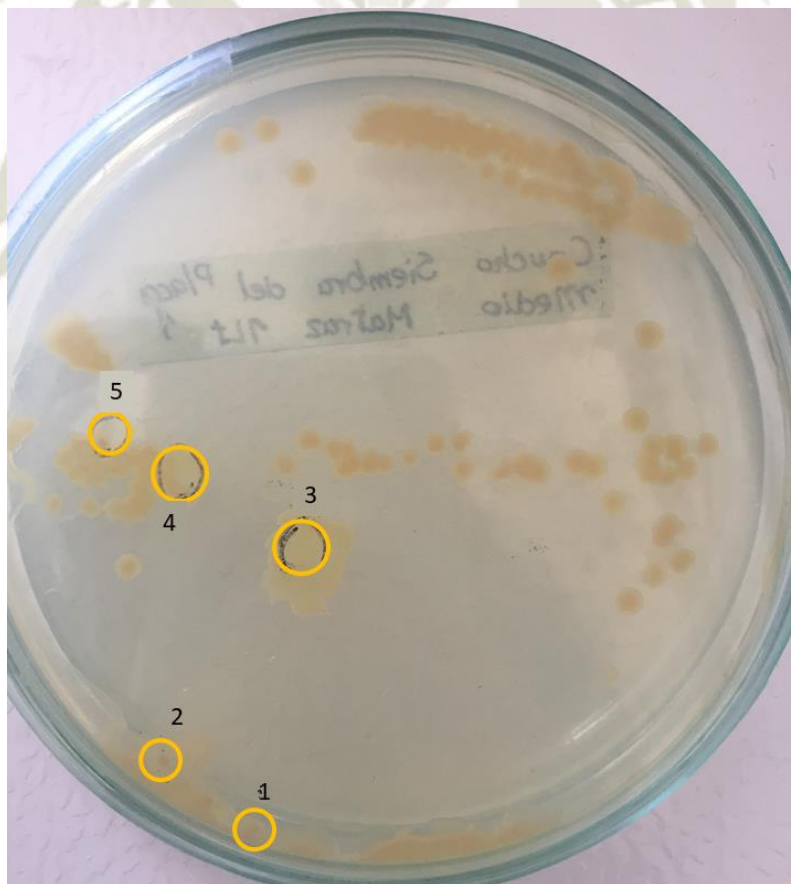


Figura 16. Placa de cultivo inicial

Pasado el tiempo de incubación, se comprobó la presencia microbiana, mediante el frotis de una alícuota de MSM en medio nutritivo, observando un crecimiento positivo tal y como se evidencia en la Figura 16, reconociendo 5 tipos de colonias microbianas con patrones de crecimiento diferentes, las colonias 1 y 2 tenían una forma de crecimiento circular, las colonias 3, 4 y 5 tenían una forma de crecimiento plano, de consistencia viscosa. Cada colonia fue luego cultivada por separado (Figura 17 a Figura 21), del análisis del crecimiento y de las diversas tinciones de Gram, se pudo encontrar similitud entre las formas de desarrollo de las colonias, siendo en mayoría bacterias con formas de bacilos gram positivos con la capacidad de formar cadenas y bacilos gran negativos con una ligera forma de coma (Figura 22 y Figura 23). Según Birke, y otros (2017) la mayoría de las bacterias capaces de degradar caucho y producir las enzimas oxigenasas de caucho son gram negativas, sin embargo, se ha evidenciado degradación tanto de bacterias gram positivas (Shah A. A., Hasan, Shah, Kanwal, & Zeb, 2013). Se distinguen dos tipos de bacterias degradadoras dependiendo de la estrategia de colonización aplicada; el primer grupo comprendido por bacterias que pueden degradar caucho mediante la excreción de enzimas extracelulares y que no necesitan de un contacto directo obligatorio para poder desarrollarse, y el segundo grupo comprendido por bacterias que necesitan un contacto estricto con el polímero a degradarse para tener un crecimiento efectivo y que además no son capaces de expresar crecimiento en placa, siendo estas últimas las que poseen mayor capacidad de degradar caucho (Jendrosseck & Birke, Rubber oxygenases, 2019). Sin importar la estrategia de colonización de las diferentes bacterias los metabolitos finales de degradación son siempre muy similares (Roy, Das, Banerjee, & Bhowmick, Comparative studies on rubber biodegradation through solid-state and submerged fermentation, 2006) constituyendo en su mayoría aldehídos y cetonas con diferentes tamaños de cadena (Chengalroyen & Dabbs, 2013).



Figura 17. Cultivo de la Colonia N°1



Figura 18. Cultivo de la Colonia N°2



Figura 19. Cultivo de la Colonia N°3



Figura 20. Cultivo de la Colonia N°4



Figura 21. Cultivo de la Colonia N°5

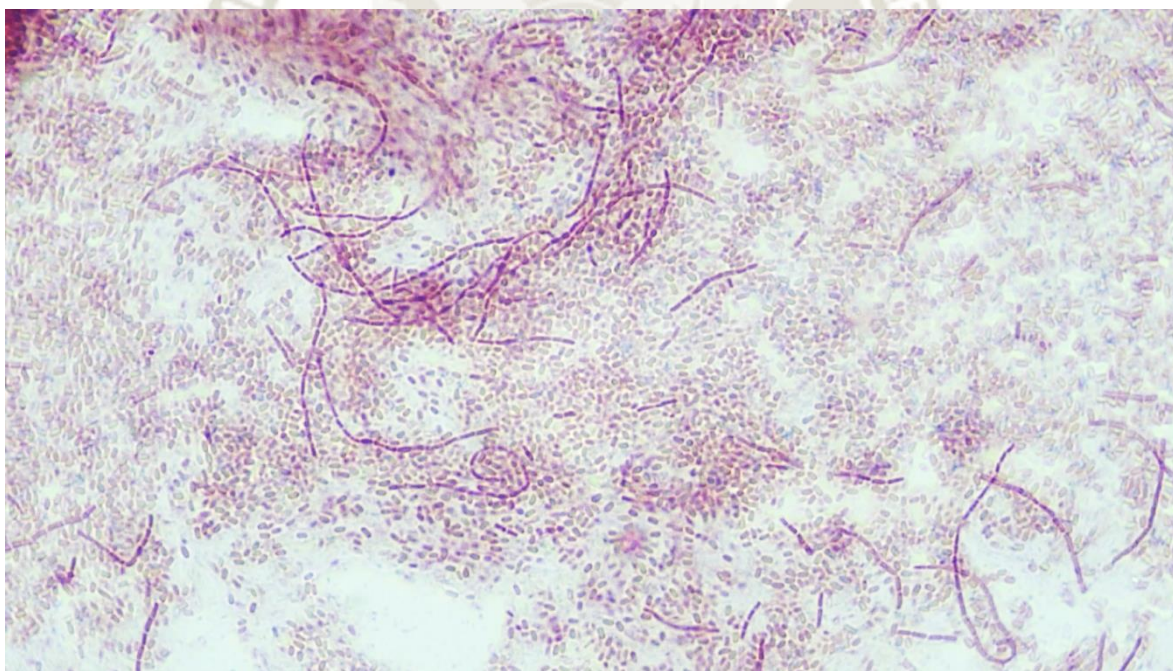


Figura 22. Tinción de gram 100x

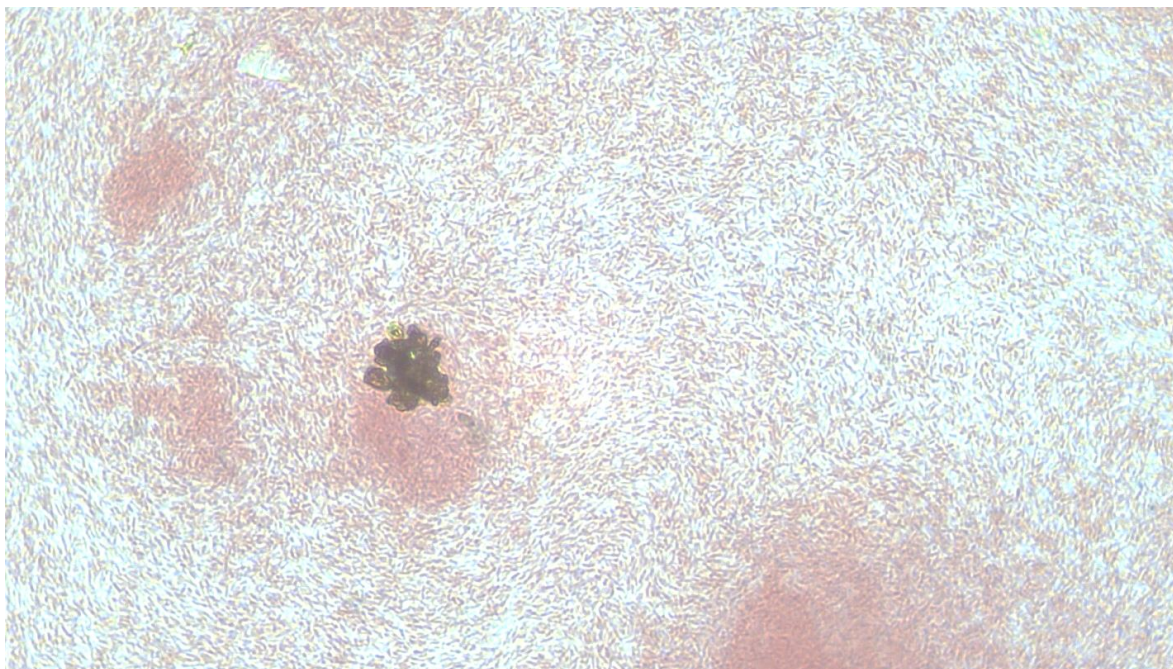


Figura 23. Tinción de gram 40x

Finalmente se llevó a cabo la comprobación cualitativa de metabolitos de degradación con el reactivo de Schiff, en la Figura 24 se puede apreciar la coloración a rosa púrpura indicando la presencia de los grupos funcionales aldehídos y cetonas en el matraz de degradación. El cambio de color del reactivo de Schiff a una coloración rosa magenta se da únicamente en presencia de grupos aldehídos (CHO) y cetona (CO) (Andler, y otros, 2018; Marchut-Mikołajczyk, y otros, 2019). Andler, y otros (2018) así como Vidya y Growther (2019) reportaron resultados de esta prueba como un indicio de reducción positiva de caucho, independientemente de los microorganismos utilizados, siendo este tipo de prueba comúnmente utilizada en sistemas biológicos de degradación de caucho debido al tipo de metabolitos que se produce luego de la degradación (Shah A. A., Hasan, Shah, Kanwal, & Zeb, 2013). Aunque todavía se desconoce la ruta de degradación exacta, Lihn, y otros (2017) propusieron la ruta de formación de aldehídos y cetonas por actividad enzimática a partir de la degradación del caucho o (poly(cis-1,4-isopreno)), misma que se teorizó posible mediante una oxidación de la cadena polimérica permitiendo el ingreso de oxígenos dentro de la cadena y fraccionándola en componentes cada vez más pequeños y con grupos químicos correspondientes a aldehídos y cetonas por actividad enzimática (Figura 25).

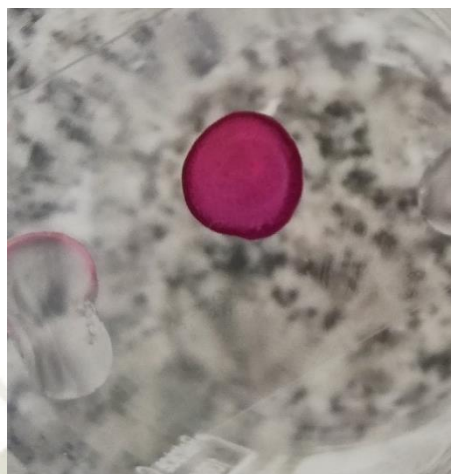


Figura 24. Coloración con reactivo de Schiff

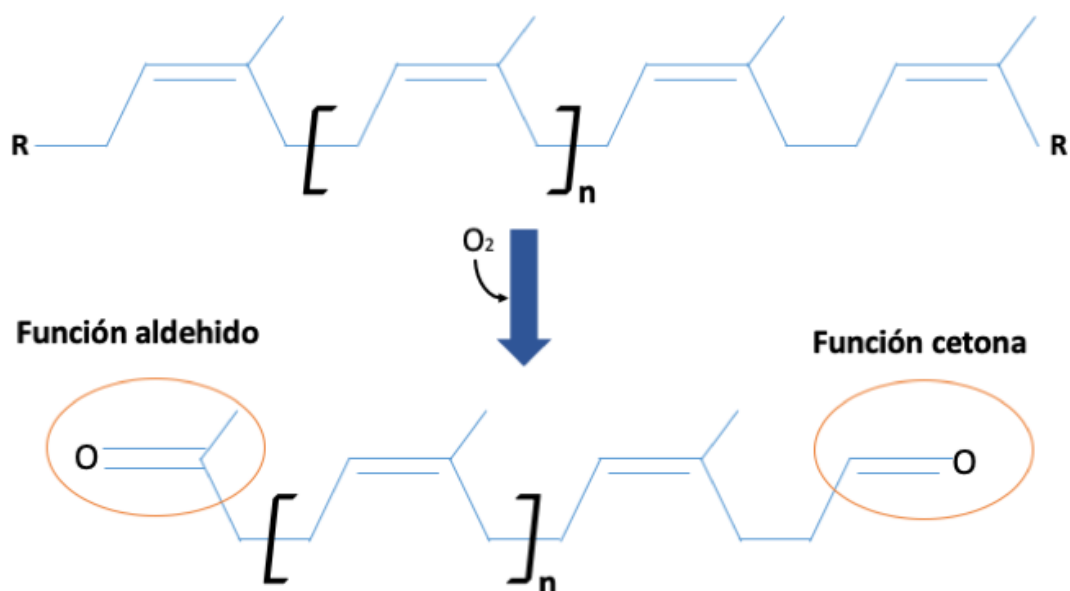


Figura 25. Formación de aldehídos y cetonas por degradación del caucho (Linh, y otros, 2017)

4.2. Evaluación de la capacidad degradativa del consorcio microbiano

La curva de crecimiento fue trazada a partir de las observaciones en cámara de Neubauer (Figura 26) para los periodos establecidos de acuerdo con la metodología (ISO 9439, 1999). La Figura 27 muestra la curva de crecimiento del consorcio cultivado en medio MSM A 35°C a 150 RPM, condiciones similares fueron reportadas por los siguientes autores: Ismail, y otros (2013), Nawong, y otros (2018), Kanwal y otros (2015), Chia y otros (2014), Shah, y otros (2012).

Se observó el desarrollo de la fase exponencial hasta el día 4 de la experimentación, seguido por una fase estacionaria que se desarrolló hasta el día 25, para el día 27 se evidenció un decrecimiento en el conteo de microorganismos y nuevamente un aumento para el día 33. La producción sostenida de aldehídos y cetonas desprendidos de la degradación de caucho (Linh, y otros, 2017) puede haber generado este tipo de comportamiento debido a la ligera toxicidad presentada de algunos tipos de estos compuestos sobre la vida microbiana (Kunjabur & Prather, 2015) y al ligero cambio en las condiciones químicas del ambiente. Esto a su vez podría haber ocasionado un proceso de sucesión microbiana favoreciendo la reproducción de cepas capaces de degradar estos nuevos sustratos que se encontraban formando parte del consorcio y de la misma forma activando nuevas interacciones entre los microorganismos (Mikesková, Novotný, & Svobodová, 2012)

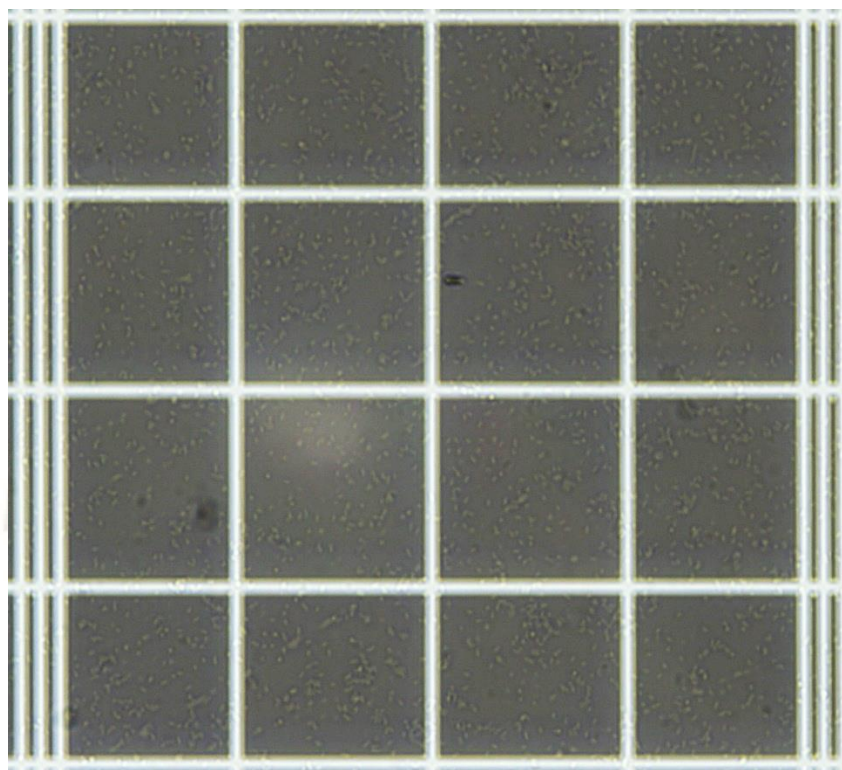


Figura 26. Microorganismos en la cámara de Neubauer

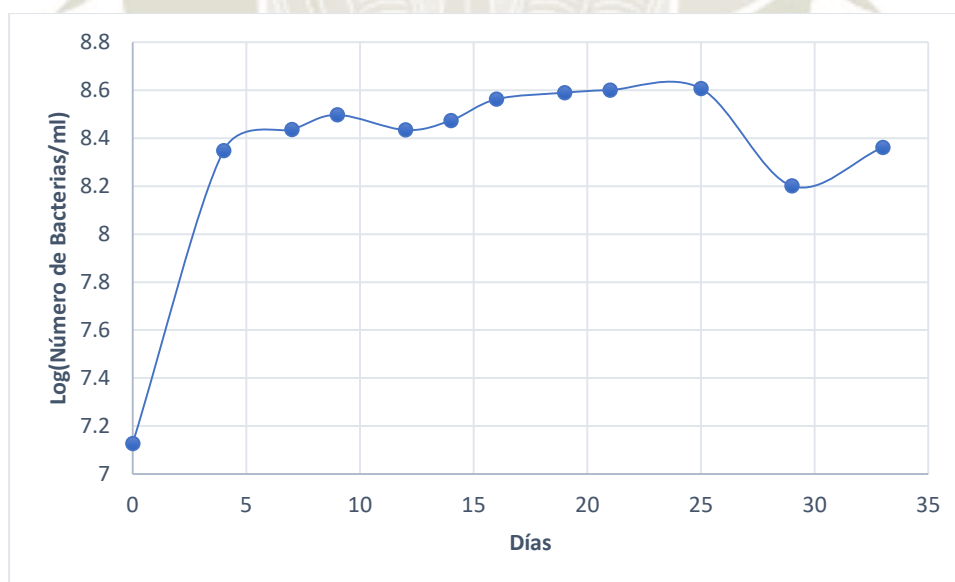


Figura 27. Curva de crecimiento microbiano

El método de respiración microbiana o formación de CO_2 es muy usado para medir la degradación en laboratorio, la cual nos da una medida más exacta de la transformación del polímero en un producto menos dañino (Pagga, Schäfer, Müller, & Pantke, 2001), estando este método estandarizado en la ISO 9439 (1999). Para ello se adaptó un sistema que fue esterilizado previo a su funcionamiento para evitar alteración por contaminación y sellado con Parafilm, sistema que fue utilizado previamente por Shah, y otros (2012) para la degradación de piezas de guantes de látex. En la Figura 28, se puede apreciar el resultado final del sistema de aireación que contaba de una bomba de aire, mangueras hidráulicas, divisores regulables de aire y un filtro de jeringa para evitar el ingreso de microorganismos al sistema.

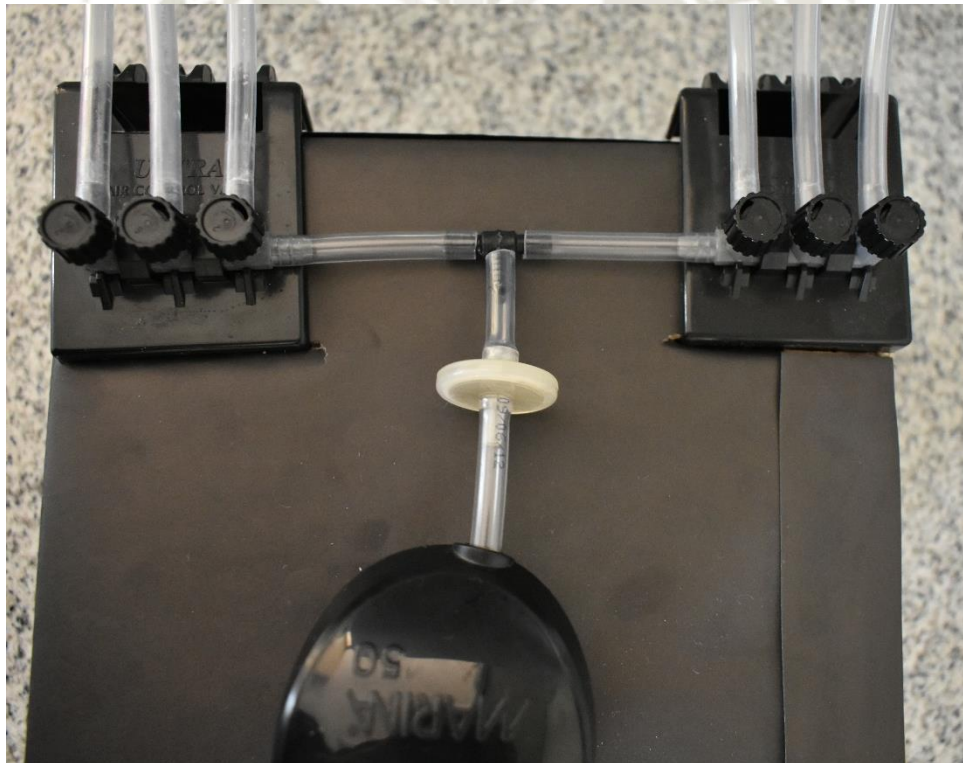


Figura 28. Sistema de aireación

En la Figura 29 podemos observar las conexiones realizadas con mangueras hidráulicas y el sistema dentro del shaker orbital. La cantidad de caucho introducido fue de 0.5% p/v, por lo que el CO_2 teórico (Ecuación 1) en el sistema fue de 183,33 mg de CO_2 . En el Anexo 3 se

pueden observar más fotografías del sistema de degradación de caucho completo y funcionando.



Figura 29. Sistema de degradación

En la Tabla 12 a la Tabla 18 del Anexo 4, se puede apreciar los datos recolectados en el desarrollo de toda la prueba siendo el resultado final expresado en miligramos de CO_2 producida por ensayo. Al finalizar el ensayo se midió el pH de todos los matraces para comprar que no hubo alteración en el medio de cultivo, el resultado final fue de 7, demostrando que no hubo alteración en este parámetro.

En la Tabla 5 podemos observar los datos en porcentajes de degradación de las tres repeticiones, visualizando un incremento significativo del día 1 al día 5, sin embargo, este disminuye conforme avanzan los días, concordando con la curva de crecimiento descrita anteriormente. Se realizó una comparación de medias (Tabla 6) encontrándose un Coeficiente de Variación (C.V.) es de 15%, lo cual evidencia similitud en los tres ensayos realizados.

Tabla 5. Porcentaje de Biodegradación

Día	Porcentaje de Biodegradación		
	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3
0	0	0	0
1	0.3	0.24	0.3
3	1.2	1.8	1.5
5	1.8	1.2	1.5
7	0.6	0.6	0.84
11	0.84	0.6	0.6
15	0.3	0	0
19	0.6	0	0
Total	5.64	4.44	4.74

Tabla 6. Descripción de la acumulación de degradación de caucho

Promedio	Desviación	D/P	C. V.
4.94	0.6244998	0.126417	12.641696

Donde:

D/P es la división entre la Desviación Estándar y el Promedio

C.V. es el Coeficiente de Variación

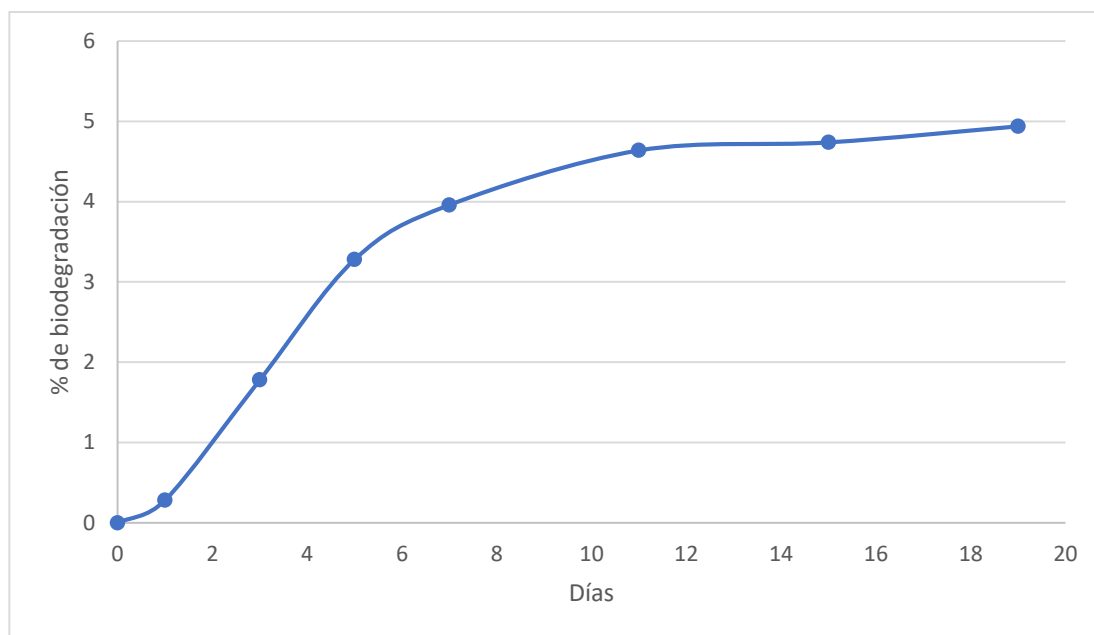


Figura 30. Curva de biodegradación de caucho

En la presente investigación se registró una degradación de aproximadamente 5% en un periodo de 20 días (Figura 30), calculada a partir de lo descrito en la ISO 9439 (1999). De la misma manera, en la Tabla 7 se muestran los estudios realizados por Berekaa, y otros (2000) en donde se usaron guantes de látex de caucho natural sin pretratamiento durante 40 días se logró un 4% de degradación con la utilización de la cepa bacteriana *Gordonia sp.* notándose la efectividad del consorcio de este estudio, ya que pudo conseguir un porcentaje moderadamente mayor en a mitad del tiempo de análisis, sin el uso de pretratamientos y con una matriz de caucho más compleja, a su vez Nawong, y otros (2018) probaron distintos sistemas para la degradación de guantes de látex, obteniendo con un mayor porcentaje el sistema de cultivo mixto seleccionando con cepas más eficientes, seguido del consorcio de cepas aisladas el cual obtuvo un 9.78% en 1 mes, y un menor porcentaje cuando probó el sistema con una sola cepa, y de la misma forma Linos, y otros (2000) evaluaron la capacidad degradativa de la *Pseudomona aeuroginosa* en matrices de caucho natural y sintéticos puros obtenidos de laboratorio, obteniendo un 35% y 18% respectivamente, para la matriz de guante de látex vulcanizado y tratado con acetona lograron un 25%. El porcentaje de degradación podría aumentar si la matriz usada es menos compleja y se optimizan las

condiciones y de acuerdo a cada tipo de bacteria (Kanwal, Shah, Qayyum, & Hasan, 2015), o si se probarán cultivos mixtos ya reconocidos por su capacidad degradativa (Nawong, Umsakul, & Sermwittayawong, 2018), por otro lado, la degradación puede verse afectada por los aditivos adicionales de las llantas, como los estabilizantes, antimicrobianos y la misma vulcanización de los neumáticos (Altenhoff, de Witt, Andler, & Steinbüchel, 2019) siendo estos muy tóxicos para los microorganismos (Aboelkheir, Visconte, Oliveira, Filho, & Souza Jr, 2019).

Tabla 7. Comparación de porcentaje de degradación

Tipo de Cultivo	Tipo de caucho degradado	Porcentaje de biodegradación	Referencia
Consorcio	Caucho vulcanizado (llanta)	4.96% (20 días)	<i>Nuestro resultado</i>
<i>Gordonia sp. strain Kb2</i>	Guante de látex sin tratamiento	4 % (40 días)	(Berekaa, y otros, 2000)
	Guante de látex tratado con cloroformo	10% (40 días)	
	Guante de látex tratado con acetona	15 % (40 días)	
Cultivo mixto con las cepas más efectivas		14.67% (1 mes)	
Consorcio	Guante de látex	9.78% (1 mes)	(Nawong, y otros, 2018)
<i>Rhodococcus pyridinivorans F5</i>		4.89% (1 mes)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Caucho natural concentrado	35% (40 días)	(Linos, y otros, 2000)
	Caucho sintético	18% (40 días)	
	Guante de látex	25% (40 días)	

Otros estudios probaron degradar diferentes matrices de caucho con microorganismos (Tabla 8) con porcentajes de degradación mayores que se deben a la menor complejidad de las matrices de caucho a degradar. Diversos otros estudios de degradación de caucho usan pretratamientos con acetona o distintos solventes orgánicos como Linos, y otros (1999), Linos y otros (2000), Chia y otros (2014), Berekaa, y otros (2000), Nanthini & Sudesh (2017)

y Tsuchii & Tokiwa (2001), el uso de estos tiene por finalidad eliminar antioxidantes y demás otros componentes químicos añadidos a las matrices de caucho (guantes o llantas) durante su fabricación (Berekaa, Linos, Reichelt, Keller, & Steinbüchel, 2000), así mismo, estos pretratamientos influyen en el porcentaje de degradación en su mayoría haciéndolo más eficiente. En el presente estudio no se realizó ningún pretratamiento químico ni físico a la matriz de degradación debido a que la poca viabilidad económica que presenta el uso de los pretratamientos, lo que para fines del proyecto de investigación del cual es parte esta tesis es poco favorable puesto que se plantea un escalamiento del proceso.

Tabla 8. Resumen de bacterias degradadoras de caucho (Chengalroyen & Dabbs, 2013)

Cepas Bacterianas	Tipo de caucho degradado	Referencia
<i>Gordonia polyisoprenivorans</i>	Caucho natural y sintético (después de remover antioxidantes), látex natural ^a	(Linos, Steinbüchel, Spröer, & Kroppenstedt, 1999)
<i>Gordonia westfalica</i>	Caucho natural y sintético, látex natural ^a	(Linos A. , y otros, 2002)
<i>Gordonia polyisoprenivorans</i> VH2 y Y2K	Caucho natural y sintético (después de remover antioxidantes), látex natural ^a	(Arenskötter, Baumeister, Berekaa, & Pötter, 2002)
<i>Streptomyces coelicolor</i> y <i>S. griseus</i> 18a, <i>Nocardia</i> DSMZ43191, <i>Actinobacter calcoaceticus</i> , <i>Xanthomonas</i> sp.	Caucho vulcanizado (guante)	(Bode, Kerkhoff, & Jendrosseck, Bacterial degradation of natural and synthetic rubber., 2001)
<i>Streptomyces</i> sp. La7	Látex, caucho natural no vulcanizado	(Gallert, 2000)

<i>Nocardia</i> sp. 835A	Caucho natural y sintético no vulcanizado, caucho natural vulcanizado (guantes de látex, bandas, tubos)	(Tsuchii, Suzuki, & Takeda, Microbial Degradation of Natural Rubber Vulcanizates, 1985)
<i>Xanthomonas</i> sp.	Látex natural purificado, caucho sintético	(Jendrossek & Reinhardt, 2003)
<i>Gordonia</i> sp. Kb2, Kd2 y VH2; <i>Micromonospora aurantiaca</i> W2b; <i>Mycobacterium fortuitum</i> NF4	Caucho natural y sintético (seguido de remoción de antioxidantes) ^a	(Berekaa, Linos, Reichelt, Keller, & Steinbüchel, 2000)
<i>Streptomyces</i> sp. SIG, S3D, S4C, S4E, S4F y S4G; <i>Amycolatopsis</i> sp. SIA y SID; <i>Nocardia</i> sp. SF3	Caucho vulcanizado (guantes)	(Heisey & Papadatos, 1995)
<i>Nocardia</i> 835A cepa mutante Wh, Rw y Rc	Caucho vulcanizado (llanta)	(Tsuchii & Tokiwa, 1999)
<i>Streptomyces</i> sp.; <i>Micromonospora</i> sp.; <i>Microtetraspora</i> sp.; <i>Actinoplanes</i> sp.; <i>Nocardia</i> sp.; <i>Actinomadura</i> sp.; <i>Dactyllosporangium</i> sp.	Látex de caucho natural	(Jendrossek, Tomasi, & Schlegel, 1997b)
<i>Streptomyces coelicolor</i> 1A;	Caucho sintético	(Bode, Zeeck, Plückhahn, & Jendrossek, 2000)

<i>Pseudonomas citronellolis</i>		
<i>Gordonia</i> sp. VH2 y Kb2, <i>Mycobacterium fortuitum</i> NF4	Caucho vulcanizado (Guante)	(Linos A. , y otros, 2000)
<i>Micromonospora aurantica</i> W2b	Látex disperso en agar	(Linos, Rudolf, Keller, & Steinbüchel, 2000)
<i>Actinomadura</i> sp. E6, <i>Nocardia farcinica</i> E1, <i>Thermomonospora curvata</i> E4 y E5	Látex disperso en agar, caucho sintético	(Ibrahim, Arenskotter, Luftmann, & Steinbüchel , 2006)
<i>Pseudonomas</i> sp.	Caucho natural y sintético (guante)	(Roy, Das, Banerjee, & Bhowmick, 2006)
<i>Bacillus</i> sp. SBS ²⁵	Látex de caucho natural	(Cherian & Jayachandran, 2009)
<i>Streptomyces</i> sp. LCICA4, <i>Actinoplanes</i> sp. OR16, <i>Methylibium</i> sp. NS21	Látex disperso en agar	(Imai, y otros, 2011)
<i>Streptomyces</i> sp., <i>Amycolatopsis orientalis</i> SY6, <i>Methylibium fulvum</i> HZ , <i>Pseudonocardia</i> sp.	Látex disperso en agar	(Chengalroyen & Dabbs, Characterization of rubber degrading isolates, 2012)

a. Creció sobre el látex extendido directamente en placas, no cuando se dispersó en agar. Las bacterias Gram negativas se resaltan en negrita.

Terminando el periodo de degradación, se procedió a retirar fragmentos de caucho del matraz de degradación para ser secados y proceder con el análisis de microscopía electrónica de barrido, siguiendo la técnica establecida por Rose, y otros (2005).

De la Figura 31 a la Figura 33 se puede apreciar los resultados de las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM), de la comparación de la matriz de caucho sin degradar (Imágenes de la izquierda) frente a la matriz sometida al proceso de biodegradación bacteriana (Imágenes de la derecha). Se puede evidenciar un aumento en la rugosidad y un aumento en la profundidad y número de grietas luego del tratamiento, datos que coinciden con los reportados por Marchut-Mikolajczyk, y otros (2019), Lao, y otros (2018) y Roy, y otros (2006)

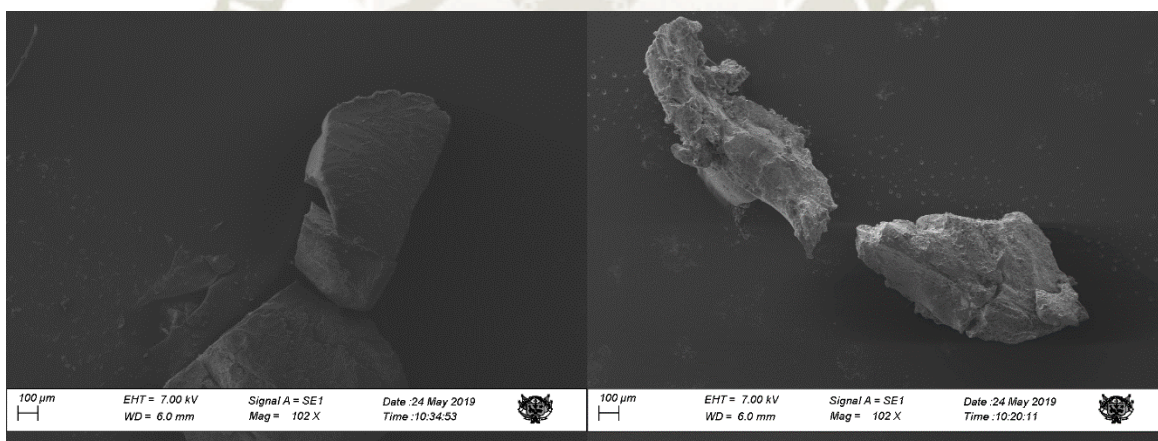


Figura 31. Matriz de caucho sin degradar (izq.) matriz degradada en 1 mes (der.) 102X

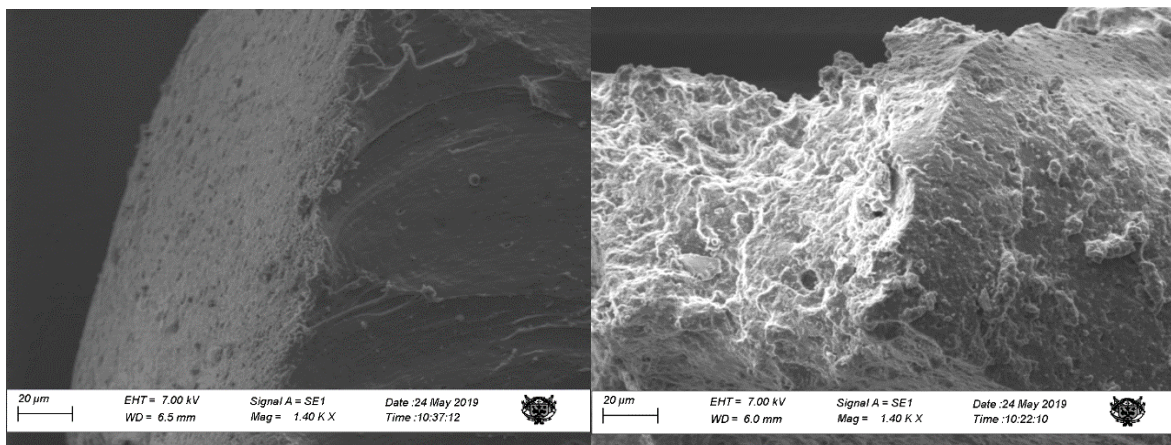


Figura 32. Matriz de caucho sin degradar (izq.) matriz degradada en 1 mes (der.) 1.40 KX

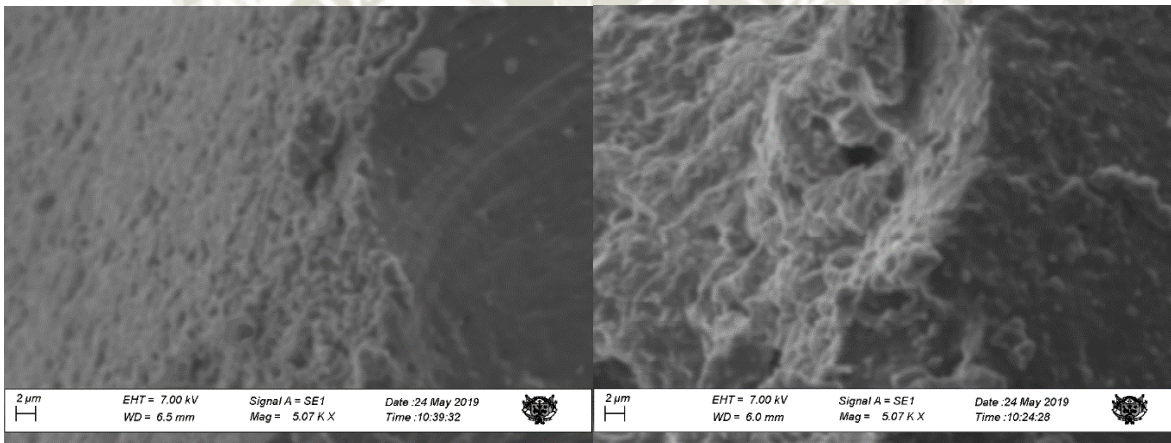


Figura 33. Matriz de caucho sin degradar (izq.) matriz degradada en 1 mes (der.) 5.07 KX

Donde:

EHT es la alta tensión de electrones, se refiere al voltaje a través del cual los electrones aceleran hacia la muestra de análisis.

WD es la distancia de trabajo, se refiere a la distancia en la cual la muestra a analizar es enfocada

Signal A es la señal a la cual han sido emitidos los electrones

SE1 son los electrones secundarios tipo 1

Mag es la magnitud de la fotografía

Date es la fecha en la que se tomó la fotografía

Time es la hora en la que se tomó la fotografía

4.3. Identificación del consorcio bacteriano capaz de degradar caucho

Los resultados del secuenciamiento metagenómico con respecto al Orden de los organismos se muestra en la Tabla 9. El orden bacteriano *Burkholderiales* se presenta en mayor cantidad con un 82.65% de las lecturas totales, consolidándose como la especie dominante dentro del consorcio, seguido por el orden *Rhizobiales* con un 9.42%. El resto de los órdenes no superaron el 2% de las lecturas dentro del consorcio, por lo que son consideradas como especies raras. El orden *Burkholderiales* comprende las siguientes familias *Burkholderiaceae*, *Oxalobacteraceae*, *Alcaligenaceae*, y *Comamonadaceae*, las mismas que pueden ser quimiolitotróficas, fijadoras de nitrógeno, quimioorganitróficas y tienen una variada distribución (Garrity, Bell, & Lilburn, 2015). Se ha reportado el uso del orden *Burkholderiales* como alternativas de remediación de una gran cantidad de contaminantes como petróleo crudo (Tao, y otros, 2017), compuestos organoclorados (Tong, Hu, Li, Chen, & Lv, 2015), compuestos aromáticos (Pérez-Pantoja, y otros, 2012). Así mismo se han hecho análisis a partir de su configuración genética, permitiendo conocer la presencia de genes responsables de la remoción de arsénico (Li, Zhang, & Wang, 2014), se encontró además que la mayoría de las bacterias del género *Burkholderiales* tienen la capacidad de generar enzimas oxidasas, mismas que varían de acuerdo a las condiciones del hábitat en donde se encuentran (Pérez-Pantoja, y otros, 2012). Finalmente, este orden ha sido categorizado como organismos clave dentro de la colonización de la capa rocosa, debido a sus características quimioorganotróficas, encontrándose presentes en la cama rocosa profunda del precámbrico a una profundidad de 2300 metros bajo tierra (Purkamo, y otros, 2015).

El orden *Rhizobiales* fue descrito por Birke, Röther y Jendrossek (2018) en la degradación de caucho mediante la producción de dos enzimas oxigenasas de caucho (RoxA y RoxB) así mismo se ha reportado la misma capacidad en el orden *Xhantomonadales* con la producción de la enzima Rox A, por parte de la cepas bacterianas *Xhanthomonas sp.* (Schmitt, Birke, & Jendrossek, 2019). El estudio realizado por Andler, y otros (2019) menciona la gran capacidad de los actinomicetos en la degradación del poli(cis-1,4-isopreno) como única fuente de carbono. Finalmente, dentro del orden *Sphingomonadales* se ha reportado la

capacidad de las *Sphingobacterias* para la degradación del isopreno (Singh, Srivastava, & Dubey, 2019) además de ello las cepas *Sphingomonadaceae* sp. poseen la capacidad de desulfuración de las llantas de caucho (Cui, Zhao, & Wang, 2016). Todos estos géneros fueron identificados en el consorcio de la presente investigación.

Los resultados muestran la presencia de una cepa viral microviridae siendo puntualmente el fago bacteriano microvirus enterobacteria phage phiX174. Este resultado se debe a la técnica empleada para la detección de ADN del secuenciador Illumina, la misma que consiste en la adición controlada de entre un 2 a 5% de la secuencia perteneciente a este fago para poder establecer una distribución más homogénea de ADN bacteriano de la muestra (Illumina, 2017), por lo que para este estudio estos resultados no se tomarán en consideración para su discusión pero sí serán presentados para no alterar los porcentajes finales.

Tabla 9. Identificación por Órdenes del consorcio de degradación de caucho

Clasificación	%Total de lecturas*
<i>Burkholderiales</i>	82.65%
<i>Rhizobiales</i>	9.42%
<i>(Microviridae)</i>	2.44%
<i>Sphingomonadales</i>	1.90%
No Clasificados a nivel Orden	0.79%
<i>Actinomycetales</i>	0.64%
<i>Xanthomonadales</i>	0.57%
<i>Enterobacterales</i>	0.24%

* Se identificaron 69 categorías, sin embargo, la tabla solo muestra el top 8 de 69

.

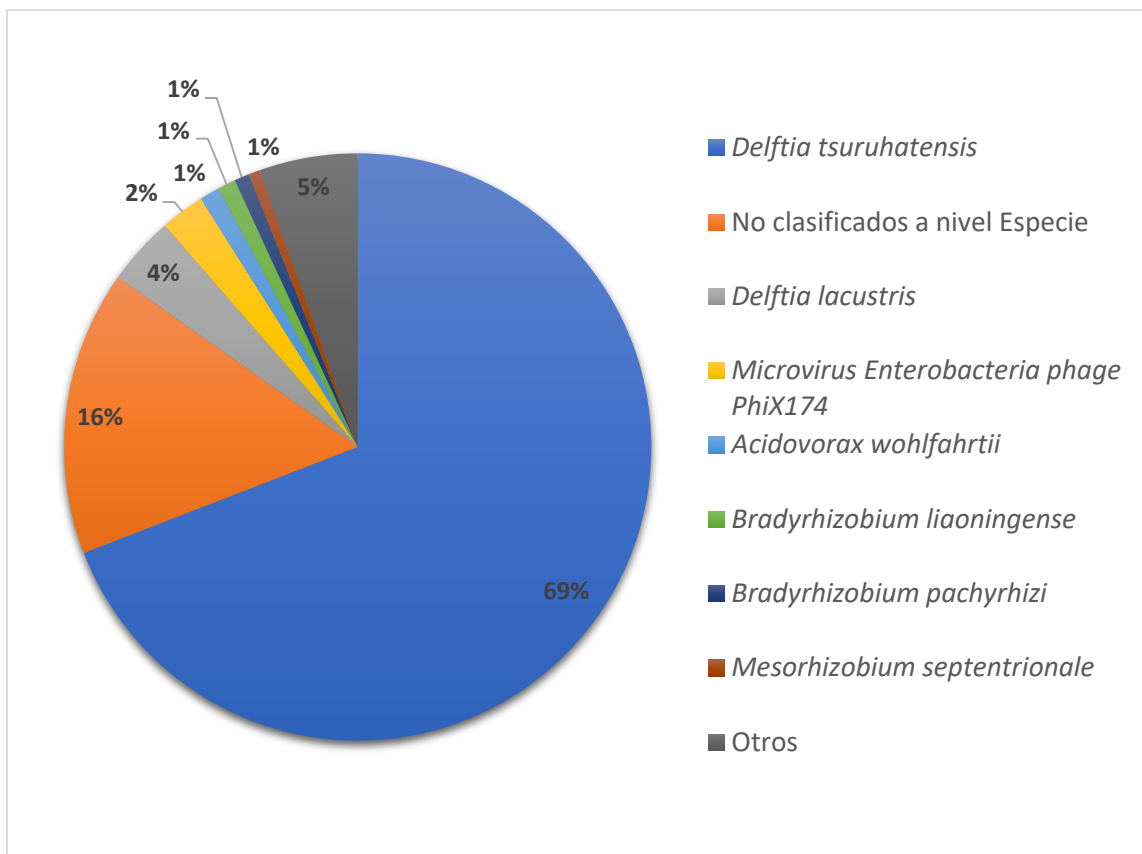


Figura 34. Especies reportadas en el consorcio de degradación de caucho

En la Figura 34 se puede observar el porcentaje de las especies representativas en el consorcio bacteriano. La especie *Delftia tsuruhatensis* se encuentra en el 69% del total de lecturas de organismos por lo que es considerada como la especie dominante dentro de la presente conformación del consorcio de esta investigación. Esta especie fue descubierta por primera vez el año 2003, aislada de un lodo residual de una planta de tratamiento en Japón y fue caracterizada para la mineralización de tereftalato, componente principal de los plásticos (Shigematsu, 2003). Otros estudios describen su efectividad en la degradación de diversos compuestos, destacando la remoción de nanopartículas de metales como el Zinc, el Plomo (Bautista-Hernández, y otros, 2012) y oro (Li, y otros, 2018), así como en la degradación de componentes organoclorados complejos dentro de los que se encuentran las Cloroanilinas (Zhang, He, Chen, & Yu, 2010), componente de estabilizantes frecuentemente utilizados en la fabricación de caucho sintético (Backley, 1983). Tanto el Zinc como el caucho sintético

se utilizan como insumos dentro de la fabricación de neumáticos, el Zinc es un componente acelerador para la vulcanización (Castro, 2008) y el caucho sintético es parte de la matriz química de las llantas (Carrión Nin, 1999). El segundo grupo de bacterias presentes dentro del consorcio de este estudio corresponde a la especie *Delftia lacustris* con una presencia en el consorcio correspondiente al 4% del total de las lecturas de identificación genética arrojadas, esta especie fue reportada por primera vez el año 2009, como degradadora de peptidoglicanos presentes en agua fresca, además detallando su hibridación de ADN en 66.2% con la *Delftia tsuruhatensis* (Jørgensen, Brandi, Nybroe, & Hansen, 2009). Estudios adicionales demostraron su capacidad en la degradación de naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno (Xu, y otros, 2019), también componentes estabilizantes para la vulcanización del caucho (Jiménez Islas, Medina Moreno, & Gracida Rodríguez, 2010). Anteriormente las cepas del género *Delftia* han sido reportadas para la degradación de caucho (Bohus, y otros, 2010). La tercera especie en el consorcio es la especie *Acidovorax wohlfahrtii*, esta especie bacteriana comparte con las dos anteriores la pertenencia a la misma familia, compuesta por las *Comamonadaceae* y fue por primera vez descrita en el año 2000 presente en la pupa de la mosca *Wohlfahrtia magnifica* (Toth, y otros, 2000). Solo existe un único registro de su utilidad en el medio ambiente en la degradación de suelos contaminados con pírenos (Jorfi, y otros, 2017), sin embargo, su pertenencia a la familia *Comamonadaceae*, podría suponer que esta bacteria comparte algunas potencialidades en degradación con las otras bacterias presentes en este estudio.

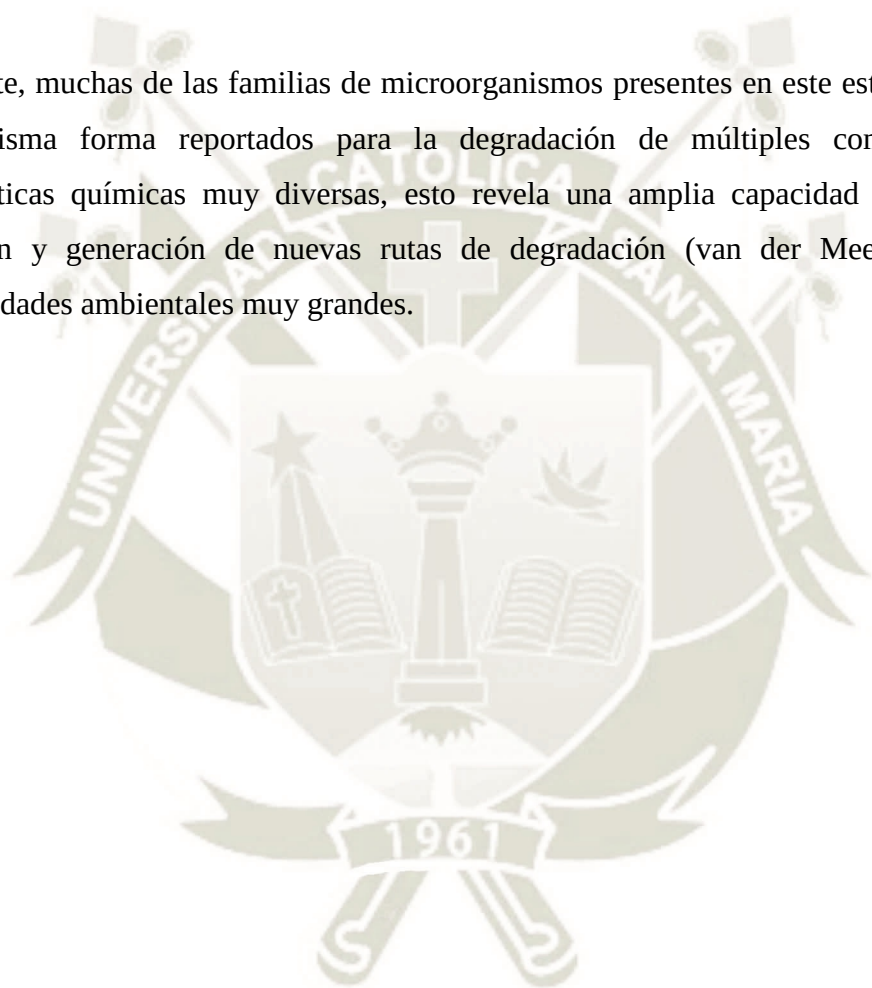
La alta presencia de la familia *Comamonadaceae* nos indica que el medio bajo las condiciones colocadas y teniendo como única fuente de carbono llantas sin pretratamiento es muy beneficioso para su desarrollo, así mismo basado en los análisis de imágenes de microscopia electrónica, como el de respiración microbiana y la reacción positiva en el reactivo de Schiff, se puede deducir por lo tanto que estas especies presentan una mayor interacción con el polímero, degradándolo parcialmente, esta idea se ve soportada debido a la capacidad de la familia *Comamonadaceae* de degradar cloroanilinas (Bathe, 2004) y como se había descrito anteriormente estas son componentes de la manufactura de neumáticos.

Las bacterias pertenecientes al género *Bradyrhizobium*, fueron reportadas como las mejores productoras de bioemulsificantes y biotensoactivos, aunque muchas de las propiedades y aplicaciones de estos compuestos todavía no están investigados (Franzetti, y otros, 2011), en el consorcio identificado se encuentran dos especies pertenecientes a este género, *Bradyrhizobium liaoningense* y *Bradyrhizobium pachyrhizi*, con una presencia total de 3.14%, por lo que podríamos inferir que los biotensoactivos producidos por estas bacterias apoyan en la degradación de caucho, puesto que la presencia de estos en medios acuáticos aumentan la disponibilidad de compuestos orgánicos, razón por la cual son utilizados para limpiar ambientes contaminados con hidrocarburos (Jiménez-Islas, Medina, & Rodríguez, 2010) y la cadena de carbonos que componen el polímero presente en el caucho presenta características similares a compuestos orgánicos alifáticos (Camacho Tamara, Reyes Pineda, & Lozano Bohorquez, 2014). Bacterias que ya fueron reportadas para la degradación de caucho comparten esta característica, como las pertenecientes a los géneros: *Rhodococcus*, *Nocardia* y *Pseudomonas* (Becerra Gutiérrez & Horna Acevedo, 2016), la aplicación de biotensoactivos es una solución atractiva para la resolución de diversos problemas, puesto que estos son seguros ambientalmente y biodegradables (Jahan, Bodratti, Tsianou, & Alexandridis, 2019).

Debido a la actividad del consorcio, el proceso de degradación pudo llevar a una eliminación de diversos componentes presentes dentro de la composición del caucho (Krishnan & Saramma, 2005) esto puede deberse a las diversas características y capacidades de las cepas encontradas. Adicionalmente, en el presente estudio se obtuvo un porcentaje de 16% de las lecturas que corresponden a microorganismos no clasificados a nivel taxa especies, los mismos podrían cumplir un rol importante dentro del funcionamiento del consorcio brindando apoyo en la degradación de componentes que evitaban una degradación microbiana o actuando a nivel de la cadena de carbonos del polímero. Experiencias en la degradación de hidrocarburos, muestran una mayor efectividad en su remoción, debido a que se producen en cooperación interacciones sinérgicas donde se utilizan nutrientes en la simbiosis emergente o facilita la obtención de nutrientes derivados de una primera degradación provocando un proceso cooperativo (Cerqueda-García, y otros, 2019). Diversas

otras experiencias con la utilización de consorcios de han desarrollado para otros componentes recalcitrantes como crisenos (Vaidya, Devpura, Jain, & Madamwar, 2018), nitrobencenos (Jin, y otros, 2012), bisfenoles (Wang, y otros, 2019) llegando a conclusiones similares, la interacción entre diversas cepas bacterianas lleva a resultados mucho más completos y en su mayoría con mejores rendimientos comparados con cepas únicas.

Finalmente, muchas de las familias de microorganismos presentes en este estudio han sido de la misma forma reportados para la degradación de múltiples compuestos con características químicas muy diversas, esto revela una amplia capacidad bacteriana de adaptación y generación de nuevas rutas de degradación (van der Meer, 1997) con potencialidades ambientales muy grandes.



Capítulo 5. Conclusiones y Recomendaciones

5.1. Conclusiones

- Se pudo obtener satisfactoriamente un consorcio bacteriano nativo de la ciudad de Arequipa con capacidad de degradar caucho, misma que fue evidenciada mediante la reacción de Schiff, resultando en datos positivos a la degradación.
- Se pudo cuantificar de manera exitosa el porcentaje de degradación de caucho del consorcio, el cual fue de 5% para un periodo de 20 días, encontrándose valores dentro de los parámetros promedio descritos por estudios anteriores para este tipo de polímeros, así mismo, se evidencio la presencia de acción microbiana sobre la matriz de caucho mediante el uso de microfotografías SEM, demostrando una gran diferencia frente a las muestras control.
- De la cuantificación del consorcio se pudieron encontrar dos grandes órdenes de bacterias presentes con mayor importancia dentro del mismo. El primero corresponde al orden *Burkholderiales* con un 82.65% de abundancia, dentro del cual se encuentra la especie dominante, *Delftia tsuruhatensis*; el segundo grupo corresponde al orden *Rhizobiales* con una abundancia de 9.42%.

5.2. Recomendaciones

- Realizar un análisis de crecimiento en el tiempo, utilizando un sistema de cuantificación de enzimas para poder confirmar la presencia de enzimas responsables de la degradación de caucho, así mismo como caracterizar las posibles nuevas rutas de degradación producida por estas bacterias.
- Analizar los diversos cambios en las condiciones ambientales (concentraciones químicas, pH, formación de metabolitos secundarios) para poder reconocer los cambios en las proporciones de los organismos respecto al tiempo de degradación.
- Aislar y realizar pruebas de degradación con las cepas microbianas presentes dentro del consorcio que se hayan encontrado en mayor cantidad, prestando especial énfasis en las cepas no categorizadas a nivel de especie y en cepas sin reportes de uso previo.
- Repetir el análisis realizado utilizando microorganismos de diversas partes de la ciudad, preferiblemente de ambientes diferentes a los utilizados en este estudio para aumentar el conocimiento en cepas microbianas de la ciudad de Arequipa con potencial de degradar caucho.
- Realizar un estudio experimental para la optimización de los parámetros de crecimiento y condiciones de cultivo para hacer más eficiente el proceso de degradación y llevarlo a una escala piloto.

Bibliografía

- Aboelkheir, M. G., Visconte, L., Oliveira, G., Filho, R., & Souza Jr, F. (2019). The biodegradative effect of *Tenebrio molitor* Linnaeus larvae on vulcanized SBR and tire crumb. *Science of The Total Environment*, 649(1), 1075-1082. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.228>
- Abraham, E., Cherian, B., Elbi, P. A., Pothan, L., & Thomas, S. (2011). *Recent advances in the recycling of rubber waste*. India: Transworld Research Network.
- Adhikari, B., De, D., & Maiti, S. (2000). Reclamation and recycling of waste rubber. *Progress in Polymer Science*, 25(7), 909-948. doi:10.1016/s0079-6700(00)00020-4
- AGRODATAPERU. (5 de Octubre de 2018). AGRODATAPERU. Obtenido de AGRODATAPERU: www.agrodataperu.com
- Aguirre Ríos, C. E., & Santoyo Cortés, V. H. (2013). *El Cultivo del árbol del hule (Hevea brasiliensis Muell Arg.): Avances y retos en la gestión de la innovación*. México: Universidad Autónoma Chapingo.
- Altenhoff, A.-L., de Witt, J., Andler, R., & Steinbüchel, A. (2019). Impact of additives of commercial rubber compounds on the microbial and enzymatic degradation of poly(cis-1,4-isoprene). *Biodegradation*, 30(1), 13-26. doi:<https://doi.org/10.1007/s10532-018-9858-5>
- Andler, R., Hiessl, S., Yücel, O., Tesch, M., & Steinbüchel, A. (2018). Cleavage of poly(cis-1,4-isoprene) rubber as solid substrate by cultures of *Gordonia polyisoprenivorans*. *New Biotechnology*, 44, 6-12. doi:10.1016/j.nbt.2018.03.002
- Andler, R., Vivod, R., & Steinbüchel, A. (2019). Synthesis of polyhydroxyalkanoates through the biodegradation of poly(cis-1,4-isoprene) rubber. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 127(3), 360-365. doi:10.1016/j.jbiosc.2018.08.015
- ANRPC. (Octubre de 2018). *Association of Natural Rubber Producing Countries*. Obtenido de ANRPC: www.anrpc.org
- Arenskötter, M., Baumeister, D., Berekaa, M. M., & Pötter, G. (2002). Taxonomic characterization of two rubber degrading bacteria belonging to the species *Gordonia*

- polyisoprenivorans and analysis of hyper variable regions of 16S rDNA sequences. *FEMS Microbiology Letters*, 205(2), 277-282. doi:10.1016/S0378-1097(01)00497-9
- Backley, D. C. (1983). *Synthetic Rubbers: Their Chemistry and Technology*. Londres y Nueva York: Applied Science Publishers. doi:10.1007/978-94-009-6619-2
- Baena-Ruano, S., Jiménez-Ot, C., Santos-Dueñas, I., Cantero-Moreno, D., Barja, F., & García-García, I. (2006). Rapid method for total, viable and non-viable acetic acid bacteria determination during acetification process. *Process Biochemistry*, 41(5), 1160-1164. doi:https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.12.016
- Barrios, Y. (2011). Biorremediación: una herramienta para el saneamiento de ecosistemas marinos contaminados con petróleo. *Biotecnología Aplicada*, 28, 60-68.
- Bathe, S. (2004). Conjugal transfer of plasmid pNB2 to activated sludge bacteria leads to 3-chloroaniline degradation in enrichment cultures. *Letters in Applied Microbiology*, 38(6), 527-531. doi:https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01532.x
- Bautista-Hernández, D., Ramírez-Burgos, L., Duran-Páramo, E., & Fernández-Linares, L. (2012). Zinc and Lead Biosorption by *Delftia tsuruhatensis*: A Bacterial Strain Resistant to Metals Isolated from Mine Tailings. *Journal of Water Resource and Protection*, 4, 207-216. doi:http://dx.doi.org/10.4236/jwarp.2012.44023
- BBC. (13 de Mayo de 2016). Spain toxic tyre dump at Sesena forces mass evacuation. BBC. Obtenido de https://www.bbc.com/news/world-europe-36288586
- Becerra Gutiérrez, L. K., & Horna Acevedo, M. V. (2016). Aislamiento de microorganismos productores de biosurfactantes y lipasas a partir de efluentes residuales de camales y suelos contaminados con hidrocarburos. *Scientia Agropecuaria*, 7(1), 23-31. doi:10.17268/sci.agropecu.2016.01.03
- Beliczky, L. S., & Fajen, J. (2001). Industria del caucho: Perfil General. En L. D. Beliczky, & J. Fajen, *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo* (págs. 2-3). España: Ministerio de Trabajo, Migraciones y Seguridad Social.
- Berekaa, M. M., Linos, A., Reichelt, R., Keller, U., & Steinbüchel, A. (2000). Effect of pretreatment of rubber material on its biodegradability by various rubber degrading bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 184(2), 199-206. doi:https://doi.org/10.1016/S0378-1097(00)00048-3

- Bhattacharya, S. N. (1954). Spectrophotometric method for the estimation of amino acids with sensitized schiff's reagent. *Analytica Chimica Acta*, 11, 559-562. doi:[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)87790-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)87790-9)
- Birke, J., Röther, W., & Jendrossek, D. (2017). RoxB Is a Novel Type of Rubber Oxygenase That Combines Properties of Rubber Oxygenase RoxA and Latex Clearing Protein (Lcp). *Applied and Environmental Microbiology*, 83(14), 1-13. doi:10.1128/AEM.00721-17
- Birke, J., Röther, W., & Jendrossek, D. (2018). Rhizobacter gummiphilus NS21 has two rubber oxygenases (RoxA and RoxB) acting synergistically in rubber utilisation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(23), 10245-10257. doi:10.1007/s00253-018-9341-6
- Bode, H., Kerkhoff, K., & Jendrossek, D. (2001). Bacterial degradation of natural and synthetic rubber. *Biomacromolecules*, 2(1), 295-303. doi:10.1021/bm005638h
- Bode, H., Zeeck, A., Plückhahn, K., & Jendrossek, D. (2000). Physiological and chemical investigations into microbial degradation of synthetic poly(cis-1,4-isoprene). *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3680-3685. doi:10.1128/aem.66.9.3680-3685.2000
- Bohm, G. G., & Stephanopoulos, G. N. (2010). *Estados Unidos Patente n° 20110301302*.
- Bohus, V., Tóth, E. M., Székely, A. J., Makk, J., Baranyi, K., Patek, G., . . . Márialigeti, K. (2010). Microbiological investigation of an industrial ultra pure supply water plant using cultivation-based and cultivation-independent methods. *Water Research*, 44(20), 6124-6132. doi:<https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.006>
- Bosco, F., Antonioli, D., Casale, A., Gianotti, V., Mollea, C., Laus, M., & Malucelli, G. (2018). Biodegradation of unvulcanized natural rubber by microorganisms isolated from soil and rubber surface: A preliminary study. *Bioremediation Journal*, 1-10. doi:10.1080/10889868.2018.1476454
- Braaz, R., Fischer, P., & Jendrossek, D. (2004). Novel Type of Heme-Dependent Oxygenase Catalyzes Oxidative Cleavage of Rubber (Poly-cis-1,4-Isoprene). *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12), 7388-7395. doi:10.1128/aem.70.12.7388-7395.2004

- Bruno, D., Bartelli, T., Rodrigues, C., & Briones, M. (2018). Prolonged growth of *Candida albicans* reveals co-isolated bacteria from single yeast colonies. *Infection Genetics and Evolution*, 65, 117-126. doi:<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.07.021>
- Burford, R. P. (1981). Cryogenic regrinding of rubber. *Conservation & Recycling*, 4(4), 219-233. doi:[https://doi.org/10.1016/0361-3658\(81\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0361-3658(81)90026-6)
- Calmon, A., Dusserre-Bresson, L., Bellon-Maurel, V., Feuilloley, P., & Silvestre, F. (2000). An automated test for measuring polymer biodegradation. *Chemosphere*, 41(5), 645-651. doi:[https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00491-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00491-9)
- Camacho Tamara, A. M., Reyes Pineda, H., & Lozano Bohorquez, A. (2014). Análisis y Caracterización Fisicoquímica del Látex de caucho especie *Hevea brasiliensis*. *Revista Tumbaga*, 1(9), 83-97.
- Cámara de Comercio de Bogotá. (Septiembre de 2006). Guía de Manejo de Llantas Usadas. Bogotá, Colombia: Kimpres Ltda.
- Cardona Gómez, L., & Sanchez Montoya, L. M. (2011). *Aprovechamiento de llantas usadas para la fabricación de pisos decorativos*. Medellín: Universidad de Medellín.
- Carrión Nin, J. (1999). Proceso de Fabricación de las Llantas de Caucho. *Industrial Data*, 2(2), 40-43.
- Castillo, F. (2005). *Biotecnología Ambiental*. Madrid: Tebar.
- Castro, G. (2008). *Materiales y Compuestos para la Industria del Neumático*. Buenos Aires: Departamento de Ingeniería Mecánica F.I.U.B.A.
- Cerqueda-García, D., García-Maldonado, J., Aguirre-Macedo, L., & García-Cruz, U. (2019). A succession of marine bacterial communities in batch reactor experiments during the degradation of five different petroleum types. *Marine Pollution Bulletin*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110775>
- Chengalroyen, M. D., & Dabbs, E. R. (2013). The Biodegradation of Latex Rubber: A Minireview. *Journal of Polymers and the Environment*, 21(3), 874-880. doi:10.1007/s10924-013-0593-z
- Chengalroyen, M., & Dabbs, E. (2012). Characterization of rubber degrading isolates. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2(3), 872-885.

- Chengalroyen, M., & Dabbs, E. (2013). The Biodegradation of Latex Rubber: A Minireview. *Journal of Polymers and the Environment*, 21(3), 874-880. doi:10.1007/s10924-013-0593-z
- Cherian, E., & Jayachandran, K. (2009). Microbial Degradation of Natural Rubber Latex by a Novel Species of Bacillus sp. SBS25 Isolated from Soil. *International Journal of Environmental Research*, 4(3), 599-604.
- Chia, K.-H., Nanthini, J., Thottathil, G. P., Najimudin, N., Mas Haris, M. H., & Sudesh, K. (2014). Identification of new rubber-degrading bacterial strains from aged latex. *Polymer Degradation and Stability*, 109, 354-361. doi:https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2014.07.027
- Collins, K. J., Jensen, A. C., & Mallinson, J. J. (2002). Environmental impact assessment of a scrap tyre artificial reef. *Journal of Marine Science*, 243-249.
- Constitución Política del Perú. (1993). *Congreso Constituyente Democrático*. Lima: Congreso Constituyente Democrático.
- Convenio de Basilea. (31 de Octubre de 2011). Directrices técnicas para el manejo ambientalmente racional de neumáticos usados y de desecho. Cartagena, Colombia: PNUMA.
- Crespo García, S. (8 de Julio de 2014). Empresa Michelin: Un Análisis desde la Perspectiva de la organización en España. León, España: Universidad de León.
- Cruz-Guzmán, M. (2007). *La contaminación de suelos y aguas, su prevención con nuevas sustancias naturales*. Sevilla, España: Universidad de Sevilla.
- Cui, X., Zhao, S., & Wang, B. (2016). Microbial desulfurization for ground tire rubber by mixed consortium-Sphingomonas sp. and Gordonia sp. *Polymer Degradation and Stability*, 128, 165-171. doi:10.1016/J.POLYMDEGRADSTAB.2016.03.011
- Danigelis, A. (10 de Diciembre de 2018). Global Tire Industry Pushes For Sustainable Rubber Supply. *Environmental Leader*.
- Departamento Nacional de Planeación. (2004). *Petroquímica-Caucho*. Colombia: Gobierno de Colombia.
- Dubkov, K. A., Semikolenov, S. V., Ivanov, D. P., Babushkin, D. E., & Parmon, V. N. (2012). Reclamation of waste tyre rubber with nitrous oxide. *Polymer Degradation*

- and Stability, 97(7), 1123-1130.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2012.04.006>
- El Comercio. (11 de Noviembre de 2014). La infeliz promesa del negocio del caucho en el Perú. *El Comercio*.
- El Comercio. (12 de Abril de 2018). Gran incendio en Comas consumió almacén de llantas. *El Comercio*.
- El-Bouraie, M., & El-Din, W. S. (2016). Biodegradation of Reactive Black 5 by *Aeromonas hydrophila* strain isolated from dye-contaminated textile wastewater. *Sustainable Environment Research*, 26(5), 209-216.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.serj.2016.04.014>
- Eldin, N., & Ahmed, S. (1993). Rubber-Tire Particles as Concrete Aggregate. *Journal of Materials in Civil Engineering*, 478-496.
- Espinoza Anaya, G. D. (Octubre de 2008). Validación del proceso Productivo del Caucho en Base a Ensayos de Dureza. Lima, Perú: Pontificia Universidad Católica del Perú.
- European Environment Agency. (2003). *TERM 2002 11b EU — Waste from vehicles (number and treatment of*. European Environment Agency.
- Fang, H., Dong, B., Yan, H., Tang, F., & Yu, Y. (2010). Characterization of a bacterial strain capable of degrading DDT congeners and its use in bioremediation of contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 184(1-3), 281-289.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.08.034>
- Fernández Garrido, A. J. (27 de Febrero de 2014). *Ingeniería Química*. Obtenido de IngenieríaQuímica.net: www.ingenieriaquimica.net
- Flores Medina, D. (2013). Diseño, Fabricación, Caracterización y Aplicaciones Constructivas de Hormigones de Consistencia Seca con Adiciones de Materiales de Procedencia Orgánica e Inorgánica de Neumáticos Fuera de Uso (NFUs). España: Universidad Politécnica de Madrid.
- Franzetti, A., Gandolgi, I., Bertolini, V., Raimondi, C., Piscitello, M., Papacchini, M., & Bestetti, G. (2011). Phylogenetic characterization of bioemulsifier-producing bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(7), 1095-1099.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.01.014>

- Gallert, C. (2000). Degradation of latex and of natural rubber by *Streptomyces* strain La 7. *Systematic and applied microbiology*, 23(3), 433-441. doi:10.1016/S0723-2020(00)80075-2
- García Morcillo, J. (1982). Del caucho al oro: El proceso colonizador de Madre de Dios. *Revista española de antropología americana*, 12, 255-271.
- Garrity, G. M., Bell, J. A., & Lilburn, T. (2015). Burkholderiales ord. nov. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1. doi:10.1002/9781118960608.obm00076
- Gong, L., Yang, H., Ke, Y., Wang, S., & Yao, X. (2019). Investigation on vulcanization degree and residual stress on fabric rubber composites. *Composite Structures*, 209, 472-480.
- González, L., Rodríguez, A., Valentín, J. L., Marcos-Fernandez, A., & Posadas, P. (2006). Entrecruzamiento convencional y eficiente del caucho natural. *Revista del Caucho*, 501, 20-27.
- Greek, B. F. (1991). Rubber Demand is Expected to Grow after 1991. *Chemical & Engineering*, 69(19), 37-54. doi:10.1021/cen-v069n019.p037
- GRM. (22 de Mayo de 2018). *Global Rubber Markets*. Obtenido de Global Rubber Markets: <https://globalrubbermarkets.com>
- Heisey, R. M., & Papadatos, S. (1995). Isolation of microorganisms able to metabolize purified natural rubber. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8), 3092-3097.
- Ibrahim, E., Arenskotter, M., Luftmann, H., & Steinbüchel, A. (2006). Identification of poly (cis-1,4- isoprene) degradation intermediates during growth of moderately thermophilic actinomycetes on rubber and cloning of a functional ICP homologue from *Nocardia farcinica* strain EI. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 3375-3385. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.72.5.3375-3382.2006>
- Illumina. (20 de 10 de 2017). *Illumina.com*. Obtenido de <https://support.illumina.com/bulletins/2016/07/what-is-nucleotide-diversity-and-why-is-it-important.html>
- Imai, S., Ichikawa, K., Kasai, D., Masai, E., & Fukuda, M. (2010). Isolation and characterization of rubber-degrading bacteria. *Journal of Biotechnology*, 150, 237. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.09.089>

- Imai, S., Ichikawa, K., Muramatsu, Y., Kasai, D., Masai, E., & Fukuda, M. (2011). Isolation and characterization of Streptomyces, Actinoplanes, and Methylibium strains that are involved in degradation of natural rubber and synthetic poly(cis-1,4-isoprene). *Enzyme and Microbial Technology*, 49(6-7), 526-531. doi:10.1016/j.enzmictec.2011.05.014.
- Ismail, M. A., Mohamed, N. H., & Shoreit, A. A. (2013). Degradation of Ficus elastica rubber latex by Aspergillus terreus, Aspergillus flavus and Myceliophthora thermophila. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 78, 82-88. doi:https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.12.009
- ISO 9439. (Marzo de 1999). Water quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium - Carbon dioxide evolution test.
- Iwase, Y., Shindo, T., Kondo, H., Ohtake, Y., & Kawahara, S. (2017). Ozone degradation of vulcanized isoprene rubber as a function of humidity. *Polymer Degradation and Stability*, 142, 206-209. doi:https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2017.06.025
- Jahan, R., Bodratti, A. M., Tsianou, M., & Alexandridis, P. (2019). Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. *Advances in Colloid and Interface Science*. doi:https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102061
- Jahirul, M., Rasul, M. G., Ahmed, A., & Ashwath, N. (2012). Biofuels Production through Biomass Pyrolysis—A Technological Review. *Energies*, 4952-5001.
- Jendrossek, D., & Birke, J. (2019). Rubber oxygenases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(1), 125-149. doi:https://doi.org/10.1007/s00253-018-9453-z
- Jendrossek, D., & Reinhardt, S. (2003). Sequence analysis of a gene product synthesized by Xanthomonas sp. during growth on natural rubber latex. *FEMS Microbiology Letters*, 224(1), 61-65. doi:https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00424-5
- Jendrossek, D., Tomasi, G., & Schlegel, H. (1997b). *Mikrobieller abbau von kautschuk*. Vandenhoeck y Ruprecht.
- Jiménez Islas, D., Medina Moreno, S., & Gracida Rodríguez, J. N. (2010). Propiedades , aplicaciones y producción de biotensoactivos: una revisión. *Revista Internacional de contaminación ambiental*, 26(1), 65-84.

- Jiménez-Islas, D., Medina, S., & Rodríguez, J. (2010). Biosurfactant properties, applications and production. A review. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 26(1), 65-84.
- Jin, D. F., Hu, H., Liu, D. F., Ding, H. T., Jia, X. M., & Zhao, Y. H. (2012). Optimization of a bacterial consortium for nitrobenzene degradation. *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 65(5), 795-801. doi:10.2166/wst.2012.692
- Jorfi, S., Samaei, M. R., Soltani, R., Khozani, A., Ahmadi, M., Barzegar, G., . . . Mehrabi, N. (2017). Enhancement of the Bioremediation of Pyrene-Contaminated Soils Using a Hematite Nanoparticle-based Modified Fenton Oxidation in a Sequenced Approach. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 26(2), 141-156. doi: 10.1080/15320383.2017.1255875
- Jørgensen, N. O., Brandi, K. K., Nybroe, O., & Hansen, M. (2009). *Delftia lacustris* sp. nov., a peptidoglycan-degrading bacterium from fresh water, and emended description of *Delftia tsuruhatensis* as a peptidoglycan-degrading bacterium. *International Journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59, 2195-2199. doi:10.1099/ijs.0.008375-0.
- Kanwal, N., Shah, A. A., Qayyum, S., & Hasan, F. (2015). Optimization of pH and temperature for degradation of tyre rubber by *Bacillus* sp. strain S10 isolated from sewage sludge. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 103, 154-160. doi:https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.05.009
- Kılıç, N. K. (2009). Enhancement of phenol biodegradation by *Ochrobactrum* sp. isolated from industrial wastewaters. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(6), 778-781. doi:https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.06.006
- Kim, B.-L. (2015). *Estados Unidos Patente n° US20170152373A1*.
- Krishnan, K. P., & Saramma, A. V. (2005). Mixed substrate degradation: Are consortia better than monocultures? *Indian Journal of Marine Sciences*, 34(2), 188-191.
- Krishnaswamy, V., & Ahongsangbam, N. (2017). A Study on Mineralisation of Poly cis-1,4-isoprene (NR) and Synthetic Rubber Gloves (SRG) by the Bacterial Consortium. *Annals of Applied Microbiology & Biotechnology Journal*, 1(1), 1005-1015.

- Kumar, D. (2018). Biodegradation of γ -Hexachlorocyclohexane by Burkholderia sp. IPL04. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 331-339. doi:https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.09.001
- Kumar, S., & Nijasure, A. (1997). Vulcanization of Rubber How to Alter Molecular Structure and Influence Physical Properties. *Resonance*, 55-59.
- Kunjapur, A., & Prather, K. (2015). Microbial Engineering for Aldehyde Synthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(6), 1892-1901.
- Lao, W. C., de Toledo, R. A., & Shim, H. (2018). Optimization of major environmental parameters to degrade scrap tyres by Bacillus sp. *Energy Procedia*, 153, 226-230. doi:https://doi.org/10.1016/j.egypro.2018.10.005
- Larson, R. J., Hansmann, M. A., & Bookland, E. A. (1996). Carbon dioxide recovery in ready biodegradation test: Mass transfer and kinetic considerations. *Chemosphere*, 33(6), 1195-1210. doi:10.1016/0045-6535(96)00253-6
- Leahy, J. G., & Colwell, R. R. (1990). Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbiological Reviews*, 54(3), 305-315.
- Ley N° 28611. (2005). *Ley General del Ambiente*. Lima: MINAM.
- LEY N°27314. (20 de Julio de 2000). *Ley General de Residuos Sólidos*. Lima, Perú.
- Li, G.-X., Zhou, S.-Y.-D., Ren, H.-Y., Xue, X.-M., Xu, Y.-Y., & Bao, P. (2018). Extracellular Biomineralization of Gold by Delftia tsuruhatensis GX-3 Isolated from a Heavy Metal Contaminated Paddy Soil. *ACS Earth Space Chemistry*, 2(12), 1294-1300. doi:10.1021/acsearthspacechem.8b00127
- Li, X., Zhang, L., & Wang, G. (2014). Genomic Evidence Reveals the Extreme Diversity and Wide Distribution of the Arsenic-Related Genes in Burkholderiales. *PLOS ONE*, 9(3), 1-11. doi:https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092236
- Li, Y., Zhao, S., & Wang, Y. (2011). Microbial desulfurization of ground tire rubber by Thiobacillus ferrooxidans. *Polymer Degradation and Stability*, 96(9), 1662-1668. doi:https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2011.06.011
- Linh, D. V., Huong, N. L., Tabata, M., Imai, S., Iijima, S., Kasai, D., . . . Fukuda, M. (2017). Characterization and functional expression of a rubber degradation gene of a

- Nocardia degrader from a rubber-processing factory. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 123(4), 412-418. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.11.012>
- Linós, A., Berekaa, M. M., Richelt, R., Keller, U., Schmitt, J., Flemming, H.-C., . . . Steinbüchel, A. (2000). Biodegradation of cis-1,4-Polyisoprene Rubbers by Distinct Actinomycetes: Microbial Strategies and Detailed Surface Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1639-1645. doi:10742254
- Linós, A., Berekaa, M., Steinbüchel, A., Kim, K., Spröer, C., & Kroppenstedt, R. (2002). *Gordonia westfalica* sp. nov. a novel rubber-degrading actinomycete. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 52, 1133-1139. doi:10.1099/00207713-52-4-1133
- Linós, A., Rudolf, R., Keller, U., & Steinbüchel, A. (2000). A Gram negative bacterium identified as *Pseudomonas aeruginosa*, AL98, is a potent degrader of natural rubber and synthetic cis-1,4-polyisoprene. *FEMS Microbiology Letters*, 182(1), 155-161. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb08890.x>
- Linós, A., Steinbüchel, A., Spröer, C., & Kroppenstedt, R. (1999). *Gordonia polyisoprenivorans* sp. nov., a rubber-degrading actinomycete isolated from an automobile tyre. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(4), 1785-1791. doi:10.1099/00207713-49-4-1785
- Liu, S., Yu, J., Bikane, K., Chen, T., Ma, C., Wang, B., & Sun, L. (2018). Rubber pyrolysis: Kinetic modeling and vulcanization effects. *Energy*, 155, 215-225. doi:<https://doi.org/10.1016/j.energy.2018.04.146>
- Lopes, T. (5 de Marzo de 2015). UI researchers study public health impact of Iowa City landfill fire. *College of Public Health*. Obtenido de <https://www.public-health.uiowa.edu/news-items/ui-researchers-study-public-health-impact-of-iowa-city-landfill-fire/#targetText=On%20May%2026%2C%202012%2C%20a,protect%20underlyin%20soil%20and%20water>.
- Machaca Villasante, L. J. (2018). Determinación de los Impactos Ambientales Producidos por las Actividades Extractivas de Materiales no Metálicos para la Construcción en el río Socabaya, Distrito de Socabaya, Arequipa. Arequipa, Perú: UNSA.

- Magallanes Reyes, C. A., & Guillén Solari, I. C. (05 de Septiembre de 2014). Experiencias en el tratamiento de neumáticos fuera de uso en Iberoamérica. Lima, Perú: Congreso de la República.
- Marchut-Mikołajczyk, O., Drożdżyński, P., Januszewicz, B., Domański, J., & Wrześniewska-Tosik, K. (2019). Degradation of ozonized tire rubber by aniline-Degrading *Candida methanosorbosa* BP6 strain. *Journal of Hazardous Materials*, 367, 8-14. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.12.045>
- Marín, B. E. (2012). En favor del medio ambiente: de llanta vieja a carbón activado. *Universitas Científica*, 32-35.
- Mason, C., Randhawa, A., Watson, K., Friedman, C. R., & Cheeptham, N. (2016). Using scanning electron microscopy to study microbial communities in speleothem samples collected from Iron Curtain Cave. *The Journal of Experimental Microbiology & Immunology*, 2, 1-7.
- Mena, M. A. (2009). Estándares de gestión medio ambiental en talleres de mecánica automotriz. Lima, Perú: Universidad Mayor de San Marcos.
- Michelin. (2019). *Michelin*. Obtenido de <https://www.michelin.com.ar/auto/tips-and-advice/when-should-i-change-my-car-tyres>
- Mikesková, H., Novotný, Č., & Svobodová, K. (2012). Interspecific interactions in mixed microbial cultures in a biodegradation perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(4), 861-870. doi:10.1007/s00253-012-4234-6
- MINAM. (19 de Julio de 2011). Aprueban Primera Actualización del Listado de Inclusión de los Proyectos de Inversión sujetos al Sistema Nacional de Evaluación de Impacto Ambiental - SEIA. *Resolución Ministerial N°157-2011-MINAM*. Lima, Lima, Perú: MINAM.
- Mishra, S., & Singh, S. (2012). Microbial degradation of n-hexadecane in mineral salt medium as mediated by degradative enzymes. *Bioresource Technology*, 111, 148-154. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.049>
- Muller, R. J., Augusta, J., & Pantke, M. (1992). An interlaboratory investigation into biodegradation of plastics. Pt. 1: A modified Sturm-test. *Material und Organismen*, 27, 179-189.

- Municipalidad Distrital de Socabaya. (2016). *Mejoramiento del servicio de transitabilidad vehicular y peatonal en la Urb. Ciudad Mi Trabajo, Distrito de Socabaya - Arequipa*. Arequipa: MDS.
- Naciones Unidas. (31 de Agosto de 2019). *un.org*. Obtenido de <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/>
- Nanthini, J., & Sudesh, K. (2017). Biodegradation of Natural Rubber and Natural Rubber Products by *Streptomyces* sp. Strain CFMR 7. *Journal of Polymers and the Environment*, 25(3), 606-616. doi:<https://doi.org/10.1007/s10924-016-0840-1>
- Nawong, C., Umsakul, K., & Sermwittayawong, N. (2018). Rubber gloves biodegradation by a consortium, mixed culture and pure culture isolated from soil samples. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(3), 481-488. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.07.006>
- NTP 900.061. (2008). Gestión ambiental. Gestión de residuos. Manejo de neumáticos desechados. Reaprovechamiento. Perú.
- NTP.900.059. (2006). Gestión ambiental. Gestión de residuos. Manejo de neumáticos desechados. Generalidades, generación, recolección, almacenamiento y transporte. Lima, Perú.
- NTP.900.060. (2008). Gestión ambiental. Gestión de residuos. Manejo de neumáticos desechados. Aprovechamiento energético. Lima, Perú.
- OMI. (2005). *Manual sobre la contaminación ocasionada por hidrocarburos* (Vol. 2). (A. Print, Ed.) Londres, Reino Unido: Organización Marítima Internacional.
- Pagga, U., Schäfer, A., Müller, R.-J., & Pantke, M. (2001). Determination of the aerobic biodegradability of polymeric material in aquatic batch tests. *Chemosphere*, 42(3), 319-331. doi:[https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00069-2](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00069-2)
- Pastor Molina, Y. M. (2003). *Tecnología del caucho y aplicación en la industria automotor*. Lima, Perú: Universidad Nacional de Ingeniería.
- Pérez-Pantoja, D., Donoso, R., Agulló, L., Córdova, M., Seeger, M., Pieper, D. H., & González, B. (2012). Genomic analysis of the potential for aromatic compounds biodegradation in Burkholderiales. *Environmental microbiology*, 14(5), 1091-1117. doi:[10.1111/j.1462-2920.2011.02613.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02613.x)

- PRODUCE. (2005). REGLAMENTO TÉCNICO PARA NEUMÁTICOS DE AUTOMÓVIL, CAMIÓN LIGERO, BUSES Y CAMIONES. Lima, Lima, Perú: PRODUCE.
- Puechner, P., Mueller, W. R., & Bardtke, D. (1995). Assessing the Biodegradation Potential of Polymers in Screening and Long-Term Test Systems. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 3(3), 133-143. Obtenido de <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02068464>
- Purkamo, L., Bomberg, M., Kletäväinen, R., Salavirta, H., Nyssönen, M., Nupponen-Puputti, M., . . . Itävaara, M. (2015). The keystone species of Precambrian deep bedrock biosphere belong to Burkholderiales and Clostridiales. *Biogeosciences Discuss*, 12, 18103-18150. doi:10.5194/bgd-12-18103-2015
- Rafei, M., Ghoreishy, M., & Naderi, G. (2009). Development of an advanced computer simulation technique for the modeling of rubber curing process. *Computational Materials Science*, 47(2), 539-547.
- Rajan, V. V., Dierkes, W. K., Joseph, R., & Noordermeer, J. W. (2006). Science and technology of rubber reclamation with special attention to NR-based waste latex products. *Progress in Polymer Science*, 31(9), 811-834. doi:<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.08.003>
- Resendiz Tejeda, V. C. (2007). *Estudio de las alternativas de aprovechamiento de las llantas en desuso*. México: Instituto Politécnico Nacional.
- Reto, G., Sara, T. L., Carleton, L. E., & Tishmack, J. K. (2015). Environmental impact of energy recovery from waste tyres. *The Geological Society*, 475-498.
- Rodgers, B. (2016). *Rubber Compounding Chemistry and Applications*. Florida: Taylor & Francis Group LLC.
- Rose, K., & Steinbüchel, A. (2005). Biodegradation of Natural Rubber and Related Compounds: Recent Insights into a Hardly Understood Catabolic Capability of Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 2803-2812.
- Rose, K., Tenberge, K. B., & Steinbüchel, A. (2005). Identification and Characterization of Genes from *Streptomyces* sp. Strain K30 Responsible for Clear Zone Formation on

- Natural Rubber Latex and Poly(cis-1,4-isoprene) Rubber Degradation. *Biomacromolecules*, 6(1), 180-188. doi:10.1021/bm0496110
- Roy, R. V., Das, M., Banerjee, R., & Bhowmick, A. K. (2006). Comparative studies on crosslinked and uncrosslinked natural rubber biodegradation by *Pseudomonas* sp. *Bioresource Technology*, 97(18), 2485-2488. doi:10.1016/j.biortech.2005.09.024
- Roy, R. V., Das, M., Banerjee, R., & Bhowmick, A. K. (2006). Comparative studies on rubber biodegradation through solid-state and submerged fermentation. *Process Biochemistry*, 41(1), 181-186. doi:10.1016/j.procbio.2005.06.016
- Sadaka, F., Campistron, I., Laguerre, A., & Pilard, J.-F. (2012). Controlled chemical degradation of natural rubber using periodic acid: Application for recycling waste tyre rubber. *Polymer Degradation and Stability*, 97(5), 816-828. doi:https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2012.01.019
- Salazar Paiva, J. (2014). El proyecto nacional ensangrentado: nacionalismo y civilización en los discursos en torno de los crímenes de la Peruvian Amazon Company en el Putumayo. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú.
- Saldivar-Guerra, E., & Vivaldo-Lima, E. (2013). *Handbook of polymer synthesis, characterization, and processing*. Estados Unidos: Jhon Wiley & Sons Inc.
- Saputra, R., Walvekar, R., Khalid, M., Shahbaz, K., & Ramarad, S. (2019). Effective devulcanization of ground tire rubber using choline chloride-based deep eutectic solvents. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(3), 103151. doi:https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103151
- Saville, W. J., & Workman, J. D. (2015). *West Nile Virus and Scrap Tires*. Ohio: Ohio State University Extension.
- Schmitt, G., Birke, J., & Jendrosseck, D. (2019). Towards the understanding of the enzymatic cleavage of polyisoprene by the dihaem-dioxygenase RoxA. *AMB Express*, 9, 166-183. doi:https://doi.org/10.1186/s13568-019-0888-0
- Seghar, S., Asaro, L., Rolland-Monnet, M., & Aït Hocine, N. (2019). Thermo-mechanical devulcanization and recycling of rubber industry waste. *Resources, Conservation and Recycling*, 144, 180-186. doi:https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2019.01.047

- SERNANP. (2012). *Aprovechamiento del caucho silvestre por las comunidades nativas en la selva amazónica del Perú*. Junín: Reserva Comunal El Sira.
- Seviour, R. J., Pethica, L. M., & McClure, S. (1984). A simple modified procedure for preparing microbial cells for scanning electron microscopy. *Journal of Microbiological Methods*, 3(1), 1-5. doi:[https://doi.org/10.1016/0167-7012\(84\)90038-1](https://doi.org/10.1016/0167-7012(84)90038-1)
- Shah, A. A., Hasan, F., Shah, Z., Kanwal, N., & Zeb, S. (2013). Biodegradation of natural and synthetic rubbers: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 83, 145-157. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.05.004>
- Shah, A. A., Hasan, F., Shah, Z., Mutiullah, & Hameed, A. (2012). Degradation of Polyisoprene Rubber by Newly Isolated *Bacillus* sp. AF-666 From Soil. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48(1), 37-42. doi:10.1134/S0003683812010140
- Shakya, P. R., Shrestha, P., Tamrakar, C. S., & Bhattarai, P. K. (2006). Studies and Determination of Heavy Metals in Waste Tyres and their Impacts on the Environment. *Journal of Analytical and Environmental Chemistry*, 70-76.
- Shigematsu, T. (2003). *Delftia tsuruhatensis* sp. nov., a terephthalate-assimilating bacterium isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(5), 1479-1483. doi:10.1099/ijs.0.02285-0
- Singh, A., Srivastava, N., & Dubey, S. (2019). Molecular characterization and kinetics of isoprene degrading bacteria. *Bioresource Technology*, 278, 51-56. doi:10.1016/J.BIORTECH.2019.01.057
- Smith, O., & Cristol, S. (1972). *Química Orgánica*. Barcelona: Reverté S.A.
- Spence, D., & Niel, C. B. (1936). Bacterial Decomposition of the Rubber in Hevea Latex. *Industrial & Engineering Chemistry*, 28(7), 847-850. doi:10.1021/ie50319a023
- Srivastva, N., Shukla, A. K., Singh, R. S., Upadhyay, S. N., & Dubey, S. K. (2015). Characterization of bacterial isolates from rubber dump site and their use in biodegradation of isoprene in batch and continuous bioreactors. *Bioresource Technology*, 188, 84-91. doi:<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2015.01.014>
- Statista. (Julio de 2018). *Statista*. Obtenido de Statista: www.statista.com

- Stevenson, K., Stallwood, B., & Hart, A. G. (2008). Tire Rubber Recycling and Bioremediation: A Review. *Bioremediation Journal*, 1-11.
- SUNARP. (2018). *REPORTE DE INMATRICULACIONES DEL REG. DE PROPIEDAD VEHICULAR PERIODO 2005-2017*. Lima: SUNARP.
- Tamri, Z., Yazdi, A. V., Haghighi, M. N., Abbas-Abadi, M. S., & Heidarinasab, A. (2018). The effect of temperature, heating rate, initial cross-linking and zeolitic catalysts as key process and structural parameters on the degradation of natural rubber (NR) to produce the valuable hydrocarbons. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 134, 35-42. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jaap.2018.05.001>
- Tang, Y., Ma, X., Lai, Z., & Fan, Y. (2015). Thermogravimetric analyses of co-combustion of plastic, rubber, leather in N₂/O₂ and CO₂/O₂ atmosphere. *Energy*, 90(1), 1066-1074. doi:<https://doi.org/10.1016/j.energy.2015.08.015>
- Tang, Y., Ma, X., Lai, Z., Zhou, D., & Chen, Y. (2013). Thermogravimetric characteristics and combustion emissions of rubbers and polyvinyl chloride in N₂/O₂ and CO₂/O₂ atmospheres. *Fuel*, 104, 508-514. doi:10.1016/j.fuel.2012.06.047
- Tao, K., Liu, X., Chen, X., Hu, X., Cao, L., & Yuan, X. (2017). Biodegradation of crude oil by a defined co-culture of indigenous bacterial consortium and exogenous *Bacillus subtilis*. *Bioresource Technology*, 224, 327-332. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.073>
- Thiele, S., & Roessle, M. (2014). Synthetic Rubbers. *Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials*, 1-7. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-642-36199-9_313-1
- Tong, H., Hu, M., Li, F., Chen, M., & Lv, Y. (2015). Burkholderiales participating in pentachlorophenol biodegradation in iron-reducing paddy soil as identified by stable isotope probing. *Environmental science. Processes & impacts*, 17(7), 1282-1289. doi:10.1039/c4em00530a
- Toth, E., Kovacs, G., Schumann, P., Kovacs, A. T., Halbritter, A., Marialigeti, K., & Stackebrandt, E. (2000).
- Tsuchii, A., & Tokiwa, Y. (1999). Colonization and disintegration of tire rubber by a colonial mutant of nocardia. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87(4), 542-544. doi:[https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(99\)80108-X](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(99)80108-X)

- Tsuchii, A., & Tokiwa, Y. (2001). Microbial degradation of tyre rubber particles. *Biotechnology Letters*, 23(12), 963-969. doi:<https://doi.org/10.1023/A:1010593807416>
- Tsuchii, A., Suzuki, T., & Takeda, K. (1985). Microbial Degradation of Natural Rubber Vulcanizates. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(4), 965-970. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC291777/>
- Twamisa. (2017). Tyre Waste Abatement and Minimisation Initiative of South Africa. South Africa: Danubia HI (Pty) Ltd.
- Ullán de la Rosa, F. (2004). La Era del Caucho en el Amazonas (1870-1920): Modelos de Explotación y Relaciones Sociales de Producción. *Anales del Museo de América*, 12, 183-204.
- Uribe, A. (1947). *Aspecto técnicos en la Producción de caucho Hevea*. Costa Rica: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas.
- Vaidya, S., Devpura, N., Jain, K., & Madamwar, D. (2018). Degradation of Chrysene by Enriched Bacterial Consortium. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-14. doi:10.3389/fmicb.2018.01333
- van der Meer, J. R. (1997). Evolution of novel metabolic pathways for the degradation of chloroaromatic compounds. *Antonie van Leeuwenhoek*, 71(1-2), 159-178. doi:<https://doi.org/10.1023/A:1000166400935>
- Velásquez, S. M., & Giraldo, D. H. (2014). Caracterización y evaluación del tiempo de vulcanización de caucho natural colombiano obtenido de tres variedades clonales de hevea brasiliensis. *Ingeniería y Competitividad*, 16(2), 225-233.
- Vidya, T. V., & Growther, L. (2019). Biodegradation promising solution to the rubber waste and for rubber industry by the Streptomyces diastaticus from soil. *Research journal of biotechnology*, 14(3), 93-99.
- Villagaray Medina, E. J. (2017). Aplicación de caucho reciclado en un diseño de mezcla asfáltica para el tránsito vehicular de la avenida Trapiche-Comas (Remanso) 2017. Lima, Perú: Universidad César Vallejo.
- Vorquímica. (1981). Medio de Cultivo para Microbiología. Barcelona: ADSA=MICRO S.A.

- Wang, X., Chen, J., Ji, R., Liu, Y., Su, Y., & Guo, R. (2019). Degradation of Bisphenol S by a Bacterial Consortium Enriched from River Sediments. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 103(4), 630-635. doi:<https://doi.org/10.1007/s00128-019-02699-7>
- Warren-Thomas, E., Dolman, P. M., & Edwards, D. P. (2015). Increasing Demand for Natural Rubber Necessitates a Robust Sustainability Initiative to Mitigate Impacts on Tropical Biodiversity. *Conservation Letters*, 8(4), 230-241. doi:<https://doi.org/10.1111/conl.12170>
- Wei, X., Zhong, H., Yang, Q., Yao, E., Zhang, Y., & Zou, H. (2019). Studying the mechanisms of natural rubber pyrolysis gas generation using RMD simulations and TG-FTIR experiments. *Energy Conversion and Management*, 189, 143-152. doi:10.1016/j.enconman.20
- Xu, X., Liu, W., Wang, W., Tian, S., Jiang, P., Qi, Q., . . . Yu, H. (2019). Potential biodegradation of phenanthrene by isolated halotolerant bacterial strains from petroleum oil polluted soil in Yellow River Delta. *Science of The Total Environment*, 664, 1030-1038. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2019.02.080
- Yañez-Ocampo, G., Sanchez-Salinas, E., Jimenez-Tobon, G. A., Penninckx, M., & Ortiz-Hernández, M. L. (2009). Removal of two organophosphate pesticides by a bacterial consortium immobilized in alginate or tezontle. *Journal of Hazardous Materials*, 168(2-3), 1554-1561. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.047>
- Yikmis, M., & Steinbüchel, A. (2012). Historical and Recent Achievements in the Field of Microbial Degradation of Natural and Synthetic Rubber. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(13), 4543-4551. doi:10.1128/AEM.00001-12
- Zhang, B. L., Huang, H. H., Wang, Y. Z., Ding, L., & Liang, Y. (2018). Study on molecular structure and property of highly purified natural rubber. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 134, 130-135. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jaap.2018.05.018>
- Zhang, L.-l., He, D., Chen, J.-m., & Yu, L. (2010). Biodegradation of 2-chloroaniline, 3-chloroaniline, and 4-chloroaniline by a novel strain Delftia tsuruhatensis H1. *Journal of Hazardous Materials*, 179(1-3), 875-882. doi:10.1016/J.JHAZMAT.2010.03.086

ANEXOS

Anexo 1. Comparación de Cantidad de Componentes para la fabricación de un neumático

Tabla 10. Comparación de Cantidad de Componentes para la fabricación de un neumático (Estados Unidos Patente n° US20170152373A1, 2015)

Ítem	Comparativo					Comparat ivo	Comparat ivo
	Ejemplo 1	Ejemplo 1	Ejempl o 2	Ejemplo 3	Ejemplo 4	Ejemplo 2	Ejemplo 3
Caucho materia prima ¹⁾	125.5	115.5	85.5	65.5	45.5	25.5	-
Negro de humo ²⁾	73.7	23.7	23.7	23.7	23.7	23.7	23.7
Lote principal de caucho con alto contenido de cis-1-4-polibutadieno ³⁾	-	10.0	40.0	60.0	80.0	100.0	125.5
Óxido de Zinc	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Ácido esteárico	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Azufre libre	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Acelerado r 1 ⁴⁾	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Acelerado r 2 ⁵⁾	2	2	2	2	2	2	2

(unidad: partes por peso).

¹⁾ Materia prima de caucho: caucho estireno-butadieno (contenido de estireno: 37.5%, contenido de aceite: 50%).

²⁾ Negro de humo: N220 (N2SA: 111 m²/g).

³⁾ Lote principal: Se obtiene de la siguiente manera, se produce un caucho sintético que incluye una matriz de caucho con alto contenido de cis-1,4-polibutadieno y 1,2-polibutadieno sindiotáctico dispersado en la matriz de caucho de cis-1,4-polibutadieno en una lámina con un espesor de 1 cm a través de una operación de laminación durante 30 minutos a 90°C, luego se corta en una longitud constante. Se introduce 1 200 gr de las hojas cortadas, 800 gr de látex SBR1721 (producto de Kumho Petrochemical Co., Ltd.), 750 gr de negro de humo y 600 gr de agente suavizante A#2 en una mezcladora y se mezclaron completamente.

El 1,2-polibutadieno sindiotáctico mencionado antes tenía una viscosidad Mooney de 62 y una fracción insoluble en n-hexano del 17% en peso.

⁴⁾ Acelerador 1: TT (acelerador de vulcanización basado en tiuram).

⁵⁾ Acelerador 2: DPG.

Anexo 2. Fotografías de la zona de muestreo



Figura 35. Alrededores de la zona de muestreo



Figura 36. Llanta en desuso de automóvil



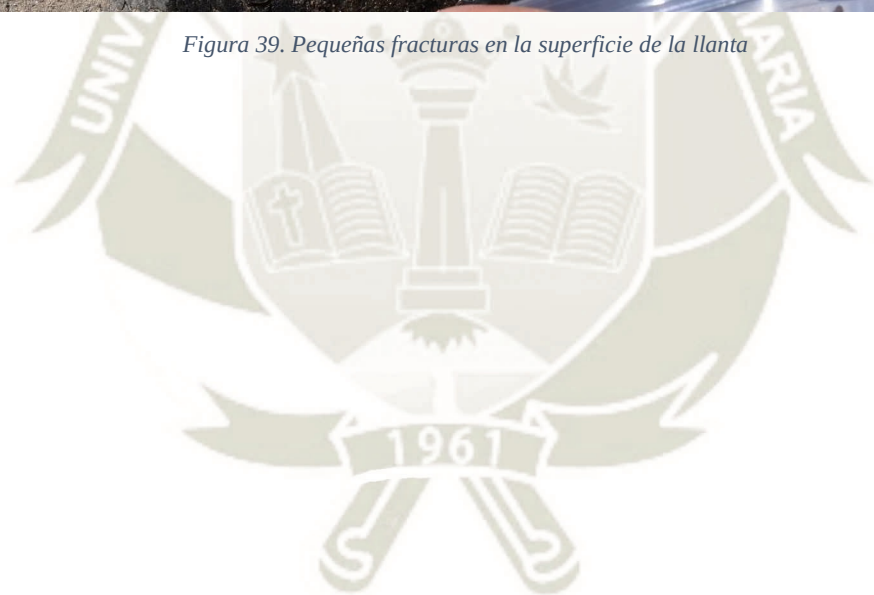
Figura 37. Llanta en desuso de bicicleta



Figura 38. Presencia de larvas en la superficie y grietas de la llanta



Figura 39. Pequeñas fracturas en la superficie de la llanta



Anexo 3. Fotografías del sistema de degradación



Figura 40. Perfil del sistema de aireación



Figura 41. Sistema completo para evolución de CO₂



Figura 42. Sistema de evolución de CO₂ funcionando

Anexo 4. Toma de datos para el test de Sturm

Tabla 11. Concentración de las soluciones

Soluciones	Concentración (M)
[Ba(OH) ₂] Tapa negra	0.012
[Ba(OH) ₂] Tapa roja	0.01125
[HCl]	0.1

Tabla 12. Prueba de Respiración Test de Sturm Prueba 1 (A1)

Día	ml de NaOH (5M)	ml de Ba(OH) ₂	Matraz de degradación (ml)	ml inicial Ba(OH) ₂	ml Ba(OH) ₂ antes de la filtración	ml alícuota Ba(OH) ₂ titulación	ml de HCl	Masa de CO ₂ producida (mg)
0	100	100	100	100	100	10	2.4	-7.816E-15
1	100	100	100	100	100	10	2.125	6.05
3	100	100	100	100	100	10	1.95	6.6
5	100	100	100	100	100	10	2	5.5
7	100	100	100	100	100	10	2.1	3.3
11	100	100	100	100	100	10	2.18	1.54
15	100	100	100	100	100	10	2.2	1.1
19	100	100	100	100	100	10	2.2	1.1

Tabla 13. Prueba de Respiración Test de Sturm Blanco 1 (B1)

Día	ml de NaOH (5M)	ml de Ba(OH) ₂	Matraz de degradación (ml)	ml inicial Ba(OH) ₂	ml Ba(OH) ₂ antes de la filtración	ml alícuota Ba(OH) ₂ titulación	ml de HCl	Masa de CO ₂ producida (mg)
0	100	100	100	100	100	10	2.4	-7.816E-15
1	100	100	100	100	100	10	2.15	5.5
3	100	100	100	100	100	10	2.05	4.4
5	100	100	100	100	100	10	2.15	2.2
7	100	100	100	100	100	10	2.15	2.2
11	100	100	100	100	100	10	2.25	0
15	100	100	100	100	100	10	2.225	0.55
19	100	100	100	100	100	10	2.25	0

Tabla 14. Prueba de Respiración Test de Sturm Prueba 2 (A2)

Día	ml de NaOH (5M)	ml de Ba(OH) ₂	Matraz de degradación (ml)	ml inicial Ba(OH) ₂	ml Ba(OH) ₂ antes de la filtración	ml alícuota Ba(OH) ₂ titulación	ml de HCl	Masa de CO ₂ producida (mg)

0	100	100	100	100	100	10	2.4	-7.816E-15
1	100	100	100	100	100	10	2.23	3.74
3	100	100	100	100	100	10	2.1	3.3
5	100	100	100	100	100	10	2.07	3.85
							5	
7	100	100	100	100	100	10	2.1	3.3
11	100	100	100	100	100	10	2.2	1.1
15	100	100	100	100	100	10	2.3	-1.1
19	100	100	100	100	100	10	2.2	1.1

Tabla 15. Prueba de Respiración Test de Sturm Blanco 2 (B2)

Dí a	ml de NaOH H (5M)	ml de Ba(OH) 2	Matraz de degradació n (ml)	ml inicial Ba(OH) 2	ml Ba(OH) 2 antes de la filtració n	ml alícuota Ba(OH) 2 titulació n	ml de HCl	Masa de CO₂ producid a (mg)
0	100	100	100	100	100	10	2.4	-7.816E-15
1	100	100	100	100	100	10	2.25	3.3
3	100	100	100	100	100	10	2.25	0
5	100	100	100	100	100	10	2.17	1.65
							5	
7	100	100	100	100	100	10	2.15	2.2
11	100	100	100	100	100	10	2.25	0
15	100	100	100	100	100	10	2.3	-1.1
19	100	100	100	100	100	10	2.2	1.1

Tabla 16. Prueba de Respiración Test de Sturm Prueba 3 (A3)

Día	ml de NaOH (5M)	ml de Ba(OH) ₂	Matraz de degradación (ml)	ml inicial Ba(OH) ₂	ml Ba(OH) ₂ antes de la filtración	ml alícuota Ba(OH) ₂ titulación	ml de HCl	Masa de CO ₂ producida (mg)
0	100	100	100	100	100	10	2.4	-7.816E-15
1	100	100	100	100	100	10	2.2	4.4
3	100	100	100	100	100	10	2.05	4.4
5	100	100	100	100	100	10	2.075	3.85
7	100	100	100	100	100	10	2.15	2.2
11	100	100	100	100	100	10	2.2	1.1
15	100	100	100	100	100	10	2.3	-1.1
19	100	100	100	100	100	10	2.2	1.1

Tabla 17. Prueba de Respiración Test de Sturm Blanco 3 (B3)

Día	ml de NaOH (5M)	ml de Ba(OH) ₂	Matraz de degradación (ml)	ml inicial Ba(OH) ₂	ml Ba(OH) ₂ antes de la filtración	ml alícuota Ba(OH) ₂ titulación	ml de HCl	Masa de CO ₂ producida (mg)
0	100	100	100	100	100	10	2.4	-7.816E-15
1	100	100	100	100	100	10	2.225	3.85

3	100	100	100	100	100	10	2.17 5	1.65
5	100	100	100	100	100	10	2.2	1.1
7	100	100	100	100	100	10	2.22	0.66
11	100	100	100	100	100	10	2.25	0
15	100	100	100	100	100	10	2.3	-1.1
19	100	100	100	100	100	10	2.2	1.1

Tabla 18. Porcentaje de Biodegradación Acumulativo

Día	Porcentaje de Biodegradación Acumulativo		
	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3
0	0	0	0
1	0.3	0.24	0.3
3	1.5	2.04	1.8
5	3.3	3.24	3.3
7	3.9	3.84	4.14
11	4.74	4.44	4.74
15	5.04	4.44	4.74
19	5.64	4.44	4.74