

# Universidad Nacional de Ingeniería

## Facultad de Ingeniería Ambiental



TESIS

### **Evaluación de la biodegradación de caucho a través del uso de consorcios microbianos extraídos de lodos residuales de la industria de curtiembre**

Para obtener el título profesional de Ingeniero Ambiental

Elaborado por

Denis Diego Cruz Marcelo

 [0000-0002-8187-2112](https://orcid.org/0000-0002-8187-2112)

Asesor

MSc. Liliana Del Rosario Marrufo Saldaña

 [0000-0002-5908-7847](https://orcid.org/0000-0002-5908-7847)

LIMA – PERÚ

2025

|                              |                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Citar/How to cite            | Cruz Marcelo [1]                                                                                                                                                                                                                                                |
| Referencia/Reference         | [1] D. D. Cruz Marcelo, “ <i>Evaluación de la biodegradación de caucho a través del uso de consorcios microbianos extraídos de lodos residuales de la industria de curtiembre</i> ” [Tesis de pregrado]. Lima (Perú): Universidad Nacional de Ingeniería, 2025. |
| Estilo/Style:<br>IEEE (2020) |                                                                                                                                                                                                                                                                 |

|                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Citar/How to cite              | (Cruz Marcelo, 2025)                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Referencia/Reference           | Cruz Marcelo, D. D. (2025). <i>Evaluación de la biodegradación de caucho termoplástico a través del uso de consorcios microbianos extraídos de lodos residuales de la industria de curtiembre</i> . [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Ingeniería]. Repositorio institucional Cybertesis UNI. |
| Estilo/Style:<br>APA (7ma ed.) |                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

### **Dedicatoria**

*Con todo el amor de mi corazón, dedico esta mi tesis de pregrado a mis padres Florencia y Bernabé, hermano Rubén, mi pareja Maribel y mi hijo Bastián, pues sin ellos no lo hubiera logrado. Cada uno de ellos han sido fundamental en mi vitalidad, y sin su apoyo incondicional, este logro no habría sido posible. Sus bendiciones diarias me han guiado y protegido, ayudándome a seguir siempre el buen camino. Les ofrezco este trabajo como muestra de gratitud por su paciencia, comprensión y amor. Los amo profundamente.*

## **Agradecimientos**

Mi más profundo reconocimiento es para Dios, por acompañarme en todo momento, otorgarme sabiduría y la fortaleza necesaria para avanzar y culminar esta etapa académica.

Agradezco profundamente a mis padres y a mi hermano por su constante apoyo, su paciencia y el aliento que me brindaron a lo largo de estos años de aprendizaje y desarrollo profesional.

A mi hijo Bastián y a Maribel, por ser mi inspiración diaria y el motor que me impulsó a culminar este proyecto con determinación y esperanza.

A mi asesora, la MSc. Liliana del Rosario Marrufo Saldaña, por su acompañamiento constante, su guía valiosa durante el desarrollo de esta tesis, y por enseñarme el verdadero significado de la perseverancia.

Agradezco también a las analistas del Laboratorio de Química del CITEccal Lima, Elizabeth Vicaña y Johanna Cabrera, por su colaboración comprometida, su orientación durante los experimentos, y por facilitarme el uso de los equipos necesarios para el análisis de biodegradación.

Finalmente, extendiendo mi gratitud al Instituto Tecnológico de la Producción – CITEccal Lima por brindarme el acceso a sus instalaciones y por el apoyo técnico que hizo posible la ejecución y desarrollo experimental de esta investigación.

## Resumen

El estudio evaluó la biodegradación del caucho termoplástico (TR) utilizando consorcios microbianos aislados de lodos residuales de la industria de curtiembre. La investigación tuvo un enfoque experimental, empleando lodos recolectados de la planta piloto del CITEccal Lima, donde se identificaron y caracterizaron bacterias del género *Pseudomonas*, específicamente las cepas CUR-44 y CUR-92. Además, se obtuvo y analizó suelo en un laboratorio acreditado por INACAL para garantizar condiciones adecuadas antes de los ensayos. La biodegradabilidad se midió mediante la captura de CO<sub>2</sub> usando hidróxido de potasio.

Se desarrollaron diez ensayos con diferentes combinaciones de suelo, caucho TR, consorcio microbiano y cepas de *Pseudomonas*. Estos incluyeron controles, blancos, material positivo con celulosa y diversas mezclas con lodo residual y bacterias. Las pruebas permitieron comparar la biodegradación natural del suelo con la obtenida bajo condiciones biológicamente enriquecidas.

Los porcentajes de biodegradación fueron: 16,56% para celulosa (control positivo); 4,55% para caucho TR solo con suelo; 12,31% para caucho TR con consorcio microbiano; 16,89% con adición de *Pseudomonas* CUR-44 y CUR-92; y 22,64% al combinar suelo, consorcio y *Pseudomonas*. Estos resultados demuestran que las bacterias del género *Pseudomonas*, tanto de forma individual como integradas en el consorcio microbiano de lodos residuales, desempeñan un papel fundamental en la degradación del caucho termoplástico, acelerando significativamente el proceso.

**Palabras clave:** *Pseudomonas*, biodegradación, caucho termoplástico y consorcios bacterianos.

## Abstract

The study evaluated the biodegradation of thermoplastic rubber (TR) using microbial consortia isolated from residual sludge from the leather tanning industry. The research followed an experimental approach, using sludge collected from the pilot wastewater treatment plant of CITEccal Lima, where bacteria of the genus *Pseudomonas*, specifically strains CUR-44 and CUR-92, were identified and characterized. Additionally, soil samples were obtained and analyzed in an INACAL-accredited laboratory to ensure appropriate conditions before the biodegradation tests. Biodegradability was measured through CO<sub>2</sub> capture using a potassium hydroxide solution.

Ten assays were conducted using different combinations of soil, TR rubber, microbial consortia, and *Pseudomonas* strains. These included controls, blanks, a positive material containing cellulose, and various mixtures with residual sludge and bacteria. The tests allowed comparison between natural soil biodegradation and biodegradation under biologically enriched conditions.

The biodegradation percentages obtained were: 16.56% for cellulose (positive control); 4.55% for TR rubber with soil only; 12.31% for TR rubber with microbial consortium; 16.89% with added *Pseudomonas* CUR-44 and CUR-92; and 22.64% when combining soil, consortium, and *Pseudomonas*. These findings demonstrate that *Pseudomonas* species, both individually and as part of the microbial consortium from residual sludge, play a key role in thermoplastic rubber degradation, significantly accelerating the process.

**Keywords:** *Pseudomonas*, biodegradation, thermoplastic rubber, bacterial consortia.

## Tabla de Contenido

|                                                                       | Pág. |
|-----------------------------------------------------------------------|------|
| Dedicatoria .....                                                     | iii  |
| Agradecimientos .....                                                 | iv   |
| Resumen .....                                                         | v    |
| Abstract .....                                                        | vi   |
| Introducción .....                                                    | xiii |
| Capítulo I. Parte Introductoria del Trabajo.....                      | 1    |
| 1.1 Generalidades .....                                               | 1    |
| 1.2 Descripción del problema de investigación .....                   | 1    |
| 1.3 Objetivos del estudio.....                                        | 5    |
| 1.3.1 Objetivo General.....                                           | 5    |
| 1.3.2 Objetivos Específicos .....                                     | 5    |
| 1.4 Hipótesis.....                                                    | 5    |
| 1.4.1 Hipótesis general.....                                          | 5    |
| 1.4.2 Hipótesis específicas.....                                      | 5    |
| 1.5 Antecedentes investigaciones.....                                 | 5    |
| 1.5.1 Antecedentes Internacionales.....                               | 5    |
| 1.5.2 Antecedentes nacionales.....                                    | 10   |
| Capítulo II. Marco Teórico y conceptual.....                          | 14   |
| 2.1 Marco teórico .....                                               | 14   |
| 2.1.1 Materiales poliméricos .....                                    | 14   |
| 2.1.2 Clasificación de los materiales poliméricos .....               | 14   |
| 2.1.3 Caucho .....                                                    | 16   |
| 2.1.4 Biodegradación.....                                             | 20   |
| 2.1.5 Industria de curtiembre .....                                   | 28   |
| 2.1.6 Aguas Residuales de la industria de curtiembre .....            | 29   |
| 2.1.7 Consorcio microbiano .....                                      | 29   |
| 2.1.8 Aislamiento de consorcios microbianos de lodos residuales ..... | 30   |

|                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1.9 Normas para evaluar la biodegradabilidad de plásticos .....                        | 30 |
| 2.1.10 Pruebas de identificación microbiológica .....                                    | 31 |
| 2.2 Marco Conceptual .....                                                               | 39 |
| Capítulo III. Desarrollo del trabajo de investigación .....                              | 42 |
| 3.1 Lugar de ejecución.....                                                              | 42 |
| 3.2 Tipo y nivel de investigación .....                                                  | 43 |
| 3.3 Variables de la investigación.....                                                   | 43 |
| 3.4 Diseño de investigación .....                                                        | 44 |
| 3.5 Materiales y Equipos.....                                                            | 45 |
| 3.6 Método del desarrollo experimental .....                                             | 46 |
| 3.6.1 Recolección de suelo.....                                                          | 46 |
| 3.6.2 Análisis de Suelo Tamizado.....                                                    | 47 |
| 3.6.3 Recolección de lodos residuales de curtiembres .....                               | 47 |
| 3.6.4 Aislamiento y caracterización de bacterias de efluentes y/o lodos residuales ..... | 50 |
| 3.6.5 Caracterización de bacterias lipolíticas .....                                     | 50 |
| 3.6.6 Determinación de la humedad del suelo .....                                        | 51 |
| 3.6.7 Pruebas o ensayos de biodegradabilidad bajo la norma ASTM D5988-29.....            | 52 |
| 3.6.8 Preparación de los ensayos de biodegradación.....                                  | 57 |
| 3.6.9 Medición de la biodegradabilidad.....                                              | 64 |
| 3.6.10 Prueba de ANOVA .....                                                             | 67 |
| 3.6.11 Test de TUKEY HSD/KRAMER .....                                                    | 67 |
| 3.6.12 Q-Test .....                                                                      | 68 |
| 3.6.13 Estadística en Excel .....                                                        | 69 |
| Capítulo IV. Análisis y discusión de resultados .....                                    | 70 |
| 4.1 Resultados obtenidos .....                                                           | 70 |
| 4.1.1 Determinación de Humedad de suelo .....                                            | 70 |
| 4.1.2 Resultados de la caracterización del suelo .....                                   | 70 |
| 4.1.3 Resultados de la estandarización de Ácido Clorhídrico 0.25 N .....                 | 72 |

|                                                                                                                                                                                  |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.1.4 Resultados de la evaluación de la biodegradación del caucho TR a través del uso de consorcios microbianos extraídos de lodos residuales de la industria de curtiembre..... | 73  |
| 4.1.5 Resultados de la obtención del porcentaje de biodegradación .....                                                                                                          | 74  |
| 4.1.6 Evaluar la biodegradación del caucho termoplástico a través del uso de consorcios microbianos extraídos de lodos residuales de la industria de curtiembre.....             | 77  |
| 4.2 Discusión de los resultados .....                                                                                                                                            | 93  |
| Conclusiones .....                                                                                                                                                               | 98  |
| Recomendaciones .....                                                                                                                                                            | 99  |
| Referencias bibliográficas .....                                                                                                                                                 | 100 |
| Anexos .....                                                                                                                                                                     | 112 |

## Lista de Tablas

|                                                                                            | Pág. |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Tabla 1: Tipos de material polimérico .....                                                | 15   |
| Tabla 2: Instalaciones donde se realizó la etapa experimental .....                        | 42   |
| Tabla 3: Operacionalización de las variables .....                                         | 43   |
| Tabla 4: Lista de materiales para los ensayos experimentales. ....                         | 45   |
| Tabla 5: Lista de equipos para los ensayos experimentales. ....                            | 45   |
| Tabla 6: Valores para la preparación de la solución 0.5 N de KOH.....                      | 56   |
| Tabla 7: Contenido de los desecadores.....                                                 | 60   |
| Tabla 8: Resultados de la humedad de suelos .....                                          | 70   |
| Tabla 9: Resultados de la caracterización de suelos .....                                  | 71   |
| Tabla 10: Resultados de la estandarización de Ácido Clorhídrico 0.25N.....                 | 72   |
| Tabla 11: Resultados de los gastos totales de volumen de ácido clorhídrico (ml) .....      | 73   |
| Tabla 12: Cuadro resumen de los ensayos de biodegradación.....                             | 77   |
| Tabla 13: Determinación de los porcentajes de biodegradación (%).....                      | 79   |
| Tabla 14: mg CO <sub>2</sub> generados por los desecadores a diferentes condiciones.....   | 85   |
| Tabla 15: Análisis de Varianza de los ensayos de biodegradación (Alpha menor a 0.05) ..... | 86   |
| Tabla 16: Cuadro Resumen del Análisis de Varianza de los ensayos de biodegradación .....   | 86   |
| Tabla 17: Prueba de TUKEY HSD/KRAMER .....                                                 | 88   |
| Tabla 18: Prueba de Q test.....                                                            | 89   |
| Tabla 19: Comparación entre Qstat y Q crit .....                                           | 89   |
| Tabla 20: Pruebas de reconocimiento.....                                                   | 91   |
| Tabla 21: Pruebas bioquímicas.....                                                         | 92   |

## Lista de Figuras

|                                                                                        | Pág. |
|----------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Figura 1: Esquema del proceso de biodegradación .....                                  | 21   |
| Figura 2: Una posible vía de biodegradación de los residuos plásticos.....             | 26   |
| Figura 3: Diagrama de la prueba de biodegradabilidad.....                              | 27   |
| Figura 4: Método de la investigación.....                                              | 28   |
| Figura 5: Metodologías actuales de ensayos de biodegradación .....                     | 31   |
| Figura 6: Recolección suelo del mercado de Flores.....                                 | 46   |
| Figura 7: Bolsas de polietileno a presión al vacío .....                               | 47   |
| Figura 8: Recolección de lodos residuales de curtiembres .....                         | 48   |
| Figura 9: Recolección de lodos residuales de curtiembres .....                         | 49   |
| Figura 10: Recolección de efluentes y lodos residuales de curtiembres .....            | 49   |
| Figura 11: Preparación de Ácido Clorhídrico 0.25 N .....                               | 54   |
| Figura 12: Estandarización del Ácido Clorhídrico 0.25 N .....                          | 55   |
| Figura 13: Preparación de Hidróxido de Potasio .....                                   | 57   |
| Figura 14: Acondicionamiento de desecadores.....                                       | 58   |
| Figura 15: Acondicionamiento de vasos precipitados.....                                | 58   |
| Figura 16: Preparación de suelo en balanza.....                                        | 59   |
| Figura 17: Cierre del desecador.....                                                   | 62   |
| Figura 18: Traslado de los desecadores preparados .....                                | 62   |
| Figura 19: Colocación de Termohigrómetro .....                                         | 63   |
| Figura 20: Almacenamiento de desecadores .....                                         | 63   |
| Figura 21: Recarga de vasos precipitados a los desecadores .....                       | 66   |
| Figura 22: Recarga de vasos precipitados a los desecadores .....                       | 67   |
| Figura 23: Diagrama de biodegradación de papel celulosa y caucho termoplástico (TR).83 | 83   |
| Figura 24: Pseudomonas Cepa CUR-92.....                                                | 90   |
| Figura 25: Pseudomonas Cepa CUR-44.....                                                | 91   |

## Lista de siglas

**TR** : Caucho Termoplástico

**CO<sub>2</sub>** : Dióxido de Carbono

**KOH** : Hidróxido de Potasio

**HCl** : Ácido Clorhídrico

**FTIR** : Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier

**SEM** : Microscopía Electrónica de Barrido

**CITEccal** : Centro de Innovación Productiva y Transferencia Tecnológica del Cuero, Calzado y Afines

**INACAL** : Instituto Nacional de la Calidad

**CUR-44 / CUR-92** : Cepas bacterianas de *Pseudomonas* aisladas del lodo residual

**ITP** : Instituto Tecnológico de la Producción

## Introducción

La gestión inadecuada de los residuos poliméricos sintéticos constituye uno de los problemas ambientales más relevantes de la actualidad, debido a su persistencia en el ambiente y a la escasa capacidad de degradación que presentan bajo condiciones naturales. El caucho termoplástico (TR), ampliamente utilizado en la industria por su versatilidad y propiedades mecánicas, forma parte de este grupo de materiales que generan preocupación por su acumulación en rellenos sanitarios y vertederos. Su descomposición lenta contribuye a un aumento progresivo del volumen de residuos y a la necesidad de encontrar soluciones más sostenibles que permitan mitigar su impacto ambiental.

Paralelamente, la industria de curtiembre genera grandes cantidades de lodos residuales como subproductos de sus procesos. Estos lodos son generalmente tratados como desechos, a pesar de contener una amplia diversidad de microorganismos con potencial para ser utilizados en procesos biotecnológicos. En particular, estos consorcios microbianos poseen la capacidad de transformar compuestos orgánicos complejos, lo cual abre la posibilidad de emplearlos en la biodegradación de materiales poliméricos. De este modo, se plantea una alternativa dualmente beneficiosa: el aprovechamiento de un residuo industrial y la reducción del impacto generado por polímeros de difícil degradación.

Estudios recientes han demostrado que ciertos géneros bacterianos, como *Pseudomonas*, poseen la habilidad de degradar materiales poliméricos mediante procesos enzimáticos específicos. Estas bacterias han sido identificadas con frecuencia en lodos residuales y suelos contaminados, donde cumplen funciones clave en la transformación de compuestos orgánicos. Las cepas *Pseudomonas* CUR-44 y CUR-92, aisladas de los lodos residuales de curtiembre, representan un ejemplo de microorganismos con potencial degradativo, capaces de actuar sobre matrices poliméricas como el caucho termoplástico.

En este contexto, la presente investigación evalúa la biodegradación del caucho TR utilizando consorcios microbianos provenientes de lodos residuales y cepas específicas de

*Pseudomonas*. El estudio se desarrolló siguiendo un enfoque experimental que incluyó la caracterización microbiológica de los lodos, la identificación de las cepas de interés, y la preparación de sistemas de ensayo basados en la técnica de captura de CO<sub>2</sub> mediante soluciones de hidróxido de potasio. Esta metodología permitió cuantificar la mineralización del polímero bajo distintas combinaciones de suelo, lodo residual, consorcios microbianos y cepas bacterianas.

Los ensayos realizados permitieron comparar la biodegradación natural del caucho TR en suelo con aquella obtenida bajo sistemas biológicamente enriquecidos. Los resultados evidenciaron que la presencia de microorganismos del lodo residual aumentó significativamente los niveles de degradación, mientras que la incorporación de las cepas *Pseudomonas CUR-44* y *CUR-92* generó un efecto sinérgico que incrementó aún más la producción de CO<sub>2</sub> asociada a la biodegradación del material. Dichos hallazgos reflejan la importancia de la interacción entre consorcios microbianos y bacterias específicas en la aceleración de la degradación del polímero.

Finalmente, esta investigación contribuye al campo de la biotecnología ambiental al demostrar que los consorcios microbianos provenientes de lodos residuales representan una alternativa viable para la degradación de caucho termoplástico. Además, promueve la valorización de residuos industriales, como los lodos de curtiembre, dentro de un enfoque de economía circular. Esta aproximación no solo reduce la carga ambiental generada por los residuos poliméricos, sino que también respalda el desarrollo de tecnologías más sostenibles para la gestión de residuos en la industria.

## **Capítulo I . Parte Introductoria del Trabajo**

### **1.1 Generalidades**

#### ***1.1.1. Título de la investigación***

Evaluación de la biodegradación de caucho termoplástico a través del uso de consorcios microbianos extraídos de lodos residuales de la industria de curtiembre

#### ***1.1.2. Línea de investigación***

La presente investigación pertenece a la línea de investigación “Protección, conservación y remediación ambiental”, sublínea “Residuos sólidos municipales y no municipales”

#### ***1.1.3. Tipo de investigación***

Por su finalidad: Aplicada

Diseño: Experimental

Por su profundidad: descriptivo

Localidad en el que se aplicó la investigación: Centro de Innovación Productiva y Transferencia Tecnológica del Cuero, Calzado Textil, Confecciones e Industrias Conexas.

#### ***1.1.4. Datos de los investigadores***

Tesista: Denis Diego Cruz Marcelo

Asesora: Msc. Liliana del Rosario Marrufo Saldaña

### **1.2 Descripción del problema de investigación**

El presente estudio enfrenta dos desafíos principales: el impacto ambiental derivado de la acumulación de los materiales polímeros sintéticos y la necesidad de dar un nuevo uso a los lodos residuales generados por el proceso de curtido. En general, los materiales poliméricos son descartados tras un solo uso y comúnmente se eliminan de manera inadecuada en vertederos, lo cual representa una práctica poco sostenible y perjudicial para el entorno natural (Shah et al., 2023). Además, debido a su gran volumen en comparación con otros residuos, como los orgánicos, su presencia en los rellenos

sanitarios ocupa un espacio significativo y dificulta su manejo, generando también un aumento en los costos de operación.

Esta situación se debe a que el 50 % de estos desechos corresponde a productos plásticos de un solo uso, caracterizados por su bajo costo y amplia accesibilidad para todos los niveles socioeconómicos, tanto en la vida diaria como en el sector industrial (Gravis, 2018). En este contexto, se ha evidenciado un incremento significativo en el consumo de material polimérico, pasando de 1,5 millones de toneladas en la década de 1950 a aproximadamente 12.000 millones de toneladas en la actualidad (Wang, 2020). De esa cantidad, el 79 % ha sido depositado en vertederos, mientras que el 12 % ha sido incinerado y solo el 9 % reciclado (Jia et al., 2021).

En el país, se estima que anualmente se generan aproximadamente 1,4 millones de toneladas de polímeros, de los cuales cerca del 58 %, equivalente a unas 806 mil toneladas, terminan como desechos. De esta cantidad, solo el 15 % es reciclado, mientras que el 85 % restante se deposita en botaderos informales (Salas, 2020). Según datos del Ministerio del Ambiente (2018), solo en Lima Metropolitana y el Callao se producen diariamente 886 toneladas de residuos plásticos, lo que representa el 46 % del total nacional generado por día.

El mercado está dominado por los tipos termoplásticos de polipropileno (PP) en 21 % y en 18 % por el polietileno de baja densidad (LDPE) y el polietileno lineal de baja densidad (LLDPE), asimismo, por cloruro de polivinilo (PVC), polietileno de alta densidad (HDPE), poliestireno (PS) y tereftalato de polietileno (PET) en una cuota de mercado del 17 %, 15 %, 8 % y 7 % respectivamente (Kabeyi & Olanrewaju, 2023).

Por otra parte, la industria del cuero se destaca como una de las más contaminantes, debido tanto al volumen como a la complejidad de los efluentes que genera. Estos vertidos representan un serio riesgo ambiental, ya que pueden alterar

significativamente el equilibrio ecológico por su elevada carga de compuestos orgánicos e inorgánicos, presencia de sustancias nitrogenadas, variaciones en el pH, alto contenido de colorantes y una considerable cantidad de sólidos en suspensión (Liang et al., 2018).

En la Unión Europea (UE), reconocida como uno de los mayores productores de cuero, el proceso de curtido da lugar a la generación de cerca de 170.000 toneladas de residuos provenientes de pieles curtidas, así como entre 400.000 y 900.000 toneladas de lodos resultantes del tratamiento de sus efluentes que contienen metales pesados y otras sustancias (Carreazo et al., 2018). Mientras que, en Perú la producción de cuero supera los 1.900.000 pies cuadrados con una generación entre 45 y 50 m<sup>3</sup> de efluentes por cada tonelada de cuero producido según datos oficiales del Ministerio de Producción (Aguilar et al., 2019).

Frente a esta problemática, el propósito de este estudio es mostrar el uso de consorcios microbianos aislados de lodos residuales provenientes de la industria curtidora como una alternativa para la biodegradación de compuestos poliméricos (Liang et al., 2018).

La tecnología basada en microorganismos autóctonos se aplica ampliamente para la gestión de residuos. A partir de esta base, se busca impulsar la realización de investigaciones multidisciplinarias más profundas que permitan comprender mejor los mecanismos de biodegradación accesibles y ambiental sostenibles, mediante el empleo de consorcios microbianos capaces de degradar materiales poliméricos de manera más eficiente, considerando además la influencia de diversos factores que afectan dicho proceso (Chittella et al., 2021).

Entre los microorganismos más comúnmente aplicados destacan las bacterias y hongos, estos se ubican en distintas partes, como los rellenos sanitarios, botaderos, residuos agrícolas, humus orgánico, playas y océanos, lodos residuales, entre otros. Estos

organismos son un grupo de consorcio microbiano innato que habita el suelo y las superficies de los seres vivos que poseen la capacidad de biodegradación, biolixiviación y biocompostaje. Por consiguiente, el uso de estos microorganismos autóctonos es inherentemente atractivo y una forma eficiente de proteger el ambiente (Vijayaraj et al., 2018).

En la región de Puno, Perú, se investigó la capacidad de biodegradación de una bacteria del género *Pseudomonas* sobre polietileno de baja densidad, aislada de un botadero ubicado en Cancharani, Puno. El estudio se realizó bajo condiciones de temperatura de 25 y 35 °C, con potencial de hidrógeno de 5.0 y 7.0, durante un período de 30 días, logrando una reducción del peso del material del 21.7 % y 27.3 %, respectivamente. (Butrón Pinazo, 2020)

Por lo antes expuesto, se propuso el siguiente problema general: ¿Cuál es la capacidad de los consorcios microbianos extraídos de lodos residuales de la industria de curtiembre en la biodegradación del caucho termoplástico?, por consiguiente, se plantearon dos problemas específicos: ¿Cómo aislar y caracterizar de manera efectiva las cepas microbianas presentes en el lodo residual de curtiembre con capacidad de biodegradación?, y ¿En qué medida los consorcios microbianos aislados del lodo residual logran degradar el caucho termoplástico?.

### **1.3 Objetivos del estudio**

#### **1.3.1 *Objetivo General***

Evaluar la biodegradación del caucho termoplástico a través del uso de consorcios microbianos extraídos de lodos residuales de la industria de curtiembre.

#### **1.3.2 *Objetivos Específicos***

Aislar cepas de *Pseudomona* del lodo residual de la planta de tratamiento de aguas industriales de curtiembre.

Evaluar la capacidad de la biodegradación de los consorcios microbianos del lodo residual en el material polimérico caucho termoplástico.

### **1.4 Hipótesis**

#### **1.4.1 *Hipótesis general***

El uso de consorcios microbianos extraídos de lodos residuales de la industria de curtiembre tiene un efecto significativo en la biodegradación del caucho.

#### **1.4.2 *Hipótesis específicas***

Se logra aislar cepas de *Pseudomona* del lodo residual de la planta de tratamiento de aguas industriales de curtiembre.

Los consorcios microbianos y las cepas *Pseudomonas* CUR44–CUR92 biodegradan el caucho termoplástico en por lo menos 20%

### **1.5 Antecedentes investigaciones**

#### **1.5.1 *Antecedentes Internacionales***

En su estudio, Pattanawanidchai et al. (2024) analizaron la biodegradación de muestras de caucho natural (NR) bajo condiciones simuladas de suelo a temperatura

controlada ( $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), siguiendo la norma ISO 17556. Se utilizó un suelo arcilloso franco con pH de 7.2 y capacidad de retención de agua del 57.6%. Se analizaron muestras de NR sin vulcanizar y vulcanizadas con bajo y alto contenido de curantes. Los resultados mostraron que las muestras con bajo contenido de curantes (UNRL y VNRL) tuvieron un comportamiento similar al NR sin tratar, mostrando una rápida biodegradación al inicio y una tasa constante a lo largo de los 365 días del estudio. Sin embargo, las muestras con alto contenido de curantes (UNRH y VNRH) presentaron un retraso en la biodegradación durante los primeros 130 días, aunque la muestra UNRH mostró una tasa de biodegradación relativamente alta después de este periodo. Al final del test, las muestras de NR sin tratar, UNRL, VNRL y UNRH alcanzaron una biodegradación del 54-59%, mientras que la muestra VNRH tuvo la menor biodegradación (28%). Se concluyó que el contenido de curantes no afecta significativamente la biodegradabilidad del NR sin vulcanizar a largo plazo, aunque un alto contenido de curantes puede retardar la actividad microbiana al principio del proceso.

Prakash et al. (2024) analizaron la descomposición bacteriana del caucho natural (NR) en condiciones oxidadas, proceso que comienza con la ruptura por oxidación de los enlaces dobles presentes en la cadena de carbono del NR, catalizado por oxigenasas ruberas extracelulares que contienen hemo. Se identificaron las proteínas RoxA y RoxB, asociadas principalmente a bacterias Gram-negativas, y la proteína Lcp, vinculada con bacterias Gram-positivas, como responsables de esta degradación. La metodología incluyó la revisión de bases de datos para encontrar nuevos ortólogos de las proteínas Rox y se describió la evolución de estas oxigenasas, confirmando la existencia de un tercer subgrupo de proteínas relacionadas (RoxCs), aunque su función biológica aún es incierta. Además, se analizó la posición taxonómica de *Steroidobacter cummioxidans* 35Y, sugiriendo que pertenece a un género nuevo, al que se le propuso el nombre de *Aurantibaculum* gen. nov.

En el estudio realizado por Kučić Grgić et al. (2023), se empleó un consorcio microbiano formado por hongos y bacterias provenientes de lodos activados para degradar LDPE (polietileno de baja densidad) combinado con TPS (almidón termoplástico). Este consorcio estaba integrado por ocho especies bacterianas y cinco tipos de mohos. En el experimento E1, se inoculó con microorganismos aislados de lodos activados y sedimentos fluviales, mientras que en el experimento E2 se utilizaron microorganismos aislados de compost. Los resultados indicaron que los microorganismos en ambos experimentos fueron capaces de degradar materiales poliméricos. El cultivo mixto de microorganismos en los experimentos E1-2 y E2-2 logró degradar completamente el TPS (almidón termoplástico). Los porcentajes de disminución de peso para LDPE, LDPE con 20 % de TPS y LDPE con 20 % de TPS más SEBS fueron de 3.3184 %, 14.1152 % y 16.0062 % respectivamente en el experimento E1, y de 3.9625 %, 20.4520 % y 21.9277 % en el experimento E2. Por otra parte, el análisis mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) indicó que las muestras con matriz de LDPE mostraron una degradación superficial moderada y una oxidación mínima bajo las condiciones experimentales aplicadas.

En la investigación realizada por Cada et al. (2019), se evaluó la biodegradación del polietileno de baja densidad (PEBD) mediante la aplicación de un consorcio bacteriano conformado por dos cepas alcalifílicas. El consorcio bacteriano, en presencia y ausencia de nanopartículas de óxido de hierro (IONPs), fue capaz de reducir el peso del polímero residual hasta un  $18,3 \pm 0,3\%$  y un  $13,7 \pm 0,5\%$ , respectivamente.  $13,7 \pm 0,5\%$ , respectivamente, tras 60 días de incubación. Este resultado fue corroborado por un mayor contenido proteínico de las células adheridas a las películas. El análisis de productos finales, a partir del sistema de “transformada de Fourier” y de microscopía electrónica, mostraron una marcada alteración de la textura de la superficie en presencia de IONPs, respectivamente, confirmando así el proceso de biodegradación.

Nawong et al., (2018) evaluaron la capacidad de un consorcio bacteriano para degradar guantes de látex de caucho, mediante la comparación entre un cultivo mixto de cepas bacterianas seleccionadas y cultivos puros individuales. La mayor pérdida de peso del 18 % de los guantes de goma se detectó después de la incubación con el cultivo mixto. La presencia de grupos aldehídos en los productos de degradación fue detectada a través de análisis mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier. La cepa F5 de *Rhodococcus pyridinivorans* dio la mayor pérdida de peso de los guantes de goma entre la cepa aislada y posee una proteína de limpieza del látex codificada por el gen lcp. El cultivo mixto de las cepas seleccionadas mostró el potencial de degradar el caucho en 30 días y se considera que se usa de manera eficiente para la degradación de productos de caucho. Este es el primer informe que demuestra una gran capacidad para degradar el caucho por parte de *Rhodococcus pyridinivorans*.

En su investigación, Giacomucci et al. (2020) analizaron la capacidad de ciertos consorcios microbianos, obtenidos de residuos y agua marina, para degradar películas de cloruro de polivinilo (PVC) bajo condiciones anaeróbicas en microcosmos. A los siete meses, tres de estos microcosmos presentaron biopelículas densas sobre el material plástico, junto con una pérdida de masa de hasta un  $11,7 \pm 0,6$  %, además de una notable reducción en la estabilidad térmica y en el peso molecular promedio del polímero, lo que indica una posible degradación microbiana de sus cadenas. Luego de 24 meses, se observaron efectos similares en otros tres consorcios. El análisis de las comunidades microbianas en ese punto reveló la presencia de organismos relacionados con degradadores conocidos de compuestos orgánicos halogenados. Este trabajo representa el primer registro de la degradación del PVC por microorganismos marinos en condiciones anaeróbicas, aportando datos relevantes sobre la posible descomposición de plásticos en ambientes marinos mediante microbios autóctonos.

Jeon et al., (2021) en su estudio investigó *Lysinibacillus sp.*, aislada e identificada como una nueva cepa, para descomponer el polietileno y el polipropileno. En el medio de cultivo microbiano sin ningún pretratamiento fisicoquímico, el *Lysinibacillus sp.* redujo el peso del polipropileno y el polietileno en aproximadamente un 4 y un 9 %, respectivamente, durante 26 días. Durante la biodegradación del polietileno y el polipropileno, se observó un aumento de la superficie rugosa mediante imágenes de microscopio electrónico de barrido (SEM). Además, mediante análisis GC-MS se observaron varios productos de oxidación que contenían grupos CH<sub>2</sub> producidos a partir de la descomposición del polietileno y el polipropileno. Los resultados sugieren que se pueden utilizar microorganismos para degradar polietileno y polipropileno sin un proceso fisicoquímico. Este resultado representa un punto inicial para diseñar estrategias dirigidas a la recuperación de suelos afectados por la contaminación plástica.

Thakwani et al. (2023) desarrollaron una película biodegradable a partir de polímeros naturales, enriquecida con extracto de semillas de dáttil, con el objetivo de evaluar su viabilidad como material para envases alimentarios. La película fue elaborada principalmente con almidón, al cual se incorporó el extracto con el fin de dotarla de propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Para analizar su desempeño ambiental, se realizó una investigación sobre la biodegradabilidad conforme a la norma ASTM D5988, la cual especifica el procedimiento estándar para medir la biodegradación aeróbica de plásticos en suelos. Las películas se enterraron bajo condiciones controladas de humedad (60–65%) y temperatura (25–30 °C). Los resultados indicaron que estas películas podrían degradarse completamente en suelos de compostaje en un periodo de 5 a 7 semanas. Además, al ser utilizadas como envoltura para frutas, demostraron una notable capacidad para conservar la frescura y prolongar la calidad de los alimentos durante su almacenamiento.

Kishk et al. (2020) desarrollaron un ensamblaje biodegradable innovador y evaluaron su biodegradabilidad mediante un ensayo en pruebas aeróbica basado en lo establecido por la norma ASTM D5988-18, la cual define el procedimiento estándar para evaluar la biodegradación de materiales plásticos en suelo. Las muestras fueron incubadas en desecadores ubicados en cámaras oscuras, a una temperatura constante de  $28 \pm 2$  °C durante ocho semanas. Durante el experimento, se midió la liberación de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), abriendo periódicamente los desecadores para renovar la solución de hidróxido de potasio (KOH), lo que facilitó la aireación y el control de la humedad. Los resultados indicaron un nivel de biodegradación aceptable, alcanzando un 90 % en menos de 20 días. En resumen, lograron producir una película multicapa de origen biológico y biodegradable, que presenta una alta tasa de degradación bajo condiciones aeróbicas.

### **1.5.2 Antecedentes nacionales**

En Lima, Pérez (2024) realizó un análisis sobre la efectividad del uso de fermentación láctica para disminuir contaminantes presentes en los lodos residuales generados por el proyecto Provisur de la planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR). El trabajo, de tipo experimental con enfoque longitudinal y explicativo, empleó observación experimental como técnica de recolección de datos. Para el tratamiento, se utilizó una mezcla con arroz que promovió el desarrollo de bacterias del género *Lactobacillus*, alcanzando una proporción del 15 % en un reactor anaeróbico con capacidad de 20 litros. El diseño experimental correspondió a un modelo factorial 2x2, incluyendo dos grupos de control y dos experimentales con bacterias activadas. Los datos evidenciaron que inicialmente el lodo contenía altos niveles de coliformes fecales y totales, junto con bajas concentraciones de metales. Tras cuatro semanas de tratamiento, se observó una disminución de hasta el 99.99 % en coliformes fecales y una eliminación completa de los coliformes totales. La investigación concluyó que este proceso de fermentación láctica es altamente eficaz para remover contaminantes biológicos, mostrando diferencias

estadísticamente significativas entre los grupos tratados y no tratados, con un nivel de confianza del 95 %.

Anaya (2023), en Huancayo, desarrolló una investigación aplicada con enfoque explicativo, cuyo objetivo fue evaluar la influencia de la concentración de microorganismos eficientes y el pH sobre la cinética de biodegradación de lodos residuales. El estudio utilizó un diseño experimental factorial 2x2 con dos réplicas por tratamiento, y se empleó análisis de varianza (ANOVA) para la validación estadística de las hipótesis. La muestra experimental consistió en 16 kg de lodo residual proveniente de una planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR), fraccionada en ocho unidades experimentales de 2 kg cada una. Los resultados revelaron que la aplicación de 100 ml de consorcios microbianos a un pH de 8 redujo el tiempo medio de biodegradación a 28.5 días, mostrando un efecto estadísticamente significativo en la aceleración del proceso de descomposición orgánica.

Arela et al. (2020) efectuó una revisión exhaustiva de la literatura con el objetivo de identificar las metodologías y enfoques utilizados en la biodegradación de polímeros plásticos mediante cepas del género *Pseudomonas*. Los estudios analizados reportan que dichas bacterias poseen la capacidad de asimilar compuestos poliméricos, llevándolos a su descomposición en monómeros y, posteriormente, a su mineralización en productos finales como dióxido de carbono o metano. Este proceso bioconversivo se ve favorecido por la notable adaptabilidad fisiológica de *Pseudomonas* a un amplio rango de condiciones bióticas y abióticas. En virtud de ello, se concluye que este género microbiano representa un agente biológico con alto potencial para la mitigación de la contaminación por residuos plásticos, destacándose su eficacia frente a polímeros comúnmente encontrados en el ambiente, tales como polietileno de alta y baja densidad (HDPE y LDPE), tereftalato de polietileno (PET), polietileno (PE) y polipropileno (PP).

Quispe (2022) estableció como objetivo obtener un consorcio bacteriano con alta actividad colagenolítica aislado de la curtiduría PACHECO SAC. A los consorcios aislados se les realizó una prueba de tolerancia con Colapez en medio agar LB. Se lograron aislar dos consorcios bacterianos resistentes, denominados P3R1 y P3R7, los cuales fueron evaluados para pruebas de actividad colagenolítica a pH 7 y 8, utilizando concentraciones de carne del 12.5%, 25%, 50% y 75%. Para determinar la actividad colagenolítica relativa, se aplicó el producto Azocoll, siguiendo el método de Chavira et al. (1984). Al finalizar la prueba, se observó que el consorcio bacteriano P3R7 mostró una actividad colagenolítica relativa superior al 50.92% a pH 8 y a una concentración de 75% tras 120 horas de evaluación. Este resultado indica diferencias estadísticas altamente significativas, lo que sugiere la efectividad del consorcio en la degradación del colágeno bajo las condiciones evaluadas.

Palacios y Prado (2018) realizaron un estudio con el propósito de evidenciar la biodegradación del tereftalato de polietileno (PET) mediante un consorcio bacteriano aislado de distintos tipos de humus. La metodología involucró la evaluación de tres sustratos diferentes, empleando métodos cuantitativos, como la medición de la reducción del peso del plástico cada 15 días, y cualitativos, mediante la observación de la formación de biopelículas y cambios en la porosidad. Los resultados indicaron que el nivel promedio de degradación osciló entre 0% y 4.5%, siendo el humus vegetal el que demostró una mayor eficiencia en la degradación en comparación con los demás tipos de humus analizados. Aunque no se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos, sí se observaron variaciones importantes al compararlos con el grupo de control. La investigación concluyó que ciertos microorganismos tienen la capacidad de descomponer el tereftalato de polietileno.

Gutiérrez (2019) 19) orientó su estudio al aislamiento y caracterización de microorganismos con potencial para la biodegradación de polietileno de baja densidad

(LDPE). Los aislamientos microbianos se realizaron a partir de muestras recolectadas en sitios de disposición final de residuos sólidos en la ciudad de Tacna. Las cepas obtenidas incluyeron géneros bacterianos y fúngicos tales como *Bacillus sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Micrococcus sp.*, *Rhodotorula sp.*, *Penicillium vanoranjei*, *Aspergillus sp.* y *Saccharomyces cerevisiae*. La actividad degradativa del consorcio microbiano fue evidenciada por una pérdida promedio de masa de 172.975 mg del polímero, correspondiente a un 2.88 % de degradación luego de 70 días de incubación. El consorcio más eficiente, integrado por *Bacillus sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Flavobacterium sp.* y *Micrococcus sp.*, alcanzó una tasa de degradación del 6.54 % bajo las condiciones experimentales establecidas.

## **Capítulo II . Marco Teórico y conceptual**

### **2.1 Marco teórico**

#### **2.1.1 *Materiales poliméricos***

Los materiales poliméricos están compuestos por moléculas de gran tamaño llamadas polímeros. Los polímeros son sustancias químicas que se forman a partir de largas cadenas o redes de moléculas más pequeñas (Schäli, 2022). Los materiales poliméricos, también conocidos como plásticos, son componentes esenciales y duraderos que poseen múltiples aplicaciones en la vida diaria, incluyendo la agricultura, la manufactura y la industria textil (Rodrigues et al., 2019).

Danso et al., (2019) señalan que los principales materiales poliméricos incluyen poliuretano, polietileno, poliamida, tereftalato de polietileno, poliestireno, cloruro de polivinilo y polipropileno. Estos polímeros son empleados en la producción de una variedad de artículos, tales como botellas, piezas para la industria manufacturera y otras aplicaciones industriales.

#### **2.1.2 *Clasificación de los materiales poliméricos***

Se clasifican de acuerdo con su comportamiento térmico en tres categorías principales: termoplásticos, termoestables y elastómeros (polímeros elásticos). Asimismo, en la Tabla N.º 1 se categoriza la clasificación según su desempeño en tres grupos: material polimérico termoplásticos, termofijos y elastómeros, tal como señala (Schäli, 2022).

**Tabla 1***Tipos de material polimérico*

| Tipos                | Derivados                                                       |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------|
| <b>Termoplástico</b> | Polietileno (PE)                                                |
|                      | Polipropileno (PP)                                              |
|                      | Poliestireno (PS)                                               |
|                      | Cloruro de Polivinilo (PVC)                                     |
|                      | Acrilonitrilo/Butadieno/Estireno (ABS)                          |
|                      | Estireno Acrilonitrilo (SAN)                                    |
|                      | Acrílico (polimetilmetacrilato, PMMA)                           |
|                      | Policarbonato (PC)                                              |
|                      | Nylon (poliamida)                                               |
|                      | Polietileno Tereftalato, PBT o PBTP                             |
|                      | Acetal (polioximetileno, POM)                                   |
|                      | Oxido Polifenileno Modificado y Ether Polifenileno (PPO, PPE)   |
|                      | Polisulfeno, Polietherimide, y Polyethersulfone (PSO, PEI, PES) |
|                      | Poliuretano Termoplástico (TPU)                                 |
|                      | Caucho Termoplástico (TR)                                       |
| <b>Termofijos</b>    | Resina epoxi (EP)                                               |
|                      | Poliéster no saturado (UP)                                      |
|                      | Poliuretano (PUR)                                               |
|                      | Silicones (SI)                                                  |
|                      | Resinas Fenolicas (FP)                                          |
|                      | Resinas Urea Formaldehido                                       |
|                      | Resinas de Melamina                                             |
|                      | Elastómeros de butadieno-estirero                               |
|                      | Neopreno                                                        |
|                      | Elastómeros de Polisulfuro y de Siliconas                       |
| <b>Elastómeros</b>   | Hypalón                                                         |
|                      | Elastómeros de Poliuterano                                      |
|                      | Fluoroelastómeros                                               |
|                      | Polisoprenos                                                    |
|                      | Polibutadieno                                                   |

*Nota. Extraído de Manual de plástico para diseñadores, 2013.*

### 2.1.3 Caucho

El caucho es un material polimérico elastomérico compuesto principalmente por largas cadenas de hidrocarburos con unidades repetitivas de isopreno o monómeros similares. Su estructura química le otorga propiedades como alta elasticidad, resiliencia, impermeabilidad y resistencia a la abrasión, lo que permite su recuperación después de la deformación. Existen dos grandes tipos de caucho: el natural, obtenido del látex del árbol *Hevea brasiliensis*, y el sintético, derivado del petróleo mediante procesos de polimerización. Dentro de este último grupo se encuentran el caucho estireno-butadieno (SBR), el neopreno (policloropreno) y el caucho termoplástico (TR), que combina propiedades de los elastómeros con la facilidad de procesamiento de los termoplásticos (Yildirim & Aksoy, 2024). Esta versatilidad hace del caucho un material clave en la industria moderna, utilizado en la fabricación de neumáticos, suelas de calzado, juntas, guantes, cables, componentes automotrices, materiales de sellado y dispositivos médicos (Jia et al., 2024).

En los últimos años, la investigación sobre el caucho se ha orientado hacia su reciclabilidad y sostenibilidad ambiental, debido a que los cauchos sintéticos presentan baja biodegradabilidad y provienen de recursos no renovables. Los estudios actuales destacan la necesidad de desarrollar elastómeros biodegradables y bio-basados que reduzcan la contaminación por residuos poliméricos. Asimismo, se ha investigado la posibilidad de aplicar procesos biotecnológicos, como la biodegradación microbiana, para aprovechar microorganismos que degraden parcialmente estos materiales y así disminuir su impacto ambiental (Wu et al., 2024; Yildirim & Aksoy, 2024). El caucho, por tanto, representa un material de gran valor tecnológico, pero también un reto ambiental y científico en el contexto de la economía circular.

El término "caucho TR" se refiere a un tipo específico de material polimérico utilizado en la fabricación de calzado, siendo este un neopreno butadieno. El TR es una

abreviatura de Termoplástico Rubber (goma termoplástica en español), que es un compuesto sintético que combina propiedades de la goma y el plástico. Es un tipo de material que suele proceder de una combinación física de caucho y plástico (Sethulekshmi et al., 2022).

Esta composición específica produce un material con propiedades tanto termoplásticas como elastoméricas. A diferencia de los termoestables, los cauchos termoplásticos son más sencillos de trabajar a la hora de fabricar componentes como moldes de inyección. En ellos se combinan las ventajas tanto del caucho como de los materiales plásticos. Este tipo de material tiene un alto grado de elasticidad debido al grado de reticulación de sus estructuras, lo que lo hace muy útil en la fabricación de componentes (Song et al., 2019).

El caucho TR se utiliza comúnmente en la suela de zapatos debido a su durabilidad, resistencia al deslizamiento y capacidad para mantener la tracción en diversas condiciones. También es conocido por su flexibilidad y ligereza. Esto lo convierte en un material idóneo para diversos tipos de calzado, abarcando desde zapatillas deportivas hasta zapatos tanto casuales como formales (Torres et al., 2023).

Una de las principales ventajas del caucho TR en la industria del calzado es su capacidad para ser reciclado, lo que responde a las crecientes demandas de sostenibilidad que marcan la pauta en el sector. En un contexto global donde la preocupación por el impacto ambiental es cada vez mayor, el caucho TR destaca como un material amigable con el medio ambiente. A diferencia de los cauchos tradicionales, como el caucho vulcanizado, que se caracteriza por una estructura reticulada que hace difícil su reciclaje, el caucho termoplástico puede ser rehecho y reprocesado fácilmente sin que pierda sus propiedades originales. Esta propiedad de reciclabilidad es especialmente importante en una industria que enfrenta una creciente presión por reducir el uso de materiales no

biodegradables y disminuir la huella ecológica (Martín, 2021). El caucho TR puede ser reciclado y reutilizado para la fabricación de nuevos productos, lo que contribuye significativamente a la reducción de residuos y a la creación de un ciclo de vida más circular para los materiales empleados en la fabricación de calzado (Alexandrescu et al., 2020).

Además de su reciclabilidad, el caucho TR destaca por su alta resistencia frente a agentes externos, lo que lo posiciona como una alternativa óptima para calzado destinado a condiciones exigentes. Su capacidad para resistir la humedad, aceites y sustancias químicas lo hace ideal no solo para calzado deportivo, sino también para aplicaciones industriales y laborales. Este tipo de calzado debe ser resistente y funcional en ambientes que requieren durabilidad frente a diversas agresiones externas, como las altas temperaturas, el contacto constante con líquidos y productos corrosivos. La capacidad del caucho TR para preservar sus características físicas y mecánicas frente a condiciones ambientales adversas lo hace especialmente apreciado en sectores como la construcción, la agricultura y la manufactura, donde se requiere que el calzado ofrezca resistencia y durabilidad para los trabajadores (Kohan et al., 2020).

Otro factor que contribuye a la popularidad del caucho TR en la industria del calzado es su adaptabilidad a diferentes formulaciones y colores, lo que lo convierte en un material sumamente atractivo para los diseñadores. Los diseñadores de calzado pueden experimentar con este material para crear suela y componentes de calzado de diferentes estilos, texturas y rigidez, respondiendo a las diversas necesidades del mercado. Gracias a su capacidad para ser moldeado con precisión, el caucho TR permite la creación de suelas con diseños innovadores, que pueden incluir detalles estéticos y funcionales como tracción mejorada, resistencia al deslizamiento, o incluso propiedades impermeables. La posibilidad de modificar sus características físicas en función de la formulación también lo hace ideal para crear calzado que ofrezca un alto confort y soporte ergonómico, especialmente en modelos de calzado deportivo o de alto rendimiento (Biswas, 2024).

En términos de rendimiento, el caucho TR es relativamente ligero, lo que permite la fabricación de calzado más liviano sin sacrificar la resistencia o durabilidad. Este factor es especialmente relevante en el sector del calzado deportivo, donde las propiedades del material influyen directamente en el rendimiento del atleta. Las suelas de caucho TR ofrecen la combinación perfecta entre flexibilidad y soporte, lo que permite a los deportistas disfrutar de un calzado cómodo y funcional que no compromete la estabilidad ni el agarre en diversas superficies. Además, el caucho TR proporciona una excelente amortiguación y absorción de impactos, lo que aumenta la comodidad del usuario durante largos periodos de uso. Esta ligereza también es apreciada en el calzado cotidiano, donde la comodidad es un factor clave para los consumidores (Steleescu et al., 2022).

Desde un punto de vista económico, el caucho TR tiene un bajo costo de producción en comparación con los cauchos tradicionales o los compuestos de caucho vulcanizado. Esta ventaja lo convierte en una opción económica tanto para los fabricantes como para los consumidores. Los costos más bajos en la producción del caucho TR no solo permiten la fabricación de productos a gran escala de manera eficiente, sino que también pueden hacer que el calzado hecho con este material sea más accesible para una mayor parte del mercado. Esto es una ventaja significativa en un sector tan competitivo como el del calzado, donde las empresas buscan ofrecer productos de calidad sin sacrificar la rentabilidad. El uso de caucho termoplástico puede, por lo tanto, optimizar los márgenes de beneficio sin comprometer las características de rendimiento y durabilidad del calzado (Pinizzotto et al., 2021).

Sin embargo, el caucho TR no está exento de algunas limitaciones. Una de las principales desventajas es que, en comparación con el caucho natural o el caucho sintético vulcanizado, su resistencia a la intemperie y a la exposición prolongada a altas temperaturas puede ser inferior. Esto significa que, en entornos extremadamente cálidos o cuando el calzado se somete a condiciones de alta exposición al sol o a sustancias

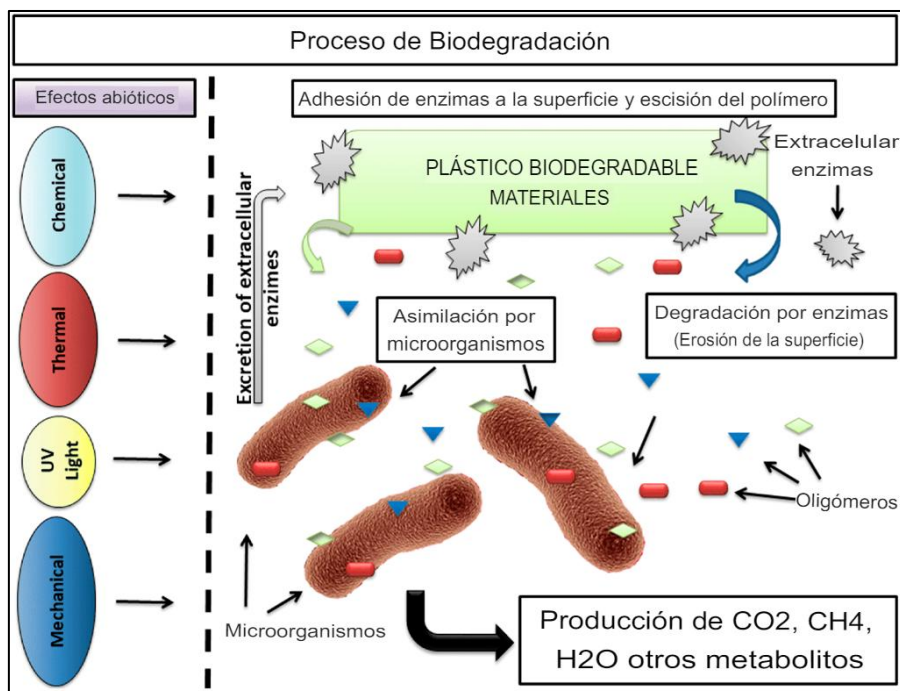
químicas agresivas, el caucho TR podría experimentar un mayor desgaste o pérdida de propiedades en comparación con otros materiales. No obstante, las investigaciones en el área de la mejora de formulaciones de caucho TR han avanzado significativamente, y los fabricantes están trabajando constantemente en desarrollar versiones más resistentes y duraderas. Con las mejoras continuas en la tecnología y la formulación del caucho termoplástico, estas limitaciones están siendo progresivamente minimizadas, lo que asegura que el caucho TR siga ganando terreno en la industria del calzado (Krishna et al., 2021).

#### **2.1.4 Biodegradación**

Se entiende por biodegradación al proceso de descomposición de materiales tras la acción que ejercen las sustancias como carbono y energía de un determinado grupo de microorganismos sobre los constituyentes básicos de los poliméricas (Poznyak et al., 2019). La biodegradación de los plásticos se basa en las características físicas y químicas propias del material. Estas propiedades engloban aspectos como la topografía superficial, el peso molecular, la estructura química, la temperatura de fusión, la cristalinidad y las propiedades hidrófilas e hidrófobas de los materiales poliméricos (Skariyachan et al., 2022).

**Figura 1**

*Esquema del proceso de biodegradación*



*Nota. Extraído de Pires et al., (2022).*

Este proceso de biodegradación de los polímeros se articula como un proceso enzimático específico que abarca varias etapas, entre las que se encuentran el biodeterioro, la despolimerización y la asimilación. La colaboración de diversos microorganismos, en conjunto con la interacción de factores abióticos, posibilita la materialización del biodeterioro (Rosendo et al., 2023). Este último fenómeno se traduce en cambios o modificaciones que se generan debido a la intervención de microorganismos en la superficie del plástico. Estos cambios pueden manifestarse como alteraciones físicas, químicas y mecánicas. La segregación de enzimas catalíticas y la liberación de radicales libres conllevan a la formación de biopelículas, las cuales gradualmente provocan la ruptura de las cadenas poliméricas, dando lugar a la despolimerización de los plásticos (Asiandu et al., 2020).

#### **2.1.4.1 Microorganismos para la Biodegradación de materiales poliméricos.**

En la búsqueda de mitigar la contaminación derivada de los plásticos, se han emprendido numerosos experimentos en el campo de la biodegradación de polímeros. Los microorganismos y comunidades microbianas que se encuentran en vertederos, suelos y océanos se han erigido como la opción primordial para la identificación de especies con capacidad para biodegradar plásticos (Wu et al., 2023).

La literatura científica ya ha documentado una considerable cantidad de organismos con capacidad para la biodegradación de plásticos. Para el poliestireno, se han identificado *Enterobacter* sp., *Citrobacter sedlakii*, *Alcaligenes* sp. y *Brevundimonas diminuta* como agentes capaces de llevar a cabo la biodegradación (Sekhar, Nampoothiri, Mohan, & Bhaskar, 2016). En cuanto al cloruro de polivinilo, el proceso de biodegradación se asocia con *Pseudomonas* sp., *Brevibacterium* sp. y *Micrococcus* sp (Zhang et al., 2024). Por otro lado, se han identificado cepas fúngicas como *Curvularia* sp., *Phanerochaete chrysosporium* y *Trogia buccinalis* que demuestran ser prometedoras para la degradación de la mezcla de policaprolactona y PVC (Ruginescu & Purcarea, 2024). Las cepas fúngicas de *Aspergillus tubingensis* han demostrado su capacidad para eliminar el poliuretano (Khan, Nadir, Shah, & Karunarathna, 2017). Finalmente, la biodegradación del polipropileno ha sido estudiada con *Pseudomonas stutzeri*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus flexus* como microorganismos relevantes en este proceso (Jadaun et al., 2022).

Los microorganismos degradadores de caucho, como ciertas especies de *Nocardia* sp. y *Pseudomonas* sp., también pueden llegar a tener participación en la biodegradación de este material sintético. Estos microorganismos son capaces de fragmentar los polímeros del caucho, convirtiéndolos en sustancias más simples que pueden ser utilizadas como fuentes de carbono y energía. Su función biológica no solo ayuda a minimizar la acumulación de residuos de caucho en el medio ambiente, sino que también favorece la creación de métodos sostenibles para el reciclaje y la restauración biológica del entorno.

La investigación sobre estos organismos está en auge, ya que su potencial puede ser clave para abordar problemas de contaminación en diversas industrias (Soares & Steinbüchel, 2022).

*Pseudomonas sp.* es una bacteria gramnegativa que destaca por su diversidad metabólica y su capacidad para degradar múltiples compuestos orgánicos, entre ellos varios tipos de plásticos. Esta bacteria ha evidenciado una gran eficacia en la descomposición del poliuretano, un polímero que se utiliza frecuentemente en la elaboración de espumas, recubrimientos y adhesivos. Los estudios han identificado que *P. putida* produce enzimas específicas, como la ureasa y las hidrolasas, que atacan los enlaces en la estructura del poliuretano, facilitando su mineralización (Hou et al., 2022). Este proceso no solo convierte el polímero en compuestos más simples, sino que también libera energía que la bacteria utiliza para crecer y multiplicarse. La investigación sobre *Pseudomonas sp.* ha abierto nuevas perspectivas en biotecnología, con aplicaciones potenciales en la biorremediación de sitios contaminados por desechos de poliuretano y en el desarrollo de procesos industriales más sostenibles para la eliminación de plásticos (Shilpa et al., 2024).

Se ha observado que bacterias del género *Nocardia* presentan una capacidad destacable para degradar el caucho sintético. Este polímero de alta resistencia constituye un desafío importante en el contexto de la contaminación ambiental. Los microorganismos filamentosos de *Nocardia* pueden aprovechar el caucho como fuente de carbono gracias a su habilidad para sintetizar enzimas específicas, por ejemplo, oxidasas e hidrolasas, que catalizan la ruptura de los enlaces químicos de la estructura polimérica. Los estudios han demostrado que ciertas cepas de *Nocardia* pueden reducir la masa de neumáticos desechados en un período relativamente corto, lo que subraya su potencial para la biorremediación (El-Sayed et al., 2024). Además, la investigación sobre las condiciones óptimas para el crecimiento de estas bacterias y su actividad degradadora es crucial para

desarrollar aplicaciones industriales que utilicen *Nocardia* en el reciclaje de caucho, contribuyendo así a una economía más circular y sostenible (Sarkar et al., 2022).

El género *Gordonia* incluye varias especies de bacterias que han mostrado una notable capacidad para degradar materiales poliméricos, especialmente aquellos derivados del caucho y los hidrocarburos. Estas bacterias son resistentes a ambientes adversos y su propiedad para metabolizar compuestos complejos (Chandramouli et al., 2024). La capacidad de *Gordonia* para descomponer el caucho se atribuye a la producción de enzimas como las liasas y las epóxidas, que atacan los enlaces estructurales del polímero. Investigaciones recientes han demostrado que estas bacterias no solo degradan caucho, sino que también pueden contribuir a la eliminación de otros contaminantes orgánicos en su entorno, lo que las convierte en candidatas prometedoras para programas de biorremediación (Wang et al., 2023).

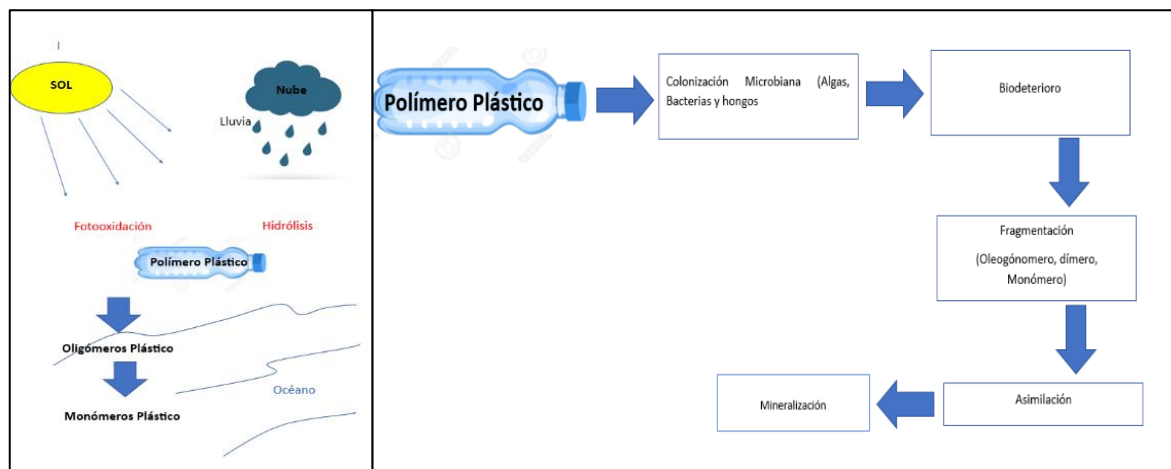
*Ideonella sakaiensis* es una bacteria que posee una capacidad única para degradar el tereftalato de polietileno (PET), un polímero mayormente utilizado en la elaboración de botellas y envases plásticos. Este microorganismo fue descubierto en un sitio de desecho plástico en Japón, donde se identificó que utiliza el PET como fuente de carbono. *I. sakaiensis* produce enzimas específicas, como la PETasa y la MHETasa, que descomponen el PET en productos intermedios, como el ácido tereftálico y el etilenglicol, que posteriormente pueden ser metabolizados por la bacteria (Joho et al., 2023). La identificación y caracterización de estas enzimas ha abierto nuevas posibilidades para el desarrollo de procesos biotecnológicos que permiten la reciclabilidad del PET, ofreciendo una solución viable para mitigar el impacto medio ambiental de este tipo de plástico. El estudio sobre *I. sakaiensis* y sus enzimas continúa siendo un área activa de estudio, con la finalidad de incrementar su eficacia y potencial aplicación en la industria del reciclaje (Sevilla et al., 2023).

**2.1.4.2 Mecanismo de biodegradación.** El mecanismo de biodegradación consiste en varias reacciones bioquímicas que realizan la despolimerización de las sustancias poliméricas en oligómero o monómeros que puedan entrar en el ciclo biogeoquímico (Srikanth et al., 2022). La catalización enzimática puede intervenir en diferentes fases de la biodegradación. El proceso de forma general de la biodegradación se clasifica en colonización, biofragmentación, asimilación y mineralización (Jadaun et al., 2022).

La primera etapa (colonización), es donde ocurre la formación de biopelículas por el consorcio o especie individual que está en contacto con la superficie del polímero plástico. Este proceso puede investigarse mediante microscopía electrónica, fotónica y/o de polarización (Silva et al., 2023). Además, la fijación a la superficie del plástico a través de diversos polisacáridos y/o proteínas como los hidrofóbicos producidas por el consorcio microbiano, estas sustancias al penetrar la superficie alteran el tamaño de los poros del polímero de tal manera que modifican la forma convencional del polímero, es en esta etapa donde se produce un cambio fisicoquímico que hace que la durabilidad y resistencia del polímero disminuya mientras la superficie aumenta (Ali et al., 2021).

**Figura 2**

*Una posible vía de biodegradación de los residuos plásticos*



*Nota: Adaptado de Jadaum et al. (2002)*

En la biofragmentación, ocurre la ruptura de la estructura polimérica debido a la acción enzimática específica, tales como hidrólisis, oxidorreductasas y/o radicales libres. En la etapa de asimilación, las células del consorcio o de una especie individual emplean los monómeros generados en la etapa previa como fuente de carbono y energía, lo que favorece su crecimiento. Por último, la etapa (mineralización) es posible verificar mediante la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMRS), la cromatografía de permeación en gel (GPC), la espectroscopia de masas (MS) y/o la cromatografía de gases-espectrofotometría de masas (GC/MS) (Ali et al., 2021)

**2.1.4.3 Determinación de la Biodegradación.** Se refiere a la técnica o método que se debe seguir para poder saber el porcentaje, cantidad. etc., de biodegradación de los materiales poliméricos que se expone a consorcios microbianos (Cao et al., 2022). A continuación, se hace mención de dos de ellos:

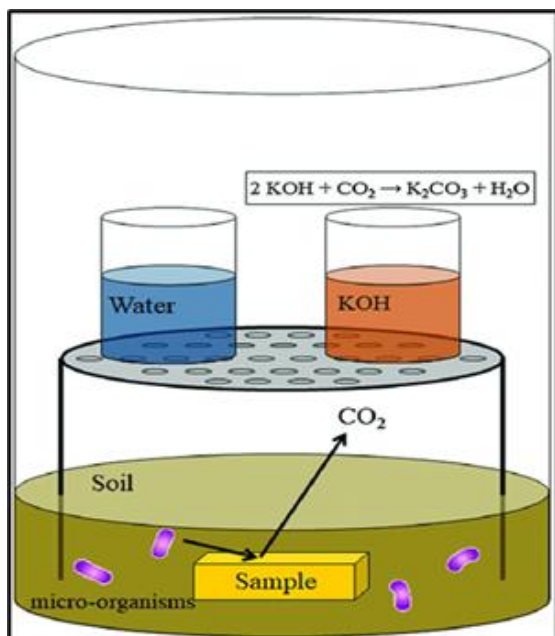
**Evaluación por pérdida de peso molecular:** Consiste en determinar el peso molecular de un material polímero que luego será expuesto a la presencia de uno o varios consorcios microbianos con la finalidad de ser biodegradado. Este análisis permite evaluar la pérdida de peso del material polimérico a través del tiempo (Xian et al., 2023).

**Pruebas de Biodegradabilidad:** Para poder determinar el grado o nivel de biodegradación del material polimérico (caucho), se toma en consideración la norma referencial internacional ASTM D5988-12 (EuroLab, 2024).

Esta prueba consiste en exponer el material polimérico o material de prueba a condiciones aeróbicas, con la finalidad que se mida que tanto y que tan rápido un material polimérico se biodegrada cuando se expone a los microorganismos presentes en el suelo. Para este propósito, se cuantifica el **dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>)** liberado durante la descomposición del polímero, el cual es retenido en una trampa o vaso precipitado que contiene una solución de KOH 0.5 N. Posteriormente, esta solución es titulada con HCl 0.25 N. El volumen obtenido en la titulación se utiliza para calcular la cantidad de CO<sub>2</sub> capturada, aplicando un factor de corrección de 1.1 (ASTM D5988, Matestlab)

**Figura 3**

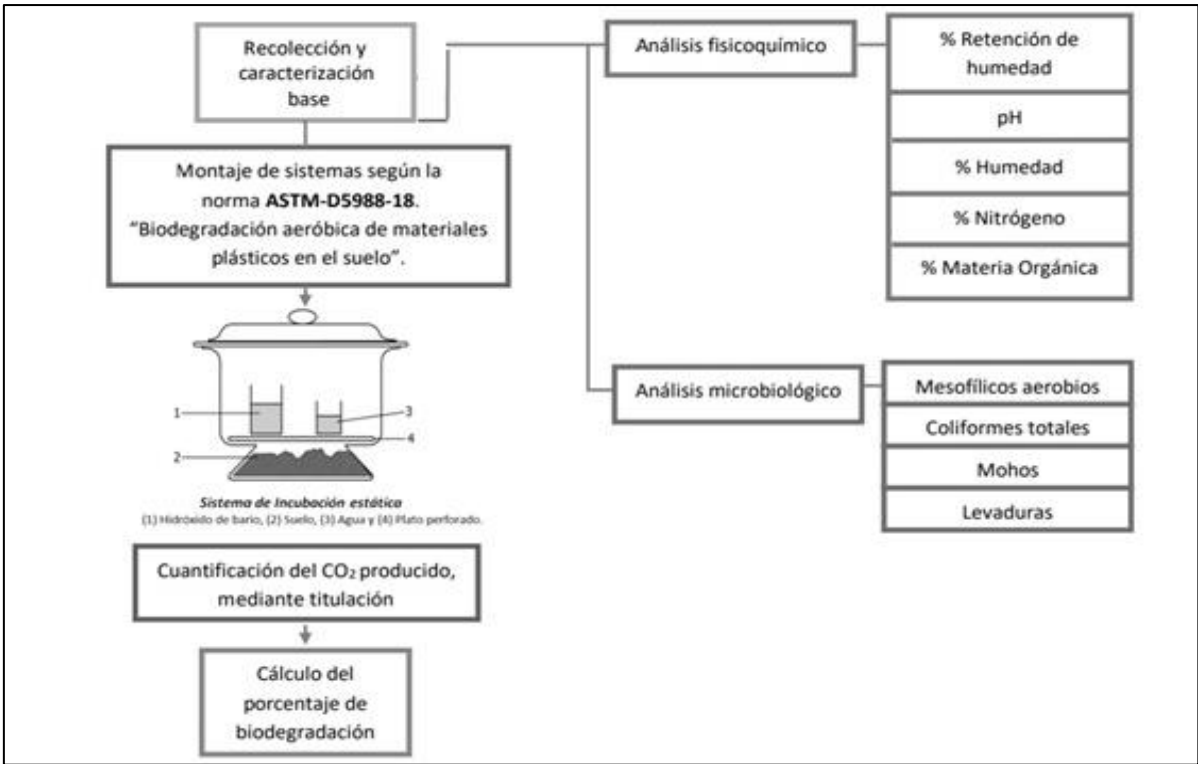
*Diagrama de la prueba de biodegradabilidad*



*Nota.* Adaptado de Matestlab

Figura 4

Método de la investigación



Nota. Adaptado de Carrillo, 2020.

### 2.1.5 Industria de curtiembre

A nivel mundial, los principales actores en esta industria son China, India, Italia, Brasil, Corea del Sur, Vietnam y Taiwán, con India en segundo lugar tras China (Kumar et al., 2023). La industria de curtiembre es el sector manufacturero que valoriza la piel en bruto en artículos nuevos, como bolsos, prendas de vestir, zapatos, etc (Ricky et al., 2022). Esta industria presentó un valor de 271. 210 millones de dólares en 2021 (Saira y Shanthakumar, 2023). Esta es una industria que elimina grandes cantidades de residuos y que presenta altas dificultades para la eliminación de estos (Suman et al., 2021)

La industria de la curtiembre usa los subproductos (pieles y cueros de animales) de la industria cárnica como materia prima para sus procesos de obtención de productos a base de cuero; de una tonelada de este subproducto (piel cruda) obtienen 200, Kg de cuero

seco, 250,0 Kg de residuos sólidos curtidos, 350,0 Kg de residuos no curtidos y 100,0 Kg se pierden como aguas residuales (Shaibur, 2023).

#### **2.1.6 Aguas residuales de la industria de curtiembre**

La industria de curtiembre produce 30 L de aguas residuales por cada kilogramo de piel que procesa (Kumar et al., 2023). El proceso de pieles animales en esta industria genera grandes cantidades de residuos sólidos, líquidos y gaseosos. Los residuos sólidos representan entre el 50 y 60% y estos consisten en descarnados; el afeitado, serrajes y polvo de pulido (35 a 40%), los recortes de pieles de 5 a 7% y pelo de las pieles de 2 a 5% (Shaibur, 2023).

De una tonelada de materia prima procesada producen hasta 800 kg de residuos y subproductos relacionados con la producción. Los desechos generados por las actividades de la industria de curtiembre son grandes cantidades de sólidos y líquidos. Descrito en porcentaje, el residuo representa entre el 75% y el 80% de la piel cruda en forma de residuos sólidos y líquidos, estos representan un problema medioambiental ya que al degradarse emiten olores fétidos por la degradación de las proteínas y emiten contaminantes como NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S y CO<sub>2</sub> (Chagtmí et al., 2023). Además, las aguas residuales de la curtiembre presentan altas concentraciones de contaminantes orgánicos, resultando en una DQO hasta de 27, 600 mg/L (Kumar et al., 2023).

#### **2.1.7 Consorcio microbiano**

Es una combinación de varios macroorganismos con la capacidad de degradar diferentes tipos de materiales poliméricos. Un consorcio microbiano o cocultivo presenta mayor potencial de biodegradación comparados con el potencial individual de un microorganismo en condiciones ideales. Los consorcios microbianos son adaptables, esto significa que se pueden asociar los mejores aislados capaces de degradar polímeros plásticos (Skariyachan et al., 2022).

La mayoría de las investigaciones que se han desarrollado en los últimos años con respecto a consorcios microbianos se basan en comunidades bacterianas. Los consorcios microbianos son un conjunto de microorganismos presentes en una misma fuente ya sea de forma natural o inducidas, que usan los materiales poliméricos como única recurso de carbono y energía que les permite enriquecer el consorcio natural o inducido (Wu et al., 2023).

#### **2.1.8 Aislamiento de consorcios microbianos de lodos residuales**

En los lodos residuales de diferentes industrias existen microorganismos como bacterias y hongos que se adaptan y crecen en las condiciones de nutrientes, temperatura, etc. que le brinda los lodos residuales. El aislamiento de estos se hace a través de técnicas establecidas con posibles modificaciones. Eslami et al. (2019) aislaron e identificaron dos especies de bacterias *Enterococcus faecalis* (EF) y *Klebsiella variicola* (KV), con la finalidad de evaluar su capacidad para biodegradar y eliminar el colorante Rojo Reactivo 198 (RR198) de medios acuosos.

Por su parte, en la investigación de Skariyachan et al., (2022), aislaron dos bacterias termófilas (*Aneurinibacillus* sp. y *Brevibacillus* sps.) a partir de plantas de tratamiento de aguas residuales y vertederos, estas bacterias demostraron alta capacidad de biodegradación hacia polietileno y polipropileno. Según las bases de datos analizadas en su mayoría usaron residuos líquidos de diferentes industrias para aislar e identificar microorganismos con alto potencial para biodegradar plásticos.

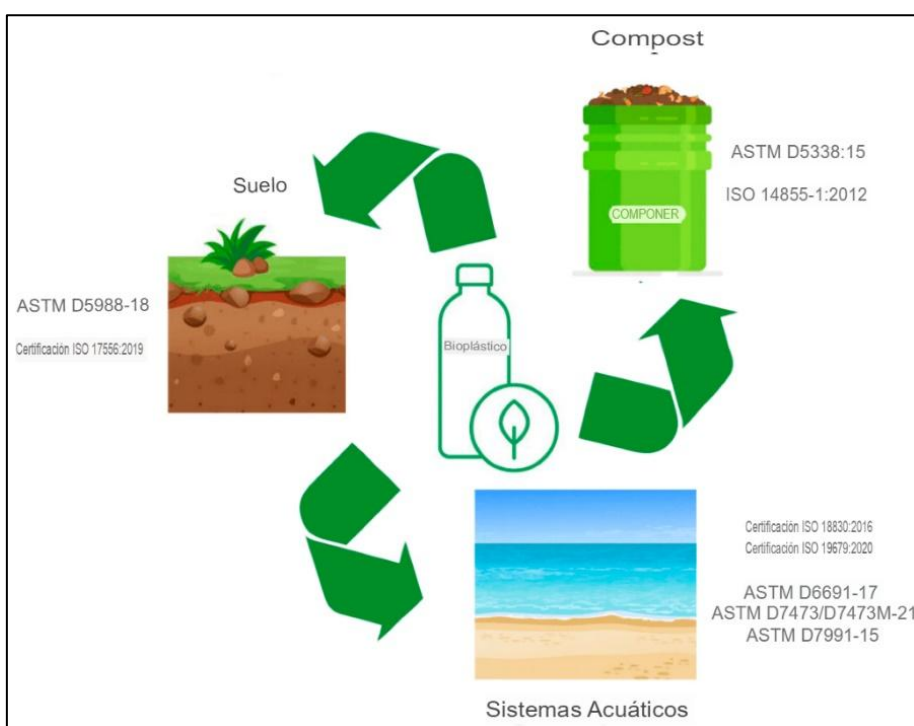
#### **2.1.9 Normas para evaluar la biodegradabilidad de plásticos**

Estas normas se clasifican en dos grupos principales: el primero ofrece un método para estimar la biodegradación mediante un procedimiento experimental, y el segundo permite calcular o analizar el nivel de biodegradación alcanzado. Las normas ASTM e ISO son ambas imprescindibles para la evaluación de la biodegradación en materiales

plásticos. Actualmente, las normas ASTM D5988-18 e ISO 17556:2019 son las más utilizadas para medir la biodegradación de plásticos en el suelo. La ASTM D5988-18 mide el porcentaje y la velocidad de biodegradación aeróbica basándose en la cantidad de dióxido de carbono generado por la descomposición del polímero. En tanto, la ISO 17556:2019 especifica un método para cuantificar la demanda de oxígeno usando un respirómetro cerrado o mediante la medición del CO<sub>2</sub> liberado (Silva et al., 2023).

**Figura 5**

*Metodologías actuales de ensayos de biodegradación*



*Nota. Extraído de (Pires et al., 2022).*

### **2.1.10 Pruebas de identificación microbiológica**

A continuación, se describe sobre las pruebas de identificación microbiológica

#### **2.1.10.1 Prueba de GRAM**

La técnica de tinción de Gram constituye un método esencial en microbiología para la clasificación de bacterias en dos categorías principales: grampositivas y gramnegativas, fundamentándose en la estructura de su pared celular. Este procedimiento inicia con la

aplicación del colorante violeta cristal, seguido por un agente fijador, típicamente yodo, que forma un complejo insoluble con el colorante. Posteriormente, se efectúa una etapa de decoloración utilizando etanol o acetona; en esta fase, las bacterias grampositivas retienen el colorante debido a su capa gruesa de peptidoglicano, mientras que las gramnegativas, caracterizadas por una pared celular más delgada y la presencia de una membrana externa, pierden la coloración. Finalmente, se emplea un colorante de contraste, comúnmente safranina, que tiñe las bacterias gramnegativas de rosa, facilitando así su diferenciación visual (Cherkaoui & Schrenzel, 2022).

#### **2.1.10.2 Prueba de Catalasa.**

La prueba de catalasa es una técnica microbiológica empleada para identificar si un microorganismo es capaz de sintetizar la enzima catalasa, responsable de catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en agua y oxígeno. Para llevar a cabo esta prueba, se añade una pequeña cantidad de peróxido de hidrógeno sobre una muestra bacteriana depositada en un portaobjetos o tubo de ensayo. La presencia de burbujas de oxígeno indica un resultado positivo, señalando la producción de catalasa. Esta prueba resulta fundamental para distinguir entre diferentes géneros bacterianos, como en el caso de los estafilococos, que son catalasa positivos, y los estreptococos, que carecen de esta enzima (Lin et al., 2022).

#### **2.1.10.3 Prueba de Oxidasa.**

La prueba de oxidasa es un procedimiento microbiológico empleado para identificar la presencia de la enzima citocromo c oxidasa, la cual juega un papel fundamental en el sistema de transporte electrónico durante la respiración aeróbica bacteriana. Para esta prueba, se utiliza un reactivo oxidasa, comúnmente tetrametil-p-fenilendiamina, que se aplica sobre una muestra del cultivo bacteriano. La reacción positiva se manifiesta

mediante un cambio de color en la superficie bacteriana, típicamente a un tono púrpura, que aparece en pocos minutos. Este método es especialmente valioso para diferenciar ciertos grupos bacterianos, incluyendo los géneros *Neisseria* y *Pseudomonas*, que presentan actividad oxidasa, en contraste con bacterias como *Escherichia coli*, que resultan negativas para esta enzima (Wahart et al., 2022).

#### **2.1.10.4 Prueba en Agar Cetrimide.**

La prueba de agar con cetrimida es una técnica empleada para la identificación selectiva de *Pseudomonas aeruginosa*, una bacteria gramnegativa patógena que suele causar infecciones en individuos con sistemas inmunitarios comprometidos. Este medio de cultivo contiene cetrimida, un compuesto tensioactivo que inhibe el crecimiento de otras bacterias, favoreciendo así la proliferación exclusiva de *P. aeruginosa*. Cuando se inocula la muestra en este medio, la presencia de *P. aeruginosa* se evidencia por la formación de colonias de color verde azulado, atribuible a la producción de pigmentos como la piocianina. Asimismo, la turbidez y la variación cromática del medio reflejan la actividad metabólica bacteriana (Shatti et al., 2022).

#### **2.1.10.5 Prueba en Agar P.**

La técnica del Agar P es un procedimiento específico empleado para la identificación de *Pseudomonas aeruginosa*, una especie de gran importancia clínica dentro del género *Pseudomonas*. Este medio selectivo está formulado con nutrientes y compuestos inhibidores que promueven el crecimiento de *Pseudomonas* mientras restringen el desarrollo de otras bacterias. La inoculación de una muestra en Agar P permite observar la formación de colonias distintivas, generalmente con tonalidades verdosas o azuladas, originadas por la síntesis de pigmentos como la piocianina y la fluoresceína. Además, esta prueba puede incorporar la evaluación de la capacidad del microorganismo

para metabolizar determinados compuestos como fuentes de carbono, lo que ayuda a validar su identificación (Molitor et al., 2020).

#### **2.1.10.6 Prueba de Oxidación-Fermentación (OD)**

La prueba de Oxidación-Fermentación (OD) es una técnica microbiológica diseñada para evaluar cómo las bacterias metabolizan los carbohidratos, diferenciando entre aquellos que utilizan la oxidación aeróbica y los que emplean la fermentación anaeróbica. En este procedimiento, se inoculan dos tubos de medio que contienen un carbohidrato, como glucosa, donde uno se incubará en presencia de oxígeno (aeróbico) y el otro se sellará para crear un ambiente sin oxígeno (anaeróbico). Ambos tubos contienen un indicador de pH que cambiará de color si hay producción de ácidos, permitiendo observar cómo la bacteria utiliza el carbohidrato en función del oxígeno disponible (Kohlerschmidt et al., 2021).

La evaluación de los resultados de la prueba OF se analiza de la siguiente manera: si el tubo aeróbico se torna amarillo mientras que el tubo anaeróbico permanece verde, indica que la bacteria es oxidativa, utilizando el carbohidrato en presencia de oxígeno. Si ambos tubos se vuelven amarillos, la bacteria está fermentando el carbohidrato en ambos entornos. Por otro lado, si ambos tubos permanecen verdes, se concluye que la bacteria no utiliza ese carbohidrato (Saeed et al., 2023).

#### **2.1.10.7 Prueba de Methyl Red-Voges Proskauer (MR-VP)**

La prueba Methyl Red-Voges Proskauer (MR-VP) consiste en un conjunto de análisis bioquímicos diseñados para determinar la habilidad de ciertas bacterias de metabolizar glucosa y generar distintos productos finales. Para llevar a cabo esta prueba, se inocula un medio que contiene glucosa y se somete a incubación durante varios días. En la prueba MR, se añade un indicador de pH llamado rojo de metilo, el cual detecta la

acidez generada; si la bacteria fermenta glucosa produciendo ácidos fuertes, el medio cambia a un color rojo. Por su parte, la prueba VP se basa en la adición de reactivos que permiten identificar la formación de acetona y otros compuestos neutros, evidenciando un tipo alternativo de fermentación que genera un medio menos ácido y sin cambio de color (Roy et al., 2023).

La evaluación de los resultados se efectúa observando las variaciones de color en el medio. Un cambio a rojo tras la adición del rojo de metilo indica un resultado positivo en la prueba MR, reflejando la producción de ácidos fuertes, característico de bacterias como *Escherichia coli*. Si el medio permanece amarillo, el resultado es negativo. En cuanto a la prueba VP, la aparición de un color rojo luego de añadir los reactivos señala la producción de acetona y se asocia a microorganismos como *Enterobacter* y *Klebsiella*; la ausencia de cambio de color o un tono amarillo indica un resultado negativo. En conjunto, estas pruebas bioquímicas permiten distinguir entre diversas especies bacterianas y sus vías metabólicas específicas (Nordin et al., 2020).

#### **2.1.10.8 Prueba de Triple Sugar Iron (ITS)**

La prueba Triple Sugar Iron (TSI) es un método microbiológico empleado para la identificación y diferenciación de bacterias del grupo *Enterobacteriaceae*, basado en su habilidad para fermentar distintos azúcares, generar gas y reducir sulfatos a sulfuros. Para esta prueba se utiliza un medio que contiene tres tipos de azúcares (glucosa, lactosa y sacarosa), un indicador de pH y sales de hierro, dispuesto en un tubo con agar inclinado. Esto permite observar cambios cromáticos y la producción de gas tanto en la zona superior (condiciones aeróbicas) como en la inferior (anaeróbicas) tras el tiempo de incubación correspondiente (Contreras & María, 2022).

La evaluación de los resultados se fundamenta en varias observaciones: la coloración amarilla en todo el medio indica fermentación de uno o más azúcares; el color

rojo señala ausencia de fermentación. La generación de gas se detecta mediante la formación de burbujas o la separación del agar en la base del tubo. Asimismo, la reducción de sulfatos se manifiesta por la aparición de un precipitado negro, señal de producción de sulfuros. Al combinar estas evidencias, se pueden distinguir distintas especies bacterianas; por ejemplo, la presencia de color amarillo en la parte superior y precipitado negro en la inferior es indicativa de fermentación de glucosa junto con reducción de sulfatos, característica típica de *Salmonella* (Contreras & María, 2022).

#### **2.1.10.9 Prueba de Citrato**

La prueba de citrato se emplea en microbiología para determinar si ciertas bacterias pueden utilizar el citrato como su única fuente de carbono, además de crecer en un medio donde las sales de amonio constituyen la fuente de nitrógeno. Para llevar a cabo esta prueba, se inocula un medio de cultivo que incluye citrato de sodio, un indicador de pH y nutrientes esenciales. Cuando la bacteria es capaz de metabolizar el citrato, se libera amoníaco, lo cual incrementa el pH y provoca un cambio de color en el indicador, normalmente hacia un tono azul, señalando un resultado positivo (Yang & Wang, 2020).

La evaluación del ensayo se basa en la observación del cambio cromático del medio. Un viraje hacia el azul indica que la bacteria utiliza efectivamente el citrato, lo que representa un resultado positivo. Por el contrario, si el medio conserva un color verde, se interpreta como negativo, lo que significa que el microorganismo no emplea el citrato como fuente de carbono. Esta prueba resulta especialmente valiosa para identificar bacterias del grupo Enterobacteriaceae, tales como *Enterobacter* y *Klebsiella*, las cuales suelen dar resultados positivos, a diferencia de *Escherichia coli*, que generalmente es negativa para esta prueba (Yang & Wang, 2020).

#### **2.1.10.10 Prueba de Lysine Iron Agar (LIA)**

El medio Lysine Iron Agar (LIA) es utilizado en microbiología para la identificación y diferenciación de bacterias del grupo Enterobacteriaceae, basándose en su capacidad para realizar la desaminación de lisina y reducir compuestos de hierro. Este medio contiene lisina, glucosa, sales de hierro y un indicador de pH. Tras la inoculación y el periodo de incubación, se pueden observar cambios en la coloración del medio y la formación de sulfuros de hidrógeno, aspectos esenciales para la diferenciación bacteriana (Dimri et al., 2019).

La interpretación de esta prueba depende del color que adopte el medio y la presencia de precipitados. Un cambio a color rojo en la superficie indica desaminación de lisina, mientras que un fondo amarillo señala fermentación de glucosa, lo que altera el pH. La generación de sulfuros de hidrógeno se manifiesta con la formación de un precipitado negro en la parte inferior del tubo. Por ejemplo, un medio con superficie roja y precipitado negro en la base es indicativo de *Salmonella*, que desamina lisina y produce sulfuros, mientras que un medio con color amarillo y precipitado negro puede corresponder a *Proteus* (TM Media, 2023).

#### **2.1.10.11 Prueba de Motilidad-Indol-Ornitina (MIO)**

La prueba MIO (Motilidad-Indol-Ornitina) es un método microbiológico empleado para identificar y diferenciar bacterias, especialmente dentro del grupo de las enterobacterias. Este medio de cultivo incorpora triptófano para evaluar la producción de indol, ornitina para determinar la capacidad de descarboxilación, y un componente que permite la observación de la motilidad bacteriana. Tras la inoculación y el período de incubación, se analizan los cambios que reflejan la actividad metabólica relacionada con estos tres parámetros. La motilidad se determina por la extensión del crecimiento bacteriano más allá del área inicial de inoculación, mientras que la detección de indol y la

descarboxilación de ornitina se realizan mediante la adición de reactivos específicos luego de la incubación (Britania, 2024).

La interpretación de esta prueba se basa en la observación de la difusión del crecimiento, la coloración del medio y la producción de compuestos específicos. Un crecimiento difuso indica motilidad positiva, mientras que un crecimiento restringido señala motilidad negativa. La formación de un color rojo tras la adición de reactivos indica la producción de indol, confirmando la descomposición del triptófano. En cuanto a la descarboxilación de ornitina, un cambio a color púrpura en el medio es indicativo de un resultado positivo, mientras que la permanencia del color amarillo sugiere que no se produjo esta reacción (Britania, 2024).

#### **2.1.10.12 Prueba de Urea**

La prueba de urea es un procedimiento microbiológico diseñado para detectar la presencia de la enzima ureasa en bacterias, responsable de la hidrólisis de la urea en amoníaco y dióxido de carbono. En este ensayo, se inocula un medio que contiene urea y un indicador de pH, comúnmente fenol rojo. Durante la incubación, si la bacteria produce ureasa, el amoníaco generado eleva el pH, causando un cambio en la coloración del medio, usualmente de amarillo a rosa. Esta habilidad para degradar la urea es propia de ciertos grupos bacterianos, en particular algunas enterobacterias y bacterias patógenas (Empendium, 2024).

La evaluación del resultado se basa en la observación del cambio cromático del medio. Un color rosa indica un resultado positivo, lo que implica que la bacteria sintetizó ureasa y metabolizó la urea con la liberación de amoníaco. En contraste, la ausencia de cambio o el mantenimiento del color amarillo señala un resultado negativo, sugiriendo que la bacteria no posee actividad ureasa. Esta prueba resulta especialmente valiosa para la

identificación de especies como *Proteus* y *Helicobacter pylori*, contribuyendo al diagnóstico de infecciones relacionadas con estos microorganismos (Empendium, 2024).

## 2.2 Marco Conceptual

**Biodegradación:** A través de ciclos elementales como los del carbono, el nitrógeno y el azufre, las moléculas orgánicas del medio ambiente sufren un proceso natural denominado biodegradación que las reduce a compuestos más simples, las mineraliza y las redistribuye (Assis et al., 2023).

**Contaminación:** El concepto de "contaminación" se refiere a la introducción o existencia de sustancias materiales y/o energía térmica en los distintos ambientes, tales como el aire, el agua y el suelo— que alteran su composición, distribución o concentración, generando impactos negativos sobre el entorno natural (Landrigan et al., 2018).

**Enzimas catalíticas:** Un tipo de biocatalizador que puede utilizarse para cambiar moléculas orgánicas es un catalizador enzimático, también conocido como enzima como catalizador. En general, una enzima natural es una macromolécula biológica creada por los seres vivos. Fundamentalmente, son complejas proteínas que contienen nitrógeno y que facilitan la aceleración de reacciones bioquímicas esenciales para los organismos vivos. Y lo que es más importante, los catalizadores son necesarios para todos los procesos bioquímicos que tienen lugar en los seres vivos (Jee et al., 2018).

**Lodo residual:** Se denomina lodo residual a cualquier residuo sólido, semisólido o líquido producido durante el tratamiento de las aguas residuales (Ćwiertniewicz et al., 2023).

**Microorganismos:** Organismos visibles sólo con un microscopio. Los hongos, las algas, las bacterias y los protozoos son ejemplos de microorganismos. Aunque los virus no se consideran seres vivos, a veces se clasifican como microbios (Berg et al., 2020).

**Material Polimérico:** Este conjunto está formado por diversos compuestos orgánicos, tanto sintéticos como semisintéticos, que se distinguen por su habilidad para ser moldeados en estructuras sólidas. Una característica compartida por todos estos materiales es su plasticidad, que les permite experimentar deformaciones permanentes sin romperse (Berry et al., 2023).

**Elastómeros:** Los polímeros elásticos poseen la capacidad de estirarse cuando se les aplica tensión y regresar a su forma inicial una vez que esta fuerza cesa. Estos materiales se distinguen por su gran flexibilidad, resistencia al desgaste y longevidad, características que los hacen adecuados para diversas aplicaciones, como neumáticos, juntas, dispositivos médicos y piezas industriales. Su elasticidad se debe a una estructura molecular compuesta por cadenas largas y reticuladas (Alarifi, 2023).

**Consortios microbianos:** Grupo de diferentes microorganismos que coexisten y colaboran en un entorno específico, como el suelo, los sedimentos o sistemas biológicos. Estos consorcios pueden incluir bacterias, hongos, protozoos y otros organismos, cada uno desempeñando un papel particular en procesos ecológicos como la biodegradación, el ciclo de nutrientes y la fijación de nitrógeno. La sinergia entre los microorganismos que integran un consorcio microbiano mejora significativamente la descomposición de materia orgánica y la transformación de diversos compuestos, lo cual es esencial en actividades como el tratamiento biológico de aguas residuales, la biorremediación de suelos afectados y el desarrollo de prácticas agrícolas sostenibles (Sanchez et al., 2023).

**Biopelículas:** Los biofilms consisten en comunidades microbianas organizadas que se adhieren a diversas superficies, formando una capa delgada y estructurada. Estas

comunidades pueden estar integradas por bacterias, hongos y otros microorganismos, todos inmersos en una matriz extracelular compuesta principalmente por polímeros que ellos mismos generan. Esta estructura es común en distintos entornos, como en cuerpos de agua naturales, plantas de tratamiento de aguas residuales y equipos médicos. La formación del biofilm proporciona a los microorganismos una mayor protección contra condiciones ambientales adversas, incluyendo la acción de agentes antimicrobianos y desinfectantes, lo que favorece su supervivencia y proliferación en ambientes difíciles (Sauer et al., 2022).

## Capítulo III . Desarrollo del trabajo de investigación

### 3.1 Lugar de ejecución

La etapa experimental de este trabajo de investigación se ejecutó en las siguientes instalaciones:

**Tabla 2**

*Instalaciones donde se realizó la etapa experimental*

| Lugar de ejecución                                                                                                                                                              | Acciones                                                                                                                                                                               |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Planta Piloto de Curtiembre de CITEccal Lima</b> (Centro de Innovación Productiva y Transferencia Tecnológica del Cuero, Calzado, Textil, Confecciones e Industrias Conexas) | Se realizó la recolección de muestras lodos de la planta piloto de tratamiento de aguas residuales de curtiembre de CITEccal Lima.                                                     |
| <b>Laboratorio de Biotecnología del ITP</b> (Instituto Tecnológico de la Producción)                                                                                            | Se realizó las pruebas microbiológicas, para identificar a las especies <i>Pseudomonas</i> ,<br><br>Se aislaron las especies <i>Pseudomonas</i> de la muestra de los lodos residuales. |
| <b>ANALYTICAL LABORATORY E.I.R.L.</b>                                                                                                                                           | Se realizaron los ensayos con respecto a los parámetros del suelo.                                                                                                                     |
| <b>Laboratorio Químico del CITEccal Lima</b> (Centro de Innovación Productiva y Transferencia Tecnológica del Cuero, Calzado, Textil, Confecciones e Industrias Conexas)        | Se realizó las pruebas de biodegradación del material polimérico a diferentes condiciones específicas.                                                                                 |

*Fuente: Elaboración propia*

### 3.2 Tipo y nivel de investigación

Esta investigación se llevó a cabo con un enfoque orientado a la resolución de una problemática concreta, haciendo uso de fundamentos teóricos y procedimientos científicos (Marotti y Pedroso, 2018). Del mismo modo, se adoptó un nivel de investigación de tipo descriptivo, ya que se pretende identificar y caracterizar las variables involucradas dentro de su contexto natural, con el objetivo de analizar cómo la variable independiente influye en la dependiente (Hernández-Sampieri y Mendoza, 2018).

### 3.3 Variables de la investigación

A continuación, se describe las variables de la presente investigación.

**Tabla 3**

*Operacionalización de las variables*

| Tipo de variable | Variables                                 | Definición operacional                                                             | Unidad de Medidas                | Abreviatura         |
|------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|---------------------|
| Dependiente      | Biodegradación del caucho termoplásticos  | Nivel de biodegradación (CO <sub>2</sub> generado/CO <sub>2</sub> teórica)         | %                                | % de Biodegradación |
|                  | Consortios microbianos extraídos de lodos | Lodos residuales de la planta de tratamiento de aguas residuales de CITEccal Lima. | Concentración de microorganismos | UFC/ml              |
| Independiente    | Concentración de <i>Pseudomonas</i>       | Cepas de <i>Pseudomonas</i>                                                        | Concentración de microorganismos | UFC/ml              |
|                  | Tiempo de Biodegradación                  | El tiempo utilizado para la biodegradación                                         | días                             | Tp                  |
|                  | Potencial de Hidrogeno                    | Se controlará que el PH del suelo se mantengan en el rango 5-7                     | Unidad de pH                     | pH                  |
|                  | Temperatura                               | Se controlará que la temperatura de                                                | °C                               | T                   |

|                            |                                            |   |    |
|----------------------------|--------------------------------------------|---|----|
|                            | la cámara se mantenga entre 20-27°C        |   |    |
| Humedad relativa del suelo | Se mantendrá humedad relativa entre 50-70% | % | Hr |

Fuente: *Elaboración propia*

### 3.4 Diseño de investigación

Se aplicó un diseño experimental siendo: único por tratamiento que incluye métodos controlados para la manipulación de las variables que se caracteriza por tener carácter cuantitativo, a la vez que se describe la percepción del comportamiento y las relaciones entre una variable independiente y su conexión una variable dependiente dentro de una población en un tiempo determinado, para luego ser interpretadas en base a un ensayo pre experimental de un solo grupo (Castañeda, 2022).

En este caso, se evaluó la biodegradación de Caucho TR en el suelo extraído del mercado local, con la presencia de consorcios microbianos y de *Pseudomonas*, los cuales fueron extraídos y aislados de lodos residuales de la planta de tratamiento del Centro de Innovación Productiva y Transferencia Tecnológica del Cuero, Calzado e Industrias Conexas (CITEccal LIMA), para lo cual se realizará la medición de generación de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) absorbidos en la solución de 0.25 N de KOH.

Asimismo, las variables intervinientes serían la temperatura ambiental, Potencial de hidrogeno del suelo, humedad relativa del suelo, concentración de carbono en suelo, concentración de nitrógeno, concentración diluida de microorganismos y de lodos residuales.

### 3.5 Materiales y Equipos

Para el desarrollo de la presente investigación, se dispuso de una serie de materiales, equipos y reactivos específicos. La Tabla 4 sintetiza los recursos de laboratorio empleados durante la etapa experimental.

**Tabla 4**

*Lista de materiales para los ensayos experimentales*

| MATERIALES                                                             | UNIDADES |
|------------------------------------------------------------------------|----------|
| Desecadores 1.5 L de volumen interno que estén sellados herméticamente | 11       |
| Vasos de precipitación PYREX 100 mL                                    | 10       |
| Vasos de precipitación PYREX 40 mL                                     | 10       |
| Vasos de precipitación PYREX 20 mL                                     | 3        |
| Placas perforadas u otro soporte                                       | 10       |
| Bureta PYREX 100 mL                                                    | 1        |
| Hidróxido de Potasio en p.a. (Pellets)                                 | 1        |
| Ácido Clorhídrico 37%                                                  | 1        |
| Capsula de aluminio con tapas                                          | 2        |
| Grasa al vacío                                                         | 1        |
| Pipeta de vidrio PYREX de 20 mL                                        | 2        |
| Propipeta eléctrica                                                    | 1        |
| Agua destilada                                                         | 1        |
| Matraz de fondo redondo PYREX de 100 mL                                | 2        |
| Tamiz de acero inoxidable de radio menor 0.2mm                         | 1        |
| Tina de plástico                                                       | 1        |
| Tijera punta roma                                                      | 1        |
| Guantes resistentes al calor de nitrilo                                | 1        |
| Fenolftaleína                                                          | 1        |
| Anaranjado de Metilo                                                   | 1        |

*Fuente: Elaboración Propia*

**Tabla 5**

*Lista de equipos para los ensayos experimentales.*

| Materiales                                 | Unidades |
|--------------------------------------------|----------|
| Balanza analítica A&D Weighing             | 1        |
| Horno, ajustado a 104 +- °1C Thermo        | 1        |
| Transmisor de Temperatura y Humedad RHT.WM | 1        |
| Medidor de pH                              | 1        |
| Refrigeradora                              | 1        |
| Empacadora al vacío                        | 1        |

*Fuente: Elaboración Propia*

### 3.6 Método del desarrollo experimental

#### 3.6.1 *Recolección de suelo*

El suelo fue recolectado del mercado de flores Santa Rosa en dos bolsas de 10 Kg, después se trasladó al Laboratorio de Química del CITEccal Lima-LIMA. Luego, se tamizó el suelo con una rejilla de diámetro menor a 20 mm con la finalidad de retirar las impurezas que se encontraban en el suelo, entre ellas, ramas, insectos, piedras y pajas. El suelo tamizado se recolectó en un recipiente plástico y limpio, para luego llenar con una espátula en 03 bolsas de polietileno de 1 Kg de capacidad. Cabe indicar que las bolsas de polietileno fueron sometidas a presión al vacío y guardados en una refrigeradora a 4°C con la finalidad de conservar sus propiedades físicas, químicas y evitar el crecimiento de microorganismos a temperatura ambiente.

**Figura 6**

*Recolección suelo del mercado de Flores*



**Figura 7**

*Bolsas de polietileno a presión al vacío*



### **3.6.2 Análisis de suelo tamizado**

Para el análisis de suelo tamizado, se utilizó una de las bolsas de polietileno de 1 Kg, el cual fue trasladado al laboratorio ANALYTICAL LABORATORY E.I.R.L. acreditado por INACAL para el análisis de parámetros de suelos físico y químicos recomendado por la ASTM-D5988-12.

### **3.6.3 Recolección de lodos residuales de curtiembres**

Se recogió muestras de lodos de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales del CITEccal LIMA, para los cuales se almacenaron en contenedores de 55 L por 3 o 4 semanas. Luego se tomaron muestras de los microorganismos (películas de bacterias) que se habían formado en la parte superior de los contenedores, estas fueron colocadas en tubos falcón de 50 ml con la ayuda de una espátula debidamente esterilizada y luego trasladado en un cooler con hielo seco para que se pudiera mantener a una temperatura

de 4°C. Por último, fueron trasladados hacia el Laboratorio de Biotecnología del ITP para su asilamiento y caracterización.

### **Figura 8**

Recolección de lodos residuales de curtiembres



**Figura 9**

*Recolección de lodos residuales de curtiembres*



**Figura 10**

*Recolección de efluentes y lodos residuales de curtiembres*



#### **3.6.4 Aislamiento y caracterización de bacterias de efluentes y/o lodos residuales**

La metodología utilizada para aislar y caracterizar bacterias con capacidad lipolítica a partir de efluentes y/o lodos residuales se basó en el protocolo descrito por Lickes (2017). Se prepararon diluciones seriadas utilizando agua peptonada al 0.1 %, alcanzando una dilución final de  $10^{-8}$ . Posteriormente, se realizó la siembra por vertido en medio agar tributirina, incubando las placas a 37 °C bajo condiciones aeróbicas durante un periodo de 24 a 48 horas. Las colonias que generaron halos transparentes indicativos de actividad lipolítica fueron seleccionadas. El aislamiento se llevó a cabo mediante la transferencia de dichas colonias, utilizando un asa de siembra en punta, hacia nuevas placas con agar tributirina, con el objetivo de confirmar la actividad enzimática y obtener cultivos puros. Estas nuevas siembras se incubaron por 48 horas a 37 °C. Una vez verificada la presencia de crecimiento y actividad lipolítica, se procedió a la siembra en medio de conservación (agar stock) para preservar los aislados.

#### **3.6.5 Caracterización de bacterias lipolíticas**

Para llevar a cabo la caracterización microbiana, se emplearon sistemas de identificación API de la marca BioMérieux. A partir de colonias frescas derivadas de medios de conservación en agar, se realizaron tinciones de Gram junto con pruebas preliminares (orientation test) con el fin de definir qué conjunto de pruebas bioquímicas (galerías API) eran apropiadas para su análisis. Una vez determinado el tipo de galería según el microorganismo, se procedió a su inoculación: API 20 E fue usada para enterobacterias, API 20 NE para bacilos Gram negativos no pertenecientes a este grupo, y API 50 CHB para bacilos Gram positivos esporulados con actividad catalasa positiva, específicamente del género *Bacillus*. Posteriormente, las galerías fueron incubadas entre 24 y 48 horas, a temperaturas de 30 °C o 37 °C dependiendo del tipo de ensayo, siempre bajo condiciones aeróbicas.

### 3.6.6 Determinación de la humedad del suelo

Para determinar la humedad en la muestra de suelo, se utilizó el siguiente procedimiento:

El proceso de determinación de humedad comenzó con la preparación de dos capsulas y dos tapas de aluminio bien lavadas y secadas, luego se colocó las dos cápsulas en el horno durante un mínimo de 8 horas a  $104 \pm 1^\circ \text{C}$ . Posterior a ello, y con la ayuda de una tijera punta roma y guantes de nitrilo, se trasladó hacia un desecador por una hora y se volvió a pesar en una balanza analítica de precisión digital 0.001, se anotó en la libreta el peso de bote (PB).

Se añadió 30 gramos de suelo húmedo sobre las dos capsulas, se pesaron y se anotó en la libreta (peso de bote más suelo húmedo PB + Psh). Luego, se introdujeron al horno durante un mínimo de 24 horas a  $104 \pm 1^\circ \text{C}$ , se trasladaron con la ayuda de una tijera punta roma y guantes de nitrilo hacia el desecador durante 1 hora. Después, se sacó del desecador, se pesaron en la balanza analítico y se anotó en una libreta el peso del bote más peso del suelo seco (PB + Pss). Tras esto, se introdujo las capsulas al horno durante 1 hora a  $104 \pm 1^\circ \text{C}$ , se trasladó hacia el desecador durante 1 hora, se pesó y se anotó en una libreta el peso del bote más peso del suelo seco (PB + Pss) por segunda vez, se siguió aplicando el mismo procedimiento hasta obtener un peso constante en las dos capsulas (APHA, AWWA, & WEF, 2017).

Aplicamos la fórmula para determinar la humedad del suelo:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{(PB + Psh) - (PB + Pss)}{(PB + Psh) - PB} \times 100$$

Donde:

PB (g): Peso de bote con tapa

Psh: Peso de suelo húmedo

PB + Psh: Peso de Bote más suelo húmedo

PB + Pss: peso del bote más peso del suelo seco

Cabe indicar que, para poder realizar los ensayos de biodegradabilidad, la humedad de suelo recomendada por la norma ASTM D5988-29 tiene que ser mayor al 50% humedad.

### **3.6.7 Pruebas o ensayos de biodegradabilidad bajo la norma ASTM D5988-29**

Para determinar el grado o nivel de biodegradación del material polimérico (caucho), se tomó en consideración la norma referencial internacional ASTM D5988-29, denominado “Método de Prueba Estándar para Determinar la Biodegradación Aérobica de Materiales Plásticos en el suelo”.

Se ejecutó las pruebas o ensayos de biodegradabilidad, para lo cual se tuvo que contar con los materiales de acuerdo con la norma referencial. Para ello, primero se preparó los siguientes materiales:

- Preparación del Ácido Clorhídrico 0.25 N.
- Preparación del Hidróxido de Potasio 0.5 N.
- Preparación del suelo en los desecadores.
- Titulación del CO<sub>2</sub> absorbido en muestras de Hidróxido de Potasio 0.5 N.

### 3.6.7.1. Preparación del Ácido Clorhídrico 0.25N

Para la preparación de solución de ácido clorhídrico (HCL) 0.25 N, se debe contar los siguientes materiales:

- Ácido clorhídrico concentrado (HCl) de alta pureza (37%) o 12N
- Agua destilada
- Balanza analítica
- Matraz aforado de volumen adecuado (1 litro)
- Pipeta graduada de 20 ml
- Pipeteador PUM o propipeta de 25 ml
- Equipo de protección personal (guantes, gafas de seguridad, bata)

$$V_{\text{Comercial HCl}} = \text{Volumen de solución} * \frac{\text{normalidad de HCl}}{1000 \text{ mL}} * \frac{\text{masa molar HCl}}{\text{nmol HCl}} * \text{Densidad}$$
$$* \frac{1 \text{ ml HCl}}{\text{Densidad del Reactivo}}$$

Por lo tanto, se requiere de 20.88 ml HCl al 37% en un matraz de aforo de 1 Litro.

A continuación, se detalla el procedimiento:

Antes de iniciar con la preparación, se utilizaron guantes y mascarilla con la finalidad de protección, debido a que se estaba manipulando el ácido clorhídrico a altas concentraciones.

**Preparación de la solución:** Se lleno el matraz aforado con un volumen de 200 ml de agua destilada, para luego verter 20.88 ml HCl al 37% con la ayuda de la pipeta y propipeta. Luego se aforó con agua destilada hasta llegar a un (01) litro y se agitó suavemente para asegurar una mezcla homogénea. Asimismo, esta operación se realizó dentro de una campana de extracción para laboratorio, para evitar acumulación de vapor en el ambiente.

**Figura 11**

*Preparación de Ácido Clorhídrico 0.25 N*



**Etiquetado y almacenamiento:** Después de la preparación, se etiquetó el matraz aforado con la concentración, el aviso de no tocar y la fecha de preparación. Se almacenó la solución en un estante designado para productos químicos, y se aseguró de mantenerla fuera del alcance de personas que no estarán involucradas en el proyecto de investigación.

**Estandarización de la normalidad:** Se verificó la normalidad de la solución utilizando métodos de titulación estándar con una base carbonato de sodio  $\text{NaCO}_3$  en pellets (sólidos) y con fenolftaleína y naranja de metilo.

Para esta verificación de la normalidad se realizaron tres mediciones en tres vasos precipitados de 20 ml y se titularon con fenolftaleína y naranja de metilo. Para ello, se determinó mediante el cálculo del volumen teórico:

$$\text{Cálculo teórico: } \frac{\text{mg de } \text{CO}_3\text{Na}_2 * 1000}{\text{PEquív Na}_2\text{CO}_3 * \text{Hcl (N teórica)}}$$

Cabe indicar que para la presente investigación se realizaron 10 mediciones estándar durante cuatros meses que tomaron las pruebas de biodegradación.

**Figura 12**

*Estandarización del Ácido Clorhídrico 0.25 N*



#### **3.6.7.2. Preparación del Hidróxido de Potasio 0.5 N**

Para preparar una solución de hidróxido de potasio (KOH) 0.5N se utilizaron los siguientes materiales:

- Hidróxido de potasio (KOH) en forma de pellets sólidos
- Agua destilada
- Balanza analítica con precisión de 4 decimales
- 10 vasos de precipitación de 40 ml
- Pipeta
- Pipeteador PUM o propipeta de 25 ml
- Equipos de protección personal (guantes, gafas de seguridad y bata)

**Tabla 6**

*Valores para la preparación de la solución 0.5 N de KOH*

| Preparación de la solución 0.5 N de KOH |             |
|-----------------------------------------|-------------|
| Masa molar de soluto (HCl), g/mol       | 56,11 g/mol |
| Volumen de solución a preparar (ml)     | 20          |
| Parámetro de valencia ( $\theta$ )      | 1           |
| Normalidad                              | 0.5         |

*Fuente: Elaboración propia*

$$Normalidad = \frac{m * \theta}{M * V}$$

$$m = 0.56105 \text{ gr}$$

Por lo tanto, se requiere de 0.56105 gr de KOH en un vaso precipitado de 20 ml de agua destilada.

A continuación, se detalla el procedimiento:

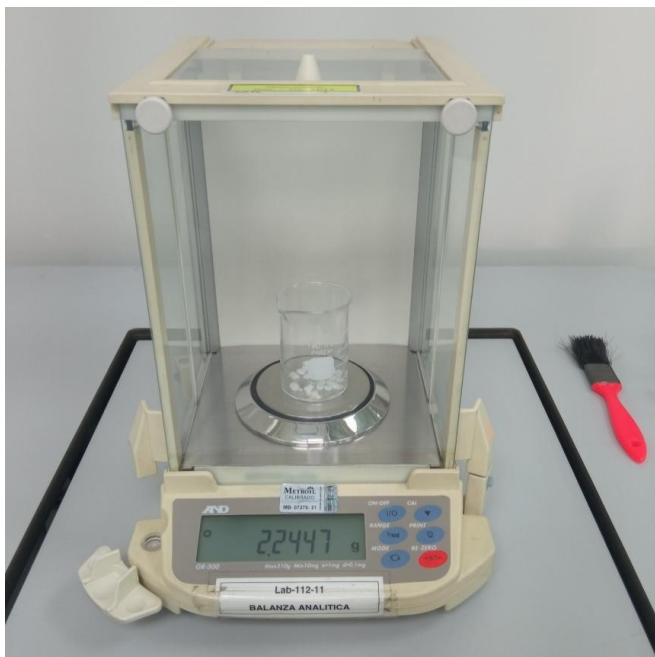
**Medición del hidróxido de potasio (KOH):** Se utilizó una balanza analítica para medir 0.5105 gramos de hidróxido de potasio en pellets.

**Disolución del KOH:** Se tomó 10 ml de agua destilada en un recipiente de vidrio de 40 ml con la ayuda de un pipeta y propipeta, luego se agregó los pellets de KOH cuidadosamente, debido a que se produce una reacción exotérmica, Por último, se agitó suavemente y se rellenó con agua destilada hasta los 20 ml.

**Almacenamiento:** La disolución de hidróxido de potasio 0.5 N se almacenó dentro de los desecadores, debido a su propiedad de absorber dióxido de carbono en el ambiente, por lo tanto, se preparó 10 vasos de 20 ml de hidróxido de potasio, cada uno en un desecador.

**Figura 13**

*Preparación de Hidróxido de Potasio*



### **3.6.8 Preparación de los ensayos de biodegradación**

Las muestras de suelos que se almacenaron en el refrigerador durante 24 horas fueron utilizadas para los ensayos de biodegradación.

La preparación de suelo en desecadores para los ensayos de biodegradación se realizó en un ambiente controlado y estéril, tal como el Laboratorio de Química del Centro de Innovación Productiva y Transferencia Tecnológica del Cuero, Calzado, Textil, Confecciones e Industrias Conexas. Asimismo, se utilizaron los siguientes materiales:

- Suelo tamizado menor de 20 mm, con humedad mayor a 50 %, con las características fisicoquímicas de acuerdo a la ASTM-5988-12.
- 10 desecadores de vidrio limpio y seco 300 mm de diámetro con tapa tubulada
- Agua destilada
- Instrumentos estériles (espátulas, pipetas y propipetas)
- Equipos de protección personal (guantes y bata)
- Termohidrogrómetro

**Acondicionamiento del desecador:** Se realizó el lavado, limpieza y secado natural de los 10 desecadores de vidrio.

**Acondicionamiento de los vasos precipitados:** Se realizó el lavado, limpieza y secado natural de 10 vasos precipitados de 40 ml y 10 vasos de precipitados de 20 ml.

**Figura 14**

*Acondicionamiento de desecadores*



**Figura 15**

*Acondicionamiento de vasos precipitados*



**Preparación del suelo:** El suelo tamizado con un diámetro de 20 mm que fue almacenado en una refrigeradora a temperatura a 4°C se extrajo de la bolsa de plástico para pesar 150 gramos de suelo en la parte inferior de cada desecador con la ayuda de una espátula, balanza analítica y un crisol. Se trató de distribuir el suelo de forma

homogénea en toda la superficie del desecador y dejarlo al mismo nivel. Por último, se colocó la placa de porcelana. Cabe indicar que la cantidad de 150 gramos el suelo no llegó al mismo nivel donde se coloca la placa porcelana.

**Figura 16**

*Preparación de suelo en balanza*



**Acondicionamiento de los desecadores:** Luego se preparó la disolución de KOH al 0.5 N, tal como se describió anteriormente, para luego colocar el vaso precipitado de 40 ml sobre la placa de porcelana, de igual manera se llenó 10 ml de agua destilada sobre un vaso precipitado de 20ml de agua destilada y se colocó sobre la placa de porcelana, por lo tanto, en cada desecador se colocaban dos vasos precipitados, a excepción de la prueba blanco, el cual sólo tenía un vaso precipitado de 40 ml. Por lo tanto, los desecadores fueron preparados de la siguiente forma:

**Tabla 7**

*Contenido de los desecadores*

| Numero de desecador | Nomenclatura | Tipo de desecador                                           | Contenido                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|---------------------|--------------|-------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1                   | VCO          | Desecador utilizado para ensayo control                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 1 vaso precipitado de 40 ml con solución de 20 ml al KOH 0.5 N</li> <li>✓ 1 vaso precipitado de 20 ml con 10 ml agua destilada</li> <li>✓ 150 gramos de suelo tamizado</li> <li>✓ 3 gramos de papel celulosa</li> </ul>                                     |
| 2                   | VP           | Desecador utilizado para ensayo positivo (celulosa)         | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 1 vaso precipitado de 40 ml con solución de 20 ml al KOH 0.5 N</li> <li>✓ 1 vaso precipitado de 20 ml con 10 ml agua destilada</li> <li>✓ 150 gramos de suelo tamizado</li> <li>✓ 1 vaso precipitado de 40 ml con solución de 20 ml al KOH 0.5 N</li> </ul> |
| 3                   | VK           | Desecador utilizado para ensayo blanco (solo suelo)         | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 1 vaso precipitado de 20 ml con 10 ml agua destilada</li> <li>✓ 150 gramos de suelo tamizado</li> <li>✓ 3 gramos de caucho TR</li> </ul>                                                                                                                    |
| 4                   | VPR          | Desecador utilizado para ensayo prueba (caucho TR)          | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 1 vaso precipitado de 40 ml con solución de 20 ml al KOH 0.5 N</li> <li>✓ 1 vaso precipitado de 20 ml con 10 ml agua destilada</li> <li>✓ 150 gramos de suelo tamizado</li> <li>✓ 1 vaso precipitado de 40 ml con solución de 20 ml al KOH 0.5 N</li> </ul> |
| 5                   | VKL          | Desecador utilizado para ensayo blanco y lodo               | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 1 vaso precipitado de 20 ml con 10 ml agua destilada</li> <li>✓ 10 ml de lodo residual</li> <li>✓ 150 gramos de suelo tamizado</li> <li>✓ 3 gramos de caucho TR</li> </ul>                                                                                  |
| 6                   | VPRL         | Desecador utilizado para ensayo prueba (Caucho TR) y lodo   | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 1 vaso precipitado de 40 ml con solución de 20 ml al KOH 0.5 N</li> <li>✓ 1 vaso precipitado de 20 ml con 10 ml agua destilada</li> <li>✓ 10 ml de lodo residual</li> <li>✓ 150 gramos de suelo tamizado</li> </ul>                                         |
| 7                   | VKPS         | Desecador utilizado para ensayo blanco y <i>Pseudomonas</i> | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 1 vaso precipitado de 40 ml con solución de 20 ml al KOH 0.5 N</li> <li>✓ 1 vaso precipitado de 20 ml con 10 ml agua destilada</li> </ul>                                                                                                                   |

|    |        |                                                                               |                                                                                          |
|----|--------|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| 8  | VPRPS  | Desecador utilizado para ensayo prueba (Caucho TR) y <i>Pseudomonas</i>       | ✓ 10 ml de disolución de CUR44-CUR92 {5 ml C/U)<br>Concentración: $3 \times 10^8$ UFC/ml |
|    |        |                                                                               | ✓ 150 gramos de suelo tamizado                                                           |
|    |        |                                                                               | ✓ 3 gramos de caucho TR                                                                  |
| 9  | VKPSL  | Desecador utilizado para ensayo blanco, <i>Pseudomonas</i> y lodo             | ✓ 1 vaso precipitado de 40 ml con solución de 20 ml al KOH 0.5 N                         |
|    |        |                                                                               | ✓ 1 vaso precipitado de 20 ml con 10 ml agua destilada                                   |
|    |        |                                                                               | ✓ 10 ml de disolución de CUR44-CUR92 {5 ml C/U)<br>Concentración: $3 \times 10^8$ UFC/ml |
| 10 | VPRPSL | Desecador utilizado para ensayo prueba (Caucho TR), <i>Pseudomonas</i> y lodo | ✓ 150 gramos de suelo tamizado                                                           |
|    |        |                                                                               | ✓ 3 gramos de caucho TR                                                                  |
|    |        |                                                                               | ✓ 1 vaso precipitado de 40 ml con solución de 20 ml al KOH 0.5 N                         |
|    |        |                                                                               | ✓ 1 vaso precipitado de 20 ml con 10 ml agua destilada                                   |
|    |        |                                                                               | ✓ 10 ml de lodo residual                                                                 |
|    |        |                                                                               | ✓ 10 ml de disolución de CUR44-CUR92 {5 ml C/U)<br>Concentración: $3 \times 10^8$ UFC/ml |

Fuente: Elaboración propia

**Cierre de los desecadores:** Se colocó la tapa hermética en los desecador y se aseguró con adhesivo para que esté bien sellada y evitar la entrada de contaminantes externo.

**Figura 17**

*Cierre del desecador*



**Control de condiciones:** Los desecadores se almacenaron en un espacio cerrado, oscuro, el cual se controló las condiciones ambientales tales como la temperatura (23 a 27°C), humedad (50%) y presión constante (760 mmHg), para ello, se utilizó un termohigrómetro eléctrico y calibrado.

**Figura 18**

*Traslado de los desecadores preparados*



**Figura 19**

*Colocación de Termohigrómetro*



**Figura 20**

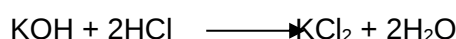
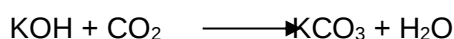
*Almacenamiento de desecadores*



### 3.6.9 Medición de la biodegradabilidad

Los ensayos de biodegradabilidad consistieron en la medición del CO<sub>2</sub> capturado en la solución de hidróxido de sodio (KOH) a 0.5 N, producto de la generación de CO<sub>2</sub> del suelo y de la biodegradación de las bacterias y hongos en el caucho. Luego de transcurrido tres días se procedió a titular las soluciones de los diez desecadores con indicador fenolftaleína y ácido clorhídrico (HCl) a 0.25 N en una bureta de 100 ml. El ácido clorhídrico estaba guardado en un matraz de 1L como se describió anteriormente. El volumen de ácido clorhídrico que se consumía en la titulación fue anotado en un registro. Luego se procedió a preparar nuevamente 20 ml de KOH de 0.5 N en vasos de 40ml y 10 ml de agua destilada en vasos de 20 ml para colocarlos dentro de los desecadores y repetir el mismo procedimiento. Durante las tres primeras semanas se titularon todos los vasos de los desecadores con 0.25 N de ácido clorhídrico, con frecuencia de tres días, después de ello, a partir de la cuarta semana se titularon con frecuencia semanal. Todo estas preparaciones y mediciones se realizaron durante 120 días.

Para poder terminar el volumen de dióxido de carbono absorbido se analizó la siguiente reacción estequiométrica:



$$m \text{ moles de CO}_2 = \frac{m \text{ moles de HCl}}{2}$$

El CO<sub>2</sub> total generado se determinó utilizando el control técnico como Zb y el material de prueba o el blanco como Zt.

$$m \text{ moles de CO}_2 = \frac{0.05 \text{ N} * \text{mL HCl}}{2}$$

$$\text{mg de CO}_2 = \frac{0.05 \text{ N} * \text{mL HCl} * 44}{2}$$

Por tanto, el dióxido de carbono desprendido en mg se obtiene multiplicando la valoración de HCl por 1,1.

Para lo cual también se aplicarán las siguientes formulas:

$$\% Biodegradación = \frac{CO2_L - CO2_B}{CO2\ teórico} \times 100$$

Donde:  $(CO_2)_L$  es la cantidad acumulada de dióxido de carbono que se produjo en cada ensayo del material de prueba con 5ml de lodos residuales, mientras que  $(CO_2)_B$  es la cantidad acumulada de dióxido de carbono que se produjo en cada ensayo del material blanco y  $CO_2$  teórico es la cantidad total de carbono orgánico en el sólido.

$$\% Biodegradación = \frac{CO2_P - CO2_B}{CO2\ teórico} \times 100$$

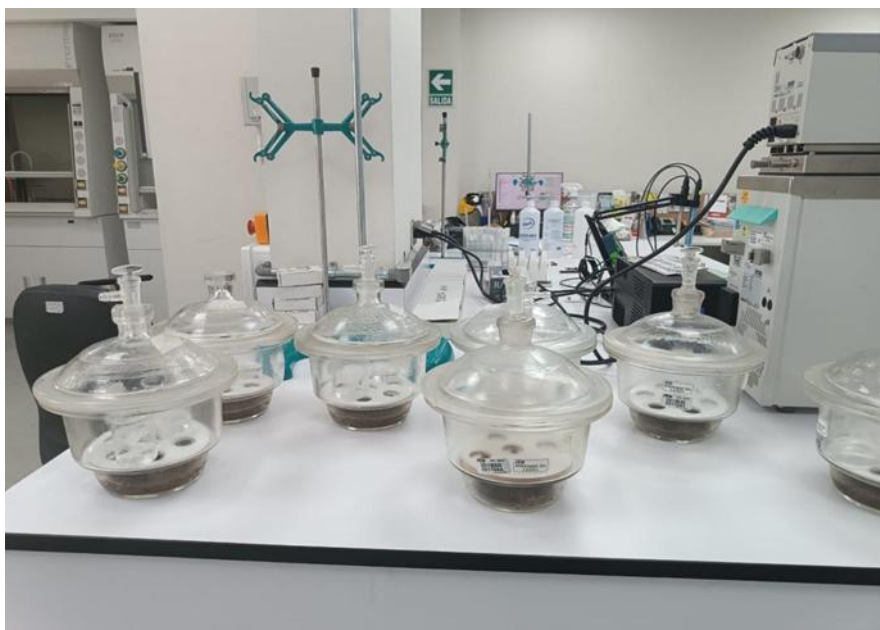
Donde:  $(CO_2)_P$  es la cantidad acumulada de dióxido de carbono que se produjo en cada ensayo del material de pruebas con cepas CUR44-CUR95 (5ml C/U) con concentración  $3 \times 10^8$  UFC/ml, mientras que  $(CO_2)_B$  es la cantidad acumulada de dióxido de carbono que se produjo en cada ensayo del material blanco y  $CO_2$  teórico es la cantidad total de carbono orgánico en el sólido.

- Utiliza fenolftaleína o un indicador adecuado para detectar el punto final de la titulación. La solución cambiará de color al alcanzar el punto final de la neutralización.
- El volumen del consumo del HCl en la titulación significa el consumo del  $CO_2$  que absorbió la solución del KOH y que se encontraba dentro del sistema de cada desecador.
- Después de sacar los vasos precipitados, lavar y secar adecuadamente.
- Destapar los desecadores como máximo de 15 min a 1 hora.

- Volver a llenar los vasos precipitados con 10 ml de agua destilada y 20 ml de KOH y dejarlo en el soporte del desecador.
- Verter gotas de agua al suelo, con la finalidad de mantener la humedad en mayor al 60%.
- Tapar el desecador con cuidado y esperar a repetir la segunda medición de acuerdo con el cuadro anterior y así sucesivamente durante 120 días (Tabla N°11).

**Figura 21**

*Recarga de vasos precipitados a los desecadores*



**Figura 22**

*Recarga de vasos precipitados a los desecadores*



### **3.6.10 Prueba de ANOVA**

Se aplicó la prueba de ANOVA para analizar las diferencias en la producción de CO<sub>2</sub> entre los diferentes grupos experimentales. Esta prueba se utilizó para determinar si existían diferencias significativas en las medias de los distintos tratamientos, comparando el efecto de las variables como el tipo de suelo, el caucho TR, el lodo residual y la concentración de las cepas de *Pseudomonas*. La fórmula utilizada fue:

$$F = \frac{MS \text{ entre grupos}}{MS \text{ dentro de los grupos}}$$

donde **MS entre grupos** representa la varianza explicada por las diferencias entre los tratamientos, y **MS dentro de los grupos es la varianza residual** o no explicada dentro de cada grupo. Si el valor calculado de F resultaba significativamente mayor que el valor crítico de la distribución F, se concluía que existían diferencias significativas entre los tratamientos.

### **3.6.11 Test de TUKEY HSD/KRAMER**

Se aplicó la prueba de Tukey HSD (Honest Significant Difference) para realizar comparaciones múltiples entre los grupos experimentales después de obtener resultados significativos en la prueba de ANOVA. Esta prueba fue utilizada para identificar qué pares

de grupos mostraban diferencias significativas en la producción de CO<sub>2</sub>. La fórmula utilizada para calcular la diferencia mínima significativa fue:

$$HSD = q * \sqrt{\frac{MS_{error}}{n}}$$

donde **q** es el valor de la distribución de Tukey para un nivel de confianza específico, **MSerror** es el error cuadrático medio de la prueba de ANOVA, y **n** es el número de observaciones por grupo. Los valores de **q** se obtuvieron en función de los grados de libertad del error y el número de grupos. Esta prueba permitió determinar cuáles tratamientos, como el caucho, el lodo residual y las cepas de *Pseudomonas*, mostraron diferencias estadísticamente significativas en la producción de CO<sub>2</sub> en comparación con el grupo control y otros tratamientos.

### 3.6.12 Q-Test

Se aplicó la prueba Q-Test para evaluar las diferencias significativas entre los grupos experimentales en cuanto a la producción de CO<sub>2</sub>. Esta prueba fue utilizada para comparar las medias de los diferentes tratamientos y determinar si las diferencias observadas eran estadísticamente significativas. La fórmula de la prueba Q-Test es:

$$Q = \frac{|Media_1 - Media_2|}{\sqrt{\frac{Varianza_1}{n_1} + \frac{Varianza_2}{n_2}}}$$

donde **Media<sub>1</sub>** y **Media<sub>2</sub>** son las medias de los dos grupos comparados, **Varianza<sub>1</sub>** y **Varianza<sub>2</sub>** son las varianzas de los grupos, y **n<sub>1</sub>** y **n<sub>2</sub>** son los tamaños de muestra de cada grupo. Con esta fórmula, se evaluaron los pares de grupos experimentales, como los tratados con efluentes industriales o *Pseudomonas*, contra el grupo control y otros tratamientos.

### **3.6.13 Estadística en Excel**

Para las pruebas estadísticas ANOVA, Test de Tukey HSD/KRAMER y Q-Test se utilizó la herramienta Real Statistics disponibles en el software Excel.

## Capítulo IV . Análisis y discusión de resultados

### 4.1 Resultados obtenidos

#### 4.1.1 Determinación de Humedad de suelo

A continuación, se presenta los resultados obtenidos del porcentaje de humedad del suelo del Mercado de Flores y su duplicado, tal como se describe en la tabla N°8:

**Tabla 8**

*Resultados de la humedad de suelos*

| Suelo | PB<br>(g) | Psh<br>(g) | PB+Psh<br>(g) | (PB+Pss)g<br>(1) | (PB+Pss)g<br>(2) | (PB+Pss)<br>g<br>(3) | (PB+Pss)g<br>(final) | %<br>humeda<br>d |
|-------|-----------|------------|---------------|------------------|------------------|----------------------|----------------------|------------------|
| 1     | 54.8803   | 61.0001    | 115.8804      | 85.2635          | 85.2636          | 85.2636              | 85.2636              | 50.1914          |
| 1 dup | 54.6941   | 61.1863    | 115.6941      | 84.9835          | 84.9812          | 84.9814              | 84.9814              | 50.4999          |

*Fuente: Elaboración Propia*

Según la Tabla N° 8, la humedad del suelo recolectado en el mercado de Flores supera el 50%.

#### 4.1.2 Resultados de la caracterización del suelo

En la tabla N°9 se presenta los resultados obtenidos de los parámetros Potencial de hidrogeno (pH) fue de 7.39, lo que indica que el suelo tiene una acidez casi neutra (pH cercano a 7), capacidad de campo (C.C.) del suelo con un valor de 9.30 %, lo que significa que el suelo puede retener un 9.30% de agua después de que el exceso haya drenado. Las cenizas con un valor de 88.6%, este valor indica que el suelo tiene un alto contenido mineral. La porosidad del suelo es del 33.8%, lo que indica que una proporción significativa del suelo está formada por espacios porosos o vacíos que permiten el paso de agua y aire. El contenido de carbono orgánico total es del 10.78%, lo que sugiere que el suelo tiene una buena cantidad de materia orgánica (Martínez, Fuentes, & Acevedo). El nitrógeno total en el suelo es de 9930 mg/Kg. El nitrógeno es un nutriente esencial para las plantas, ya que es parte de los aminoácidos y las proteínas (Núñez-Colima). Los resultados de parámetros obtenidos indican que el suelo se encontraba en condiciones adecuadas según lo realizado

por otras investigaciones antes de realizar los ensayos de biodegradación, los cuales evaluaron condiciones tales como la humedad entre el rango de 40% y 100%, el contenido de carbono orgánico y el nitrógeno de suelo, el cual son factores que influye en el metabolismo microbiano, es decir la capacidad de los microbios para respirar, crecer y dividirse. (Chinaglia et al., 2024)

**Tabla 9**  
*Resultados de la caracterización de suelos*

| Parámetros                                              | Unidad       | L.D.M. | L.C.M. | Nombre de la metodología del análisis                                                                                   | Resultado  |
|---------------------------------------------------------|--------------|--------|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| pH (Extracto 1:1) en Suelos                             | Unidad de pH | NA.    | 0,01   | MVAL-AGR-01. 2022                                                                                                       | 7.39       |
| Capacidad de Campo (C.C.) (**)                          | %            | 0,03   | 0,10   | Smith Alfred 1917, Relation of the mechanical analysis to the moisture equivalent of soils, Soil Sci 4,471-476. (P.M.P) | 9.30       |
| Ceniza (**)                                             | %            | 0,03   | 0,10   | NORMA MEXICANA NMX-AA-16-1984                                                                                           | 88.6       |
| Porosidad (**)                                          | %            | 0,01   | 0,10   | Métodos de análisis para suelos plantas y aguas Homer Chapman                                                           | 33.8       |
| Preparación de Muestras Suelos (**)                     | —            | NA.    | NA.    | Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, AS-01, Ítem 7.1.1                                                           | FINALIZADO |
| Carbono Orgánico Total (**)                             | %            | 0,04   | 0,10   | Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, AS-07, Ítem 7.1.7                                                           | 10.78      |
| Nitrógeno Total (**)                                    | mg/Kg        | 50     | 150    | NOM-021-AS 08/SMWEE Part 4500 NH3 D, 4500NO2B, 4500NO3 E                                                                | 9930       |
| Textura                                                 |              |        |        |                                                                                                                         |            |
| 1. Arena (2 - 0.05 mm Diámetro de Partícula) (**)       | %            | NA.    | NA.    | Manual de Procedimientos de los Análisis de Suelos y Agua con Fines de Riego, Item 3,4                                  | 80         |
| 2. Arcilla (0.05 - 0.002 mm Diámetro de Partícula) (**) | %            | NA.    | NA.    |                                                                                                                         | 5          |

|                                                             |   |     |     |    |
|-------------------------------------------------------------|---|-----|-----|----|
| <b>3. Limo (&lt; a 0.002 mm Diámetro de Partícula) (**)</b> | % | NA. | NA. | 15 |
| <b>4. Clase Textural (**)</b>                               | – | NA. | NA. | A  |

Fuente: Informe de ensayo N° IE-22-162294

#### 4.1.3 Resultados de la estandarización de Ácido Clorhídrico 0.25 N

A continuación, se presenta los resultados obtenidos de la estandarización del ácido clorhídrico a 0.25N.

**Tabla 10**

*Resultados de la estandarización de Ácido Clorhídrico 0.25N*

| Fecha      | Numero de Estandarización | CO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> (g) | Volumen gastado HCl | Factor de corrección HCl | Factor de corrección promedio | Porcentaje |
|------------|---------------------------|-------------------------------------|---------------------|--------------------------|-------------------------------|------------|
| 11/03/2023 | Fc1                       | 0.1003                              | 7.5                 | 1.0094                   | 0.9731                        | 3%         |
|            | Fc2                       | 0.1005                              | 8.1                 | 0.9365                   |                               |            |
|            | Fc3                       | 0.1006                              | 7.8                 | 0.9735                   |                               |            |
| 26/03/2023 | Fc1                       | 0.1004                              | 7.5                 | 1.0104                   | 1.0210                        | -2%        |
|            | Fc2                       | 0.1009                              | 7.4                 | 1.0292                   |                               |            |
|            | Fc3                       | 0.101                               | 7.45                | 1.0233                   |                               |            |
| 11/04/2023 | Fc1                       | 0.1003                              | 7.5                 | 1.0094                   | 0.9994                        | 0%         |
|            | Fc2                       | 0.1005                              | 7.5                 | 1.0114                   |                               |            |
|            | Fc3                       | 0.101                               | 7.8                 | 0.9774                   |                               |            |
| 26/04/2023 | Fc1                       | 0.1003                              | 7.5                 | 1.0094                   | 1.0100                        | -1%        |
|            | Fc2                       | 0.1005                              | 7.52                | 1.0087                   |                               |            |
|            | Fc3                       | 0.1004                              | 7.49                | 1.0118                   |                               |            |
| 10/05/2023 | Fc1                       | 0.1003                              | 7.3                 | 1.0371                   | 1.0375                        | -4%        |
|            | Fc2                       | 0.1005                              | 7.4                 | 1.0251                   |                               |            |
|            | Fc3                       | 0.1002                              | 7.2                 | 1.0504                   |                               |            |
| 25/05/2023 | Fc1                       | 0.1005                              | 7.3                 | 1.0391                   | 1.0340                        | -3%        |
|            | Fc2                       | 0.1005                              | 7.25                | 1.0463                   |                               |            |
|            | Fc3                       | 0.101                               | 7.5                 | 1.0165                   |                               |            |
| 10/07/2023 | Fc1                       | 0.1003                              | 7.4                 | 1.0231                   | 1.0134                        | -1%        |
|            | Fc2                       | 0.1005                              | 7.55                | 1.0047                   |                               |            |
|            | Fc3                       | 0.1006                              | 7.5                 | 1.0124                   |                               |            |
| 10/08/2023 | Fc1                       | 0.1002                              | 7.7                 | 0.9822                   | 1.0194                        | -2%        |
|            | Fc2                       | 0.1                                 | 7.3                 | 1.0340                   |                               |            |
|            | Fc3                       | 0.1001                              | 7.25                | 1.0421                   |                               |            |

Fuente: Elaboración propia

De acuerdo con lo presentado en la Tabla N°10, el porcentaje de desviación en la normalidad es menor al 5%, lo que confirma que la preparación del ácido clorhídrico a 0.25 N fue adecuada (Christian, G. D., 2009).

#### **4.1.4 Resultados de la evaluación de la biodegradación del caucho TR a través del uso de consorcios microbianos extraídos de lodos residuales de la industria de curtiembre.**

**Tabla 11**

*Resultados de los gastos totales de volumen de ácido clorhídrico (ml)*

| FECHAS     | DIAS | VCO <sup>1</sup> | VP <sup>2</sup> | VK <sup>3</sup> | VPR <sup>4</sup> | VKL <sup>5</sup> | VPRL <sup>6</sup> | VKPS <sup>7</sup> | VPRPS <sup>8</sup> | VKPSL <sup>9</sup> | VPRPSL <sup>10</sup> |
|------------|------|------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
| 13/03/2023 | 1    | 40               | 0               | 0               | 0                | 0                | 0                 | 0                 | 0                  | 0                  | 0                    |
| 17/03/2023 | 4    | 31.5             | 12.3            | 17.8            | 13               | 15               | 13.9              | 16.6              | 12                 | 12.2               | 11.9                 |
| 21/03/2023 | 8    | 33.15            | 15.3            | 19.15           | 18.7             | 18.2             | 16                | 17.8              | 15.4               | 15.2               | 14.8                 |
| 25/03/2023 | 12   | 30.04            | 11.2            | 15.6            | 15.3             | 15               | 13                | 14                | 10.2               | 13.2               | 11.1                 |
| 29/03/2023 | 16   | 33               | 25.3            | 27.3            | 27.25            | 25.2             | 18                | 25.1              | 17                 | 24.8               | 15                   |
| 3/04/2023  | 21   | 32.4             | 22.15           | 26.3            | 24.65            | 22.14            | 17                | 22.12             | 15.8               | 22.08              | 16.8                 |
| 7/04/2023  | 25   | 31.4             | 16.45           | 18.5            | 18.35            | 16.8             | 16.4              | 16.24             | 14.6               | 16.8               | 14                   |
| 11/04/2023 | 29   | 31.4             | 16.45           | 19.5            | 18.2             | 18.5             | 16                | 17                | 16.2               | 16.3               | 15                   |
| 18/04/2023 | 36   | 31.2             | 16.15           | 18.25           | 18.1             | 16.8             | 16.4              | 16.8              | 16.2               | 17.2               | 14                   |
| 26/04/2023 | 44   | 30               | 12.5            | 16.8            | 16.75            | 15               | 13                | 14.6              | 12.68              | 12.78              | 12.48                |
| 3/05/2023  | 51   | 30               | 21.3            | 22.4            | 17               | 22.2             | 19                | 22                | 17.8               | 22.6               | 12                   |
| 9/05/2023  | 57   | 31.6             | 21.4            | 24.2            | 23               | 20.4             | 16.6              | 22.4              | 14                 | 23.4               | 12                   |
| 13/05/2023 | 61   | 32               | 20.2            | 25              | 24.6             | 20.1             | 18.2              | 19.6              | 15                 | 19.8               | 14                   |
| 17/05/2023 | 65   | 32               | 22.6            | 26              | 25.4             | 22.5             | 18                | 22.8              | 15                 | 22.2               | 14                   |
| 21/05/2023 | 69   | 30.8             | 25              | 26.6            | 25.1             | 24.9             | 18                | 24.6              | 16                 | 24.8               | 14                   |
| 25/05/2023 | 73   | 31               | 20.4            | 23              | 20.3             | 20.2             | 16                | 18.4              | 14                 | 18                 | 13                   |
| 29/05/2023 | 77   | 30               | 26              | 26.1            | 26               | 25.8             | 18                | 25.2              | 16.9               | 26.2               | 14                   |
| 2/06/2023  | 81   | 32               | 26.1            | 26.2            | 26               | 26               | 19.5              | 26                | 17.8               | 28                 | 14                   |
| 9/06/2023  | 88   | 30.4             | 25              | 26.4            | 25.4             | 24.9             | 18                | 24.8              | 16                 | 24.6               | 14                   |
| 16/06/2023 | 95   | 30.4             | 24              | 24.8            | 24.3             | 23.4             | 17.5              | 23.5              | 16.6               | 23.8               | 14.6                 |
| 23/06/2023 | 102  | 29.6             | 23              | 24.6            | 23               | 22.8             | 18.2              | 22.6              | 16.8               | 22.4               | 15                   |
| 30/06/2023 | 109  | 31.4             | 22              | 24              | 22               | 21.6             | 19                | 21.8              | 17                 | 21.6               | 15                   |
| 7/07/2023  | 116  | 31.4             | 20.5            | 23              | 21               | 20.6             | 19                | 20.4              | 18                 | 20.2               | 16                   |

<sup>1</sup> VCO: Desecador utilizado para ensayo control

<sup>2</sup> VP: Desecador utilizado para ensayo positivo

<sup>3</sup> VK: Desecador utilizado para ensayo blanco

<sup>4</sup> VPR: Desecador utilizado para ensayo prueba

<sup>5</sup> VKL: Desecador utilizado para ensayo blanco y lodo residual

<sup>6</sup> VPRL: Desecador utilizado para ensayo prueba y lodo

<sup>7</sup> VKPS: Desecador utilizado para ensayo blanco y cepa de *Pseudomonas*

<sup>8</sup> VPRPS: Desecador utilizado para ensayo prueba y cepas de *Pseudomonas*

<sup>9</sup> VKPSL: Desecador utilizado para ensayo blanco, cepas de *Pseudomonas* y lodo

<sup>10</sup> VPRPSL: Desecador utilizado para ensayo prueba, cepas de *Pseudomonas* y lodo

|                   |     |      |      |      |    |      |      |      |      |      |    |
|-------------------|-----|------|------|------|----|------|------|------|------|------|----|
| <b>14/07/2023</b> | 123 | 32.3 | 21.4 | 22.6 | 22 | 21.9 | 20   | 22   | 18   | 22.8 | 16 |
| <b>14/07/2023</b> | 123 | 32.3 | 21.4 | 22.6 | 22 | 21.9 | 20   | 22   | 18   | 22.8 | 16 |
| <b>21/07/2023</b> | 130 | 32   | 22.3 | 23   | 23 | 22.9 | 18   | 22.8 | 16.9 | 23.4 | 14 |
| <b>28/07/2023</b> | 137 | 33   | 20.5 | 24   | 22 | 21.8 | 19.5 | 21.6 | 17.8 | 22.2 | 14 |
| <b>4/08/2023</b>  | 144 | 32   | 21   | 25   | 23 | 22.9 | 19.4 | 22.4 | 17.8 | 22.8 | 14 |
| <b>11/08/2023</b> | 151 | 31   | 21   | 26   | 22 | 21.9 | 19   | 22.2 | 17   | 22.8 | 15 |
| <b>18/08/2023</b> | 158 | 31.4 | 22   | 25   | 23 | 22.9 | 17   | 22.8 | 16   | 23.2 | 13 |

#### 4.1.5 Resultados de la obtención del porcentaje de biodegradación

Para determinar el porcentaje de biodegradación se utiliza la siguiente formula:

$$\% \text{ Biodegradación} = \frac{CO_{2L} - CO_{2B}}{CO_2 \text{ teórico}} \times 100$$

CO<sub>2L</sub>: CO<sub>2</sub> liberado en la muestra con el material a evaluar.

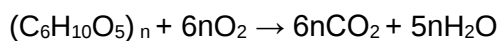
CO<sub>2B</sub>: CO<sub>2</sub> liberado en el blanco (sin material).

CO<sub>2</sub> teórico: Cantidad máxima de CO<sub>2</sub> que se podría liberar si todo el material se degradara completamente.

Para determinar el CO<sub>2</sub> teórico para el papel celulosa se realizó a través de relación estequiométrica (Nomadolo et al., 2022)

Fórmula general de celulosa: (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)<sub>n</sub>

Reacción de biodegradación completa:



Relación de masa:

1 mol de celulosa (162 g) → 6 moles de CO<sub>2</sub> (264 g)

**Entonces:**

$$\frac{264 \text{ g } CO_2}{162 \text{ g celulosa}} = 1.63 \text{ g } CO_2/\text{g celulosa}$$

### **Para el papel de celulosa:**

1 g de papel celulosa= 1.63 g de CO<sub>2</sub> teórico

Por lo tanto, para la ejecución del ensayo positivo se utilizó 300 miligramos de papel celulosa, por lo tanto, el CO<sub>2</sub> teórico es de 489 miligramos de CO<sub>2</sub>.

### **Para el caucho termoplástico:**

El CO<sub>2</sub> teórico para caucho termoplástico se realizó a través de relación estequiométrica (Nomadolo et al., 2022), utilizando la siguiente formula:

$$CO_2 t = Mt \times Ct \times \frac{44}{12}$$

donde Mt representa la masa seca del material plástico, Ct el contenido de carbono orgánico (obtenido por análisis elemental), y 44/12 es la relación de masas molares entre el CO<sub>2</sub> y el carbono. Esta relación permite estimar el CO<sub>2</sub> que se formaría si todo el carbono orgánico se mineralizara completamente.

Dado que el caucho termoplástico (TR) utilizado en el presente estudio corresponde a un material polimérico de composición compleja no especificada, se estimó su potencial de liberación de CO<sub>2</sub> mediante una fórmula empírica aproximada basada en composiciones reportadas para elastómeros termoplásticos tipo estireno-butadieno. Se asumió una proporción representativa de 70 % butadieno (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>) y 30 % estireno (C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>), lo que permitió calcular la siguiente relación estequiométrica, 3.12 kg CO<sub>2</sub>/kg de caucho, por lo tanto, para 300 miligramos de caucho termoplástico se obtuvo 936 mg de CO<sub>2</sub>.

Para determinar el carbono capturado en CO<sub>2</sub> del papel celulosa y caucho termoplástico en los desecadores se aplica la siguiente fórmula.

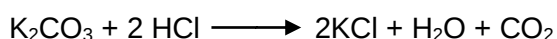
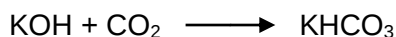
$$Z_t = Z_b - Z_n$$

Zn = mL calculados de HCL para eliminar el CO<sub>2</sub> generado únicamente a partir del material de prueba (caucho termoplástico o papel celulosa).

Zb = mL de HCL usado para tirar los recipientes en blanco con tierra de suelo adentro, y

Zt = mL de HCL usado para tirar los recipientes que contienen el suelo más el material de prueba

Luego:



$$m \text{ moles de CO}_2 = \frac{m \text{ moles de HCl}}{2}$$

#### **Corrección de la normalidad del HCl:**

$$m \text{ moles de CO}_2 = 0.05 \text{ N} * \text{ml HCl} / 2$$

$$\text{mg de CO}_2 = 0.05 \text{ N} * \text{mL HCl} * 44/2$$

$$\text{mg de CO}_2 = 1.1 * \text{ml HCl}$$

Por tanto, el dióxido de carbono desprendido en mg se obtiene multiplicando la valoración de ml de HCl por 1.1.

Por lo tanto, para calcular el nivel o porcentaje de biodegradación de las muestras de caucho termoplástico que se sometieron a las condiciones de los ensayos de biodegradación, se realizó la diferencia entre los volúmenes de gastos de HCl expresados en mililitros de VK, VKL, VKPS y VKPSL y los ensayos VPR, VPRL, VPRP, VPRPSL, respectivamente, para después multiplicarlo por el factor 1.1. para obtener la cantidad de CO<sub>2</sub> generado de la biodegradación del caucho termoplástico durante todo el proceso que duro la investigación.

Similar se realizó con el material positivo o papel celulosa, en el cual se realizó la diferencia entre los volúmenes de gastos de HCl en mililitros de VK y VP, después se multiplico por el factor 1.1, para obtener la cantidad de CO<sub>2</sub> generado de la biodegradación del papel celulosa durante todo el proceso que duro la investigación.

**Tabla 12:**

*Cuadro resumen de los ensayos de biodegradación*

| <b>Zt</b>    | <b>Zb</b>     | <b>mg de CO<sub>2</sub></b>                                                                                                    | <b>Representación</b>                |
|--------------|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| <b>VK</b>    | <b>VP</b>     | Zn (ml) X 1.1= mg de CO <sub>2</sub> obtenido del papel celulosa en el desecador para ensayo positivo                          | Celulosa (control positivo)          |
| <b>VK</b>    | <b>VPR</b>    | Zn (ml) X 1.1 = mg de CO <sub>2</sub> obtenido del caucho termoplástico en el desecador para ensayo de prueba                  | Caucho TR                            |
| <b>VKL</b>   | <b>VPRL</b>   | Zn (ml) X 1.1 = mg de CO <sub>2</sub> obtenido del caucho termoplástico en el desecador para ensayo de prueba y lodo           | Caucho TR y lodo                     |
| <b>VKPS</b>  | <b>VPRP</b>   | Zn (ml) X 1.1 = mg de CO <sub>2</sub> obtenido del caucho termoplástico para ensayo de prueba y cepas de <i>Pseudomonas</i>    | Caucho TR y <i>Pseudomonas</i>       |
| <b>VKPSL</b> | <b>VPRPSL</b> | Zn (ml) X 1.1 = mg de CO <sub>2</sub> obtenido del caucho termoplástico para ensayo prueba, cepas de <i>Pseudomonas</i> y lodo | Caucho TR, <i>Pseudomonas</i> y lodo |

*Fuente: Elaboración propia*

#### **4.1.6 Evaluar la biodegradación del caucho termoplástico a través del uso de consorcios microbianos extraídos de lodos residuales de la industria de curtiembre.**

Se evaluó la biodegradación del caucho termoplástico mediante el empleo de consorcios microbianos aislados de lodos residuales de curtiembre, así como a través de

cepas bacterianas de *Pseudomonas* CUR44-CUR92. Los resultados obtenidos en los ensayos de desecador mostraron diferencias en la producción de CO<sub>2</sub>, pérdida de masa del polímero y alteraciones estructurales observadas por FTIR/SEM entre los tratamientos. En el ensayo con consorcio microbiano (caucho + lodo), se evidenció una mayor capacidad degradativa en comparación con el caucho sin inoculación, confirmando que los microorganismos presentes en el lodo tienen la capacidad para atacar la matriz polimérica. Por otro lado, los ensayos con *Pseudomonas* CUR44-CUR92 presentaron actividad degradativa, aunque en una intensidad menor que el consorcio. Finalmente, la combinación de *Pseudomonas* y lodo residual mostró un efecto sinérgico, con indicadores de biodegradación superiores respecto a los tratamientos individuales. Estos hallazgos confirman el cumplimiento del objetivo general, demostrando que los consorcios microbianos provenientes de lodos residuales constituyen una alternativa viable para la biodegradación del caucho termoplástico.

A partir de los ensayos de respirometría, se evaluó la biodegradación del caucho termoplástico en presencia de consorcios microbianos de lodos residuales de curtiembre y cepas de *Pseudomonas* CUR44-CUR92. Los resultados mostraron que el caucho incubado únicamente con suelo presentó una baja mineralización (4.55 %), mientras que la adición de lodo residual incrementó la degradación hasta 12.31 %. El uso de cepas aisladas de *Pseudomonas* alcanzó un 16.89 %, y la combinación de *Pseudomonas* con lodo residual evidenció un efecto sinérgico, logrando el mayor porcentaje de biodegradación (22.64 %). Estos valores, comparados con el control positivo (papel celulosa, 16.56 %), confirman que los consorcios microbianos provenientes de lodos de curtiembre poseen potencial para degradar caucho termoplástico, cumpliéndose así el objetivo general del estudio.

**Tabla 13:**

*Determinación de los porcentajes de biodegradación (%)*

| Fecha      | VK-VP <sup>11</sup> | mg (CO <sub>2</sub> ) = ml<br>(HCl) x 1.1 | VK-<br>VPR <sup>12</sup> | mg (CO <sub>2</sub> ) = ml<br>(HCl) x 1.1 | VKL-<br>VPRL <sup>13</sup> | mg (CO <sub>2</sub> ) = ml<br>(HCl) x 1.1 | VKPS-<br>VPRP <sup>14</sup> | mg (CO <sub>2</sub> ) = ml<br>(HCl) x 1.1 | VKPSL-<br>VPRPSL <sup>15</sup> | mg (CO <sub>2</sub> ) = ml<br>(HCl) x 1.1 |
|------------|---------------------|-------------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------------|
| 13/03/2023 | 0.00                | 0.00                                      | 0.00                     | 0.00                                      | 0.00                       | 0.00                                      | 0.00                        | 0.00                                      | 0.00                           | 0.00                                      |
| 17/03/2023 | 5.50                | 6.05                                      | 4.80                     | 5.28                                      | 1.10                       | 1.21                                      | 4.60                        | 5.06                                      | 0.30                           | 0.33                                      |
| 21/03/2023 | 3.85                | 10.29                                     | 0.45                     | 5.78                                      | 2.20                       | 3.63                                      | 2.40                        | 7.70                                      | 0.40                           | 0.77                                      |
| 25/03/2023 | 4.40                | 15.13                                     | 0.30                     | 6.11                                      | 2.00                       | 5.83                                      | 3.80                        | 11.88                                     | 2.10                           | 3.08                                      |
| 29/03/2023 | 2.00                | 17.33                                     | 0.05                     | 6.16                                      | 7.20                       | 13.75                                     | 8.10                        | 20.79                                     | 9.80                           | 13.86                                     |
| 3/04/2023  | 4.15                | 21.89                                     | 1.65                     | 7.98                                      | 5.14                       | 19.40                                     | 6.32                        | 27.74                                     | 5.28                           | 19.67                                     |
| 7/04/2023  | 2.05                | 24.15                                     | 0.15                     | 8.14                                      | 0.40                       | 19.84                                     | 1.64                        | 29.55                                     | 2.80                           | 22.75                                     |
| 11/04/2023 | 3.05                | 27.5                                      | 1.30                     | 9.57                                      | 2.50                       | 22.59                                     | 0.80                        | 30.43                                     | 1.30                           | 24.18                                     |
| 18/04/2023 | 2.10                | 29.81                                     | 0.15                     | 9.74                                      | 0.40                       | 23.03                                     | 0.60                        | 31.09                                     | 3.20                           | 27.70                                     |
| 26/04/2023 | 4.30                | 34.54                                     | 0.05                     | 9.79                                      | 2.00                       | 25.23                                     | 1.92                        | 33.20                                     | 0.30                           | 28.03                                     |
| 3/05/2023  | 1.10                | 35.75                                     | 5.40                     | 15.73                                     | 3.20                       | 28.75                                     | 4.20                        | 37.82                                     | 10.6                           | 39.69                                     |
| 9/05/2023  | 2.80                | 38.83                                     | 1.20                     | 17.05                                     | 3.80                       | 32.93                                     | 8.40                        | 47.06                                     | 11.4                           | 52.23                                     |
| 13/05/2023 | 4.80                | 44.11                                     | 0.40                     | 17.49                                     | 1.90                       | 35.02                                     | 4.60                        | 52.12                                     | 5.80                           | 58.61                                     |
| 17/05/2023 | 3.40                | 47.85                                     | 0.60                     | 18.15                                     | 4.50                       | 39.97                                     | 7.80                        | 60.70                                     | 8.20                           | 67.63                                     |
| 21/05/2023 | 1.60                | 49.61                                     | 1.50                     | 19.80                                     | 6.90                       | 47.56                                     | 8.60                        | 70.16                                     | 10.8                           | 79.51                                     |
| 25/05/2023 | 2.60                | 52.47                                     | 2.70                     | 22.77                                     | 4.20                       | 52.18                                     | 4.40                        | 75.00                                     | 5.00                           | 85.01                                     |

<sup>11</sup> VK-VP: Diferencia de volúmenes en ml entre el desecador para ensayo en blanco y desecador para ensayo positivo

<sup>12</sup> VK-VPR: Diferencia de volúmenes en ml entre el desecador para ensayo en blanco y desecador para ensayo prueba

<sup>13</sup> VKL-VPRL: Diferencia de volúmenes en ml entre el desecador para ensayo en blanco y lodo y desecador para ensayo prueba y lodo

<sup>14</sup> VKPS-VPRPS: Diferencia de volúmenes en ml entre el desecador para ensayo blanco y cepas de *Pseudomonas* y desecador para ensayo prueba y cepas de *Pseudomonas*

<sup>15</sup> VKPSL-VPRPSL: Diferencia de volúmenes en ml entre el desecador para ensayo blanco, cepas de *Pseudomonas* y lodo y desecador para ensayo prueba con cepas de *Pseudomonas* y lodo

|                               |                   |                              |                             |                              |                            |                              |                            |                              |                        |                              |
|-------------------------------|-------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------|------------------------------|
| 29/05/2023                    | 0.10              | 52.58                        | 0.10                        | 22.88                        | 7.80                       | 60.76                        | 8.30                       | 84.13                        | 12.2                   | 98.43                        |
| 2/06/2023                     | 0.10              | 52.69                        | 0.20                        | 23.10                        | 6.50                       | 67.91                        | 8.20                       | 93.15                        | 14.00                  | 113.83                       |
| 9/06/2023                     | 1.40              | 54.23                        | 1.00                        | 24.20                        | 6.90                       | 75.50                        | 8.80                       | 102.83                       | 10.60                  | 125.49                       |
| 16/06/2023                    | 0.80              | 55.11                        | 0.50                        | 24.75                        | 5.90                       | 81.99                        | 6.90                       | 110.42                       | 9.20                   | 135.61                       |
| 23/06/2023                    | 1.60              | 56.87                        | 1.60                        | 26.51                        | 4.60                       | 87.05                        | 5.80                       | 116.80                       | 7.40                   | 143.75                       |
| 30/06/2023                    | 2.00              | 59.07                        | 2.00                        | 28.71                        | 2.60                       | 89.91                        | 4.80                       | 122.08                       | 6.60                   | 151.01                       |
| 7/07/2023                     | 2.50              | 61.82                        | 2.00                        | 30.91                        | 1.60                       | 91.67                        | 2.40                       | 124.72                       | 4.20                   | 155.63                       |
| 14/07/2023                    | 1.20              | 63.14                        | 0.60                        | 31.57                        | 1.90                       | 93.76                        | 4.00                       | 129.12                       | 6.80                   | 163.11                       |
| 21/07/2023                    | 0.70              | 63.91                        | 0.00                        | 31.57                        | 4.90                       | 99.15                        | 5.90                       | 135.61                       | 9.40                   | 173.45                       |
| 28/07/2023                    | 3.50              | 67.76                        | 2.00                        | 33.77                        | 2.30                       | 101.68                       | 3.80                       | 139.79                       | 8.20                   | 182.47                       |
| 4/08/2023                     | 4.00              | 72.16                        | 2.00                        | 35.97                        | 3.50                       | 105.53                       | 4.60                       | 144.85                       | 8.80                   | 192.15                       |
| 11/08/2023                    | 5.00              | 77.66                        | 4.00                        | 40.37                        | 2.90                       | 108.72                       | 5.20                       | 150.57                       | 7.80                   | 200.73                       |
| 18/08/2023                    | 3.00              | 80.96                        | 2.00                        | 42.57                        | 5.90                       | 115.21                       | 6.80                       | 158.05                       | 10.20                  | 211.95                       |
|                               |                   |                              | Cauc                        |                              | Cauch                      |                              | Cauch                      |                              | Cauch                  |                              |
| mg CO <sub>2</sub><br>teórico | Papel<br>celulosa | 489 mg de<br>CO <sub>2</sub> | ho<br>termo<br>plásti<br>co | 936 mg de<br>CO <sub>2</sub> | o<br>termo<br>plásti<br>co | 936 mg de<br>CO <sub>2</sub> | o<br>termo<br>plástic<br>o | 936 mg de<br>CO <sub>2</sub> | o<br>termop<br>lástico | 936 mg de<br>CO <sub>2</sub> |
| Porcentaje<br>obtenidos       | 16.56%            |                              | 4.55%                       |                              | 12.31%                     |                              | 16.89%                     |                              | 22.64%                 |                              |

Fuente: Elaboración Propia

De acuerdo con la tabla 13, se presenta el volumen de gasto expresado en ml y la cantidad de CO<sub>2</sub> absorbido expresado en mg en cada desecador por la acción de bacterias que se encontraban en el suelo natural y otras que se encontraban en el lodo y las cepas de *Pseudomonas*, de los cuales se pueden describir los siguientes resultados:

- ✓ La biodegradación del caucho TR en el desecador de ensayo para lodos y *Pseudomonas* fue el ensayo más efectivo, alcanzando un 22.64% del CO<sub>2</sub>, lo que resalta la eficiencia combinada del lodo y las cepas de *Pseudomonas*.
- ✓ La biodegradación del caucho TR en el desecador de ensayo de prueba (solo caucho TR con suelo) fue el menos eficiente, apenas con un 4.55%, lo que indica que el caucho termoplástico por sí solo no se biodegrada fácilmente sin ayuda microbiana o sin condiciones mejoradas.
- ✓ La biodegradación del caucho TR en el desecador de ensayo de prueba y cepas de *Pseudomonas* y desecador de para ensayo de prueba y lodo confirman que tanto el lodo como las *Pseudomonas* contribuyen significativamente, pero su combinación tiene un efecto más pronunciado.
- ✓ Los volúmenes de HCl gastados, expresados en mililitros, fueron menores en el desecador correspondiente al ensayo de prueba positiva (papel de celulosa) (VP), en comparación con el desecador del ensayo blanco (solo suelo) (VK). Esta diferencia se explica por la mayor generación de CO<sub>2</sub> como resultado de la biodegradación del papel de celulosa, el cual es rápidamente absorbido por el hidróxido de potasio (KOH), provocando una saturación más temprana de la solución absorbente y, por ende, requiriendo un menor volumen de HCl para su posterior valoración. En este contexto, la diferencia entre los volúmenes de HCl gastados (VP - VK) permite atribuir al CO<sub>2</sub> generado en la biodegradación del papel de celulosa, lo que valida la actividad microbiana en el ensayo positivo.
- ✓ Los volúmenes de HCl gastados, expresados en mililitros, fueron menores en el desecador correspondiente al ensayo con caucho termoplástico (VPR), en

comparación con el desecador del ensayo blanco (solo suelo) (VK). Esta diferencia se atribuye a la generación de CO<sub>2</sub> como producto de la biodegradación del caucho termoplástico (TR), el cual es absorbido en menor tiempo por el hidróxido de potasio (KOH), lo que conduce a una saturación más rápida de la solución absorbente y, por tanto, a un menor volumen requerido de HCl para la valoración. En consecuencia, la diferencia entre los volúmenes de gasto (VPR - VK) evidenciaría que el CO<sub>2</sub> absorbido en los vasos precipitados proviene de la biodegradación del caucho TR, confirmando la actividad microbiana sobre este material.

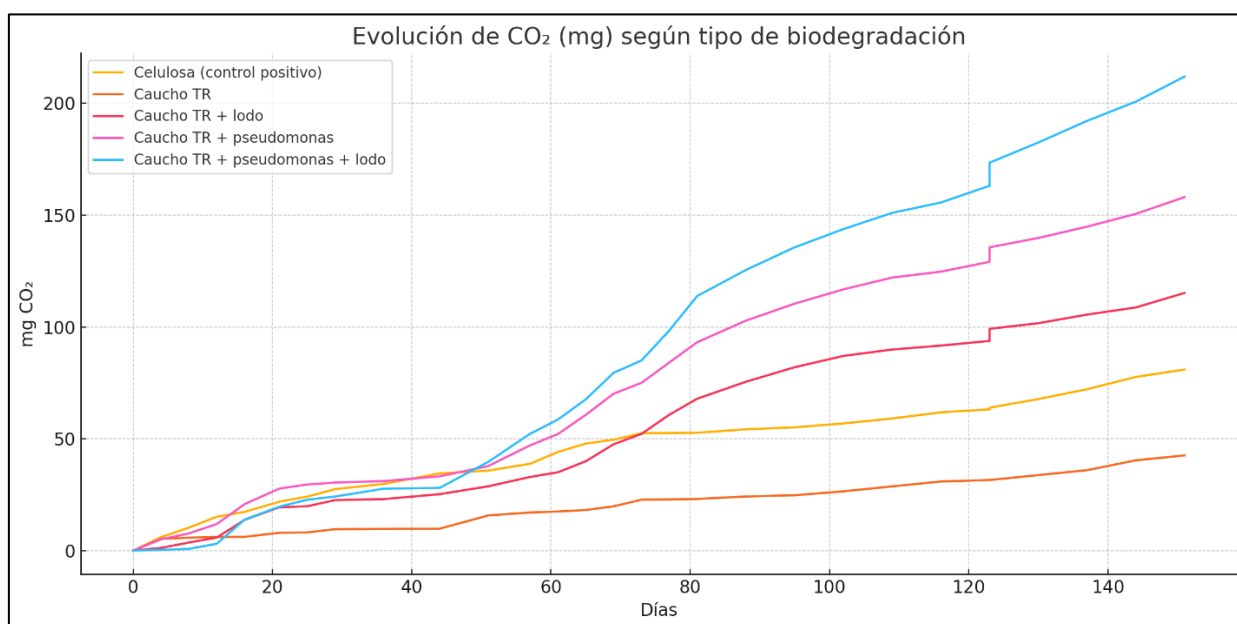
- ✓ Los volúmenes de HCl gastados, expresados en mililitros, fueron menores en el desecador correspondiente al ensayo con caucho termoplástico y lodo (VPRL), en comparación con el desecador del ensayo blanco con solo lodo (VKL). Esta diferencia se debe a la generación de CO<sub>2</sub> producto de la biodegradación del caucho TR, el cual es absorbido con mayor rapidez por el hidróxido de potasio (KOH), ocasionando una saturación más temprana de la solución absorbente y, en consecuencia, una menor necesidad de HCl para su valoración. Por tanto, la diferencia entre los volúmenes de gasto (VPRL - VKL) indicaría que el CO<sub>2</sub> absorbido en los vasos precipitados se originó a partir de la biodegradación del caucho TR, lo que evidencia la actividad microbiana degradativa del lodo sobre dicho material.
- ✓ El volumen de HCl gastado fue menor en el desecador correspondiente al ensayo con caucho termoplástico, *Pseudomonas* y lodo (VPRPSL), en comparación con el desecador del ensayo blanco con *Pseudomonas* y lodo (VKPSL). Esta diferencia se atribuye a la generación de CO<sub>2</sub> como resultado de la biodegradación del caucho TR, el cual es rápidamente absorbido por el hidróxido de potasio (KOH), provocando su saturación en un menor tiempo y, por tanto, requiriendo un volumen menor de HCl para la valoración. La diferencia entre ambos volúmenes de gasto (VPRPSL - VKPSL) sugiere que el CO<sub>2</sub> absorbido se originó por la actividad biodegradativa sobre el caucho TR, lo cual evidencia la capacidad de

biodegradación del consorcio *Pseudomonas* de cepas CUR44-CUR93 (5ml C/U) y lodo frente a este material polimérico.

A continuación, se realiza la gráfica visualizando la biodegradación del papel celulosa y caucho TR en las diferentes tratamientos o ensayos de biodegradación:

**Figura 23**

*Diagrama de biodegradación de papel celulosa y caucho termoplástico (TR)*



Fuente: Elaboración propia

El gráfico señala la evolución del CO<sub>2</sub> (en mg) producida durante la biodegradación bajo diferentes condiciones experimentales, de los cuales se puede discutir:

- ✓ La curva de “Caucho TR + *Pseudomonas* + lodo” presentó la mayor generación de CO<sub>2</sub>, lo que indica la biodegradación más activa. Esto sugiere una sinergia efectiva entre el consorcio microbiano y el lodo como ambiente de soporte.
- ✓ La curva “Caucho TR + *Pseudomonas*” también presentó una biodegradación significativa, mucho más alta que el caucho solo. Esto confirma que estas bacterias tienen un papel activo en la biodegradación del caucho TR.

- ✓ La curva de “Caucho TR presentó una producción de CO<sub>2</sub> baja y lenta, evidenciando su resistencia natural a la biodegradación en ausencia de ayuda microbiana o ambiental.
- ✓ La curva control (papel celulosa), sirvió como referencia positiva. Aunque tiene un buen nivel de CO<sub>2</sub> generado en el desecador de prueba positiva, fue superada por la generación de CO<sub>2</sub> de las *Pseudomonas* en los otros desecadores.
- ✓ Las curvas más eficientes mantienen una pendiente positiva constante incluso hacia el día 158, indicando que la biodegradación no se estancó en ningún momento de la evaluación.

Para los resultados obtenidos sobre la generación de mg de CO<sub>2</sub> del caucho TR bajo las cuatro condiciones diferentes de los desecadores descritos en las tablas N° 12 y N°13, se realizaron pruebas estadísticas utilizando ANOVA, Test de Tukey HSD/KRAMER y Q-Test. Se excluyeron las pruebas positivas, ya que estas analizaron la generación mg de CO<sub>2</sub> del material positivo “celulosa”. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando la herramienta *Real Statistics* disponible en el software Excel.

**Tabla 14**

*mg CO<sub>2</sub> generados por los desecadores a diferentes condiciones*

| Fecha      | Caucho TR <sup>16</sup> | Caucho TR y lodo <sup>17</sup> | Caucho TR y <i>Pseudomonas</i> <sup>18</sup> | Caucho TR, <i>Pseudomonas</i> y lodo <sup>19</sup> |
|------------|-------------------------|--------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| 13/03/2023 | 0                       | 0                              | 0                                            | 0                                                  |
| 17/03/2023 | 5.28                    | 1.21                           | 5.06                                         | 0.33                                               |
| 21/03/2023 | 5.78                    | 3.63                           | 7.7                                          | 0.77                                               |
| 25/03/2023 | 6.11                    | 5.83                           | 11.88                                        | 3.08                                               |
| 29/03/2023 | 6.16                    | 13.75                          | 20.79                                        | 13.86                                              |
| 3/04/2023  | 7.98                    | 19.4                           | 27.74                                        | 19.67                                              |
| 7/04/2023  | 8.14                    | 19.84                          | 29.55                                        | 22.75                                              |
| 11/04/2023 | 9.57                    | 22.59                          | 30.43                                        | 24.18                                              |
| 18/04/2023 | 9.74                    | 23.03                          | 31.09                                        | 27.7                                               |
| 26/04/2023 | 9.79                    | 25.23                          | 33.2                                         | 28.03                                              |
| 3/05/2023  | 15.73                   | 28.75                          | 37.82                                        | 39.69                                              |
| 9/05/2023  | 17.05                   | 32.93                          | 47.06                                        | 52.23                                              |
| 13/05/2023 | 17.49                   | 35.02                          | 52.12                                        | 58.61                                              |
| 17/05/2023 | 18.15                   | 39.97                          | 60.7                                         | 67.63                                              |
| 21/05/2023 | 19.8                    | 47.56                          | 70.16                                        | 79.51                                              |
| 25/05/2023 | 22.77                   | 52.18                          | 75                                           | 85.01                                              |
| 29/05/2023 | 22.88                   | 60.76                          | 84.13                                        | 98.43                                              |
| 2/06/2023  | 23.1                    | 67.91                          | 93.15                                        | 113.83                                             |
| 9/06/2023  | 24.2                    | 75.5                           | 102.83                                       | 125.49                                             |
| 16/06/2023 | 24.75                   | 81.99                          | 110.42                                       | 135.61                                             |
| 23/06/2023 | 26.51                   | 87.05                          | 116.8                                        | 143.75                                             |
| 30/06/2023 | 28.71                   | 89.91                          | 122.08                                       | 151.01                                             |
| 7/07/2023  | 30.91                   | 91.67                          | 124.72                                       | 155.63                                             |
| 14/07/2023 | 31.57                   | 93.76                          | 129.12                                       | 163.11                                             |
| 21/07/2023 | 31.57                   | 99.15                          | 135.61                                       | 173.45                                             |
| 28/07/2023 | 33.77                   | 101.68                         | 139.79                                       | 182.47                                             |
| 4/08/2023  | 35.97                   | 105.53                         | 144.85                                       | 192.15                                             |
| 11/08/2023 | 40.37                   | 108.72                         | 150.57                                       | 200.73                                             |
| 18/08/2023 | 42.57                   | 115.21                         | 158.05                                       | 211.95                                             |

Fuente: Elaboración propia

<sup>16</sup> mg de CO<sub>2</sub> obtenido del caucho termoplástico en el desecador para ensayo de prueba (Caucho TR)

<sup>17</sup> mg de CO<sub>2</sub> obtenido del caucho termoplástico en el desecador para ensayo de prueba (Caucho TR) y lodo

<sup>18</sup> mg de CO<sub>2</sub> obtenido del caucho termoplástico para ensayo de prueba (Caucho TR) y cepas de *Pseudomona*

<sup>19</sup> mg de CO<sub>2</sub> obtenido del caucho termoplástico para ensayo prueba (Caucho TR), cepas de *Pseudomonas* y lodo

## Análisis de varianza

Ho: No existen diferencias entre los grupos

Hi: Existen diferencias entre los grupos

**Tabla 15**

*Análisis de Varianza de los ensayos de biodegradación (Alpha menor a 0.05)*

| Group                                              | Cou<br>nt | Sum   | Mean    | Varianc<br>e | SS      | Std Err | Lower   | Upper   |
|----------------------------------------------------|-----------|-------|---------|--------------|---------|---------|---------|---------|
| <b>Caucho TR</b> <sup>17</sup>                     | 29        | 576.4 | 19.8765 | 135.101      | 3782.83 | 8.82870 | 2.38360 | 37.3695 |
|                                                    |           | 2     | 517     | 238          | 466     | 721     | 009     | 034     |
| <b>Caucho TR y lodo</b> <sup>18</sup>              | 29        | 1549. | 53.44   | 1413.10      | 39566.9 | 8.82870 | 35.9470 | 70.9329 |
|                                                    |           | 76    |         | 362          | 014     | 721     | 484     | 516     |
| <b>Caucho TR y Pseudomonas</b> <sup>19</sup>       | 29        | 2152. | 74.2213 | 2571.13      | 71991.7 | 8.82870 | 56.7284 | 91.7143 |
|                                                    |           | 42    | 793     | 393          | 499     | 721     | 277     | 309     |
| <b>Caucho TR, Pseudomonas y lodo</b> <sup>20</sup> | 29        | 2570. | 88.6434 | 4922.40      | 137827. | 8.82870 | 71.1504 | 106.136 |
|                                                    |           | 66    | 483     | 546          | 353     | 721     | 966     | 4       |

Fuente: Elaboración propia-Herramienta Statitics del software Excel

<sup>17</sup> mg de CO<sub>2</sub> obtenido del caucho termoplástico en el desecador para ensayo de prueba (Caucho TR)

<sup>18</sup> mg de CO<sub>2</sub> obtenido del caucho termoplástico en el desecador para ensayo de prueba (Caucho TR) y lodo

<sup>19</sup> mg de CO<sub>2</sub> obtenido del caucho termoplástico para ensayo de prueba (Caucho TR) y cepas de Pseudomonas

<sup>20</sup> mg de CO<sub>2</sub> obtenido del caucho termoplástico para ensayo prueba (Caucho TR), cepas de Pseudomonas y lodo

**Tabla 16**

*Cuadro Resumen del Análisis de Varianza de los ensayos de biodegradación*

| Sources               | SS             | df      | MS             | F              | P value        | Eta-sq         | RMSSE          | Omega Sq       |
|-----------------------|----------------|---------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| <b>Between Groups</b> | 77487.24<br>58 | 3       | 25829.08<br>19 | 11.42659<br>26 | 1.3559E-<br>06 | 0.234343<br>93 | 0.627710<br>47 | 0.2123833<br>9 |
| <b>Within Groups</b>  | 253168.8<br>39 | 11<br>2 | 2260.436<br>06 |                |                |                |                |                |
| <b>Total</b>          | 330656.0<br>85 | 11<br>5 | 2875.270<br>3  |                |                |                |                |                |

Fuente: Elaboración propia-Herramienta Statitics del software Excel

- ✓ De acuerdo con los resultados presentados en las Tabla N° 15 y N° 16 y desde una perspectiva estadística, se observan diferencias significativas entre los grupos analizados. El valor de F obtenido (11.43), junto con un valor de  $p$  de  $1.3559 \times 10^{-6}$ , es considerablemente menor que el nivel de significancia establecido ( $\alpha = 0.05$ ). Esto indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las medias de biodegradación correspondientes a los distintos tratamientos o ensayos. En consecuencia, se rechaza la hipótesis nula, lo que sugiere que al menos uno de los grupos difiere de los demás.
- ✓ El **Eta-cuadrado** ( $\eta^2 = 0.234$ ) sugiere que aproximadamente el 23.4% de la variabilidad en la biodegradación se debe al tipo de tratamiento aplicado, lo cual representa un efecto moderado a fuerte.
- ✓ El **Omega-cuadrado** ( $\omega^2 = 0.212$ ), un estimador más conservador, confirma que el efecto es real y no producto del azar.
- ✓ **La combinación de caucho TR con *Pseudomonas* y lodo** mostró la mayor biodegradación.
- ✓ El **caucho TR solo** tuvo la menor respuesta, como era esperable.
- ✓ Las diferencias entre grupos no son sólo significativas estadísticamente, sino también **prácticamente relevantes**, como lo sugieren los tamaños del efecto ( $\eta^2$  y  $\omega^2$ ).

## Prueba de Tukey HSD

**Tabla 17**

*Prueba de TUKEY HSD/KRAMER*

| <i>group</i>                                              | <i>mean</i> | <i>n</i> | <i>ss</i>  | <i>df</i> | <i>q-crit</i> |
|-----------------------------------------------------------|-------------|----------|------------|-----------|---------------|
| <b>Caucho TR</b> <sup>17</sup>                            | 19.87655172 | 29       | 3782.83466 |           |               |
| <b>Caucho TR y lodo</b> <sup>18</sup>                     | 53.44       | 29       | 39566.9014 |           |               |
| <b>Caucho TR y <i>Pseudomonas</i></b> <sup>19</sup>       | 74.22137931 | 29       | 71991.7499 |           |               |
| <b>Caucho TR, <i>Pseudomonas</i> y lodo</b> <sup>20</sup> | 88.64344828 | 29       | 137827.353 |           |               |
|                                                           |             | 116      | 253168.839 | 112       | 3.68871429    |

*Fuente: Elaboración propia*

Diferencia mínima significativa (DMS)

- ✓ q crítico (q-crit): 3.6887
- ✓ df (error): 112
- ✓ MSE (error cuadrático medio):  $\approx 2260.44$  (obtenido del ANOVA)
- ✓ n (tamaño de muestra por grupo): 29 (constante, aplica fórmula estándar de Tukey)

La fórmula usada para la comparación entre medias es:

Diferencia mínima significativa (DMS)

$$DMS = q\_crit \times \sqrt{(MSE / n)}$$

$$HSD = 3.6887 \cdot \sqrt{\frac{2260.44}{29}} \approx 3.6887 \cdot 8.32 \approx \boxed{30.68}$$

La prueba de **Tukey HSD** confirmó que existen diferencias estadísticamente significativas entre varios pares de tratamientos o de ensayos de biodegradación.

De acuerdo a lo expresado en la tabla N° 17, los resultados mostrados se refieren a la comparación de diferentes tratamientos o ensayos sobre la biodegradación del caucho TR, y el análisis de Tukey HSD/Kramer se utiliza para identificar si existen diferencias significativas entre los grupos. El tratamiento **más efectivo** fue el que combinó **caucho TR + Pseudomonas + lodo**, lo que sugiere una **sinergia positiva** en la biodegradación cuando ambos elementos biológicos están presentes y la biodegradación **aumenta consistentemente** al incorporar lodo y/o Pseudomonas al tratamiento con caucho TR.

**Tabla 18**

*Prueba de Q test*

| group 1                                     | group 2                                           | mean           | std err        | q-stat         | lower               | upper          | p-value        | mean-crit      | Cohen d        |
|---------------------------------------------|---------------------------------------------------|----------------|----------------|----------------|---------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Caucho TR <sup>17</sup>                     | Caucho TR y lodo <sup>18</sup>                    | 33.56344<br>83 | 8.82870<br>721 | 3.80162<br>661 | 0.99686<br>985      | 66.1300<br>267 | 0.04069<br>791 | 32.5665<br>784 | 0.70594<br>434 |
| Caucho TR <sup>17</sup>                     | Caucho TR y <i>Pseudomona</i> <sup>19</sup>       | 54.34482<br>76 | 8.82870<br>721 | 6.15546<br>832 | 21.7782<br>492      | 86.9114<br>06  | 0.00017<br>349 | 32.5665<br>784 | 1.14304<br>177 |
| Caucho TR <sup>17</sup>                     | Caucho TR, <i>Pseudomona</i> y lodo <sup>20</sup> | 68.76689<br>66 | 8.82870<br>721 | 7.78901<br>088 | 36.2003<br>181      | 101.333<br>475 | 1.394E-<br>06  | 32.5665<br>784 | 1.44638<br>301 |
| Caucho TR y lodo <sup>18</sup>              | Caucho TR y <i>Pseudomona</i> <sup>19</sup>       | 20.78137<br>93 | 8.82870<br>721 | 2.35384<br>171 | -<br>11.7851<br>991 | 53.3479<br>577 | 0.34736<br>289 | 32.5665<br>784 | 0.43709<br>743 |
| Caucho TR y lodo <sup>18</sup>              | Caucho TR, <i>Pseudomona</i> y lodo <sup>20</sup> | 35.20344<br>83 | 8.82870<br>721 | 3.98738<br>427 | 2.63686<br>985      | 67.7700<br>267 | 0.02867<br>362 | 32.5665<br>784 | 0.74043<br>867 |
| Caucho TR y <i>Pseudomona</i> <sup>19</sup> | Caucho TR, <i>Pseudomona</i> y lodo <sup>20</sup> | 14.42206<br>9  | 8.82870<br>721 | 1.63354<br>256 | -<br>18.1445<br>095 | 46.9886<br>474 | 0.65627<br>134 | 32.5665<br>784 | 0.30334<br>124 |

*Fuente: Elaboración propia*

**Tabla 19**

*Comparación entre Qstat y Q crit*

| Grupo 1                                | Grupo 2                                         | Q stat     | Q crit     | ¿Significativo? |
|----------------------------------------|-------------------------------------------------|------------|------------|-----------------|
| Caucho TR                              | Caucho TR + Lodo                                | 3.80162661 | 3.68871429 | Si              |
| Caucho TR                              | Caucho TR + cepa de <i>Pseudomonas</i>          | 6.15546832 | 3.68871429 | Si              |
| Caucho TR                              | Caucho TR + cepa de <i>Pseudomonas</i> + Lodos  | 7.78901088 | 3.68871429 | Si              |
| Caucho TR +Lodo                        | Caucho TR + cepas de <i>Pseudomonas</i>         | 2.35384171 | 3.68871429 | No              |
| Caucho TR +Lodo                        | Caucho TR + cepas de <i>Pseudomonas</i> + Lodos | 3.98738427 | 3.68871429 | Si              |
| Caucho TR +cepas de <i>Pseudomonas</i> | Caucho TR + cepas de <i>Pseudomonas</i> + Lodos | 1.63354256 | 3.68871429 | No              |

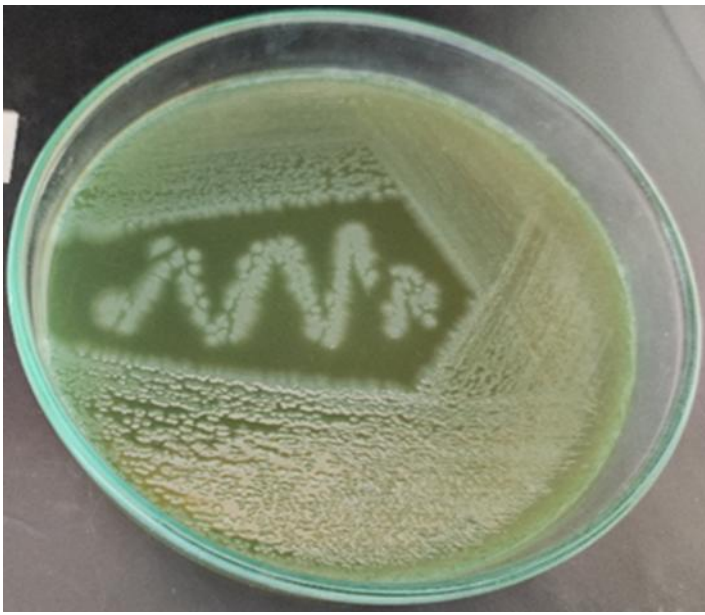
*Fuente: Elaboración propia*

Los valores de la columna "q-crit" se refieren al valor crítico utilizado en el test de Tukey para determinar si las diferencias entre los grupos son estadísticamente significativas. Si el valor de "q" calculado es mayor que el valor crítico de 32.57, las diferencias entre las medias de los grupos se consideran estadísticamente significativas. Estos resultados que, si hay diferencia significativa entre caucho TR y cualquier de los otros grupos, caucho TR y Caucho TR + cepas de *Pseudomonas* y lodo. No hay diferencia significativa entre Caucho TR + Lodo y Caucho TR más cepas de *Pseudomonas* y Caucho TR + *Pseudomonas* y Caucho TR + *Pseudomonas* + Lodo.

**Aislamiento de la *Pseudomonas* de los lodos residuales de la planta de tratamiento de aguas industriales de curtiembre:**

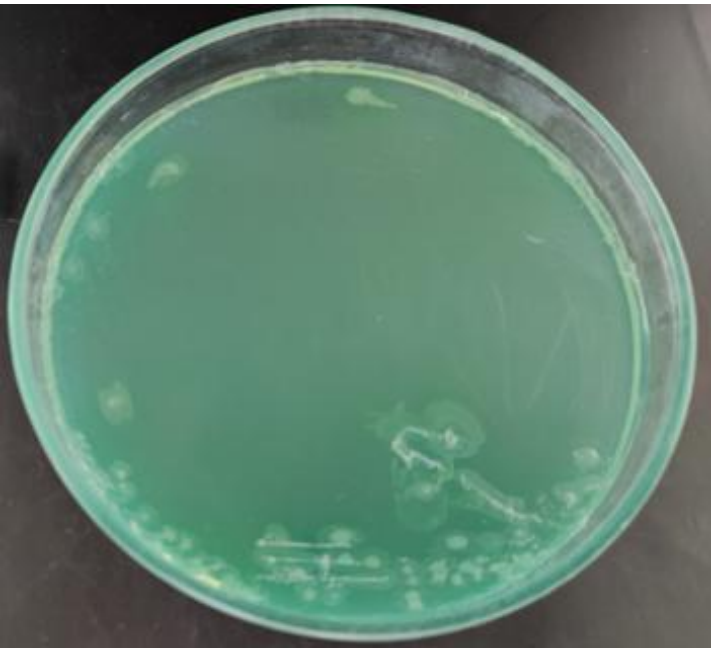
**Figura 24**

*Pseudomonas* Cepa CUR-92



**Figura 25**

*Pseudomonas* Cepa CUR-44



**Tabla 20**

*Pruebas de reconocimiento*

| Cepa   | Gram  | Oxidasa | Catalasa | Agar Cetrimide             | Agar P <i>Pseudomonas</i>                  |
|--------|-------|---------|----------|----------------------------|--------------------------------------------|
| CUR-92 | (NEG) | +       | +        | Pigmentación verde azulada | Fluorescencia amarillo verdoso bajo luz uv |
| CUR-44 | (NEG) | +       | +        | Pigmentación verde azulada | Fluorescencia amarillo verdoso bajo luz uv |

*Nota.* Elaboración propia

De acuerdo a los datos de la tabla 20 se han identificado dos cepas bacterianas, CUR-92 y CUR-44, ambas clasificadas como gramnegativas, lo que indica que tienen una pared celular con una capa delgada de peptidoglicano y una membrana externa. Las pruebas de oxidasa y catalasa son positivas para ambas cepas, sugiriendo que poseen las enzimas necesarias para realizar procesos metabólicos específicos. La positividad en la prueba de oxidasa es característica de ciertas especies, como las del género *Pseudomonas* (Chavan, Khatoon, Anokhe, & Kalia, 2022), lo que indica que estas bacterias pueden estar relacionadas con este grupo.

Además, ambas cepas presentan una pigmentación verde azulada en el medio de agar cetrimida, lo que refuerza la idea de que son capaces de crecer en condiciones que favorecen a *Pseudomonas aeruginosa*. La fluorescencia amarilla verdosa bajo luz ultravioleta en el agar P *Pseudomonas* también indica una característica asociada a este género, lo que permite identificar el género de la misma.

**Tabla 21**

*Pruebas bioquímicas*

| CEPA          | OF                                                     | MR-VP          | TSI                                   | CITRATO | LIA                        | MIO                                       | UREA |
|---------------|--------------------------------------------------------|----------------|---------------------------------------|---------|----------------------------|-------------------------------------------|------|
| <b>CUR-92</b> | Tubo sin<br>parafina:<br>+, tubo<br>con<br>parafina: - | MR: -<br>VP: - | K/K, H <sub>2</sub> S:<br>-,<br>GAS:- | +       | N/N<br>H <sub>2</sub> S: - | Movilidad:<br>+<br>Indol: -<br>Ornitina:- | -    |
| <b>CUR-44</b> | Tubo sin<br>parafina:<br>+, tubo<br>con<br>parafina: - | MR: -<br>VP: - | K/K, H <sub>2</sub> S:<br>-,<br>GAS:- | +       | N/N<br>H <sub>2</sub> S: - | Movilidad:<br>+<br>Indol: -<br>Ornitina:- | -    |

*Nota. Elaboración propia*

De acuerdo a la data proporcionada por la tabla 21, ambas cepas muestran un resultado positivo en la prueba de oxidación-fermentación (OF) en el tubo sin parafina, lo que indica que pueden fermentar el carbohidrato en condiciones aeróbicas, mientras que el tubo con parafina es negativo, sugiriendo que no fermentan en condiciones anaeróbicas. En la prueba de MR-VP, ambas cepas son negativas para el metilo rojo (MR: -) y para el Voges-Proskauer (VP: -), lo que indica que no producen ácidos fuertes ni acetona. Los resultados de la prueba TSI indican que ambas cepas son K/K (rojo en ambas partes), lo que sugiere que no fermentan azúcares, y tampoco producen H<sub>2</sub>S ni gas.

En las pruebas de citrato, LIA, MIO y urea, CUR-92 y CUR-44 muestran características similares. Ambas son positivas para la utilización de citrato, lo que indica que pueden utilizarlo como fuente de carbono. En la prueba LIA, ambas cepas son negativas para la descarboxilación de lisina (N/N), y en la prueba MIO son motiles, pero negativas para la producción de indol y la descarboxilación de ornitina. Por otro lado,

ambas cepas son negativas para la prueba de urea, lo que sugiere que no producen ureasa.

## **4.2 Discusión de los resultados**

En el presente estudio se evaluó la biodegradación del caucho TR utilizando consorcios microbianos extraídos de lodos residuales provenientes de la industria de curtiembre. Este enfoque es similar al empleado por diversos investigadores que han estudiado la biodegradación de materiales poliméricos mediante microorganismos. Por ejemplo, Pattanawanidchai et al. (2024) investigaron la biodegradación del caucho natural (NR) en condiciones de suelo controlado, y reportaron que las muestras con bajo contenido de curantes presentaron una rápida degradación inicial, alcanzando una biodegradación del 54 al 59% al cabo de 365 días. Estos resultados coinciden parcialmente con los obtenidos en el presente trabajo, en el cual se observó una biodegradación del 4.55% al 22.64%, dependiendo de las cepas utilizadas (*Pseudomonas* sp.) y del consorcio microbiano derivado de los lodos residuales. No obstante, se debe destacar que el tiempo de evaluación en este estudio fue de 158 días, lo que representa una diferencia temporal considerable con respecto al estudio de Pattanawanidchai et al. (2024). Estos hallazgos sugieren que la composición del consorcio microbiano influye significativamente en la eficiencia del proceso de biodegradación.

Prakash et al. (2024) analizaron la degradación bacteriana del caucho natural en un ambiente aeróbico. En su caso, se identificaron proteínas clave involucradas en la biodegradación, como las oxigenasas, responsables de la ruptura de enlaces en la cadena de carbono del caucho. En el presente estudio, los consorcios microbianos extraídos de lodos de curtiembre también mostraron capacidad para romper en los enlaces del caucho TR, aunque los detalles específicos de las proteínas involucradas no han sido estudiados y requieren un análisis más detallado. Bajo esta perspectiva, tanto el estudio de Prakash como el presente revelan el potencial de los consorcios bacterianos para degradar materiales de caucho, con la diferencia de que el enfoque del estudio actual se centra más

en la biodegradación mediada por un consorcio microbiano extraído de lodos residuales de la curtiembre en condiciones más específicas, como las de los lodos residuales de curtiembres.

Por otro lado, los estudios de Kučić Grgić et al. (2023) y Cada et al. (2019), que se centraron en la biodegradación de plásticos como el polietileno (LDPE), permiten una interesante comparación, ya que ambos emplearon consorcios microbianos para la degradación de materiales sintéticos. Kučić Grgić et al. (2023) utilizaron un consorcio bacteriano y fúngico proveniente de lodos activados para la degradación de LDPE, obteniendo pérdidas de peso de hasta 21.9% en condiciones experimentales de 60 días. Este valor se aproxima a los resultados obtenidos en el estudio presente, donde los ensayos de biodegradación mostraron una generación de CO<sub>2</sub> del 4.55% al 22.64% con respecto al total de CO<sub>2</sub> teórico, el cual es significativa en el caucho TR al ser tratado con las cepas de *Pseudomonas* y consorcios de lodo residual de curtiembres. Sin embargo, no se pudo establecer la pérdida de peso en el caso del caucho los niveles reportados por Kučić Grgić et al. para el LDPE, aunque sí establecieron el poder biodegradador de los consorcios bacterianos, lo que sugiere que, aunque el consorcio microbiano tiene un potencial considerable para la degradación, el caucho puede presentar una mayor resistencia debido a su estructura más compleja y su mayor contenido de aditivos, como los curantes.

Los estudios de Jeon et al. (2021) y Nawong et al. (2018), también son relevantes para la comparación de los resultados obtenidos. Jeon et al. (2021) estudiaron la biodegradación de polietileno y polipropileno mediante *Lysinibacillus* sp., una cepa microbiana capaz de reducir significativamente el peso de estos polímeros, alcanzando una reducción de aproximadamente 9% en 26 días. Similarmente, Nawong et al. (2018) observaron una pérdida de peso de 18% en guantes de látex de caucho tras ser tratados con un consorcio bacteriano. Aunque estos porcentajes de biodegradación son menores en comparación con los obtenidos para otros plásticos, la capacidad de los

microorganismos para modificar la estructura del caucho en ambos estudios sugiere una adaptación microbiana frente a diversos tipos de polímeros. En este contexto, el estudio actual refleja un proceso más lento pero constante, lo que podría ser atribuible a la resistencia inherente del caucho termoplástico y la posible presencia de componentes inhibidores en la muestra de caucho TR. (Akbarian-Saravi et al., 2024)

Arela et al. (2020), han demostrado la capacidad de bacterias como las del género *Pseudomonas* para degradar plásticos, reduciendo significativamente los polímeros a monómeros y luego mineralizándolos. Este hallazgo está en concordancia con los resultados obtenidos en el presente estudio, donde los consorcios microbianos aislados de lodos de curtiembres mostraron capacidad para degradar el caucho, un proceso que podría implicar una degradación similar de los polímeros presentes. La utilización de *Pseudomonas* como parte de los consorcios subraya el potencial de estos microorganismos para actuar sobre materiales resistentes como el caucho.

Por otro lado, la diferencia en la eficiencia de biodegradación observada entre los estudios anteriores y el presente puede explicarse por factores como las diferencias en la composición de los consorcios microbianos, la fuente de los lodos y las condiciones experimentales. Mientras que algunos estudios como los de Gutiérrez (2019) y Palacios y Prado (2018) muestran resultados prometedores con consorcios bacterianos en Trujillo y Arequipa, respectivamente, para la biodegradación de plásticos, el presente estudio resalta que el uso de consorcios microbianos específicos de la industria de curtiembres presenta un enfoque innovador que puede resultar en tasas de biodegradación variables, dependientes de la adaptabilidad de los microorganismos presentes en estos consorcios. Este fenómeno pone de manifiesto la necesidad de seguir investigando sobre la diversidad microbiana de lodos residuales y su aplicación en la biodegradación de polímeros industriales, como el caucho.

Estudios previos han comparado microorganismos presentes en efluentes y lodos residuales provenientes de diversas industrias, especialmente aquellos involucrados en la biodegradación de materiales sintéticos. La diversidad microbiana en estos efluentes y lodos juega un papel crucial en el proceso de biodegradación, ya que el consorcio microbiano puede incluir una amplia variedad de bacterias, hongos y otros microorganismos capaces de metabolizar una amplia gama de polímeros. Investigaciones como las de D'Souza et al. (2023) han demostrado que los microorganismos presentes en los lodos residuales no solo son capaces de descomponer plásticos comunes como el polietileno y el polipropileno, sino que también pueden atacar materiales más complejos, como el caucho, adaptándose a las condiciones ambientales y al tipo de contaminante presente. La comparación de estos consorcios microbianos extraídos de distintos orígenes permite entender mejor la interacción entre los microorganismos y los polímeros, optimizando su aplicación en procesos de biorremediación industrial.

Los consorcios microbianos muestran una notable capacidad de biodegradación de materiales sintéticos, especialmente cuando incluyen especies como *Pseudomonas*, que se han identificado como eficientes degradadoras de polímeros complejos. Estos consorcios microbianos tienen una alta capacidad de mineralización, proceso en el cual los polímeros se descomponen en sus componentes básicos, liberando CO<sub>2</sub> como producto final. En el presente estudio, se observó que los consorcios bacterianos, especialmente los que contenían especies del género *Pseudomonas*, presentaron una alta eficiencia de biodegradación, lo que se evidenció mediante la medición del volumen de CO<sub>2</sub> liberado durante el proceso. Este resultado resalta la capacidad de los microorganismos para descomponer las cadenas del caucho sintético, transformando el material en sustancias más simples y menos contaminantes, lo que sugiere un alto potencial para la aplicación de estos consorcios en la biorremediación de residuos industriales.

En relación con la hipótesis planteada, los resultados obtenidos en el presente estudio apoyan la premisa de que el uso de consorcios microbianos extraídos de lodos

residuales de la industria de curtiembre tiene un efecto significativo en la biodegradación del caucho. Los datos experimentales mostraron una biodegradación progresiva del caucho sintético, evidenciada por la pérdida de peso de las muestras y la liberación de CO<sub>2</sub>, producto de la descomposición de los polímeros. Además, se observó que la tasa de biodegradación variaba en función del consorcio microbiano utilizado, lo que sugiere que la composición específica de los microorganismos juega un papel clave en la eficiencia del proceso. Así, se confirma que los consorcios microbianos provenientes de los lodos residuales de curtiembres son efectivos en la degradación de caucho, aunque la rapidez y el grado de degradación dependen de factores como la diversidad microbiana y las condiciones experimentales.

A partir de los resultados obtenidos en este estudio, se recomienda profundizar en la investigación sobre la diversidad microbiana de los lodos residuales provenientes de la industria de curtiembre, para identificar cepas bacterianas con mayor potencial para la biodegradación de materiales complejos como el caucho. Además, sería beneficioso optimizar las condiciones experimentales, como la temperatura, el pH y la concentración de nutrientes, para acelerar el proceso de biodegradación y mejorar la eficiencia de los consorcios microbianos. También se sugiere explorar la posibilidad de aplicar estos consorcios en escalas piloto para evaluar su efectividad en condiciones más cercanas a las de un proceso industrial real. Finalmente, sería útil evaluar la interacción de los consorcios microbianos con otros tipos de polímeros utilizados en la industria, ampliando el espectro de materiales biodegradables y contribuyendo a la reducción de la contaminación ambiental generada por residuos sintéticos.

## Conclusiones

El uso de consorcios microbianos extraídos de lodos residuales de la industria de curtiembre tiene un efecto significativo en la biodegradación del caucho.

Se reportó la presencia de *Pseudomonas* Cepa CUR-44 y *Pseudomonas* Cepa CUR-92 en el consorcio microbiano extraído de lodos residuales de la industria de curtiembre.

La presencia de *Pseudomonas spp.*, tanto en solitario como siendo parte del consorcio microbiano extraído de lodos residuales de la industria de curtiembre influye significativamente en la biodegradación de caucho.

## **Recomendaciones**

Se recomienda investigar cómo las diferentes combinaciones y proporciones de los consorcios microbianos, como *Pseudomonas* cepa CUR-44 y *Pseudomonas* cepa CUR-92, afectan la tasa y la eficiencia de la biodegradación del caucho. La variabilidad en la interacción entre especies puede influir en la actividad enzimática y el metabolismo del consorcio, lo que puede mejorar o reducir el proceso de degradación.

Ampliar el estudio al identificar y caracterizar otros microorganismos presentes en los lodos residuales de la industria de curtiembre que puedan contribuir a la biodegradación del caucho.

Estudiar cómo las condiciones ambientales, como el pH, la temperatura y la concentración de nutrientes, afectan la capacidad de *Pseudomonas* cepa CUR-44 y *Pseudomonas* cepa CUR-92 para biodegradar caucho.

## Referencias bibliográficas

- Aguilar, E., Marrufo, L., & Neyra, W. (2019). Reduction of Total Chromium Levels from Raw Tannery Wastewater via Electrocoagulation using Response Surface Methodology. *Journal of Ecological Engineering*, 20(11), 217-224. <https://doi.org/10.12911/22998993/113191>
- Alarifi, I. (2023). A comprehensive review on advancements of elastomers for engineering applications. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*, 6(4), 451-464. <https://doi.org/10.1016/j.aiepr.2023.05.001>
- Alexandrescu, L., Georgescu, M., Sonmez, M., & Nituica, M. (2020). Biodegradable polymeric composite based on recycled polyurethane and rubber wastes: Material for green shoe manufacturing. *Leather and Footwear Journal*, 20(3), 323-331. <https://doi.org/10.24264/lfj.20.3.10>
- Anaya, M. (2023). *Evaluación de los efectos de microorganismos eficientes y el ph sobre el tiempo de biodegradación de lodos de aguas residuales Sapallanga-Huancayo* [Tesis de Maestría, Universidad Nacional del Centro del Perú]. <http://repositorio.uncp.edu.pe/handle/20.500.12894/10092>
- Arela, M. C., Masco, F. S., Churac, R. A. C., Rivera, J. E. V., & Calla, J. C. (2020). Biodegradación de polímeros de plástico por Pseudomonas. *Revista de Investigación Ciencia, Tecnología y Desarrollo*, 6(2), Article 2. <https://doi.org/10.17162/rictd.v6i2.1457>
- Assis, R., Suprani, C., Rodrigues, T., Cocco, S., & Veloso, T. (2023). Biodegradation of Polymers: Stages, Measurement, Standards and Prospects. *Macromol*, 3(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/macromol3020023>
- APHA, AWWA, & WEF. (2017). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (23rd ed.). American Public Health Association.
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A.,

- Macklin, J., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., ... Schlöter, M. (2020). Microbiome definition re-visited: Old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8(103), 1-22. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>
- Berry, K., Hall, N., Critchell, K., Chan, K., Bennett, B., Mortimer, M., & Lewis, P. (2023). Plastics. En A. Reichelt (Ed.), *Marine Pollution – Monitoring, Management and Mitigation* (pp. 207-228). Springer Nature Switzerland. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-10127-4\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-031-10127-4_9)
- Biswas, S. (2024). Sustainable waste management practices in the informal sector: Towards industrial symbiosis. *Environmental Research and Technology*, 7(3), Article 3. <https://doi.org/10.35208/ert.1284481>
- Britania. (2024). *MIO medio*. Laboratorios Britania S. A. [https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_6070743f4ed75.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6070743f4ed75.pdf)
- Butrón Pinazo, S. B. (2020). Capacidad de biodegradación de *Pseudomonas aeruginosa* frente al polietileno de baja densidad. *Revista de Investigaciones*, 9(3), 134–147. <https://doi.org/10.26788/riepg.v9i3.2027>
- Cada, E. J. G., Muyot, M. L. C., Sison, J. M. C., & Baculi, R. Q. (2019). *Enhanced in vitro biodegradation of low-density polyethylene using alkaliphilic bacterial consortium supplemented with iron oxide nanoparticles*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Enhanced-in-vitro-biodegradation-of-low-density-Cada-Muyot/a43dfeed6578209c427f17d3c1f4c162667f5a2e>
- Cai, Y., Suárez-Moo, P., Taboada-González, P. A., Díaz-Hernández, M. A., Ríos-Leal, E., & Taboada-González, P. A. (2023). *Biodegradation of different rubber types by microbial consortia from tannery wastewater sludge*. *Microorganisms*, 11(7), 1661. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071661>
- Cao, Z., Yan, W., Ding, M., & Yuan, Y. (2022). Construction of microbial consortia for microbial degradation of complex compounds. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1051233>

- Carreazo, D., García, L. C., Corredor, J. A., & Sastoque, J. D. (2018). Efectos en la salud asociados a la exposición ambiental a productos químicos generados en la industria del curtido en una población del barrio San Benito y su área de influencia durante el 2017. <https://repository.udca.edu.co/handle/11158/827>
- Castañeda, M. M. (2022). La cientificidad de metodologías cuantitativa, cualitativa y emergentes. *Revista Digital de Investigación en Docencia Universitaria*, 16(1), Article 1. <https://doi.org/10.19083/ridu.2022.1555>
- Chandramouli, T., Nagarathna, S., Reddy, P., & Nayak, A. (2024). Efficient biodegradation of Polyethylene terephthalate (PET) plastic by *Gordonia* sp. CN2K isolated from plastic contaminated environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 281, 116635. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.116635>
- Chavan, D. D., Khatoon, H., Anokhe, A., & Kalia, V. (2022). Oxidase test: A biochemical method in bacterial identification. *AgriCos e-Newsletter*, 3(1), 31–33. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/357604270>
- Cherkaoui, A., & Schrenzel, J. (2022). Total Laboratory Automation for Rapid Detection and Identification of Microorganisms and Their Antimicrobial Resistance Profiles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.807668>
- Chinaglia, S., Esposito, E., Tosin, M., Pecchiari, M., & Degli Innocenti, F. (2024). Biodegradation of plastics in soil: The effect of water content. *Polymer Degradation and Stability*, 222, 110691. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2024.110691>
- Chittella, H., Yoon, L. W., Ramarad, S., & Lai, Z. (2021). Rubber waste management: A review on methods, mechanism, and prospects. *Polymer Degradation and Stability*, 194, 109761. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2021.109761>
- Contreras, C., & María, A. (2022). Compendio de guías de laboratorio Microbiología bucal 202210 [Tesis de Maestría, Universidad Cooperativa de Colombia]. <https://hdl.handle.net/20.500.12494/45103>

- Ćwiertniewicz, M., Cema, G., & Ziemińska, A. (2023). Sewage sludge pretreatment: Current status and future prospects. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(38), 88313-88330. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-28613-7>
- Dimri, A. G., Chaudhary, S., Singh, D., Chauhan, A., & Aggarwal, M. (2019). Morphological and biochemical characterization of food borne Gram- positive and Gram-negative bacteria. *Science Archives*, 1(1).
- El-Sayed, M., Abdellatif, M., Mostafa, H., Elsehemy, I., & Kobisi, A. (2024). Biodegradation and antimicrobial capability-induced heavy metal resistance of the marine-derived actinomycetes *Nocardia harenae* JJB5 and *Amycolatopsis marina* JJB11. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40(7), 202. <https://doi.org/10.1007/s11274-024-04006-x>
- Empendium. (2024). Prueba de la ureasa. <https://empendium.com/manualmibe/tratado/social/chapter/B76.III.B.1.1.12>.
- EuroLab. (2024). Método de prueba estándar ASTM D5988 para determinar la biodegradación aeróbica de materiales plásticos en el suelo. <https://www.laboratuar.com/es/>
- Gary D. Christian, Química Analítica, Ed. Mc Graw Hill. 7a Edición. Mexico 2009
- Giacomucci, L., Raddadi, N., Soccio, M., Lotti, N., & Fava, F. (2020). Biodegradation of polyvinyl chloride plastic films by enriched anaerobic marine consortia. *Marine Environmental Research*, 158, 104949. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2020.104949>
- Hernández, Roberto & Mendoza Paulina. (2018). METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN: LAS RUTAS CUANTITATIVA, CUALITATIVA Y MIXTA.
- Hou, L., Xi, J., Liu, J., Wang, P., Xu, T., Liu, T., Qu, W., & Lin, Y. B. (2022). Biodegradability of polyethylene mulching film by two *Pseudomonas* bacteria and their potential degradation mechanism. *Chemosphere*, 286, 131758. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131758>

- Jee, A., Cho, Y., Granick, S., & Tlusty, T. (2018). Catalytic enzymes are active matter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(46), 10812-10821. <https://doi.org/10.1073/pnas.1814180115>
- Jeon, J.-M., Park, S.-J., Choi, T.-R., Park, J.-H., Yang, Y.-H., & Yoon, J.-J. (2021). Biodegradation of polyethylene and polypropylene by *Lysinibacillus* species JJY0216 isolated from soil grove. *Polymer Degradation and Stability*, 191, 109662. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2021.109662>
- Jia, B., Huang, H., Dong, Z., Ren, X., Lu, Y., Wang, W., Zhou, S., Zhao, X., & Guo, B. (2024). Degradable biomedical elastomers: Paving the future of tissue repair and regenerative medicine. *Chemical Society Reviews*, 53, 4086–4153. <https://doi.org/10.1039/D3CS00923H>
- Jia, C., Xie, S., Zhang, W., Intan, N. N., Sampath, J., Pfaendtner, J., & Lin, H. (2021). Deconstruction of high-density polyethylene into liquid hydrocarbon fuels and lubricants by hydrogenolysis over Ru catalyst. *Chem Catalysis*, 1(2), 437-455. <https://doi.org/10.1016/j.checat.2021.04.002>
- Joho, Y., Vongsouthi, V., Spence, M., Ton, J., Gomez, C., Tan, L., Kaczmariski, J., Caputo, A., Royan, S., Jackson, C., & Ardevol, A. (2023). Ancestral Sequence Reconstruction Identifies Structural Changes Underlying the Evolution of *Ideonella sakaiensis* PETase and Variants with Improved Stability and Activity. *Biochemistry*, 62(2), 437-450. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.2c00323>
- Kučić Grgić, D., Miloloža, M., Ocelić Bulatović, V., Ukić, Š., Slouf, M., & Gajdosova, V. (2023). Screening the efficacy of a microbial consortium of bacteria and fungi isolated from different environmental samples for the degradation of LDPE/TPS films. *Separations*, 10(2), 79. <https://doi.org/10.3390/separations10020079>
- Kabeyi, M. J. B., & Olanrewaju, O. A. (2023). Review and Design Overview of Plastic Waste-to-Pyrolysis Oil Conversion with Implications on the Energy Transition. *Journal of Energy*, 2023, e1821129. <https://doi.org/10.1155/2023/1821129>

- Kishk, M. W., Karam, H. J., Al-Qassimi, M., Al-Rowaih, A. A., Al-Wadi, M. H., & Al-Salem, S. M. (2020). Study of commercial thermoplastic biodegradable polyester resin as a solid waste mitigation route using ASTM D 5988-18. *WIT Transactions on Ecology and the Environment*, 247, 115–123. <https://doi.org/10.2495/WM200111>
- Khan, S., Nadir, S., Shah, Z. U., & Karunarathna, S. C. (2017). *Biodegradation of polyester polyurethane by Aspergillus tubingensis*. *Environmental Pollution*, 225, 469-480. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.03.012>
- Kohan, L., Martins, C., Dos Santos, H., Beserra, Brandao, F., & Baruque, J. (2020). Brazilian Sustainability Outlook in Footwear Sector. En S. Muthu (Ed.), *Leather and Footwear Sustainability: Manufacturing, Supply Chain, and Product Level Issues* (pp. 199-260). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-6296-9\\_9](https://doi.org/10.1007/978-981-15-6296-9_9)
- Kohlerschmidt, D., Mingle, L., Dumas, N., & Nattanmai, G. (2021). Identification of Aerobic Gram-Negative Bacteria. En *Practical Handbook of Microbiology* (4.a ed.). CRC Press.
- Krishna, S., Viswanath, V., Jacob, J., & Manoj, P. (2021). Rubber Economy in Digital Kerala and the Problems Faced by the Rubber Cultivators: Need for Technology-Based Interventions. 25, 1-12.
- Landrigan, P., Fuller, R., Hu, H., Caravanos, J., Cropper, M., Hanrahan, D., Sandilya, K., Chiles, T., Kumar, P., & Suk, W. (2018). Pollution and Global Health – An Agenda for Prevention. *Environmental Health Perspectives*, 126(8), 1-6. <https://doi.org/10.1289/EHP3141>
- Liang, H., Ye, D., & Luo, L. (2018). Unravelling diversity and metabolic potential of microbial consortia at each stage of leather sewage treatment. *RSC Advances*, 7(66), 41727-41737. <https://doi.org/10.1039/C7RA07470K>
- Lin, A., Liu, Q., Zhang, Y., Wang, Q., Li, S., Zhu, B., Miao, L., Du, Y., Zhao, S., & Wei, H. (2022). A Dopamine-Enabled Universal Assay for Catalase and Catalase-Like Nanozymes. *Analytical Chemistry*, 94(30), 10636-10642. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c00804>

- Marotti, A., & Pedroso, M. (2018). Applied Research Articles: Narrowing the gap between research and organizations. *Revista de Gestão*, 25(4), 338-339. <https://doi.org/10.1108/REGE-10-2018-075>
- Martín, J. (2021). 21—Bonding in the shoe industry. En R. Adams (Ed.), *Adhesive Bonding* (Second Edition) (pp. 667-717). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819954-1.00012-5>
- Ministerio del Ambiente. (2018). Cifras del mundo y el Perú. Menos Plástico Más Vida. <https://www.minam.gob.pe/menos-plastico-mas-vida/cifras-del-mundo-y-el-peru/>
- Martínez, E. H., Fuentes, J. P. E., & Acevedo, E. H. (s.f.). Carbono orgánico y propiedades del suelo. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-27912008000100006>
- Molitor, R., Bollinger, A., Kubicki, S., Loeschcke, A., Jaeger, K., & Thies, S. (2020). Agar plate-based screening methods for the identification of polyester hydrolysis by *Pseudomonas* species. *Microbial Biotechnology*, 13(1), 274-284. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13418>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.07.006>
- Nomadolo, N., Dada, O. E., Swanepoel, A., Mokhena, T., & Muniyasamy, S. (2022). A comparative study on the aerobic biodegradation of the biopolymer blends of poly(butylene succinate), poly(butylene adipate terephthalate) and poly(lactic acid). *Polymers*, 14(9), 1894. <https://doi.org/10.3390/polym14091894>
- Nordin, S., Azid, A., Lananan, F., Samsudin, M., & Wahab, N. (2020). The Population of Airborne Microorganisms and the Presence of *Staphylococcus aureus* in Cattle Farm at Ladang Pasir Akar. *Journal Of Agrobiotechnology*, 11(1S), Article 1S. <https://doi.org/10.37231/jab.2020.11.1S.231>

- Padilla Pajoy, C., Mozo Venera, L., & Torrenegra Valencia, S. . Estandarización de HCl y NaOH. Universidad del Atlántico, Facultad de Educación, Laboratorio de Química Inorgánica.
- Pattanawanidchai, S., Saeoui, P., Leejarkpai, T., Pokphat, P., Jiangchareon, B., Thuanboon, S., Boonyuen, N., Suriyachadkun, C., & Boonmee, C. (2024). An Assessment of Biodegradability and Phytotoxicity of Natural Rubber in a Simulated Soil Condition via CO<sub>2</sub> Evolution Measurement. *Polymers*, 16(17), Article 17. <https://doi.org/10.3390/polym16172429>
- Pinizzotto, S., Kadir, A., Gitz, A., Sainte, J., Nair, L., Gohet, E., Penot, E., & Meybeck, A. (2021). Natural rubber and climate change: A policy paper. CIFOR.
- Prakash, T., Yadav, S., Bürger, M., & Jendrosseck, D. (2024). Cleavage of natural rubber by rubber oxygenases in Gram-negative bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1), 191. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12940-3>
- Ricky, R., Shanthakumar, S., Ganapathy, G., & Chiampo, F. (2022). Zero Liquid Discharge System for the Tannery Industry—An Overview of Sustainable Approaches. *Recycling*, 7(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/recycling7030031>
- Rosendo, D., Sousa, I., Dutra, E., Furtado, A., Augusto, A., & Guimarães, C. (2023). Biodegradation of natural rubber latex films by highlighting the crosslinked bond. *Industrial Crops and Products*, 204, 117290. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117290>
- Roy, B., Das, T., & Bhattacharyya, S. (2023). Overview on Old and New Biochemical Test for Bacterial Identification. *Scholastic*, 1, 23-28.
- Ruginescu, R., & Purcarea, C. (2024). Plastic-Degrading Enzymes from Marine Microorganisms and Their Potential Value in Recycling Technologies. *Marine Drugs*, 22(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/md22100441>
- Saeed, A., Yasmin, A., Baig, M., Khan, K., Heyat, M., Akhtar, F., Batool, Z., Kazmi, A., Wahab, A., Shahid, M., Ahmed, M., Abbas, S., Muaad, A., Shahzad, A., & Ahmad, I. (2023). Isolation and Characterization of *Lactobacillus crispatus*, *Lactococcus*

- lactis*, and *Carnobacterium divergens* as Potential Probiotic Bacteria from Fermented Black and Green Olives (*Olea europaea*): An Exploratory Study. *BioMed Research International*, 2023(1), 8726320. <https://doi.org/10.1155/2023/8726320>
- Salas, L. (2020, noviembre 2). Al año se producen 1,4 millones de toneladas de plástico en Perú. *Peru21*. <https://peru21.pe/economia/al-ano-se-producen-14-millones-de-toneladas-de-plastico-en-peru-cifras-del-reciclaje-solo-el-15-del-plastico-que-se-desecha-al-ano-asociacion-civil-reciclame-grupo-gea-residuos-solidos-informalidad-ncze-noticia/>
- Sanchez, A., Bajic, D., Diaz, J., Skwara, A., Vila, J., & Kuehn, S. (2023). The community-function landscape of microbial consortia. *Cell Systems*, 14(2), 122-134. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2022.12.011>
- Sarkar, B., Gupta, A., Shah, M., & Mandal, S. (2022). Poly-cis-isoprene Degradation by *Nocardia* sp. BSTN01 Isolated from Industrial Waste. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 194(8), 3333-3350. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-03854-3>
- Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D., Hall, L., Burmølle, M., Stewart, P., & Bjarnsholt, T. (2022). The biofilm life cycle: Expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, 20(10), 608-620. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>
- Sethulekshmi, A., Saritha, A., & Joseph, K. (2022). A comprehensive review on the recent advancements in natural rubber nanocomposites. *International Journal of Biological Macromolecules*, 194, 819-842. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.134>
- Sevilla, M., Garcia, M., Perez, Y., Armijos, V., Casado, S., Vizuite, K., Debut, A., & Cerda, L. (2023). Degradation of PET Bottles by an Engineered *Ideonella sakaiensis* PETase. *Polymers*, 15(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/polym15071779>
- Shah, H. H., Amin, M., Iqbal, A., Nadeem, I., Kalin, M., Soomar, A. M., & Galal, A. M. (2023). A review on gasification and pyrolysis of waste plastics. *Frontiers in Chemistry*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2022.960894>

- Shatti, H., Al Saeed, W., & Nader, M. (2022). Effect Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* Resistance To Antibiotic. *Mustansiriya Medical Journal*, 21(1), 13. [https://doi.org/10.4103/MJ.MJ\\_11\\_21](https://doi.org/10.4103/MJ.MJ_11_21)
- Shilpa, Basak, N., & Meena, S. (2024). Biodegradation of low-density polythene (LDPE) by a novel strain of *Pseudomonas aeruginosa* WD4 isolated from plastic dumpsite. *Biodegradation*, 35(5), 641-655. <https://doi.org/10.1007/s10532-023-10061-2>
- Sekhar, V. C., Nampoothiri, K. M., Mohan, A. J., & Bhaskar, T. (2016). *Microbial degradation of high impact polystyrene (HIPS), an e-plastic with decabromodiphenyl oxide and antimony trioxide. Journal of Hazardous Materials*, 318, 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.07.008>
- Silva, R. R. A., Suprani, C., Arruda, T., Cocco, S., & Veloso, T. (2023). Biodegradation of Polymers: Stages, Measurement, Standards and Prospects. *Macromol*, 3(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/macromol3020023>
- Soares, F., & Steinbüchel, A. (2022). Natural rubber degradation products: Fine chemicals and reuse of rubber waste. *European Polymer Journal*, 165, 111001. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111001>
- Song, J., Xu, M., Liu, W., Wang, X., Xu, P., Huang, F., & Pan, Y. (2019). Thermoplastic Rubber (TPR) Modified by a Silane Coupling Agent and Its Influence on the Mechanical Properties of Oil Well Cement Pastes. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2019(1), e3587081. <https://doi.org/10.1155/2019/3587081>
- Srikanth, M., Sandeep, T., Sucharitha, K., & Godi, S. (2022). Biodegradation of plastic polymers by fungi: A brief review. *Bioresources and Bioprocessing*, 9(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00532-4>
- Steleescu, M., Sonmez, M., Alexandrescu, L., Nituica, M., Gurau, D., & Georgescu, M. (2022). Structure and properties of blends based on vulcanized rubber waste and styrene–butadiene–styrene thermoplastic elastomer. *Journal of Rubber Research*, 25(5), 421-434. <https://doi.org/10.1007/s42464-022-00187-y>

- Thakwani, Y., Karwa, A., Kumar BG, P., Purkait, M. K., & Changmai, M. (2023). A composite starch-date seeds extract based biodegradable film for food packaging application. *Food Bioscience*, 54, 102818. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102818>
- TM Media. (2023). TM 171 – LYSINE IRON AGAR [Informe técnico]. <https://www.tmmedia.in/wp-content/uploads/TD/TD-TM-171.pdf>
- Torres, G. B., Hiranobe, C., Da Silva, E., Cardim, G., Cardim, H., Cabrera, F., Lozada, E., Gutierrez, C., Sánchez, J., Jaramillo, J., Job, A., & Santos, R. (2023). Eco-Friendly Natural Rubber–Jute Composites for the Footwear Industry. *Polymers*, 15(20), Article 20. <https://doi.org/10.3390/polym15204183>
- Vijayaraj, A. S., Mohandass, C., Joshi, D., & Rajput, N. (2018). Effective bioremediation and toxicity assessment of tannery wastewaters treated with indigenous bacteria. 3 *Biotech*, 8(10), 428. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1444-3>
- Wahart, A., Staniland, J., Miller, G., & Cosgrove, S. (2022). Oxidase enzymes as sustainable oxidation catalysts. *Royal Society Open Science*, 9(1), 211572. <https://doi.org/10.1098/rsos.211572>
- Wang, H., Guan, F., Zhu, Y., Pan, Y., Liu, Q., Liu, Q., He, W., Gong, D., Tian, J., & Han, D. (2023). Biofilm formation promoted biodegradation of polyethylene in *Gordonia polyisoprenivorans* B251 isolated from bacterial enrichment acclimated by hexadecane for two years. *Chemosphere*, 344, 140383. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.140383>
- Wu, T., Li, H., & Zhang, Y. (2024). *Biodegradation: The best solution to the world problem of discarded polymers. Bioresources and Bioprocessing*, 11, 79. <https://doi.org/10.1186/s40643-024-00793-1>
- Yang, G., & Wang, J. (2020). Biohydrogen production from waste activated sludge pretreated by combining sodium citrate with ultrasonic: Energy conversion and microbial community. *Energy Conversion and Management*, 225, 113436. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2020.113436>

- Yildirim, E., & Aksoy, S. A. (2024). *Recent developments in synthesis, properties, applications and recycling of bio-based elastomers*. *Molecules*, 29(2), 387.  
<https://doi.org/10.3390/molecules29020387>
- Zhang, Z., Zhang, Q., Yang, H., Cui, L., & Qian, H. (2024). Mining strategies for isolating plastic-degrading microorganisms. *Environmental Pollution*, 346, 123572.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123572>

## **Anexos**

|                                                                                   |   |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---|
| <b>Anexo 1:</b> Informe de ensayo de suelo.....                                   | 1 |
| <b>Anexo 2:</b> ASTM D5988-18: biodegradación aeróbica de plásticos en suelo..... | 4 |
| <b>Anexo 3:</b> Ensayo de humedad del suelo según NOM-021-RECNAT-2000 .....       | 9 |

## Anexo 1:

### Informe de ensayo de suelo



## INFORME DE ENSAYO N°: IE-22-16294

N° Id.: 0000059971

### I. DATOS DEL SERVICIO

1.-RAZON SOCIAL : INSTITUTO TECNOLÓGICO DE LA PRODUCCION  
2.-DIRECCIÓN : AV. REPÚBLICA DE PANAMÁ OFICINA 501 NRO. 3418 URB. LIMATAMBO  
3.-PROYECTO : ANÁLISIS DE SUELO  
4.-PROCEDENCIA : ENSAYOS DE BIODEGRADABILIDAD  
5.-SOLICITANTE : INSTITUTO TECNOLÓGICO DE LA PRODUCCION  
6.-ORDEN DE SERVICIO N° : 0000003880-2022-0000  
7.-PROCEDIMIENTO DE MUESTREO : NO APLICA  
8.-MUESTREO POR : EL CLIENTE  
9.-FECHA DE EMISIÓN DE INFORME : 2022-10-03

### II. DATOS DE ÍTEMS DE ENSAYO

1.-PRODUCTO : Suelos  
2.-Sub.Tipo producto : Para Cultivo Permanente  
3.-NÚMERO DE MUESTRAS : 1  
3.-FECHA DE RECEP. DE MUESTRA : 2022-09-20  
4.-PERÍODO DE ENSAYO : 2022-09-20 al 2022-10-03



Firma Digital

Firmado digitalmente por MARRUFO  
SALDANA Libera Del Rosario FAU  
20191369477 hash  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 04.10.2022 09:14:51 -0500

Eder Sergio Recuay Granados  
Supervisor de laboratorio Agronomía  
Ing. Químico  
CIP N° 221809



Los resultados contenidos en el presente documento sólo están relacionados con los ítems ensayados. No se debe relacionar con otros ítems de ensayo, excepto en su totalidad, sin la aprobación escrita de Analytical Laboratory E.I.R.L. Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Su adulteración o su uso indebido constituye delito contra la fe pública y se regula por las disposiciones civiles y penales en la materia.

**INFORME DE ENSAYO N°: IE-22-16294**

N° Id.: 0000059971

**III. MÉTODOS Y REFERENCIAS**

| TIPO DE ENSAYO                                | NORMA DE REFERENCIA                                                                                                      | TÍTULO                                                               |
|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| pH (Extracto 1:1) en Suelos <sup>2</sup>      | MVAL-AGR-01. 2022                                                                                                        | Determinación de pH.                                                 |
| Capacidad de Campo (C.C.) <sup>1,3</sup>      | Smith Alfred 1917, Relation of the mechanical analysis to the moisture equivalent of soils, Soil Sci 4,471- 476. (P.M.P) | Determinación del Punto de Marchitez Permanente (P.M.P)              |
| Ceniza <sup>1,3</sup>                         | NORMA MEXICANA NMX-AA-16-1984                                                                                            | Determinación de Humedad en Residuos Sólidos                         |
| Porosidad <sup>1,3</sup>                      | Métodos de análisis para suelos plantas y aguas Homer Chapman                                                            | Determinación Caliza Activa                                          |
| Preparación de Muestras Suelos <sup>1,3</sup> | Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, AS-01, Ítem 7.1.1                                                            | Preparación de Suelos Agrícolas                                      |
| Carbono Orgánico Total <sup>1,3</sup>         | Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, AS-07, Ítem 7.1.7                                                            | Método de Walkley y Black                                            |
| Nitrógeno Total <sup>1,3</sup>                | NOM-021-AS 08/SMWEE Part 4500 NH3 D, 4500NO2B, 4500NO3 E                                                                 | Nitrógeno Total - Suelo                                              |
| Textura <sup>1,3</sup>                        | Manual de Procedimientos de los Análisis de Suelos y Agua con Fines de Riego, Ítem 3,4                                   | Método del Hidrómetro de Bouyoucos (Arena, Arcilla, Limo y Textura). |

<sup>1</sup>NOM : Norma Oficial Mexicana

<sup>2</sup> Ensayo acreditado por el IAS

<sup>3</sup> El Ensayo Indicado no ha sido acreditado

**INFORME DE ENSAYO N°: IE-22-16294**

N° Id.: 000059971

**IV. RESULTADOS**

| ITEM                                                    |              |        |        | 1                        |
|---------------------------------------------------------|--------------|--------|--------|--------------------------|
| CÓDIGO DE LABORATORIO:                                  |              |        |        | M-22-49514               |
| CÓDIGO DEL CLIENTE:                                     |              |        |        | MUESTRAS DE SUELO 220809 |
| COORDENADAS:                                            |              |        |        | NO APLICA                |
| UTM WGS 84:                                             |              |        |        | NO APLICA                |
| PRODUCTO:                                               |              |        |        | SUELOS                   |
| INSTRUCTIVO DE MUESTREO:                                |              |        |        | NO APLICA                |
| FECHA y HORA DE MUESTREO :                              |              |        |        | 20-09-2022               |
| ENSAYO                                                  | UNIDAD       | L.D.M. | L.C.M. | RESULTADOS               |
| pH (Extracto 1:1) en Suelos *                           | Unidad de pH | NA,    | 0,01   | 7,39                     |
| Capacidad de Campo (C.C.) (**)                          | %            | 0,03   | 0,10   | 9,30                     |
| Ceniza (**)                                             | %            | 0,03   | 0,10   | 88,6                     |
| Porosidad (**)                                          | %            | 0,01   | 0,10   | 33,8                     |
| Preparación de Muestras Suelos (**)                     | no unidad    | NA,    |        | FINALIZADO               |
| Carbono Orgánico Total (**)                             | %            | 0,04   | 0,10   | 10,78                    |
| Nitrógeno Total (**)                                    | mg/Kg        | 50     | 150    | 9 930                    |
| Textura                                                 |              |        |        |                          |
| 1. Arena (2 - 0.05 mm Diámetro de Partícula) (**)       | %            | NA,    | NA,    | 80                       |
| 2. Arcilla (0.05 - 0.002 mm Diámetro de Partícula) (**) | %            | NA,    | NA,    | 5                        |
| 3. Limo (< a 0.002 mm Diámetro de Partícula) (**)       | %            | NA,    | NA,    | 15                       |
| 4. Clase Textural (**)                                  | no unidad    | NA,    | NA,    | A                        |

(\*) El Ensayo indicado no ha sido acreditado

(2) Ensayo acreditado por el IAS

L.C.M.: Límite de cuantificación del método, \*&lt;= Menor que el L.C.M.

L.D.M.: Límite de detección del método, \*&lt;= Menor que el L.D.M.

A = Arena; A.Fr. = Arena Franca; Fr.A. = Franco Arenoso; Fr. = Franco; Fr.L. = Franco Limoso; L = Limoso; Fr.Ar.A = Franco Arcillo Arenoso; Fr.Ar. = Franco Arcilloso; Fr.Ar.L. = Franco Arcillo Limoso; Ar.A. = Arcillo; Arenoso; Ar.L. = Arcillo Limoso; Ar. = Arcilloso

**V. OBSERVACIONES**

Los resultados se aplican a la muestra cómo se recibió.

"FIN DE DOCUMENTO"

## Anexo 2:

### ASTM D5988-18: biodegradación aeróbica de plásticos en suelo



Designation: D5988 – 18

## Standard Test Method for Determining Aerobic Biodegradation of Plastic Materials in Soil<sup>1</sup>

This standard is issued under the fixed designation D5988; the number immediately following the designation indicates the year of original adoption or, in the case of revision, the year of last revision. A number in parentheses indicates the year of last reapproval. A superscript epsilon ( $\epsilon$ ) indicates an editorial change since the last revision or reapproval.

### 1. Scope\*

1.1 This test method covers determination under laboratory conditions of the degree and rate of aerobic biodegradation of plastic materials, including formulation additives, in contact with soil.

1.2 This test method is designed to measure the biodegradability of plastic materials relative to a reference material in an aerobic environment.

1.3 This test method is designed to be applicable to all plastic materials that are not inhibitory to the bacteria and fungi present in soil.

1.4 Claims of performance shall be limited to the numerical result obtained in the test and not be used for unqualified “biodegradable” claims. Reports shall clearly state the percentage of net gaseous carbon generation for both the test and reference samples at the completion of the test. Results shall not be extrapolated beyond the actual duration of the test.

1.5 The values stated in SI units are to be regarded as the standard.

1.6 *This standard does not purport to address all of the safety concerns, if any, associated with its use. It is the responsibility of the user of this standard to establish appropriate safety, health, and environmental practices and determine the applicability of regulatory limitations prior to use. A specific hazard statement is given in Section 8.*

1.7 This ASTM test method is equivalent to ISO 17556.

1.8 *This international standard was developed in accordance with internationally recognized principles on standardization established in the Decision on Principles for the Development of International Standards, Guides and Recommendations issued by the World Trade Organization Technical Barriers to Trade (TBT) Committee.*

<sup>1</sup> This test method is under the jurisdiction of ASTM Committee D20 on Plastics and is the direct responsibility of Subcommittee D20.96 on Environmentally Degradable Plastics and Biobased Products.

Current edition approved April 1, 2018. Published April 2018. Originally approved in 1996. Last previous edition approved in 2012 as D5988 - 12. DOI: 10.1520/D5988-18.

### 2. Referenced Documents

#### 2.1 ASTM Standards:<sup>2</sup>

D425 Test Method for Centrifuge Moisture Equivalent of Soils

D618 Practice for Conditioning Plastics for Testing

D883 Terminology Relating to Plastics

D1193 Specification for Reagent Water

D1293 Test Methods for pH of Water

D2974 Test Methods for Moisture, Ash, and Organic Matter of Peat and Other Organic Soils

D2980 Test Method for Saturated Density, Moisture-Holding Capacity, and Porosity of Saturated Peat Materials

D2989 Test Method for Acidity-Alkalinity of Halogenated Organic Solvents and Their Admixtures

D4129 Test Method for Total and Organic Carbon in Water by High Temperature Oxidation and by Coulometric Detection

D4972 Test Method for pH of Soils

D5338 Test Method for Determining Aerobic Biodegradation of Plastic Materials Under Controlled Composting Conditions, Incorporating Thermophilic Temperatures

D5511 Test Method for Determining Anaerobic Biodegradation of Plastic Materials Under High-Solids Anaerobic-Digestion Conditions

#### 2.2 APHA-AWWA-WPCF Standards:<sup>3</sup>

2540 D Total Suspended Solids Dried at 103°–105°C

2540 G Total, Fixed, and Volatile Solids in Solids and Semi-Solid Samples

#### 2.3 ISO Standard:<sup>4</sup>

ISO 11261 Soil Quality—Determination of Total Nitrogen—Modified Kjeldahl Method

ISO 17556 Plastics—Determination of the Ultimate Aerobic

<sup>2</sup> For referenced ASTM standards, visit the ASTM website, [www.astm.org](http://www.astm.org), or contact ASTM Customer Service at [service@astm.org](mailto:service@astm.org). For Annual Book of ASTM Standards volume information, refer to the standard's Document Summary page on the ASTM website.

<sup>3</sup> Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 17th Edition, 1989, Available from American Public Health Association (APHA), 800 I St., NW, Washington, DC 20001, <http://www.apha.org>.

<sup>4</sup> Available from American National Standards Institute (ANSI), 25 W. 43rd St., 4th Floor, New York, NY 10036, <http://www.ansi.org>.

\*A Summary of Changes section appears at the end of this standard

Copyright © ASTM International, 100 Barr Harbor Drive, PO Box C700, West Conshohocken, PA 19428-2959, United States

# Biodegradability of Plastic Materials in Soil by Measuring the Oxygen Demand in a Respirometer or the Amount of Carbon Dioxide Evolved

## 3. Terminology

3.1 *Definitions*—Definitions of terms applicable to this test method appear in Terminology D883.

## 4. Summary of Test Method

4.1 The test method described consists of the selection of plastic material for the determination of aerobic biodegradability, obtaining soil as a matrix and source of inoculum, exposing the plastic material to the soil, measuring the carbon dioxide evolved by the microorganisms as a function of time, and assessing the degree of biodegradability.

4.2 The CO<sub>2</sub> production measured for a material, expressed as a fraction of the measured or calculated carbon content, is reported with respect to time, from which the degree of biodegradability is assessed.

4.3 Alternatively, it is possible to determine the consumption of oxygen, or biochemical oxygen demand (BOD), for example, by measuring the amount of oxygen required to maintain a constant gas volume in the respirometer flask, or by measuring the change in volume or pressure (or a combination of the two) either automatically or manually. The level of biodegradation expressed in percent is determined by comparing the BOD with the theoretical oxygen demand (ThOD). In using this alternative approach, however, the influence of possible nitrification processes on the BOD must be considered.

## 5. Significance and Use

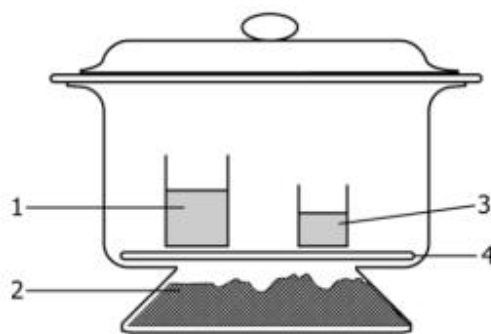
5.1 The degree and rate of aerobic biodegradability of a plastic material in the environment determines the extent to which and time period over which plastic materials are mineralized by soil microorganisms. Disposal is becoming a major issue with the increasing use of plastics, and the results of this test method permit an estimation of the degree of biodegradability and the time period over which plastics will remain in an aerobic soil environment. This test method determines the degree of aerobic biodegradation by measuring evolved carbon dioxide as a function of time that the plastic is exposed to soil.

5.2 Soil is an extremely species-rich source of inoculum for evaluation of the biodegradability of plastics in the environment. When maintained appropriately with regard to moisture content and oxygen availability, the biological activity is quite considerable, although lower than other biologically active environments, such as activated sewage-sludge or compost.

## 6. Apparatus

6.1 *Soil-Contact Incubation Apparatus* (see Fig. 1; biometer flasks are also appropriate). Ensure that all glassware is thoroughly cleaned and, in particular, free from organic or toxic matter.

6.1.1 *Vessels*, a set of vessels with approximately 2 to 4-L of internal volume with air-tight seal, such as 150-mm desicca-



NOTE 1—(1) Barium hydroxide solution or potassium hydroxide solution, (2) soil, (3) water, and (4) perforated plate.

FIG. 1 Soil-Contact Incubation Apparatus

tors. Provide three vessels for soil only (known as “blanks” or “controls,” these vessels show the background activity of the soil), three vessels for a positive reference material (these vessels show the viability of the soil microbial community), three vessels per test material, and three vessels as technical controls. The technical controls contain only the absorbing solution and no soil. The ambient air which fills the headspace of all the vessels introduces carbon dioxide into the system. The technical controls allow accounting for and subtracting this introduced carbon dioxide. Additionally, the technical controls indicate the air-tightness of the vessel system by showing possible infiltration of carbon dioxide into the sealed vessel.

6.1.2 *Beakers*, sets of 150-mL and 100-mL, equal in number to the soil incubation vessels.

6.1.3 *Perforated Plates or Other Support*, a set to hold the beakers above the soil inside each vessel. The support must be made from a material that will not absorb carbon dioxide.

6.1.4 *Darkened Chamber or Cabinet*, which allows selection of a temperature between 20°C to 28°C, and allows maintaining the selected temperature at  $\pm 2^\circ\text{C}$ .

### 6.2 Analytical Equipment:

6.2.1 *Analytical Instrument*, to measure the total carbon content of the test specimen.

6.2.2 *Analytical Balance*, to weigh the test specimen.

6.2.3 *Burette*, 100 mL.

6.2.4 *Bench-Top Centrifuge*, for moisture-holding capacity (MHC) determination.

6.2.5 *Oven*, set to  $104 \pm 1^\circ\text{C}$  for moisture determinations.

6.2.6 *Muffle Furnace*, set to  $550^\circ\text{C}$  for ash determinations.

6.2.7 *pH Meter*.

6.3 Alternatively, it is acceptable to use a flow-through apparatus or manometric apparatus as described in ISO 17566.

## 7. Reagents and Materials

7.1 *Purity of Reagents*—Reagent grade chemicals shall be used in all tests. Unless otherwise indicated, it is intended that all reagents conform to the specifications of the Committee on Analytical Reagents of the American Chemical Society where

such specifications are available.<sup>5</sup> It is acceptable to use other grades, provided it is first ascertained that the reagent is of sufficiently high purity to permit its use without lessening the accuracy of the determination.

7.2 *Ammonium Phosphate*,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 4.72 g/L.

7.3 *Barium Hydroxide Solution* (0.025 N), prepared by dissolving 4.0 g anhydrous  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ /L of distilled water. Filter free of solid material, confirm normality by titration with standard acid, and store sealed as a clear solution to prevent absorption of  $\text{CO}_2$  from the air. It is recommended that 5 to 20 L be prepared at a time when running a series of tests. When using  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ , however, care must be taken that a film of  $\text{BaCO}_3$  does not form on the surface of the solution in the beaker, which would inhibit  $\text{CO}_2$  diffusion into the absorbing medium. Alternatively, it is acceptable to use potassium hydroxide solution (KOH, 0.5 N), prepared by dissolving 28 g of anhydrous KOH/L of distilled water and proceeding in the same way as for the  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ .

7.4 *Hydrochloric Acid*, 0.05 N HCl when using 0.025 N  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ , or 0.25 N HCl when using 0.5 N KOH.

## 8. Hazards

8.1 This test method includes the use of hazardous chemicals. Avoid contact with chemicals and follow the manufacturer's instructions and material safety data sheets.

## 9. Soil

9.1 Use natural, fertile soil collected from the surface layers of fields and forests. Make a laboratory mixture of equal parts (by weight) of soil samples obtained from at least three diverse locations (for example, an agricultural field, a forest, and a pasture or meadow). Taking soil from multiple and diverse locations will maximize biodiversity. It is advisable to avoid soils that have been exposed to pollutants that cause significant perturbations of the microbial population. The soils are preferably used fresh from the field to assure active microbiota. Air-dried or frozen soils must be reactivated before use in this test. It is preferable to use fertile soil classified as "sandy loam" in accordance with USDA classification, or "silty sand" in accordance with the German DIN classification.

9.2 The sources of the soils must be reported (see 14.1.1). Record the sampling site, its location, the presence of plants or crops, the sampling date, the sampling depth, and, if possible, the history such as details of fertilizer and pesticide application.

9.3 Sieve the soil to less than 2-mm particle size, and remove obvious plant material, stones, or other inert materials. Store the soil in a sealed container at  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  for a maximum of one month.

<sup>5</sup> *Reagent Chemicals, American Chemical Society Specifications*, American Chemical Society, Washington, DC. For suggestions on the testing of reagents not listed by the American Chemical Society, see *Analar Standards for Laboratory Chemicals*, BDH Ltd., Poole, Dorset, U.K., and the *United States Pharmacopeia and National Formulary*, U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. (USPC), Rockville, MD.

9.4 Analyze the soil for MHC by Test Method D425, Test Method D2980, or another analogous test method for MHC or field capacity.

9.5 Determine the pH of the soil on a 5:1 (distilled water:soil) slurry using a glass combination electrode calibrated with standard buffers, following the guidelines given in Test Method D1293. Alternatively, it is acceptable to determine the soil pH by Test Method D4972. The pH must fall between 6.0 and 8.0. (Soil with a pH above 8.0 retains more of the  $\text{CO}_2$  evolved by the microorganisms than a neutral soil, while a soil with a pH below 6.0 has the potential to contain an atypical microbial population.)

9.6 Determine the moisture (total solids—dry solids) and ash (total solids—volatile solids) contents of the soil in accordance with Test Method D2974 or APHA-AWWA-WPCF 2540 D and G, respectively.

9.7 Determine total nitrogen in accordance with ISO 11261 or equivalent method.

9.8 It is acceptable for the test matrix to be a mixture of natural soil, as described in 9.1, and mature compost, such as obtained at the end of Test Method D5338, at a ratio of 1 g compost to 25 g soil, which corresponds to a typical application in agriculture of approximately 120 tons of compost per hectare of agricultural land (assuming 20 cm of soil depth and a bulk density of  $1.5 \text{ Mg m}^{-3}$ ).

## 10. Test Specimen

10.1 Test specimens shall be of known weight and have sufficient carbon content to yield enough carbon dioxide that can be measured accurately by the trapping procedure described in this test method (see 11.7 and 11.9). Determine the carbon content of the test material by calculation or elemental analysis, in accordance with Test Method D4129.

10.2 It is acceptable for test specimens to be in the form of films, pieces, fragments, powders, or formed articles, or in aqueous solution, in accordance with Practice D618. It is recommended, but not required, to characterize any test specimens in the form of powders as to particle size distribution by sieve analysis.

## 11. Procedure

11.1 The test shall be performed in triplicate for each of the technical control, soil blank, positive reference material, and test materials (triplicate for each test material).

11.2 Place between 100 and 500 g of soil in the bottom of the vessel.

11.3 Amend the soil with nitrogen to give a C:N of between 10:1 and 20:1 (by weight) to the added carbon in the test specimen by adding the appropriate volume of ammonium phosphate solution. Add the same amount of nitrogen to the soil blanks as to those that will receive a test material or positive reference material.

11.4 Add distilled water, prepared in accordance with Specification D1193, to bring the moisture content to 80 to 100 % of the MHC of the soil (if the MHC is determined in accordance

with Test Method **D425**; if in accordance with Test Method **D2989**, then 50 to 70 % of MHC is appropriate).

11.5 Record the weight of the vessel and lid (with the necessary amount of vacuum grease to seal air-tight) with amended soil.

11.6 Add the test material or positive reference material to the soil (approximately 200 mg to 1000 mg carbon for 500 g soil), and mix thoroughly into the soil.

11.7 Place 100 mL of 0.025 N barium hydroxide solution in a 150-mL beaker (or 20 mL of 0.5 N KOH in a 100-mL beaker) and 50 mL of distilled water in a 100-mL beaker on the perforated plate inside the vessel; seal the vessel and place it in the dark chamber or cabinet.

11.8 Select a temperature between 20 to 28°C, and maintain that temperature at  $\pm 2^\circ\text{C}$ .

#### 11.9 Carbon Dioxide Analysis:

11.9.1 The carbon dioxide produced in each vessel reacts with  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  and is precipitated as barium carbonate ( $\text{BaCO}_3$ ). The amount of carbon dioxide produced is determined by titrating the remaining barium hydroxide with 0.05 N hydrochloric acid to a phenolphthalein end-point or by automatic titrator. Because of the static incubation, the barium carbonate builds up on the surface of the liquid and must be broken up periodically by shaking the vessel gently to ensure continued absorption of the evolved carbon dioxide. (This problem is avoided by using KOH instead of  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ , which does not form a precipitate.)

11.9.2 The barium hydroxide traps must be removed and titrated before their capacity is exceeded. Considering that a 150-mm desiccator vessel provides approximately 2000  $\text{cm}^3$  headspace, which under standard conditions contains approximately 18.7 mmol  $\text{O}_2$ , then 100 mL  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  has the capacity to trap approximately 2.5 mmol  $\text{CO}_2$ . Therefore, assuming a respiratory quotient of 1.0, the  $\text{O}_2$  content of the vessel headspace will never fall below approximately 18 % if the trap is changed before saturation is reached. The period of time will vary with soils and test materials and increases slowly as the carbon content of the soil is reduced. The recommended frequency is every 3 to 4 days for the first 2 to 3 weeks and every 1 to 3 weeks thereafter. At the time of removal of the traps, weigh the vessel to monitor moisture loss from the soil and then allow it to sit open so that the air in the vessel is refreshed, before replacing 100 mL of fresh barium hydroxide and resealing the vessel. Allow the vessels to remain open a minimum of 15 min and a maximum of 1 hour. Add distilled or deionized water back periodically to the soil to maintain the initial weight of the vessel.

11.10 The cumulative carbon dioxide evolution reaches a plateau when all of the accessible carbon has been oxidized. Continue the incubation until no net carbon dioxide production is noted between consecutive measurements taken four weeks apart, from both the positive reference material and test material vessels. At the conclusion of the test, measure and record the pH and the moisture and ash contents of the soil. Extract any residual test material from the soil with an appropriate solvent and quantify (optional).

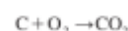
11.11 In the steps described in 11.7 and 11.9, it is acceptable to trap carbon dioxide by KOH and determine by titration the carbon dioxide produced.

11.12 Alternatively, for measuring the oxygen consumption, take the necessary readings on the manometers (for a manual system) or verify that the recorder of oxygen consumption functions properly (for an automatic respirometer).

## 12. Calculation

12.1 Determine, by calculation (if the chemical composition is well established) or by elemental analysis, the total organic carbon content of the test material. This allows the theoretical quantity of carbon dioxide evolution to be calculated as illustrated by the following:

$$\begin{aligned} \text{material} &= w \% \text{ carbon; } w/100 \times \text{mg of material charged} \\ &= Y \text{ mg carbon charged to vessel:} \end{aligned} \quad (1)$$



$$12 \text{ g C yields } 44 \text{ g CO}_2$$

$$Y \text{ mg C yields } \frac{44 \times Y}{12} \text{ mg CO}_2$$

#### 12.2 Amount of Net Carbon Dioxide Produced:

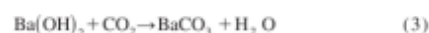
12.2.1 Correct for the carbon dioxide produced in the blank by subtracting titration from the test material titration.

$$Z_a = Z_b - Z_i \quad (2)$$

where:

- $Z_n$  = calculated mL of HCl needed to titrate the  $\text{CO}_2$  generated solely from the test material,
- $Z_b$  = mL HCl used to titrate the blank vessels with soil only, and
- $Z_i$  = mL HCl used to titrate the vessels containing the soil plus test material.

Then:



$$\text{m moles of CO}_2 = \frac{\text{m moles HCl}}{2}$$

(The total  $\text{CO}_2$  generated is determined by using the technical control as  $Z_b$  and the test material or blank as  $Z_i$ .)

#### 12.2.2 Correcting for Normality of HCl:

$$\text{m moles CO}_2 = \frac{(0.05 \text{ N} \times \text{mL HCl})}{2} \quad (4)$$

$$\text{mg of CO}_2 = \frac{(0.05 \text{ N}) \times \text{mL HCl} \times 44}{2}$$

Hence, carbon dioxide evolved in mg is obtained by multiplying the HCl titration by 1.1.

12.3 The percentage of carbon dioxide evolved is calculated as shown below:

$$= \frac{\text{mg CO}_2 \text{ produced}}{\text{mg CO}_2 \text{ theoretical}} \times 100 \quad (5)$$

$$= \frac{1.1 \text{ w mL HCl} \times 12}{44 \times Y} \times 100$$

12.4 Calculate the standard error,  $s_e$ , of the percentage of biodegradation as follows:

$$s_e = \text{SQRT}((s^2_{\text{rep}}/n1) + (s^2_{\text{blank}}/n2)) \times 100/C_i \quad (6)$$

where:

$n1$  and  $n2$  = number of replicate test material and blank vessels, respectively,

$s$  = standard deviation of the total gaseous carbon produced (mg), and

$C_i$  = amount of carbon (mg) initially added to the vessel.

12.5 Calculate the 95 % confidence limits (CL) as follows:

$$95 \% \text{ CL} = \% \text{ biodegradation} \pm (t \times s_e) \quad (7)$$

where:

$t$  =  $t$ -distribution value for 95 % probability with  $(n1 + n2 - 2)$  degrees of freedom, thus  $t = 3 + 3 - 2 = 4$ .

12.6 *Percentage of biodegradation from oxygen consumption values* Read the oxygen consumption value for each flask, using the method provided by the manufacturer for the appropriate type of respirometer. Calculate the specific biochemical oxygen demand (BODs) of the test compound as shown below:

$$= \frac{B_t - B_{bt}}{C_T} \quad (8)$$

where:

$B_t$  = the BOD of the flasks containing test material at time  $t$ , in milligrams per kg (mg/kg) of the test soil,

$B_{bt}$  = the BOD of the flasks containing soil only at time  $t$ , in milligrams per kg (mg/kg) of the test soil, and

$C_T$  = the concentration of the test material in the test flasks, in milligrams per kg (mg/kg) of the test soil.

Calculate the percentage of biodegradation as the ratio of the specific biochemical oxygen demand to the theoretical oxygen demand (ThOD), in mg/g of test material, as shown below:

$$= \frac{\text{BODs}}{\text{ThOD}} \times 100 \quad (9)$$

### 13. Interpretation of Results and Validity Criteria

13.1 Information on toxicity of the plastic material is useful in the interpretation of low results.

13.2 This test method includes the use of a reference material known to biodegrade (for example, starch or cellulose) in order to check the activity of the soil. If, after six months, limited biodegradation (<70 % theoretical CO<sub>2</sub> evolution) is observed for this reference material, the test must be regarded as invalid and must be repeated using fresh soil.

13.3 The amounts of carbon dioxide evolved from the blanks (or the BOD values for the alternative measurement of oxygen consumption) shall be within 20 % of the mean at the

plateau phase or at the end of the test. If not, the test must be regarded as invalid and must be repeated using fresh soil.

13.4 The plateau level of carbon dioxide evolution in this test method and, optionally, the quantified residual test material will suggest the degree of biodegradability of the plastic material.

### 14. Report

14.1 Report the following data and information:

14.1.1 Information on the soil, including source, pH, percent moisture (and determination method used), MHC (and determination method used), ash content, C:N ratio, date of collection, storage conditions, handling, and potential acclimation to test material.

14.1.2 Carbon content or theoretical oxygen demand of the plastic material.

14.1.3 Form or particle size distribution (if determined for powder) of the plastic materials.

14.1.4 Cumulative average carbon dioxide evolution over time to plateau, reported and displayed graphically since lag-phase and slope (rate) are important.

14.1.5 Percentages of theoretical aerobic biodegradation for each plastic material tested and the positive reference material.

14.1.6 Temperature range of the test.

14.1.7 pH of the soil, initially and finally.

14.2 Report the following optional data and information, if determined:

14.2.1 Residual weight of the test material.

14.2.2 Microorganisms per gram in the original soil.

14.2.3 Molecular weight of the plastic material.

14.2.4 Molecular weight of the residual polymeric material after the test.

### 15. Precision and Bias

15.1 Results for within-laboratory repeatability testing are presented in Table 1. These data represent three different determinations of the biodegradation of cellulose as a positive reference. The average biodegradation of cellulose after four months of soil contact in the dark at a constant temperature of 21°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) was 89.4 %, with an average standard deviation of 2.4 %. Figure 2 represents a graphical view of the first run, in which a biodegradability of 87.2 % was obtained as the mean for the three replicates, with a standard deviation of 2.2 %.

### 16. Keywords

16.1 aerobic; biodegradation; degree (of biodegradation); mineralization; plastics; soil

**TABLE 1 Results from Within-Laboratory Testing for the Aerobic Biodegradability of Cellulose Positive Reference under Soil Contact Conditions**

| Run                | Net CO <sub>2</sub> production (mg/g test item) | Biodegradation (%) |                    |
|--------------------|-------------------------------------------------|--------------------|--------------------|
|                    |                                                 | Average            | Standard Deviation |
| Run 1              | 1359                                            | 87.2               | 2.2                |
| Run 2              | 1469                                            | 94.3               | 2.4                |
| Run 3              | 1322                                            | 86.6               | 2.5                |
| Mean of three runs | 1383                                            | 89.4               | 2.4                |

### Anexo 3:

#### Ensayo de humedad del suelo según NOM-021-REC/NAT-2000

**7.1.5.** La determinación del contenido de humedad del suelo por gravimetría, se realizará a través del método AS-05.

##### Principio y aplicación

Método gravimétrico para la determinación del contenido de humedad de los suelos, sean estos orgánicos o minerales. El método se basa en la medición o determinación de la cantidad de agua expresada en gramos que contiene una muestra de suelo. Esta masa de agua se referencia de la masa de suelo seco de la muestra. La determinación de la masa de agua se realiza por la diferencia en peso entre la masa de suelo húmedo y la masa de suelo seco. Se considera como suelo seco aquél secado a la estufa a 105°C hasta obtener un peso constante.

##### Material y equipo

Botes de aluminio para humedad

Estufa con circulación forzada de aire y temperatura controlada

Balanza con aproximación de 0.01 g

Pinzas

Desecador

##### Procedimiento

1. Lave y limpie perfectamente e identifique los botes de aluminio a utilizar.
2. Los botes con todo y tapa introdúzcalos a la estufa durante 8 horas como mínimo a una temperatura de 105°C posteriormente registre el peso y vuelva a introducir los botes a la estufa hasta que se logre un peso constante en las muestras, todo este procedimiento previo al enfriamiento de los botes que se colocan en un desecador.
3. Utilizando las pinzas, saque los botes del desecador de vacío hasta que se enfríen y péselos con todo y tapa, éste será el peso del bote (PB).
4. Obtenga la muestra deseada, se recomienda sean de 30 a 50 gramos, aproximadamente, y colóquela en el bote de aluminio, en caso de que la muestra vaya a ser transportada es necesario tapar y sellar herméticamente el bote con parafilm.
5. Pese el bote con el suelo húmedo, este peso deberá ser el peso del bote más el suelo húmedo (PB + Psh).
6. Destape el bote con el suelo húmedo, coloque la tapa en la parte inferior e introdúzcalo a la estufa a una temperatura de 105°C.
7. Después de 24 horas saque el bote de la estufa tápelo y colóquelo en el desecador de vacío hasta que se enfríe, posteriormente pese el bote con la muestra seca, este peso será el peso del bote más el peso del suelo seco (PB + Pss).
8. Vuelva a introducir el bote a la estufa y una hora después sáquelo, enfríe en un desecador y pese; repetir este procedimiento hasta obtener el peso constante.

##### Cálculos

Con los datos obtenidos en el procedimiento, aplicar la siguiente ecuación:

$$\theta \text{ g} = \frac{(P B + P s h) - (P B + P s s)}{(P B + P s s) - P B} \times 100$$

Donde:

###g = Contenido de humedad gravimétrica expresado en porcentaje (%).

PB = Peso del bote con tapa (g).

Psh = Peso de suelo húmedo (g).

PB+Psh = Peso del bote más peso del suelo húmedo (g).

PB + Pss = Peso del bote más peso del suelo seco (g).

##### Comentarios

En muestras de suelos orgánicos, el secado a 105°C puede producir pérdida de masa por oxidación y volatilización de componentes orgánicos. Sin embargo bajo este método esto es inevitable.

El método gravimétrico tiene la ventaja de ser simple y no utilizar equipo sofisticado. La desventaja es que las mediciones no son *in situ* y el muestreo es destructivo al sitio.

**7.1.6.** La determinación de la curva de retención de humedad por el método del plato y membrana de presión se realizará a través del método AS-06.