

## EVALUACIÓN PRELIMINAR DE UNA ALTERNATIVA MICROBIANA PARA EL TRATAMIENTO DE NEUMÁTICOS EN DESUSO

SEMILLERO BIOTECAMBIAL

PROYECTO CURRICULAR INGENIERÍA AMBIENTAL

**Autores:** Eduardo Ruíz Molina - eduardoruizmolina@gmail.com  
Claudia E. García Flórez - cegf1023@gmail.com

**Docente tutor:** Miguel Ángel Piragauta Aguilar



### **Palabras clave**

*Biodegradación, xenobiótico, caucho, vulcanizado, microorganismo, residuo.*

Históricamente el caucho ha sido utilizado desde la época precolombina y su uso llegó a extenderse con el redescubrimiento de la especie *Hevea brasiliensis*, la cual fue cultivada en el Lejano Oriente, convirtiéndose en la cuna de las primeras industrias de caucho. Con la llegada del automóvil y la bicicleta, se incrementó la demanda de las llantas a finales del siglo XIX (Bekkedahl, 2012). El desarrollo más significativo del material se dio en 1839, cuando Charles Goodyear descubre accidentalmente el proceso de *vulcanización*, en el cual el caucho es sometido a un tratamiento térmico en presencia de azufre confiriendo al material mayor resistencia y elasticidad (Bailey & Bailey, 1998).

En la actualidad, el aumento en el uso de los neumáticos, ha suscitado gran preocupación a nivel mundial; teniendo en cuenta que un neumático tiene una vida útil aproximada de 6 a 10 años, requiriendo un cambio constante, razón por la cual son desechados y reemplazados, la mayoría de veces de forma descontrolada. En Colombia se desechan 61 mil toneladas al año, de estos un 72% es dispuesto como desecho o incinerado, un 17% es re-

encauchado, un 6% tiene un uso artesanal y un 5% tiene otros usos (Vásquez, 2011).

La alta producción de neumáticos como consecuencia del incremento del parte automotor en las grandes ciudades y su difícil tratamiento, una vez se encuentran en desuso, han desatado una gran problemática ambiental a nivel mundial. En el caso particular de Bogotá, se estima que solo el 20% de las más de dos millones de llantas descartadas anualmente son recicladas (El Tiempo, 2013).

---

---

***"La evaluación de la adaptabilidad de diferentes microorganismos frente el caucho vulcanizado, permitió obtener los primeros indicios de degradación del material a partir del desarrollo microbiano, sirviendo como base para el desarrollo de una alternativa de tratamiento biotecnológico para este complejo residuo proveniente de los neumáticos usados"***

---

---

Pese a los esfuerzos realizados, el tratamiento de este residuo continúa siendo complejo, pues puede persistir en el ambiente durante más de 500 años, siendo muy difícil de biodegradar. Las medidas que se han aplicado para el tratamiento post-consumo involucran altos costos tanto económicos, como energéticos, y a su vez estos procesos pueden producir efectos colaterales derivados, como daño paisajístico, inestabilidad química, emisiones (en el caso de la quema de neumáticos para producción de energía), entre otros (Cedrón & Mosquera, 2004). Por otro lado, es importante tener en cuenta que la vida útil del material tarde o temprano caducará, llegando a un punto en que se haga imposible su reutilización.

De acuerdo a lo anterior, se evidencia que hasta ahora se han aplicado tratamientos físicos y químicos para tratar los neumáticos desechados, pero faltan estudios en el campo biotecnológico, lo cual motivó al desarrollo de este proyecto, en donde se propone el estudio de microorganismos capaces de adaptarse y biodegradar total o parcialmente el caucho vulcanizado, lo cual puede convertirse en una alternativa más limpia para su tratamiento.

## Métodos

La presente investigación fue desarrollada en las instalaciones de Tecnoparque SENA-Nodo Bogotá, donde se brindaron los espacios y elementos necesarios para el desarrollo del proyecto, así mismo, se contó con el apoyo del Centro de Investigaciones y Desarrollo Científico (CIDC) quien aportó un porcentaje para la financiación del proyecto a través de su Convocatoria 003 de 2014. El trabajo tuvo como objetivo aislar diferentes

microorganismos a partir de muestras de composición similar al caucho vulcanizado de los neumáticos, y evaluar la capacidad de adaptabilidad de dichos microorganismos sobre el caucho vulcanizado, al ser utilizado como sustrato de crecimiento y única fuente de carbono, determinando de esta manera los cambios físicos y/o químicos sufridos por el material y sirviendo como evidencia de un proceso degradativo.

El proyecto se desarrolló en dos fases principales: Durante la primera fase se realizó la recolección de los microorganismos y fueron aislados en medios nutritivos, para ser sembrados posteriormente en otros medios de sales minerales y caucho (Caldo caucho) como única fuente de carbono, dispuestos en un bioreactor a escala de laboratorio con agitación orbital a 150 rpm y una temperatura de 28,2°C, de donde se seleccionaron las cepas que mostraron mayor adaptabilidad al medio. Fue necesario realizar un pretratamiento al caucho vulcanizado para eliminar las sustancias inhibitoras del crecimiento microbiano, para lo cual se probaron dos métodos, el primero con acetona durante 7 días, realizando una renovación diaria de la sustancia (Berekaa, Linos, Reichelt, Keller, & Steinbüchel, 2000) y el segundo con una solución de HCl al 10M, durante 7 días y el cual no requirió cambios. Posteriormente, las muestras de caucho (Láminas de 1x0,5 cm) fueron observadas con un microscopio de fluorescencia para determinar los cambios sufridos sobre la superficie del material.

La segunda fase consistió en elegir los microorganismos que generaron mayores cambios en el material, teniendo en cuenta el cambio de peso sufrido por las láminas de caucho y los cambios en su textura, observada mediante microscopio de fluorescencia. A partir de estas pruebas se eligieron dos cepas para realizar los

ensayos de biodegradabilidad de la lámina de caucho, cambios en su textura, observada mediante microscopio de fluorescencia. A partir de estas pruebas se eligieron dos cepas para realizar los ensayos de biodegradabilidad de la lámina de caucho, evaluando el crecimiento microbiano mediante conteo de viables para el hongo *Penicillium citrinum* y espectrofotometría para la bacteria *Ochrobactrum tritici*, por un periodo de 20 días, con el fin de determinar la cinética microbiana; las pruebas se realizaron en medios de caucho pretratado y caucho sin pretratar, así como se inóculo un medio con Sales Minerales, con el fin de descartar crecimiento microbiano en ausencia del sustrato de caucho. Posteriormente, se aplicaron las pruebas de biodegradabilidad mediante el análisis de cambio de peso seco del caucho, Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), cambio de pH y pruebas metabólicas (Schiff) para determinar la formación de aldehídos (Tsuchii & K., 1990). Finalmente, se realizó la identificación de los microorganismos mediante pruebas de PCR.

**Pretatamiento del caucho:** Se eligió el HCl para el pretratamiento del caucho, ya que mediante las pruebas de microscopía se evidenció agrietamiento superficial del caucho y cambio de color, mostrando unas partículas de tono amarillo probablemente por la exposición de las partículas de azufre, siendo un método que no se había estudiado con anterioridad y que no resulta tan contaminante como la acetona, pues se producen menos residuos y es más sencillo de tratar una vez usado.

**Selección del inóculo:** Las pruebas de adaptación microbiana al medio de caucho como única fuente de carbono, permitió distinguir 6 cepas principalmente, 5 bacterias y

un hongo (Tabla 1), que de manera individual se adaptaron al medio y propiciaron cambios en la textura y el peso seco del caucho, las cepas que más se destacaron fueron el hongo *P. citrinum*, y la bacteria *O. tritici*, referenciada en la bibliografía por ser útil en procesos de biodegradación de hidrocarburos. Las alteraciones observadas en el caucho fueron contrastadas con la muestra control que consistió en una lámina de caucho tratada con HCl, sin intervención microbiana. Las pruebas microscópicas revelaron la formación de grietas y alteraciones significativas en la superficie del material y cambio de color, con una pérdida de peso del 16,6% para *P. citrinum* y una pérdida de peso del 8,8% para *O. tritici*, el cual mostró cambios relevantes en el material con la formación de fisuras cortas y pronunciadas.

**Crecimiento microbiano: *Ochrobactrum tritici*:** La concentración del inóculo inicial para los medios de 150 mL, fue de  $66,7 \times 10^6$  cel/mL. Los datos de conteo obtenidos para la cepa *O. tritici*, hacen evidente la influencia del medio sobre el crecimiento del microorganismo, observando que el crecimiento en presencia de sustrato tanto en el caldo caucho pretratado, como el caucho sin pretratar alcanzó  $9,1 \times 10^9$  UFC/mL y  $7,0 \times 10^9$  UFC/mL respectivamente, frente a  $1,8 \times 10^4$  UFC/mL de crecimiento microbiano en el medio con sólo sales mínimas, probablemente por el impulso de peptona, lo cual se traduce en que el microorganismo *O. tritici*, no presenta crecimiento en ausencia de sustrato, lo que lo obliga a adaptarse al medio caucho para aprovecharlo como única fuente de carbono. (Figura 1)

***Penicillium citrinum*:** Por medio del conteo de viables realizado para cuantificar el crecimiento del hongo, se determinó que

Tabla 1. Resultado de identificación molecular de microorganismos

| TIPO                                 | N. | GENERO/<br>ESPECIE   | MUESTRA<br>ORIGEN                  | ANTECEDENTES  | REFERENCIA-<br>DO EN   |
|--------------------------------------|----|--|------------------------------------|---|--|
| B<br>A<br>C<br>T<br>E<br>R<br>I<br>A | 1  | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> o <i>Pseudomonas hibiscicola</i> | Lodo de hidrocarburo               | Genero evaluado por su capacidad para degradar PAH's (Hidrocarburos aromáticos policíclicos).       | (Bautista, Sanz, Molina, González, & Sánchez, 2009)  |
|                                      | 2  | <i>Acinetobacter johnsonii</i>                                       | Agua contaminada con hidrocarburos | <i>Acinetobacter</i> sp. ha sido descrita como degradadora de caucho en términos de peso molecular. | (Bode, Kerkhoff, & Jendrossek, 2001)   |
|                                      | 3  | <i>Microbacterium oxydans</i>  | Raspado de caucho de neumático     | Se encontró que el microorganismo <i>Microbacterium</i> sp. es capaz de realizar biodesulfuración.  | (Li, Zhang, Wang, & Shi, 2005)   |
|                                      | 4  | <i>Rhodococcus</i> sp.   | Raspado de caucho de neumático     | Estudiada con anterioridad por su capacidad de biodegradar caucho natural, sintético y vulcanizado. | (Holst, Stenberg, & Christiansson, 1998)   |
|                                      | 5  | <i>Ochrobactrum tritici</i>  | Agua contaminada con hidrocarburos | Se ha estudiado su utilidad como biosurfactante y desulfurador de hidrocarburos y carbón.           | (Lingling, Zao-sheng, Min, & Xiangli, 2010)<br>(Kumara, Sujithaa, Mamidyalab, & Usharanic, 2014) |
|                                      | 6  | <i>Penicillium citrinum</i>  | Lodo                               | Se ha estudiado el <i>Penicillium</i> sp, por su capacidad de degradar caucho natural y sintético.  | (Linos, Reichelt, Keller, & Steinbüchel, 2000)   |

Fuente: Autores, 2015

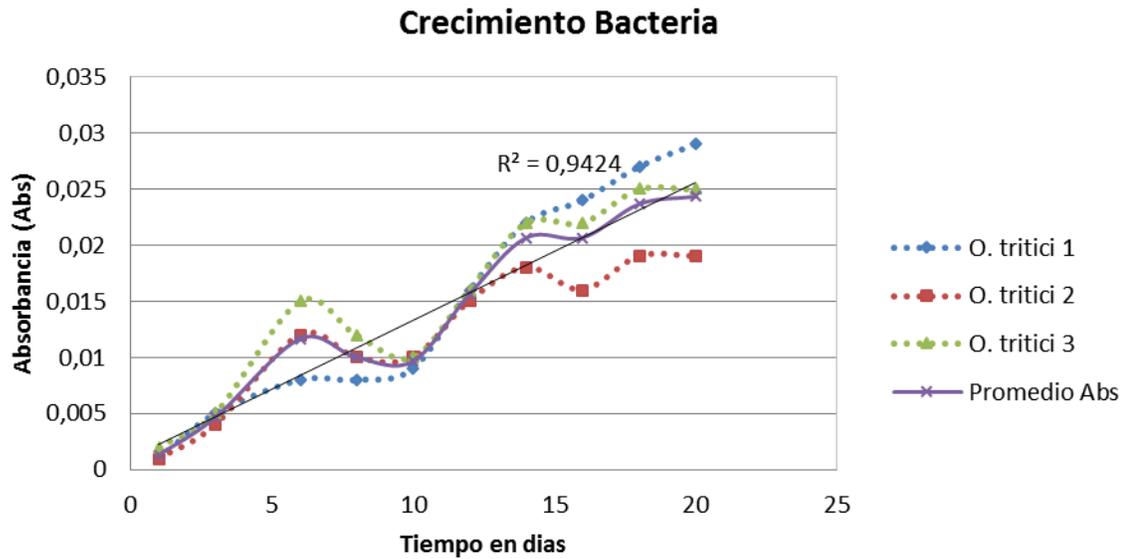
el desarrollo en presencia del sustrato (caldo caucho) se da en mayor proporción (108), respecto al blanco. De esta forma, se observa un crecimiento en el medio de sales mínimas en ausencia de sustrato, pero registra un comportamiento diferente a partir del día 8, en que continua creciendo pero de forma muy lenta en comparación con el medio suplementado con caucho, esto pudo deberse al impulso de peptona obtenido durante el pase del hongo desde el agar nutritivo al Caldo

Caucho.

**Evaluación de biodegradabilidad:** Prueba metabólica: La prueba de Schiff realizada para las muestras de caucho tratadas microbiológicamente, demostró la formación de aldehídos en una concentración de 50 ppm (Troyer D. , 1996), evidenciado en la formación de un halo magenta, frente a la muestra blanco que no evidenció halo coloreado, lo cual es un indicio de degradación microbiana (Tsuchii & K., 1990).

1

*Ochrobactrum tritici*



2

*Penicillium citrinum*

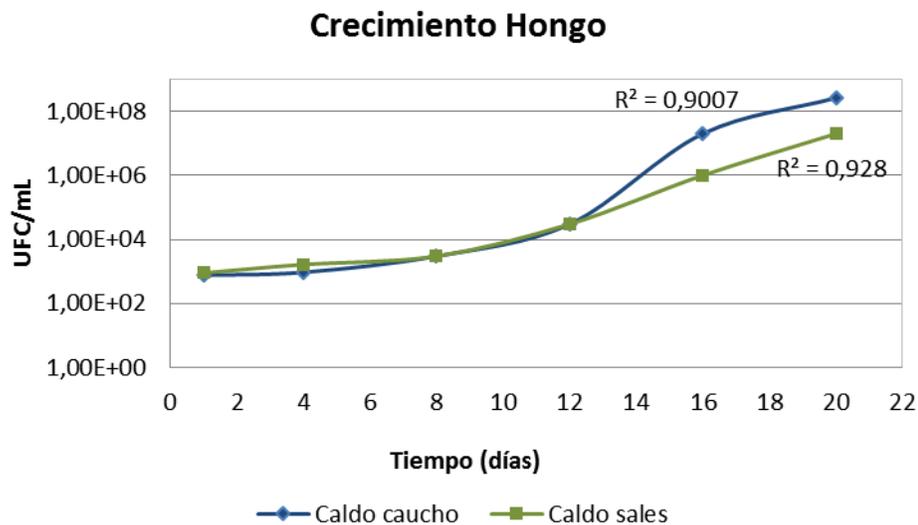


Figura 1. Curvas de crecimiento de microorganismos en periodo de 21 días

Fuente: Autores, 2015

**Peso seco:** Las muestras de caucho pretratado en presencia del microorganismo *O. tritici*, presentaron una diferencia de pérdida de peso del 2,6%, de lo cual se infiere que la ausencia de pretratamiento inhibe el aprovechamiento y desarrollo microbiano en el sustrato. Por otro lado, la muestra tratada con *P. citrinum*, presentó un comportamiento similar al tratamiento bacteriano, demostrando mayor pérdida de peso en las láminas de caucho tratadas previamente con HCl, teniendo una diferencia del 4% de pérdida de peso, frente a la muestra no tratada. Por último, la muestra control demuestra que en ausencia de microorganismo no se generan cambios relevantes en el peso.

**Análisis SEM:** La observación del material a través de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) mostró desgaste y cambio de textura en la superficie de la lámina de caucho vulcanizado, así como cambios en la coloración provocada por el tratamiento microbiano, dichos cambios fueron más relevantes en el caucho pretratado con HCl y se evidenció mayor impacto en las láminas tratadas con *P. citrinum* (Figura 2). La disminución de las partículas blancas en el caucho también se explica por el consumo de partículas de látex y azufre presente en el materia

**Cambio de pH:** Se trabajó un pH inicial neutro (7,0) para todos los medios. La muestra control no registro cambios, lo que permite interpretar que la variación del pH, se encuentra relacionada con la actividad metabólica en el medio. Se obtuvo una leve disminución en el nivel del pH al final de los tratamientos microbianos, especialmente en los medios con sustrato de caucho pretratado (pH= 0,39- 0,62). Esto debido a la posible liberación de ácidos, así como el consumo de los hidrocarburos presentes en el caucho vulcanizado liberando iones H<sup>+</sup> (Rook, 1955).

La cinética microbiana de consumo de sustrato se realizó con base en el modelo de Monod, teniendo en cuenta la pérdida de peso del material y el crecimiento microbiano, se calculó la velocidad de consumo, estimando que en condiciones ideales el sustrato (lámina de caucho) puede llegar a degradarse en un tiempo estimado de 1 año para el hongo *P. citrinum* y hasta 11 años para la bacteria *O. tritici* en caucho pretratado, dicha degradación se da en función del área de exposición. A partir de esta investigación se logran obtener 6 cepas potencialmente útiles para el proceso biodegradativo de caucho vulcanizado. En estudios posteriores se recomienda evaluar la interacción entre especies, con el fin de lograr un proceso más eficiente.

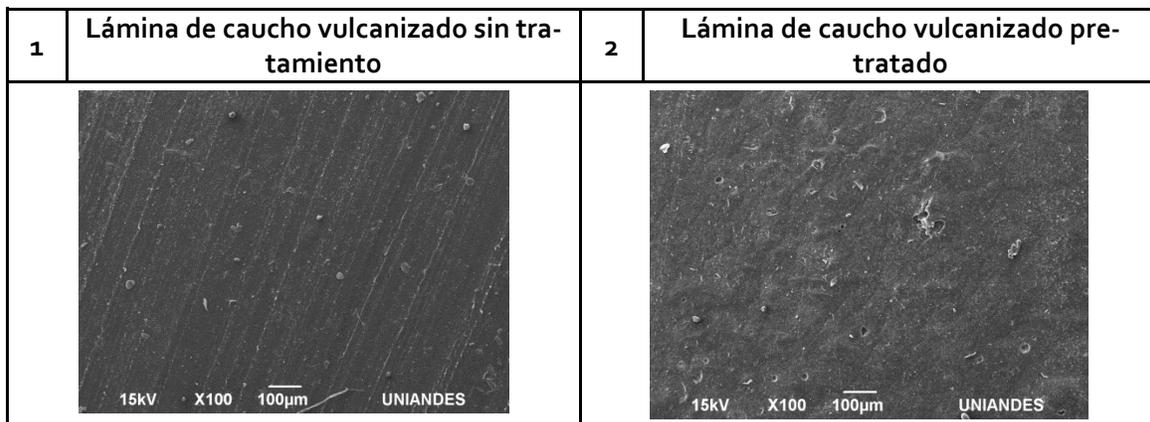
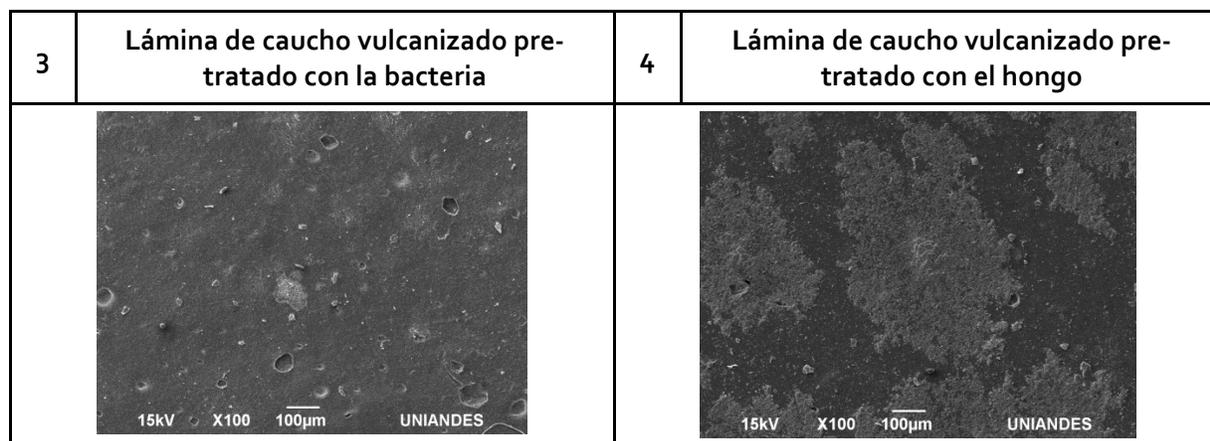


Figura 2. Láminas de caucho vulcanizado observadas mediante SEM. Enfoque panorámico de 100X.



Fuente: Autores (con colaboración de Laboratorio MEB, Uniandes), 2015

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Bailey, P. & Bailey, C.** (1998). Química orgánica: conceptos y aplicaciones. México: Prentice Hall.

**Bekkedahl, N.** (2012). Caucho natural y Caucho sintético. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín, 53-64.

**Berekaa, M., Linos, A., Reichelt, R., Keller, U. & Steinbüchel, A.** (2000). Effect of pre-treatment of rubber material on its biodegradability by various rubber degrading bacteria. FEMS Microbiology Letters, 199- 206.

**Cedron, A. & Mosquera, X.** (2004). Impacto ambiental por neumáticos usados. Cuenca, Ecuador: Universidad Politécnica Salesiana, Escuela de Ingeniería Mecánica Automotriz.

**El Tiempo.** (12 de Julio de 2013). Este es el destino final de las llantas de su vehículo. El Tiempo. Sección vehículos.

**Rook, J. J.** (1955). Microbiological Deterioration of Vulcanized Rubber. Netherlands: Technological University.

**Troyer, D.** (1996). Practicing Oil Analysis. Noria Corporation.

**Tsuchii, A., & K., T.** (1990). Rubber-degrading enzyme from a bacterial. Applied and Environmental Microbiology, 56:269–274.

**Vásquez, M.** (13 de Mayo de 2011). Las llantas viejas con un problema ambiental "radial". El Tiempo, Sección Vehículos.