

**Hongos filamentosos potencialmente degradadores de
caucho de neumático colectados en la vía Bogotá-
Fusagasugá, Colombia.**



Salomé Gómez Gómez

Presentado como requisito parcial para optar por el título de:

BIÓLOGA

Bajo la dirección de:

Luis David Gómez Méndez

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BIOLOGÍA

Bogotá, D.C

2019

Hongos filamentosos potencialmente degradadores de caucho de neumático colectados en la vía Bogotá- Fusagasugá, Colombia.

Salomé Gómez-Gómez, Luis David Gómez-Méndez

RESUMEN

El caucho de neumático (CN) es un material sumamente recalcitrante que sin embargo puede ser biodegradado. Este proceso incluye biodeterioro, depolimerización y asimilación, siendo mejorado con la detoxificación del material. Se exploró el potencial de biodegradación del caucho en hongos filamentosos aislados de neumáticos deteriorados. Su crecimiento fue evaluado en agar neumático a concentraciones (m/v) de 0.6, 1.5, 15, 45, 100 % y en medio líquido al 0.8 %. El mejor crecimiento se dio a 15 %, posiblemente por un equilibrio entre la fuente de carbono y la toxicidad del material. Seis morfotipos crecieron significativamente a 100 %, y cuatro tuvieron un pH especialmente ácido en medio líquido, sugiriendo capacidad de solubilizar metales. Todos mostraron potencial de biodeterioro al crecer sobre el polímero. La aptitud de acidificar de *Curvularia* sp. 2 y su crecimiento en agar neumático al 100 %, la hacen de especial interés, junto a cuatro morfotipos de *Trichoderma*, cuyo buen crecimiento en todas las concentraciones y reportes previos de degradación de otros polímeros sugieren gran potencial para despolimerizar y asimilar CN.

INTRODUCCIÓN

Los riesgos ambientales asociados con el caucho de neumáticos y su eliminación son preocupaciones mundiales importantes. Esto se debe a que su compleja estructura tridimensional, composición y aditivos los hacen imposibles de reciclar directamente ([Gent & Walter, 2006](#)), además de resistentes a la degradación natural ([Stevenson, Stallwood & Hart, 2008](#)), causando su acumulación.

Miles de millones de neumáticos desechados se encuentran en basureros de todo el mundo y se agregan cientos de millones cada año, que representan riesgos para la salud humana y el medio ambiente ([Shah, Hasan, Shah, Kanwal & Zeb, 2013](#)). Mientras los vertederos para la disposición segura de los residuos de caucho alcanzan su límite, la eliminación indiscriminada de estos causa problemas de contaminación de agua y suelo. Además, la quema de desechos de caucho genera

una gran cantidad de calor y humo, contribuyendo a uno de los factores principales del calentamiento global y contaminación del aire (Stevenson et al., 2008).

Los neumáticos normalmente se fabrican con una mezcla de caucho natural y caucho sintético (Holst, Stenberg & Christiansson, 1998). A esta mezcla se adicionan distintos compuestos para incrementar la fuerza, la resistencia a la abrasión y otorgar al neumático otras propiedades deseadas por los fabricantes (Akca, Gursel & Sen, 2018). La mezcla de caucho debe ser vulcanizada para que sea fuerte y elástica en un amplio rango térmico (Holst et al., 1998). La vulcanización es un proceso termoquímico que involucra reacciones complejas entre polímeros de caucho, azufre y productos auxiliares (Aprem, Joseph, Mathew, Altstaedt & Thomas, 2003), otorgando al polímero su estructura tridimensional (Akca et al., 2018). Pese a que existen otros métodos de vulcanización, la termoquímica es la empleada para la fabricación de neumáticos (Chengalroyen & Dabbs, 2013). Durante este proceso, las cadenas de poli-cis-1,4-isopreno del caucho se unen covalentemente a través de puentes de sulfuro, siendo las insaturaciones en el polímero las que proporcionan los sitios para la vulcanización (Holst et al., 1998).

Pese a su compleja composición, el caucho de los neumáticos puede ser degradado (Stevenson et al., 2008). La biodegradación de los materiales poliméricos incluye el biodeterioro (cambios iniciales en el material por los microorganismos que crecen en su superficie), la depolimerización (rompimiento enzimático del polímero en oligómeros, dímero y monómeros) y la asimilación (entrada de los compuestos a la célula para su metabolización) (Lucas et al., 2008). Para que esto ocurra biológicamente, la detoxificación y devulcanización del caucho son procesos cruciales ya que facilitan también la acción de los microorganismos.

La devulcanización implica la desulfuración del material, es decir, el rompimiento de los enlaces de azufre entre las cadenas de carbonos del caucho (Asgher, Bhatti, Ashraf & Legge, 2008). Este proceso es clave porque la formación de los puentes de azufre durante la vulcanización disminuye los sitios accesibles donde los microorganismos pueden romper las cadenas del polímero, reduciendo su biodegradabilidad (Stevenson et al., 2008). La biodevulcanización (o biodesulfuración) es un proceso biológico, alternativo a los procesos químicos, en el que la

eliminación del azufre de las moléculas orgánicas es llevada a cabo por microorganismos y/o enzimas extraídas de ellos (Akca et al., 2018). Esto es posible debido a que existen organismos capaces de romper los enlaces azufre-azufre y azufre-carbono, entre los que se destacan varias especies de bacterias y archaeas (Holst et al., 1998).

Se encuentran también reportes de hongos, particularmente los de pudrición blanca y café como *Ceriporiopsis subvermispora*, capaces de devulcanizar el caucho (Sato et al., 2004). La desulfuración microbiana es una forma prometedora de aumentar el reciclaje de materiales de caucho, sin embargo, varios organismos usados para la devulcanización son sensibles a los aditivos presentes en este sustrato (Christiansson, Stenberg, & Holst, 2000), como las sales y óxidos de zinc (Stevenson et al., 2008), metales pesados como Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, y Pb (Fukuzaki, Yanaka & Urushiyama, 1986), o hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) (Llompart et al., 2013) que inhiben el crecimiento de microorganismos y disminuyen aún más la biodegradabilidad de los neumáticos (Chengalroyen & Dabbs, 2013).

La detoxificación consiste en la remoción de los compuestos nocivos adicionados al caucho, permitiendo realizar posteriormente la devulcanización y biodegradación del neumático (Stevenson et al, 2008). Este proceso es imperativo porque aumenta la susceptibilidad del caucho a la biodegradación, además de reducir los peligros ambientales asociados con su eliminación (Bredberg, Andersson, Landfors & Holst, 2002). Distintas especies de hongos tienen la capacidad de degradar compuestos aromáticos que se encuentran en el caucho y han sido utilizados con éxito para detoxificar el material (Stevenson et al, 2008), entre ellos *Recinicium bicolor* (Bredberg et al. 2002). Se sabe, además, que hongos y bacterias pueden degradar caucho tanto natural como sintético y emplearlo como fuente de carbono (Imai et al., 2011). La habilidad de estos microorganismos para degradar polímeros depende de la presencia de enzimas extracelulares (Gallert, 2000).

Nayanashree & Thippeswamy (2015) reportan que las enzimas lacasa y manganeso peroxidasa son responsables de la degradación del caucho natural; ambas enzimas son encontradas con alta frecuencia en el reino Fungi (Mayer & Staples, 2002; Hofrichter, 2002). Según Shah et al. (2013), De Vries (1928) fue pionero en examinar la posible descomposición del caucho por

hongos. Una década más tarde, [Kalinenko \(1938\)](#) informó sobre cepas de hongos *Aspergillus* y *Penicillium* como degradadores del caucho. También *Paecilomyces variotii*, cepa SFA-25, fue reportada por [Zeb \(2009\)](#) como degradadora de caucho vulcanizado.

Existen entonces registros de organismos fúngicos capaces de biodegradar el caucho de neumático y realizar los dos procesos previos: la detoxificación y devulcanización. Esto sugiere que los hongos poseen un alto potencial en la degradación del caucho de neumático desde distintos frentes y mediante diferentes procesos. Teniendo en cuenta lo anterior, se plantea determinar si hongos filamentosos aislados de muestras de neumáticos deteriorados en la vía Bogotá- Fusagasugá, tienen el potencial de degradar el caucho de los neumáticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Lugar de muestreo

Se determinaron cinco sitios de muestreo en la vía Bogotá-Fusagasugá, (Figura 1). Estos fueron escogidos considerando la presencia de al menos tres neumáticos abandonados con un deterioro evidente. De cada sitio se seleccionaron tres neumáticos y de cada uno se extrajeron tres trozos usando un cuchillo afilado (desinfectado con hipoclorito al 5% entre cada muestra) y una muestra de 40 g de suelo en contacto con los neumáticos. Un total de 45 muestras de trozos de neumáticos y 15 de suelo fueron transportadas hasta el laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelo de la Pontificia Universidad Javeriana, en bolsas Ziploc™ debidamente rotuladas.

Los sitios de muestreo fueron:

- Gallera abandonada, municipio de Soacha (N 04°32.492' O 074°15.041')
- Salida de Bogotá, Alto de rosa (N 04°32.643' O 074°17.174')
- Montallantas, ruta a Silvania (N 04°27.607' O 074°23.086')
- Estación Brio “El vergel”, ruta a Silvania (N 04°26.935' O 074°22.754')
- Montallantas, Silvania azafranal (N 04°25.086' O 074°23.338')

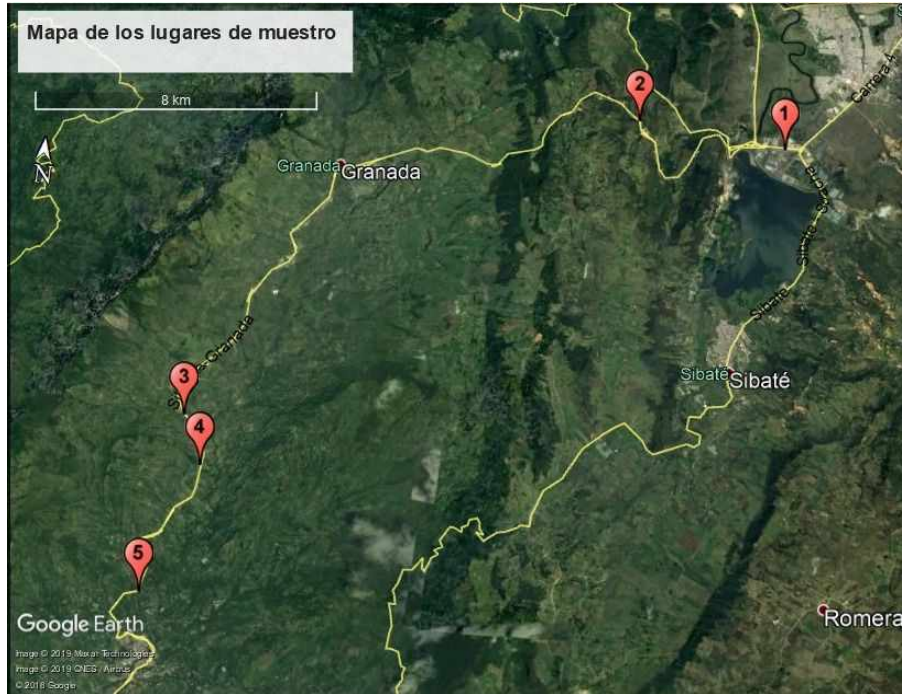


Figura 1. Mapa de los lugares de muestreo en la vía Bogotá- Fusagasugá.

2. Aislamiento de los morfotipos

Para el aislamiento de hongos se dispusieron los trozos de neumáticos de aproximadamente 12cm^2 en cámaras húmedas a temperatura ambiente durante cuatro semanas. Después de ese tiempo, se cortaron cuatro trozos de aproximadamente 1cm^2 de cada muestra y se sembraron por duplicado en cajas de Petri con agar papa dextrosa (PDA) (15 gL^{-1} de glucosa, 1.5% m/v de agar-agar, 200 mL^{-1} de infusión de papa) + 50mg L^{-1} clorafenicol (clo) y agar rosa de bengala (OXOID, Ref. CM1149), incubándose por 10 días ($30 \pm 1^\circ\text{C}$). Para las muestras de suelo, se realizaron diluciones seriadas base 10 en solución salina 0.85% (m/v) hasta 10^{-5} , y se inocularon por duplicado en agar PDA+clo las diluciones 10^{-3} y 10^{-5} .

Por otro lado, se dispusieron 50 ml de Medio mínimo de sales (K_2HPO_4 8 g L^{-1} , KH_2PO_4 1 g L^{-1} , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g L^{-1} , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g L^{-1} , NaCl 0.1 g L^{-1} , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.1 g L^{-1} , $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 20mg L^{-1} , $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 20mg L^{-1} , 0.5 mg of $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 0.5 mg L^{-1} , MnSO_4 0.5 mg L^{-1}) (Heisey & Papadatos, 1995) con 0.1% (m/v) de glucosa en Erlenmeyers de 100 ml y se adicionaron 4 ml de la dilución 10^{-3} de cada muestra de suelo por duplicado (15 muestras). Posteriormente, en una balanza analítica ScoutPro OHAUS, se pesaron $0.25 \pm 0.01\text{g}$ de

neumático que se adicionaron como sebo a los Erlenmeyers y se incubaron en un rotador orbital marca New Brunswick TM Innova 44 a 120 rpm, y $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ durante dos semanas (adaptado de [Tsuchii & Tokiwa, 2001](#)). Tras un lavado suave en agua destilada, los pedazos fueron sembrados en PDA+clo.

De las 180 cajas de Petri de las cámaras húmedas y de las 30 del rotador orbital, se aislaron el mayor número de morfotipos fúngicos posibles mediante técnica de punción central en PDA+clo. De las 60 cajas de Petri de las diluciones seriadas, se aislaron los morfotipos más representativos (aquellos que tuvieron un mayor crecimiento radial o que se presentaron con mayor frecuencia).

3. Selección de morfotipos aislados y medición de crecimiento a diferentes concentraciones de polvo de neumático

Los morfotipos se agruparon según su lugar de muestreo y características macro y microscópicas. Con el fin de reducir el número de morfotipos a evaluar se seleccionaron aquellos más representativos de cada agrupación, eliminando los morfotipos repetidos (que compartían muchas similitudes macro y microscópicas). Tras esta reducción inicial, los hongos se sometieron a una segunda selección según su capacidad de crecimiento en agar neumático.

Para esto se preparó agar neumático compuesto de medio Radha (CuSO_4 1.5mM L⁻¹, KH_2PO_4 2g L⁻¹, NH_4Cl 0.05g L⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{xH}_2\text{O}$ 0.5g L⁻¹, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{2H}_2\text{O}$ 0.1g L⁻¹, 10ml L⁻¹ de solución de elementos traza (MnSO_4 0.5 g L⁻¹, $\text{FeSO}_4 \cdot \text{7H}_2\text{O}$ 0.1g L⁻¹, $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{7H}_2\text{O}$ 0.1g L⁻¹)) ([Radha et al, 2005](#)) con 0.6% (m/v) de polvo de neumático, 0.5% (m/v) de glucosa y 2% (m/v) de agar-agar. Por duplicado, se inocularon las cajas con un trozo de medio PDA+clo de 0.7 cm de diámetro con crecimiento micelial de cada morfotipo. Se incubaron a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ en una incubadora marca VELPTM Scientifica FOC 225I durante dos semanas, registrando su crecimiento radial cada cinco días.

De los morfotipos que crecieron en el agar neumático al 0.6 % (m/v) se tomaron discos y se siguió el procedimiento anterior, sembrándolos sucesivamente en agar neumático al 1.5 %, 15 % y 45 %. Después se realizó el mismo procedimiento, pero inoculando los discos con los morfotipos en cajas de Petri con 7g de polvo de neumático autoclavado humectados con 7 ml de medio Radha (100 % m/v).

4. Evaluación del potencial de degradación de los morfotipos seleccionados

Se prepararon Erlenmeyers de 100 ml con 200.00 ± 0.01 mg de polvo de neumático pesados en una balanza Mettler™ Toledo xp26p, agregando glucosa 0.5 % (m/v) y 25 ml de medio líquido Radha, autoclavado e inoculado con discos de 0.7 mm del agar neumático al 0.6 % (m/v) por duplicado (adaptado de [Tsuchii, Suzuki, & Takeda, 1985](#)). Como control negativo se empleó, por duplicado, un Erlenmeyer con polvo de neumático y medio Radha en las mismas cantidades, sin inóculo. Se mantuvieron durante ocho semanas ([Nayanashree & Thippeswamy, 2015](#)) en agitación constante en un rotador orbital marca Innova44 a 110 rpm y a $30.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ([Watcharakul, Umsakul, Hodgson, Chumeke, & Tanrattanakul, 2012](#)).

Luego de la incubación, el polvo de neumático fue separado del medio Radha empleando un filtro para café (Stilocafé #8). El medio filtrado fue colectado en tubos Falcon™ de 50 ml y se determinó su pH en un pHmetro Okaton™. A continuación, cada masa de micelio y neumático fue almacenada en Erlenmeyers de 100 ml con 20 ml de agua destilada estéril. Estos fueron sometidos a agitación en un vortex Velp Scientifica ZX Classic a 3000 rpm durante 20 segundos para separar la biomasa del polvo de neumático. El polvo de neumático separado de la biomasa se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos en un PowerSpin™ CENTRIFUGE UNICO, se desechó el sobrenadante (agua, micelio y algunas partículas de neumático) y se autoclavó el precipitado para eliminar rastros de células fúngicas. Con el fin de evaporar el agua restante, se mantuvo además durante 36 horas a $45.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ en un horno Memmert™ UF55.

Tras este proceso, se analizó cada muestra en Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) empleando un espectrofotómetro Shimadzu™ MIRacle 10, acoplado con celda ATR (Attenuated Total Reflection) y se compararon los resultados de los morfotipos con los del control. Posteriormente se realizó a las muestras microscopía electrónica de barrido (MEB) en un microscopio electrónico marca Jeol™ JSM 6490LV con potencia de 10 kV, señal SEI y magnificaciones entre 450 y 5000X. Antes de la observación, las láminas fueron recubiertas con una capa de oro en condiciones de vacío en un metalizador Denton Vacuum Desk IV (Gómez-Méndez et al., 2018).

Para la identificación de los morfotipos de mayor interés en el estudio se realizó la descripción macroscópica y microscópica (empleando azul de lactofenol) de cada uno (Anexo 1) y se empleó la clave de Illustrated genera of imperfect fungi (Barnett & Hunter, 1972).

RESULTADOS

3. Selección de los morfotipos y medición de crecimiento a diferentes concentraciones de polvo de neumático.

De las muestras de suelo y neumático se aislaron aproximadamente 300 morfotipos cuyo número se redujo tras el primer proceso de selección. La Tabla 1 muestra como disminuyeron los morfotipos aislados durante el segundo proceso de selección. Todos los morfotipos que lograron crecer en concentración del 100% (m/v) fueron producto de los aislamientos realizados a partir de las siembras de trozos de neumático deteriorados e incubados en cámara húmeda.

Tabla 1. Número de morfotipos aislados según concentración de agar polvo de neumático

Concentración %(m/v)	Número de morfotipos aislados
0.6	33
1.5	32
15	30

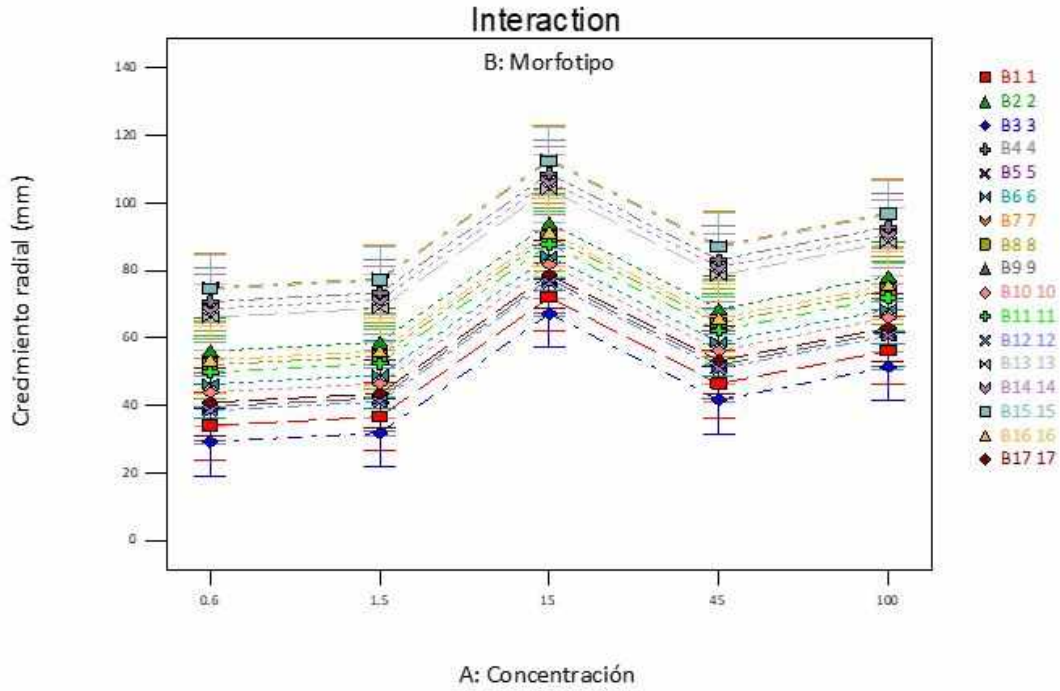
45	25
100	21

Sin embargo, debido a que algunos de los morfotipos finales se caracterizaron por tener un crecimiento en numerosas colonias satélite y su diámetro no pudo ser medido, sólo 17 se analizaron estadísticamente empleando un ANOVA factorial en el software Desing-Expert® versión 9.

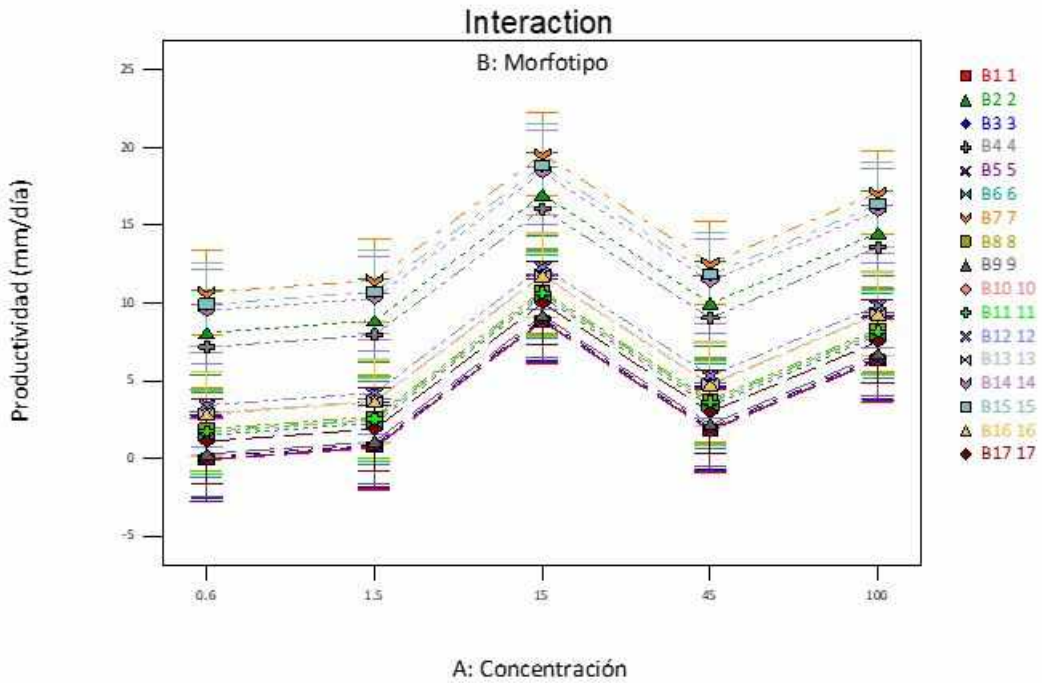
El crecimiento máximo alcanzado por réplica se promedió y se analizó como variable respuesta a las variables independientes concentración y morfotipo (Gráfica 1). El estadístico-F para el modelo fue de 8.2 (valor-p <0.0001); para la concentración fue de 19.99 (valor-p <0.0001); para el morfotipo de 5.25 (valor-p <0.0001) y se obtuvo un R-cuadrado de 0.7193.

Empleando nuevamente las mismas variables independientes, la productividad (crecimiento máximo en mm/día en el que se evidenció) se empleó como variable respuesta con el fin de incluir el factor tiempo en el análisis (Gráfica 2). El estadístico-F para el modelo fue de 7.32 (valor-p <0.0001); para la concentración fue de 17.19 (valor-p <0.0001); para el morfotipo de 4.85 (valor-p <0.0001) y se obtuvo un R-cuadrado de 0.6957.

Teniendo en cuenta los resultados del análisis estadístico de ambas variables respuesta, se tomaron como morfotipos de interés para realizar el análisis de FTIR-ATR aquellos con significativamente mayor crecimiento y productividad



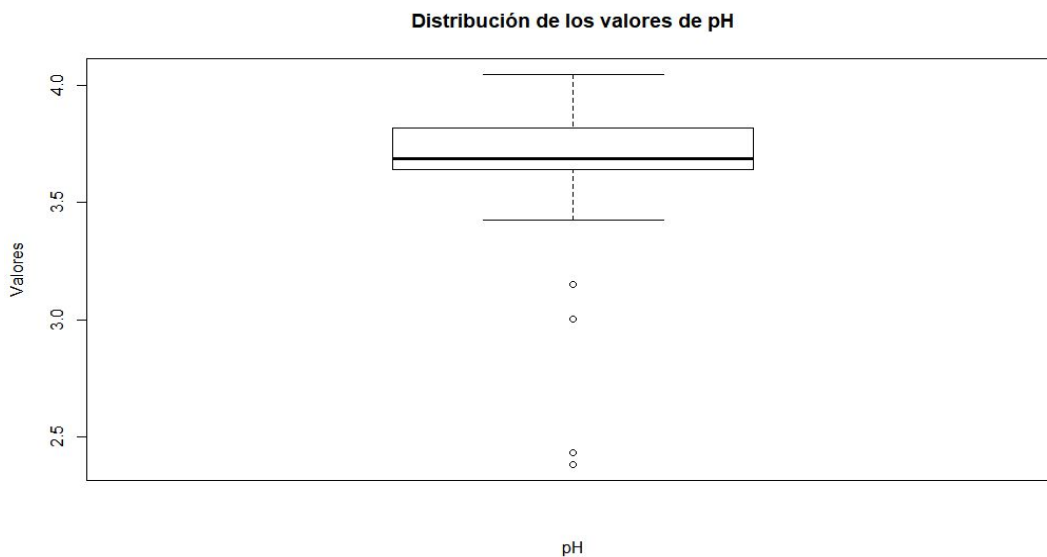
Gráfica 1. Interacción entre las variables concentración y morfotipo para el crecimiento. Las convenciones hacen referencia a la concentración de polvo de neumático en % (m/v)



Gráfica 2. Interacción entre las variables concentración y morfotipo para la productividad. Las convenciones hacen referencia a la concentración de polvo de neumático en % (m/v)

4. Evaluación del potencial de degradación de los morfotipos seleccionados.

Empleando el software RStudio se graficó la distribución de los valores de pH del medio filtrado, exceptuando los del control (Gráfica 3). Debido a que en todos los Erlenmeyers inoculados se observó crecimiento de biomasa y las mediciones de pH fueron en su mayoría similares, los *outliers* se tomaron como indicadores de los morfotipos de interés para el análisis en FTIR-ATR.



Gráfica 3. Distribución de los datos de pH. Promedio por réplica.

Tabla 2. Criterios de selección de los morfotipos para el análisis en FTIR-ATR, identificación y MEB.

Morfotipo	Código*	Criterio de selección	Especie identificada
2	0201-3F	Productividad	<i>Trichoderma</i> sp.1
4	0202-3D	Crecimiento y productividad	<i>Trichoderma</i> sp.2
7	0301-1D	Crecimiento y productividad	<i>Trichoderma</i> sp.3
13	0502-3B	Crecimiento	<i>Mucor</i> sp.1
14	0502-3D	Crecimiento y productividad	No identificado
15	0503-2D	Crecimiento y productividad	<i>Trichoderma</i> sp.4

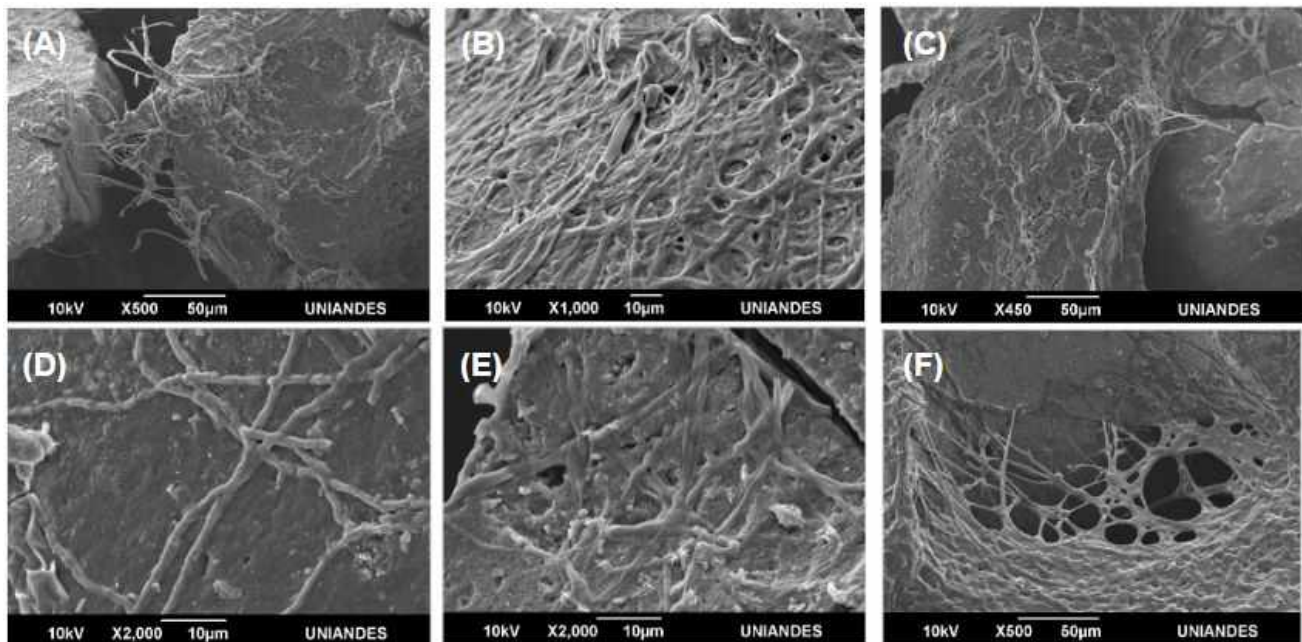
-	0202-1C	pH	<i>Aspergillus</i> sp.
-	0303-3I	pH	<i>Curvularia</i> sp.1
9	0403-1G	pH	<i>Curvularia</i> sp.2
-	0401-1A	pH	<i>Mucor</i> sp. 2

*El código es la identificación de cada morfotipo desde su aislamiento inicial.

Tabla 3. Promedio del crecimiento máximo alcanzado por réplica en cada concentración de los morfotipos de interés no representados en la Gráficas 1 ni 2.

Especie identificada	Concentración % (m/v)				
	0.6	1.5	15	45	100
<i>Aspergillus</i> sp.	*	*	*	*	1.8 cm
<i>Curvularia</i> sp.1	4.8 cm	4.8 cm	9 cm	2.35 cm	No creció
<i>Mucor</i> sp.2	5.3 cm	No creció	-	-	-

* El crecimiento se dio en numerosas colonias satélite.



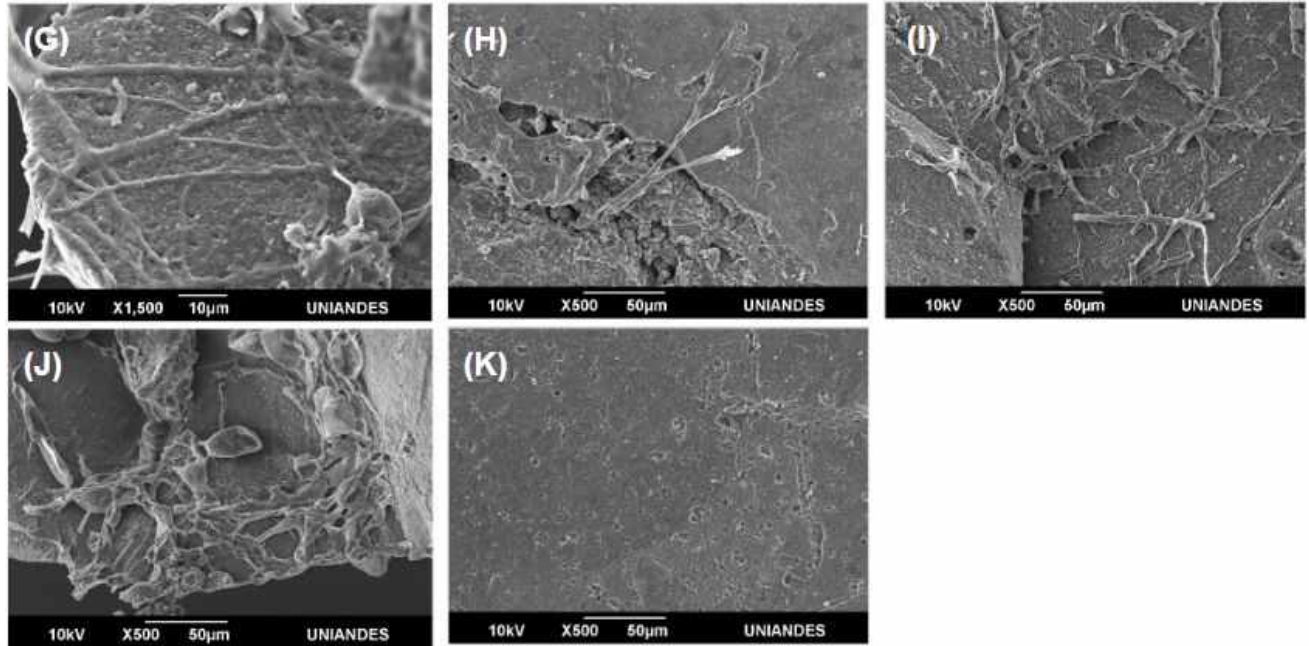


Figura 2. Imágenes de MEB de (G): *Aspergillus* sp., (H): *Curvularia* sp. 1, (I): *Curvularia* sp. 2, (J): *Mucor* sp. 2, (K): Control.

DISCUSIÓN

El comportamiento del crecimiento de los morfotipos evaluados en la Gráfica 1 y Gráfica 2 sigue el mismo patrón para todas las concentraciones. Según [Lucas et al. \(2008\)](#), el crecimiento del microorganismo en el agar con el polímero puede indicar el consumo de este por la especie inoculada. Como los hongos pudieron usar sustancias de reserva, la pequeña cantidad de glucosa adicionada o moléculas como impurezas, este resultado no puede aceptarse como una conclusión irrefutable. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que hubo muchos morfotipos (Tabla 1) que no crecieron o lo hicieron de forma reducida en las mismas condiciones en las que los organismos de la Tabla 2 crecieron significativamente.

También es importante mencionar que el crecimiento de los morfotipos fue significativamente dependiente de la concentración de neumático del agar. En ambos análisis, el mejor crecimiento se dio a 15 % (m/v), para todos los morfotipos evaluados. Esto posiblemente se deba a que al aumentar la concentración de neumático (45 y 100 % m/v) hay mayor fuente de carbono necesaria para el crecimiento fúngico, pero también aumentan los compuestos tóxicos que

inhiben el crecimiento de estos. Por otro lado, en las concentraciones menores a 15 % (m/v) es posible que la concentración de carbono no haya sido suficiente para soportar un buen crecimiento en los morfotipos.

Para las concentraciones de 0.6 % y 1.5 % (m/v), tomando la totalidad del polvo de neumático como carbono y sumando el 0.5 % (m/v) de glucosa, la fuente de carbono no sobrepasa el 2 % del medio, siendo esta de difícil asimilación. [Basu et al. \(2015\)](#) afirman que para un buen crecimiento, los hongos requieren una alta fuente de carbono. Los medios más usados según [Booth \(1971\)](#) para el cultivo de hongos son agar papa dextrosa (PDA), Czapek Dox agar (CzA) y agar avena (OA). De acuerdo con las formulaciones de Himedia®, CzA tiene 3% de fuente de carbono (tomado de <http://www.himedialabs.com/TD/M075.pdf>), PDA 2.4 % (tomado de <http://himedialabs.com/TD/M096.pdf>) y OA 6 % (tomado de <http://himedialabs.com/TD/M397.pdf>) aproximadamente. Estos porcentajes, aunque de fácil asimilación, no difieren tanto del estimado para las concentraciones de agar neumático mencionadas. Sin embargo, debido a la insolubilidad del polvo, éste se precipitó en el medio. Esto, además de la complejidad del polímero, pudo dificultar la disponibilidad y acceso de los morfotipos a la fuente de carbono.

Antes de asimilar el neumático en polvo, este debió ser depolimerizado. En general, la depolimerización ocurre principalmente gracias a enzimas oxidorreductasas e hidrolasas ([Lucas et al., 2008](#)). Los microorganismos secretan enzimas y radicales libres capaces de romper moléculas poliméricas, reduciendo progresivamente su peso molecular. Este proceso genera oligómeros, dímeros y monómeros que pueden ingresar a la célula y luego ser utilizados como fuente de energía ([Raut et al., 2015](#)). Debido a la dificultad en separar la biomasa del polvo de neumático después de la incubación, el peso como variable respuesta no se tuvo en cuenta.

La estructura tridimensional adquirida por el neumático tras la vulcanización es uno de los mayores retos para su biodegradación ([Akca et al., 2018](#)). No obstante, en la naturaleza existen compuestos con esta estructura, como la lignina. Los microorganismos ligninolíticos sintetizan

enzimas capaces de romper la compleja red del compuesto (Lucas et al., 2008), siendo las principales enzimas involucradas lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasa (Leonowicz et al., 1999). Las últimas dos se han empleado en la degradación de otros compuestos recalcitrantes, como polietileno (Sowmya et al., 2015; Gómez-Mendez et al., 2018), caucho natural (Nayanashree & Thippeswamy, 2015) y otros polímeros (Madhavi & Lele, 2009), siendo entonces probable que las enzimas estén implicadas también en la depolimerización del caucho de neumático.

Para todos los morfotipos de la Tabla 2 hay reportes de la producción de al menos una de estas enzimas: Especies de *Curvularia* han sido reportadas por su capacidad de producir lacasa (Zhang, Ren, Yu & Wang, 2010), celulasa y manganeso peroxidasa (Neoh et al., 2015); especies del género *Mucor* son capaces de producir diversas enzimas como amilasas (Alves, Campos-Takaki, Porto & Milanez, 2002) e incluso lacasas (Kiiskinen, Rättö & Kruus, 2004); *Aspergillus* sp. es considerado una fuente de nuevas lacasa (Ramos, Barends, Verhaert & de Graaff, 2011) y puede producir peroxidases (Jebor, 2017); enzimas líticas como hidrolasas, peroxidases y lacasas son abundantemente producidas en el género *Trichoderma* (Waghunde, Shelake & Sabalpara, 2016; Adav & Sze, 2014).

Por otro lado, el crecimiento a nivel microscópico puede observarse en la Figura 2. La formación de una biopelícula en la superficie del polímero es el primer paso de la biodegradación (Raut et al., 2015; Linos et al., 2000). Los microorganismos que colonizan la superficie se adhieren por medio de sustancias poliméricas extracelulares, principalmente polisacáridos. Los hongos pueden formar proteínas hidrofóbicas capaces de unirse a la superficie del polímero, generar enzimas degradantes y crecer de manera rápida y eficaz al extenderse y penetrar con su red de micelio (Raut et al., 2015). Esto puede ser observado en la Figura 2, donde se evidencia claramente el crecimiento de micelio en todas las muestras de polvo de neumático de los morfotipos identificados aun después de ser lavadas, agitadas en vortex, centrifugadas, autoclavadas y secadas a 45°C. Lucas et al. (2008) afirman que el desarrollo de microorganismos sobre la superficie es un indicador de biodeterioro de polímeros. Esto significaría que todas las

especies de la Tabla 2 tienen potencial de biodeteriorar el caucho de los neumáticos. No obstante, también es posible que solo lo están utilizando para soportar su crecimiento.

En vista de que el crecimiento de numerosos morfotipos fue inhibido por el polvo de neumático, aun en concentraciones mínimas (0.6 % m/v) y que un aumento en la concentración de este fue reduciendo la capacidad de otros morfotipos de presentar un buen crecimiento radial (Tabla 1), es pertinente mencionar algunas posibilidades de cómo las especies identificadas en la Tabla 2 fueron capaces de crecer abundantemente pese a la toxicidad del material.

Las sales y óxidos de zinc son de los compuestos que más contribuyen a la toxicidad de los neumáticos (Stevenson et al., 2008). Fomina et al. (2004), concluyeron que la acidólisis (protonación) era el mecanismo principal de la disolución de zinc. También es sabido que el óxido de zinc puede ser solubilizado mediante ácidos orgánicos (Burgstaller, Strasser, Woebking & Schinner, 1992). El zinc es un metal necesario para el crecimiento de los hongos, que aunque tóxico en alta concentración (Ballou & Wilson, 2016), podría ser asimilado y empleado por los organismos identificados.

Los procesos responsables de la producción de protones y ácidos en hongos son complejos (Gadd, 1999) pero se sabe que es necesaria una fuente de carbono para producir dichos metabolitos (Boswell et al., 2003). Como se dijo anteriormente, se conoce que la movilización de metales puede ocurrir por acidificación y formación de complejos de metal promovido por ligando. Estos procesos incluyen la producción de metabolitos primarios y secundarios con propiedades quelantes, como ácidos orgánicos, aminoácidos y fenólicos (Fomina et al., 2004).

Los bajos valores de pH registrados en ambas especies de *Curvularia*, *Mucor* sp. 2 y *Aspergillus* sp. no solo indican la producción de ácidos orgánicos y el uso del sustrato, sino que además sugieren la facultad de solubilizar y, posiblemente, asimilar metales tóxicos presentes en los neumáticos. Lo anterior indica además que las especies que acidifican en mayor medida el medio

Radha con polvo de neumático (Gráfica 3), tienen potencial como detoxificadores de metales pesados en el material.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) presentes en los neumáticos también son responsables en gran medida de su toxicidad (Llompart et al., 2013). La mayoría de los hongos no pueden usar HAPs como fuentes únicas de carbono y energía, pero pueden co-metabolizarlos a una amplia variedad de productos oxidados y en algunos casos a CO₂ (Cerniglia & Sutherland, 2010). Además de enzimas como lacasas (Madhavi & Lele, 2009), los hongos no ligninolíticos involucrados en la degradación de HAPs generalmente los metabolizan mediante la monooxigenasa y epóxido hidrolasa del citocromo P450 para formar trans-dihidrodiolés (Juckpech et al., 2012). Hay reportes de estas enzimas para especies de *Trichoderma* (Druzhinina, Shelest & Kubicek, 2012; Adav et al., 2011), *Curvularia* (Lu et al., 2007), *Mucor* (Kolet, Haldar, Niloferjahan & Thulasiram, 2014) y para *Aspergillus* sp. (Faber, van Gorcom & Duine, 2001). No es de extrañar que existan entonces registros de degradación de HAPs (Cerniglia & Sutherland, 2010) para estos organismos y que los morfotipos identificados (Tabla 2) hayan podido crecer en el agar neumático pese a la presencia de estos compuestos tóxicos. Es probable que los morfotipos en la Gráfica 2, en especial las especies identificadas de *Trichoderma* y *Mucor* sp. 1, crecieran en el agar neumático tan efectivamente a diferentes concentraciones no solo porque pueden tolerar estos compuestos, sino porque fueron capaces de co-metabolizar los HAPs.

Curvularia sp. 1 y 2, *Aspergillus* sp. y *Mucor* sp. 2 mostraron una alta capacidad de acidificar el medio y posiblemente de detoxificar el materia. En cuanto a su crecimiento y tolerancia a diferentes concentraciones, el de *Curvularia* sp. 2 puede ser observado en la Gráfica 1 y Gráfica 2 como Morfotipo 9, es decir que puede tolerar concentraciones de hasta 100 % (m/v) aunque no mostró un crecimiento significativo en comparación a los demás morfotipos evaluados. Esto puede deberse a que no tiene la suficiente batería enzimática para depolimerizar el carbono del neumático necesario para soportar su crecimiento, o a que a esta concentración los compuestos tóxicos son suficientes para limitar su desarrollo. La última hipótesis es más probable ya que a la

concentración de 15 % (m/v) mostró un mejor crecimiento, lo que significaría que cuenta con enzimas para depolimerizar el polvo del neumático.

Aspergillus sp. también logró desarrollarse a todas las concentraciones, no obstante, debido a su crecimiento en numerosas colonias satélite en 0.6, 1.5, 15 y 45 % (m/v), su diámetro no pudo ser medido y no se analizó estadísticamente. En la concentración de 100% (m/v) se evidenció un crecimiento limitado (Tabla 3), posiblemente a causa de los compuestos tóxicos.

Por otro lado, *Curvularia* sp. 1 logró crecer, aunque muy limitadamente, hasta una concentración de 45 % (m/v) (Tabla 3). Probablemente este morfotipo sea más sensible que *Curvularia* sp. 2 a los compuesto tóxicos, ya que también presentó un buen crecimiento a 15 % (m/v). *Mucor* sp. 2, en cambio, no logró crecer ni siquiera a 1.5 % (m/v) (Tabla 3). Esto implica que pese a su capacidad de acidificar el medio y solubilizar metales, no tolera mayores concentraciones de neumático, posiblemente por ser muy sensible a compuestos tóxicos diferentes de metales, como los HAPs. Su limitada resistencia no lo hace apto para degradar o detoxificar neumáticos.

De las seis especies que mostraron mejor crecimiento y productividad (Gráfica 1 y 2), cuatro pertenecen al género *Trichoderma* (Tabla 2). Este género de saprófitos generales con requisitos nutricionales mínimos y rápido crecimiento, produce una gran variedad de metabolitos secundarios (Harman & Kubicek, 2002) que, como se mencionó anteriormente, pueden ayudar en la solubilización de metales al quelarlos y acidificando el medio (Fomina et al., 2004). Especies de este género pueden transformar o incluso degradar componentes potencialmente peligrosos y recalcitrantes (Harman & Kubicek, 2002), como los neumáticos. También son hiperproductores de enzimas degradativas (Harman & Kubicek, 2002).

En cuanto a los análisis de FTIR-ATR, los resultados fueron inconclusos debido a la imposibilidad de separar el micelio del polvo de neumático mediante métodos físicos empleados (lavado, agitación en vórtex, centrifugación, autoclavado y secado).

CONCLUSIONES

El método más eficaz para el aislamiento de morfotipos con potencial de biodegradar caucho de neumático, en este estudio, fue a partir de trozos de muestras de caucho deteriorado incubadas en cámara húmeda. De los diez morfotipos identificados como potenciales degradadores de caucho de neumático, *Curvularia* sp. 2 podría ser especialmente útil en su detoxificación gracias a su resistencia a altas concentraciones de polvo de neumático y a su capacidad de acidificar el medio. Cuatro especies de *Trichoderma* también demostraron alto potencial en biodegradación del caucho de los neumáticos por su buen crecimiento. Anteriores reportes de biodegradación de polímeros por este género los hacen especialmente prometedores. Sin embargo, más estudios deben realizarse para confirmar este potencial, dilucidar las enzimas y mecanismos implicados e identificar a las especies. Además, se deben realizar mediciones en concentraciones alrededor de 15 % , entre 1.5 y 45 %, para determinar en qué concentración se da el máximo crecimiento de las especies de interés.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por su apoyo incondicional. A la Pontificia universidad Javeriana, por ser clave en mi formación académica. A Luis David Gómez Méndez, por su paciencia y compromiso. A Aura Marina Pedroza Rodríguez y María Ximena Rodríguez Bocanegra, por amablemente facilitar los laboratorios para la realización del trabajo. A Angela María Alvarado Fernández, por su colaboración en la identificación de morfotipos. A los auxiliares de laboratorio, por su cooperación y servicio permanente. A Humberto Ibarra Ávila, coordinador del centro de microscopía de la universidad de Los Andes, por facilitar el equipo para realizar el MEB. Muchas gracias.

BIBLIOGRAFÍA

- Adav, S. S., & Sze, S. K. (2014). *Trichoderma secretome: an overview*. In *Biotechnology and biology of Trichoderma* (pp. 103-114). Elsevier. doi:10.1016/b978-0-444-59576-8.00008-4

- Akca, E., Gursel, A., & Sen, N. (2018). A Review on Devulcanization of Waste Tire Rubber. *Periodicals of Engineering and Natural Sciences (PEN)*, 6(1), 154-160. doi: 10.21533/pen.v6i1.167
- Alves, M. H., Campos-Takaki, G. M., Porto, A. L. F., & Milanez, A. I. (2002). Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33(4), 325-330. doi:10.1590/s1517-83822002000400009
- Aprem, A. S., Joseph, K., Mathew, T., Altstaedt, V., & Thomas, S. (2003). Studies on accelerated sulphur vulcanization of natural rubber using 1-phenyl-2, 4-dithiobiuret/tertiary butyl benzothiazole sulphenamide. *European Polymer Journal*, 39(7), 1451-1460. doi:10.1016/s0014-3057(02)00382-8
- Asgher, M., Bhatti, H. N., Ashraf, M., & Legge, R. L. (2008). Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation*, 19(6), 771. doi:10.1007/s10532-008-9185-3
- Ballou, E. R., & Wilson, D. (2016). The roles of zinc and copper sensing in fungal pathogenesis. *Current opinion in microbiology*, 32, 128-134. doi:10.1016/j.mib.2016.05.013
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1972). *Illustrated genera of imperfect fungi*.
- Basu, S., Bose, C., Ojha, N., Das, N., Das, J., Pal, M., & Khurana, S. (2015). Evolution of bacterial and fungal growth media. *Bioinformation*, 11(4), 182. doi: 10.6026/97320630011182
- Booth, C. (1971). Chapter II Fungal Culture Media. In *Methods in microbiology* (Vol. 4, pp. 49-94). Academic Press. doi:10.1016/s0580-9517(09)70007-8
- Boswell, G. P., Jacobs, H., Davidson, F. A., Gadd, G. M., & Ritz, K. (2003). Growth and function of fungal mycelia in heterogeneous environments. *Bulletin of Mathematical Biology*, 65(3), 447. doi:10.1016/S0092-8240(03)00003-X
- Bredberg, K., Andersson, B. E., Landfors, E., & Holst, O. (2002). Microbial detoxification of waste rubber material by wood-rotting fungi. *Bioresource Technology*, 83(3), 221-224. doi:10.1016/s0960-8524(01)00218-8

- Burgstaller, W., Strasser, H., Woebking, H., & Schinner, F. (1992). Solubilization of zinc oxide from filter dust with *Penicillium simplicissimum*: bioreactor leaching and stoichiometry. *Environmental science & technology*, 26(2), 340-346. doi:10.1021/es00026a015
- Cerniglia, C. E., & Sutherland, J. B. (2010). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*, 2079-2110. doi:10.1007/978-3-540-77587-4_151
- Christiansson, M., Stenberg, B., & Holst, O. (2000). Toxic Additives- A Problem for Microbial Waste Rubber Desulphurisation. *Resource and Environmental Biotechnology*, 3(1), 11-21.
- Chengalroyen, M. D., & Dabbs, E. R. (2013). The biodegradation of latex rubber: a minireview. *Journal of Polymers and the Environment*, 21(3), 874-880. doi:10.1007/s10924-013-0593-z
- De Vries, O. (1928). Zersetzung von Kautschuk-Kohlenwasserstoff durch Pilze. *Zentbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr*, 74, 22-24.
- Druzhinina, I. S., Shelest, E., & Kubicek, C. P. (2012). Novel traits of *Trichoderma* predicted through the analysis of its secretome. *FEMS microbiology letters*, 337(1), 1-9. doi:10.1111/j.1574-6968.2012.02665.x
- Faber, B. W., van Gorcom, R. F., & Duine, J. A. (2001). Purification and characterization of benzoate-para-hydroxylase, a cytochrome P450 (CYP53A1), from *Aspergillus niger*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 394(2), 245-254. doi:10.1006/abbi.2001.2534
- Fomina, M., Alexander, I. J., Hillier, S., & Gadd, G. M. (2004). Zinc phosphate and pyromorphite solubilization by soil plant-symbiotic fungi. *Geomicrobiology Journal*, 21(5), 351-366. doi:10.1080/01490450490462066
- Fukuzaki, N., Yanaka, T., & Urushiyama, Y. (1986). Effects of studded tires on roadside airborne dust pollution in Niigata, Japan. *Atmospheric Environment* (1967), 20(2), 377-386. doi:10.1016/0004-6981(86)90041-7

- Gadd, G. M. (1999). Fungal production of citric and oxalic acid: importance in metal speciation, physiology and biogeochemical processes. In *Advances in microbial physiology* (Vol. 41, pp. 47-92). Academic Press. doi:10.1016/s0065-2911(08)60165-4
- Gallert, C. (2000). Degradation of latex and of natural rubber by *Streptomyces* strain La 7. *Systematic and applied microbiology*, 23(3), 433-441. doi:10.1016/s0723-2020(00)80075-2
- Gent, A. N., & Walter, J. D. (2006). Pneumatic tire. https://ideaexchange.uakron.edu/mechanical_ideas/854
- Gómez-Méndez, L. D., Moreno-Bayona, D. A., Poutou-Pinales, R. A., Salcedo-Reyes, J. C., Pedroza-Rodríguez, A. M., Vargas, A., & Bogoya, J. M. (2018). Biodeterioration of plasma pretreated LDPE sheets by *Pleurotus ostreatus*. *PloS one*, 13(9), e0203786. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203786>
- Harman, G. E., & Kubicek, C. P. (2002). *Trichoderma and Gliocladium*. Volume 1: Basic biology, taxonomy and genetics. CRC Press.
- Hatada, K., Fox, R. B., Kahovec, J., Maréchal, E., Mita, I., & Shibaev, V. P. (1996). Definitions of terms relating to degradation, aging, and related chemical transformations of polymers (IUPAC Recommendations 1996). *Pure and Applied Chemistry*, 68(12), 2313–2323. doi:10.1351/pac199668122313
- Heisey, R. M., & Papadatos, S. (1995). Isolation of microorganisms able to metabolize purified natural rubber. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8), 3092-3097.
- Hofrichter, M. (2002). lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial technology* 30(4), 454-466. doi:10.1016/s0141-0229(01)00528-2
- Holst, O., Stenberg, B., & Christiansson, M. (1998). Biotechnological possibilities for waste tyre-rubber treatment. *Biodegradation*, 9(3-4), 301-310. doi:10.1023/a:1008337708006
- Imai, S., Yoshida, R., Endo, Y., Fukunaga, Y., Yamazoe, A., Kasai, D., ... & Fukuda, M. (2013). *Rhizobacter gummiphilus* sp. nov., a rubber-degrading bacterium isolated from the soil of a botanical garden in Japan. *The Journal of general and applied microbiology*, 59(3), 199-205. doi:10.2323/jgam.59.199

- Jebor, M. A. (2017). Production and Purification of Peroxidase from *Aspergillus niger*.
- Juckpech, K., Pinyakong, O., & Rerngsamran, P. (2012). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by newly isolated *Curvularia* sp. F18, *Lentinus* sp. S5, and *Phanerochaete* sp. T20. *Science Asia*, 38, 147. doi: 10.2306/scienceasia1513-1874.2012.38.147
- Kalinenko, V. O. (1938). The role of *Actinomyces* and bacteria in decomposing rubber. *Mikrobiologiya*, 17, 119-128.
- Kiiskinen, L. L., Rättö, M., & Kruus, K. (2004). Screening for novel laccase-producing microbes. *Journal of applied microbiology*, 97(3), 640-646. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02348.x
- Kolet, S. P., Haldar, S., Niloferjahan, S., & Thulasiram, H. V. (2014). *Mucor hiemalis* mediated 14 α -hydroxylation on steroids: In vivo and in vitro investigations of 14 α -hydroxylase activity. *Steroids*, 85, 6-12. doi:10.1016/j.steroids.2014.04.002
- Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtaś-Wasilewska, M., Cho, N. S., ... & Rogalski, J. (1999). Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal genetics and biology*, 27(2-3), 175-185. doi:10.1006/fgbi.1999.1150
- Linos, A., Berekaa, M. M., Reichelt, R., Keller, U., Schmitt, J., Flemming, H. C., ... & Steinbüchel, A. (2000). Biodegradation of cis-1, 4-polyisoprene rubbers by distinct actinomycetes: microbial strategies and detailed surface analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(4), 1639-1645. doi:10.1128/aem.66.4.1639-1645.2000
- Llompart, M., Sanchez-Prado, L., Lamas, J. P., Garcia-Jares, C., Roca, E., & Dagnac, T. (2013). Hazardous organic chemicals in rubber recycled tire playgrounds and pavers. *Chemosphere*, 90(2), 423-431. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.07.053
- Lu, W., Du, L., Wang, M., Jia, X., Wen, J., Huang, Y., ... & Sun, B. (2007). Optimisation of hydrocortisone production by *Curvularia lunata*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 142(1), 17-28. doi:10.1007/s12010-007-0005-8
- Lucas, N., Bienaime, C., Belloy, C., Queneudec, M., Silvestre, F., & Nava-Saucedo, J.-E. (2008). Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques – A review. *Chemosphere*, 73(4), 429–442. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.06.064

- Madhavi, V., & Lele, S. S. (2009). Laccase: properties and applications. *BioResources*, 4(4), 1694-1717.
- Mayer, A. M., & Staples, R. C. (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 60(6), 551-565. doi:10.1016/s0031-9422(02)00171-1
- Nayanashree, G., & Thippeswamy, B. (2015). Biodegradation of natural rubber by laccase and manganese peroxidase enzyme of *Bacillus subtilis*. *Environmental Processes*, 2(4), 761-772. doi:10.1007/s40710-015-0118-y
- Neoh, C. H., Lam, C. Y., Yahya, A., Ware, I., & Ibrahim, Z. (2015). Utilization of agro-industrial residues from palm oil industry for production of lignocellulolytic enzymes by *Curvularia clavata*. *Waste and Biomass Valorization*, 6(3), 385-390. doi:10.1007/s12649-015-9357-4
- Raut, S., Raut, S., Sharma, M., Srivastav, C., Adhikari, B., & Sen, S. K. (2015). Enhancing degradation of low density polyethylene films by *Curvularia lunata* SG1 using particle swarm optimization strategy. *Indian journal of microbiology*, 55(3), 258-268. doi:10.1007/s12088-015-0522-z
- Radha, K. V., Regupathi, I., Arunagiri, A., & Murugesan, T. (2005). Decolorization studies of synthetic dyes using *Phanerochaete chrysosporium* and their kinetics. *Process Biochemistry*, 40(10), 3337-3345. doi:10.1016/j.procbio.2005.03.033
- Ramos, J. A. T., Barends, S., Verhaert, R. M., & de Graaff, L. H. (2011). The *Aspergillus niger* multicopper oxidase family: analysis and overexpression of laccase-like encoding genes. *Microbial cell factories*, 10(1), 78. doi:10.1186/1475-2859-10-78
- Sato, S., Honda, Y., Kuwahara, M., Kishimoto, H., Yagi, N., Muraoka, K., & Watanabe, T. (2004). Microbial scission of sulfide linkages in vulcanized natural rubber by a white rot basidiomycete, *ceriporiopsis subvermispora*. *Biomacromolecules*, 5(2), 511-515. doi:10.1021/bm034368a
- Shah, A. A., Hasan, F., Shah, Z., Kanwal, N., & Zeb, S. (2013). Biodegradation of natural and synthetic rubbers: A review. *International biodeterioration & biodegradation*, 83, 145-157. doi:10.1016/j.ibiod.2013.05.004

- Sowmya, H. V., Ramalingappa, B., Nayanashree, G., Thippeswamy, B., & Krishnappa, M. (2015). Polyethylene degradation by fungal consortium. *International Journal of Environmental Research*, 9(3), 823-830. doi: 10.22059/IJER.2015.969
- Steudel, R., & Steudel, Y. (2006). Interaction of zinc oxide clusters with molecules related to the sulfur vulcanization of polyolefins (“rubber”). *Chemistry–A European Journal*, 12(33), 8589-8602. doi:10.1002/chem.200600700
- Stevenson, K., Stallwood, B., & Hart, A. G. (2008). Tire rubber recycling and bioremediation: a review. *Bioremediation Journal*, 12(1), 1-11. doi:10.1080/10889860701866263
- Tsuchii, A., Suzuki, T., & Takeda, K. (1985). Microbial degradation of natural rubber vulcanizates. *Applied and environmental microbiology*, 50(4), 965-970.
- Tsuchii, A., & Tokiwa, Y. (2001). Microbial degradation of tyre rubber particles. *Biotechnology letters*, 23(12),963-9 69. doi:10.1023/a:1010593807416
- Waghunde, R. R., Shelake, R. M., & Sabalpara, A. N. (2016). Trichoderma: A significant fungus for agriculture and environment. *African journal of agricultural research*, 11(22), 1952-1965. doi: 10.5897/AJAR2015.10584
- Watcharakul, S., Umsakul, K., Hodgson, B., Chumeka, W., & Tanrattanakul, V. (2012). Biodegradation of a blended starch/natural rubber foam biopolymer and rubber gloves by *Streptomyces coelicolor* CH13. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15(1), 8-8. doi: 10.2225/vol15-issue1-fulltext-10
- Zhang, J., Ren, J., Yu, Y., & Wang, B. S. (2010). Purification and Characterization of Laccase from *Curvularia triful*. In *Advanced Materials Research* (Vol. 113, pp. 2215-2219). Trans Tech Publications. doi:10.4028/www.scientific.net/amr.113-116.2215
- Zeb, S. (2009). Vulcanized rubber degrading *Paecilomyces variotii* Strain SFA-25 isolated from hot spring in Pakistan (Doctoral dissertation, Master’s Thesis, Quaid-i-Azam University, Islamabad, Pakistan).

ANEXO 1. DESCRIPCIÓN DE LOS MORFOTIPOS

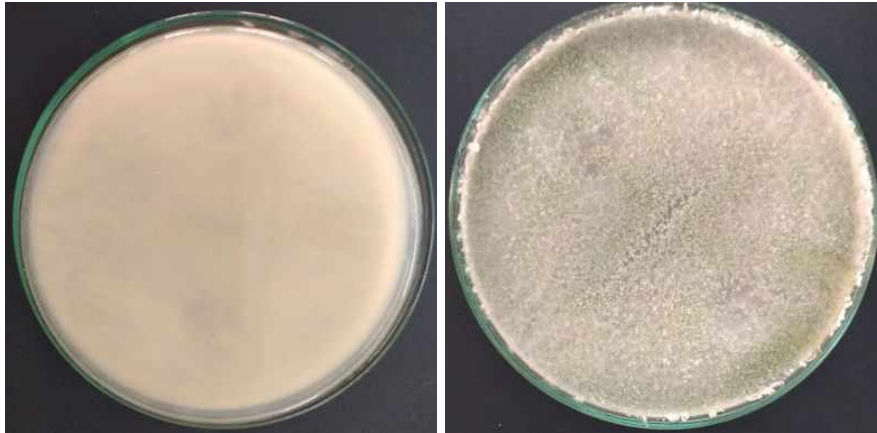
Código: 0503-2D

Medio de cultivo: Agar papa dextrosa + 50mg L⁻¹ clorafenicol.

Edad de la colonia: Cinco días.

Especie identificada: *Trichoderma* sp. 4

Fotografía del reverso y del anverso:



Descripción del reverso: Color blanco.

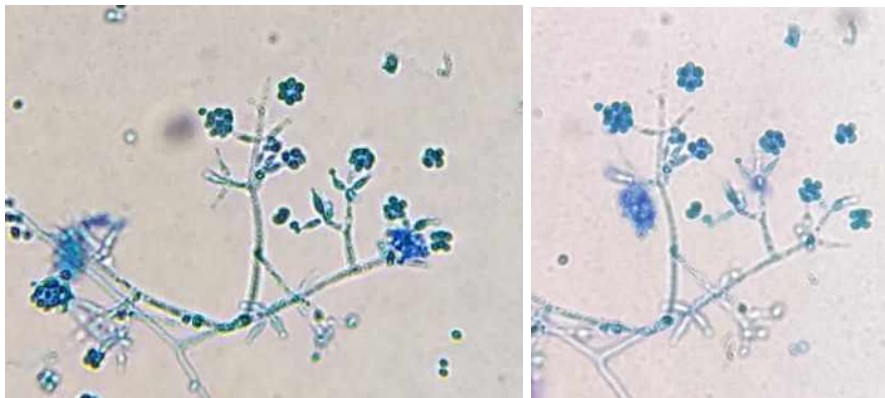
Descripción del anverso: Colonias de color blanco con verde pastel, textura algodonosa compacta, crecimiento radial.

Pigmento difusible: Ausente.

Micelio vegetativo: Muy delgado, hialino, septado.

Propágulos: Ameroconidios esféricos, verdosos, en cabezas mucilaginosas. Se originan en fiálides con forma de botella (sucesión basipétala, origen blástico), de conidióforos ramificados.

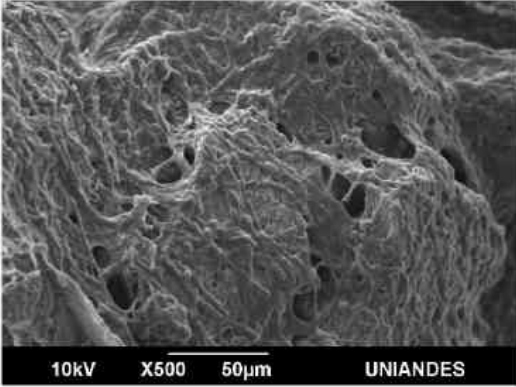
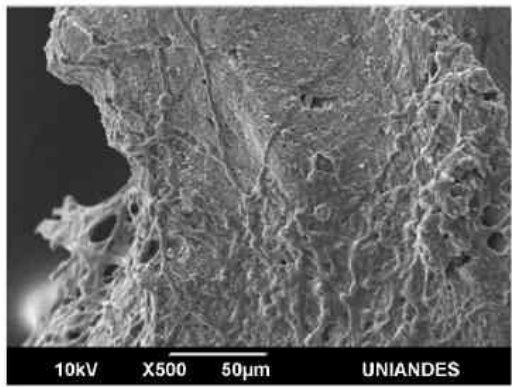
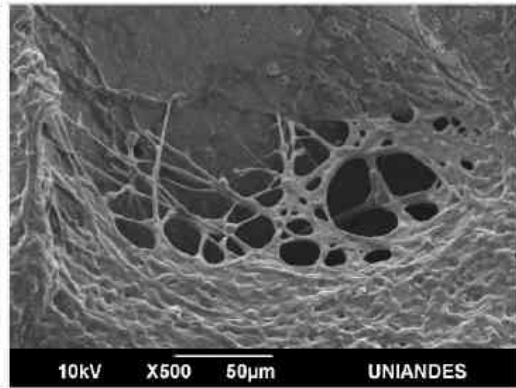
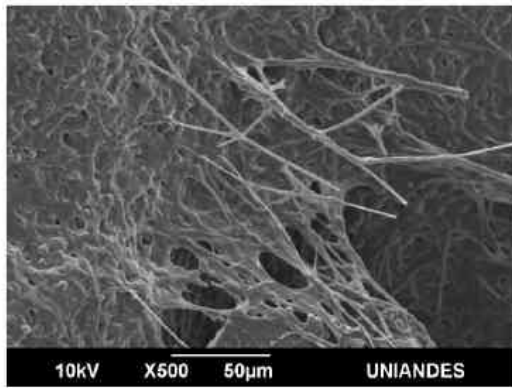
Fotografías de la microscopía:



Fotografía del Erlenmeyer (neumático+caldo Radha) tras 8 semanas en agitación:



Fotografía del SEM:



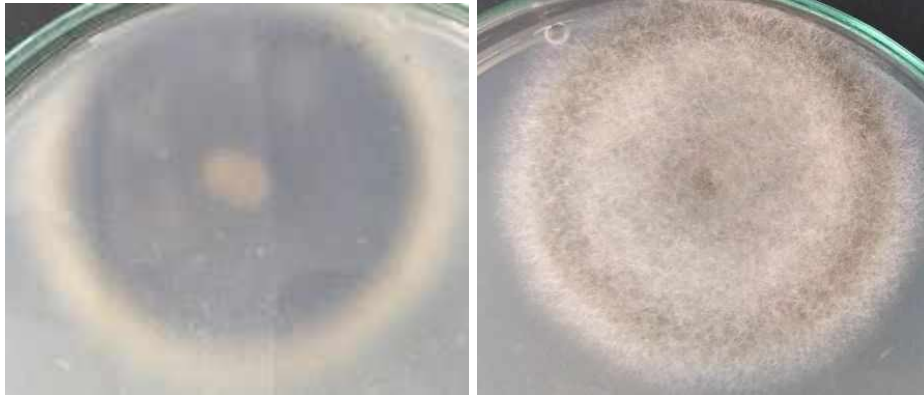
Código: 0403-1G

Medio de cultivo: Agar papa dextrosa + 50mg L⁻¹ clorafenicol.

Edad de la colonia: Cinco días.

Especie identificada: *Curvularia* sp. 2

Fotografía del reverso y del anverso:



Descripción del reverso: Color marrón muy oscuro, casi negro. Con el centro y margen de la colonia crema.

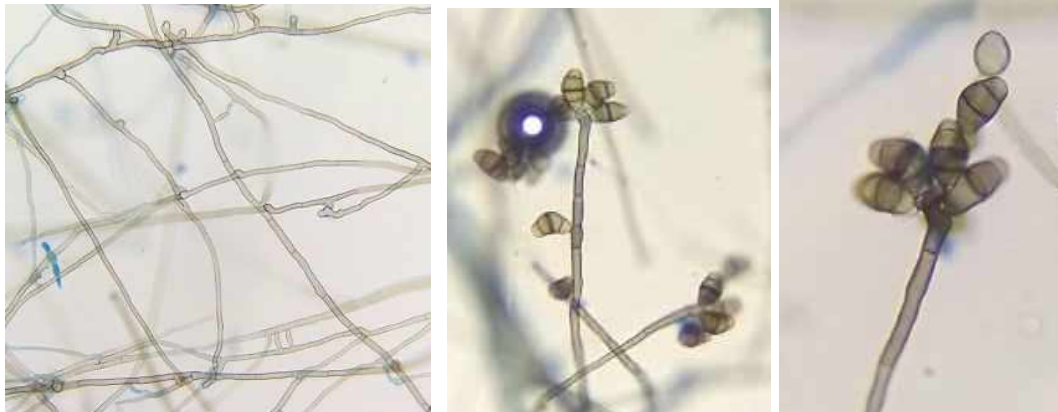
Descripción del anverso: Colonia con el centro color marrón oscuro y verdoso, con una zonación concéntrica gris clara, seguida de otra marrón para terminar con un margen gris claro nuevamente. Textura algodonosa compacta.

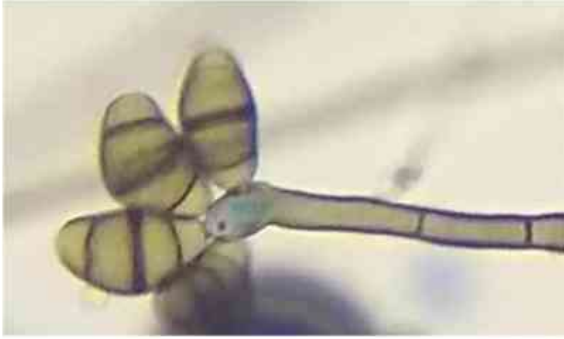
Pigmento difusible: Ausente.

Micelio vegetativo: Delgado, dematiáceo y septado.

Propágulos: Fragmaconidios de cuatro células, dematiáceos, bastante curvados, solitarios de origen blástico, con el septo central más oscuro que los demás. Se originan de un conidióforo simpodial y porógeno.

Fotografías de la microscopía:

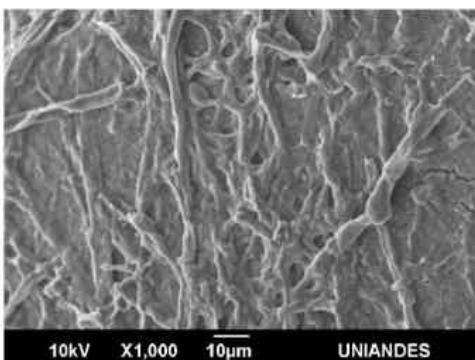
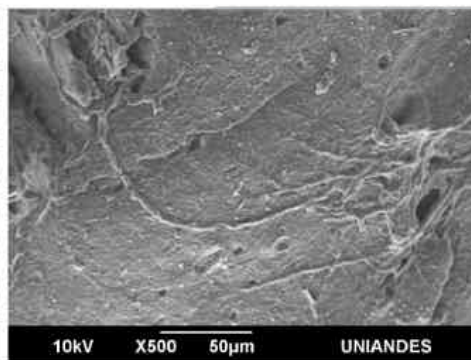
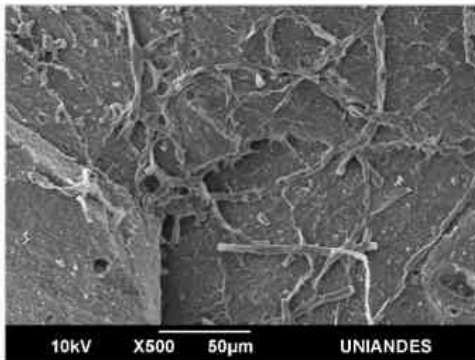




Fotografía del Erlenmeyer (neumático+caldo Radha) tras 8 semanas en agitación:



Fotografía del SEM:



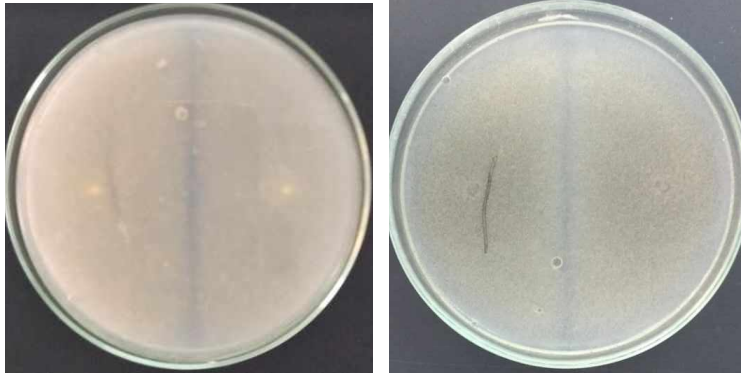
Código: 0401-1A

Medio de cultivo: Agar papa dextrosa + 50mg L⁻¹ clorafenicol.

Edad de la colonia: 30 días.

Especie identificada: *Mucor* sp. 2

Fotografía del reverso y anverso:



Descripción del reverso: Color gris claro.

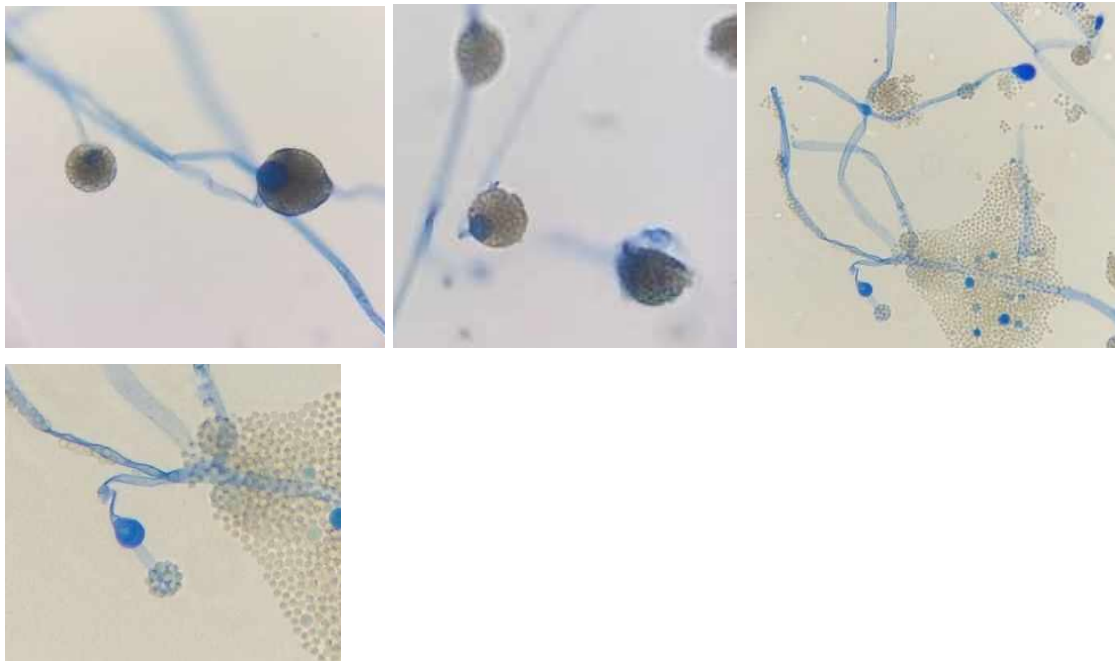
Descripción del anverso: Colonias color gris verdoso, de textura pulverulenta.

Pigmento difusible: Ausente.

Micelio: Grueso, hialino y sin septos.

Propágulos: Esporas verdes, unicelulares, esféricas, originados en esporangios esféricos de esporangióforo hialino simple, con columella. No se observan rizoides.

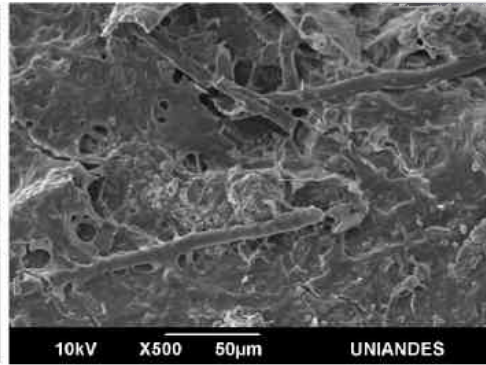
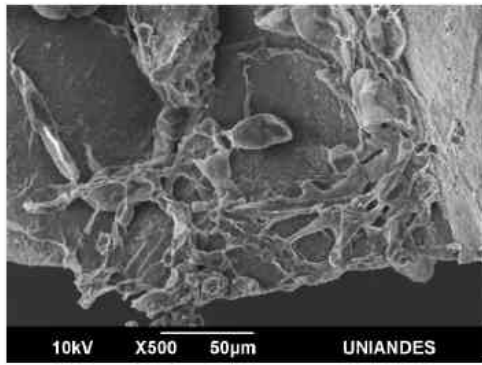
Fotografías de la microscopía:



Fotografía del Erlenmeyer (neumático+caldo Radha) tras 8 semanas en agitación:



Fotografía del SEM:



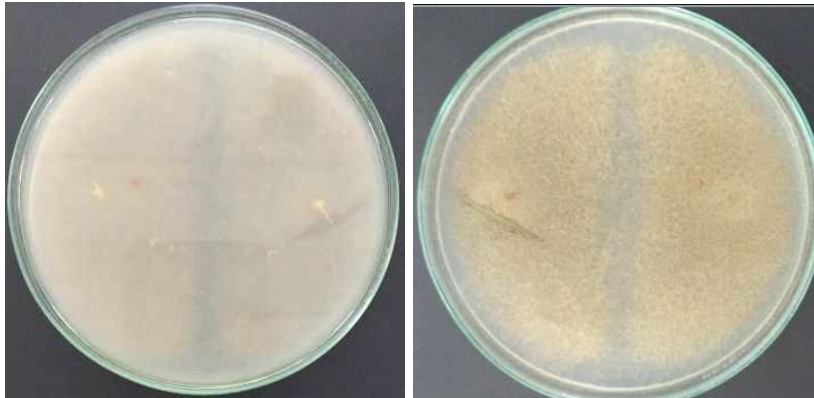
Código: 0502-3B

Medio de cultivo: Agar papa dextrosa + 50mg L⁻¹ clorafenicol.

Edad de la colonia: 30 días.

Especie identificada: *Mucor* sp. 1

Fotografía del reverso y anverso:



Descripción del reverso: Color gris claro.

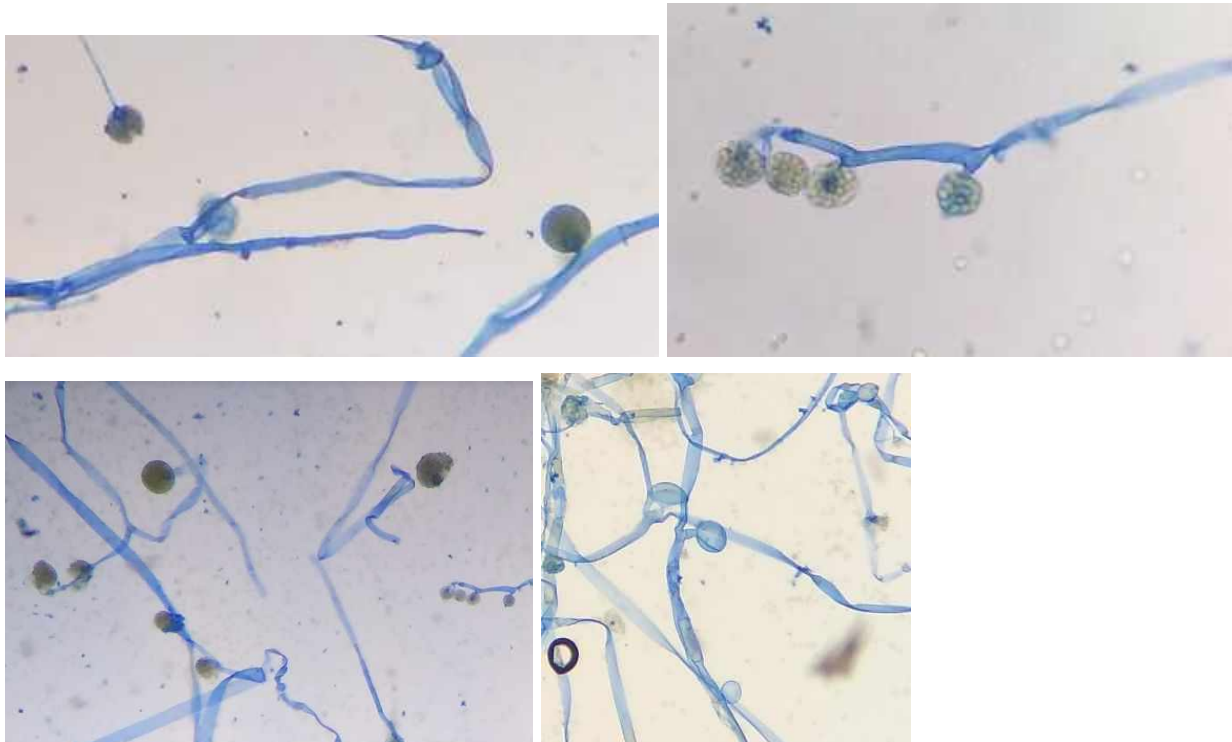
Descripción del anverso: Colonias color amarillo-marrón pálido, de textura pulverulenta.

Pigmento difusible: Ausente.

Micelio vegetativo: Grueso, hialino y sin septos.

Propágulos: Esporas verdes, unicelulares, esféricas, originados en esporangios esféricos de esporangióforo hialino ramificado, con columella. Se observan collaretetes.

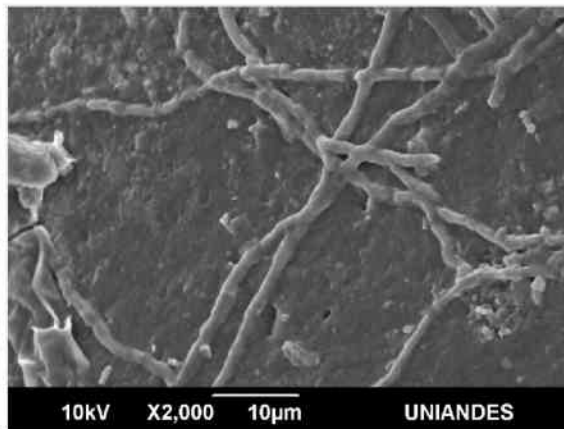
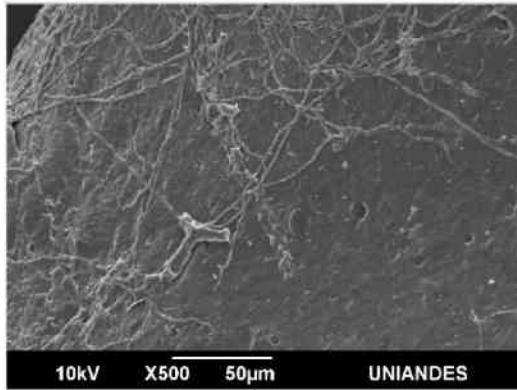
Fotografías de la microscopía:



Fotografía del Erlenmeyer (neumático+caldo Radha) tras 8 semanas en agitación:



Fotografía del SEM:



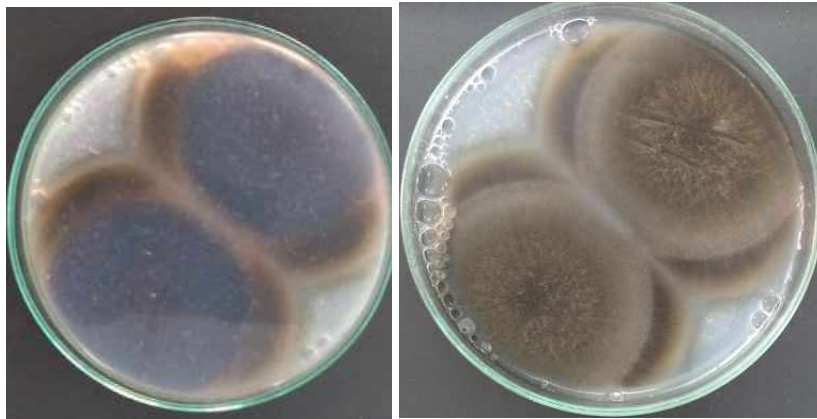
Código: 0303-3I

Medio de cultivo: Agar papa dextrosa + 50mg L⁻¹ clorafenicol.

Edad de la colonia: 30 días.

Especie identificada: *Curvularia* sp. 1

Fotografía del reverso y anverso:



Descripción del reverso: Color marrón oscuro casi negro, más claro hacia el margen.

Descripción del anverso: Colonias de color marrón oscuro con zonaciones concéntricas de marrón más claro. Margen crema. Textura algodonosa en el centro, más aplanada hacia el margen.

Pigmento difusible: Ausente.

Micelio vegetativo: Delgado, dematiáceo y septado.

Propágulos: Fragmaconidios de cuatro células, dematiáceos, casi rectos, solitarios de origen blástico, con el septo central más oscuro que los demás y el ápice achatado. Se originan de un conidióforo simpodial y porógeno.

Fotografías de la microscopía:

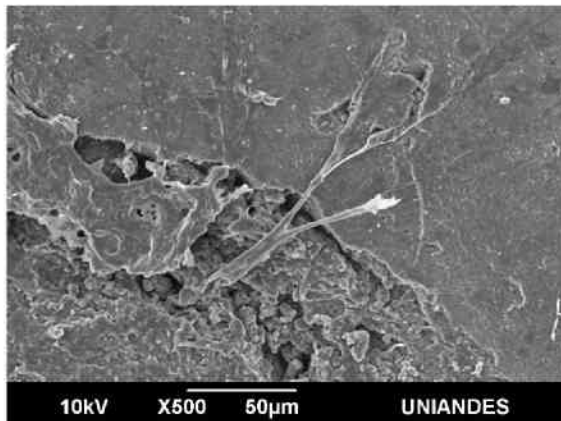




Fotografía del Erlenmeyer (neumático+caldo Radha) tras 8 semanas en agitación:



Fotografía del SEM:



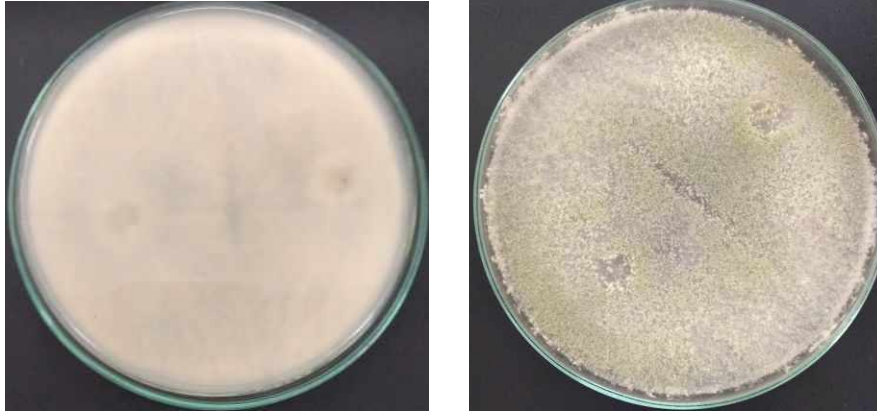
Código: 0201-3F

Medio de cultivo: Agar papa dextrosa + 50mg L⁻¹ clorafenicol.

Edad de la colonia: Cinco días.

Especie identificada: *Trichoderma* sp. 1

Fotografía del reverso y anverso:



Descripción del reverso: Color blanco.

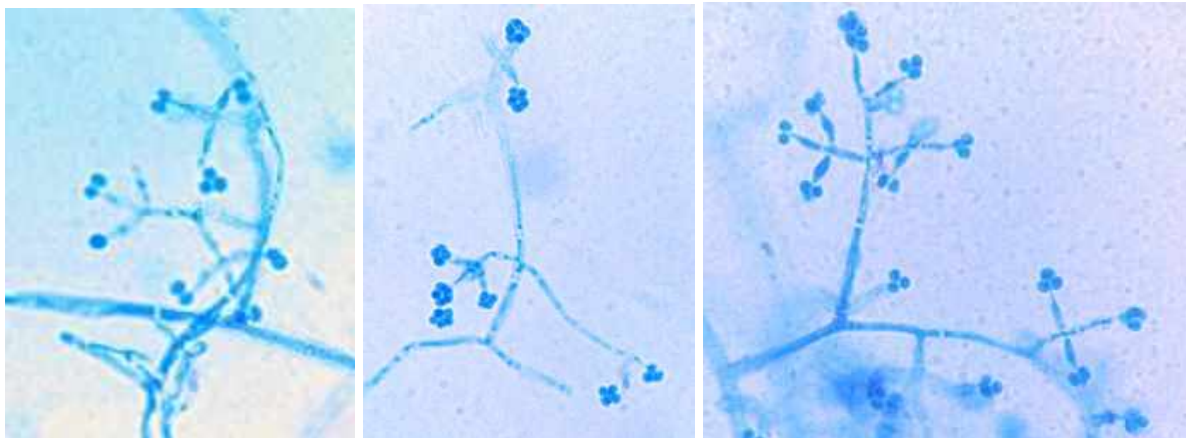
Descripción del anverso: Colonias color blanco con verde claro, de textura algodonosa compacta.

Pigmento difusible: Ausente.

Micelio vegetativo: Muy delgado, hialino y septado.

Propágulos: Ameroconidios esféricos, verdosos, en cabezas mucilaginosas. Se originan en fiálides con forma de botella (sucesión basipétala, origen blástico), de conidióforos ramificados.

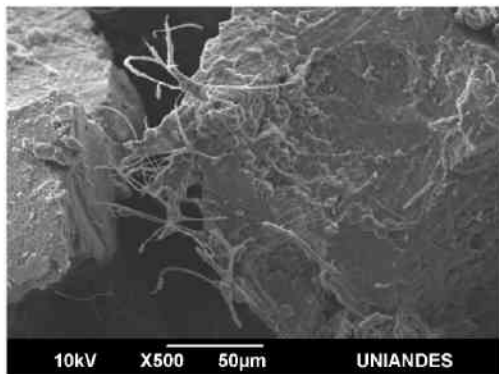
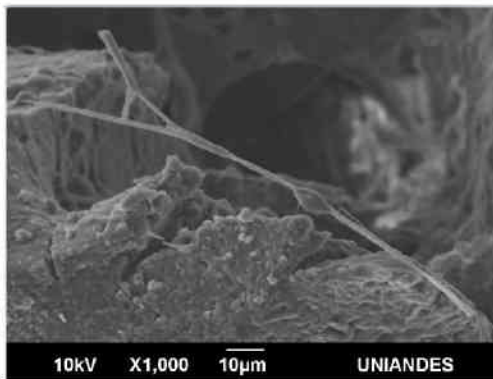
Fotografías de la microscopía:



Fotografía del Erlenmeyer (neumático+caldo Radha) tras 8 semanas en agitación:



Fotografía del SEM:



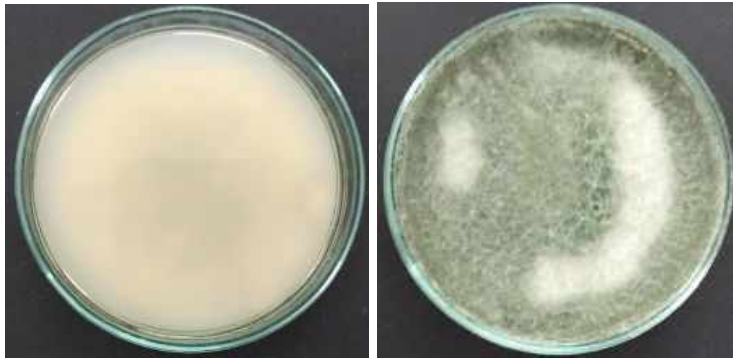
Código: 0301-1 D

Medio de cultivo: Agar papa dextrosa + 50mg L⁻¹ clorafenicol.

Edad de la colonia: 30 días.

Especie identificada: *Trichoderma* sp. 3

Fotografía del reverso y anverso:



Descripción del reverso:

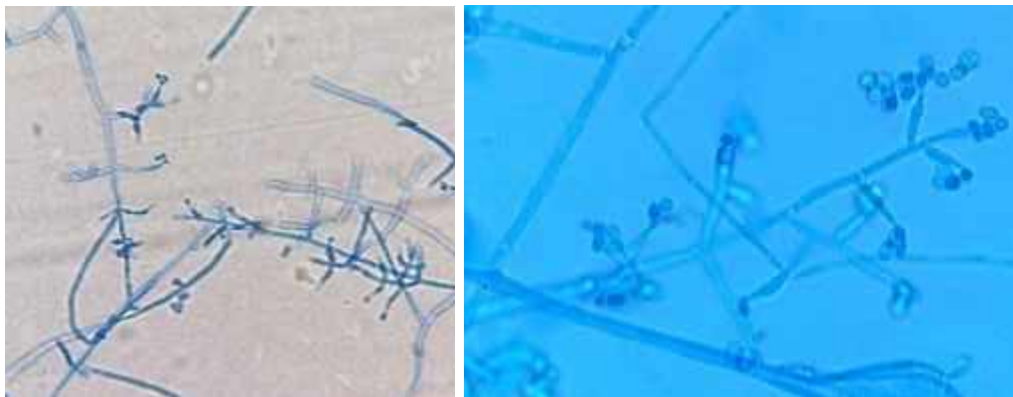
Descripción del anverso:

Pigmento difusible: Ausente.

Micelio vegetativo: Delgado, hialino y septado.

Propágulos: Ameroconidios esféricos, verdosos, en cabezas mucilaginosas. Se originan en fiálides con forma de botella (sucesión basipétala, origen blástico), de conidióforos ramificados.

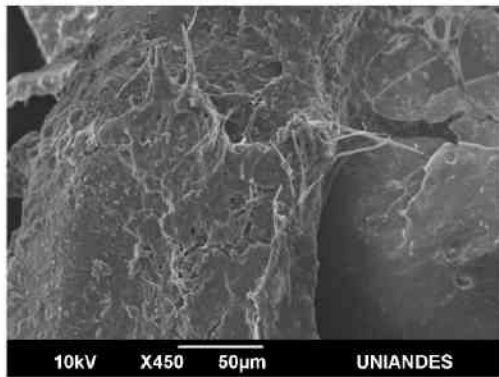
Fotografías de la microscopía:



Fotografía del Erlenmeyer (neumático+caldo Radha) tras 8 semanas en agitación:



Fotografía del SEM:



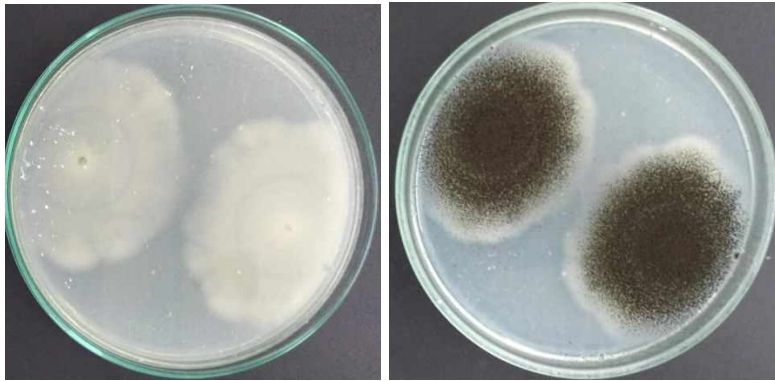
Código: 0202-1C

Medio de cultivo: Agar papa dextrosa + 50mg L⁻¹ clorafenicol.

Edad de la colonia: Cinco días.

Especie identificada: *Aspergillus* sp.

Fotografía del reverso y anverso:



Descripción del reverso: Color blanco

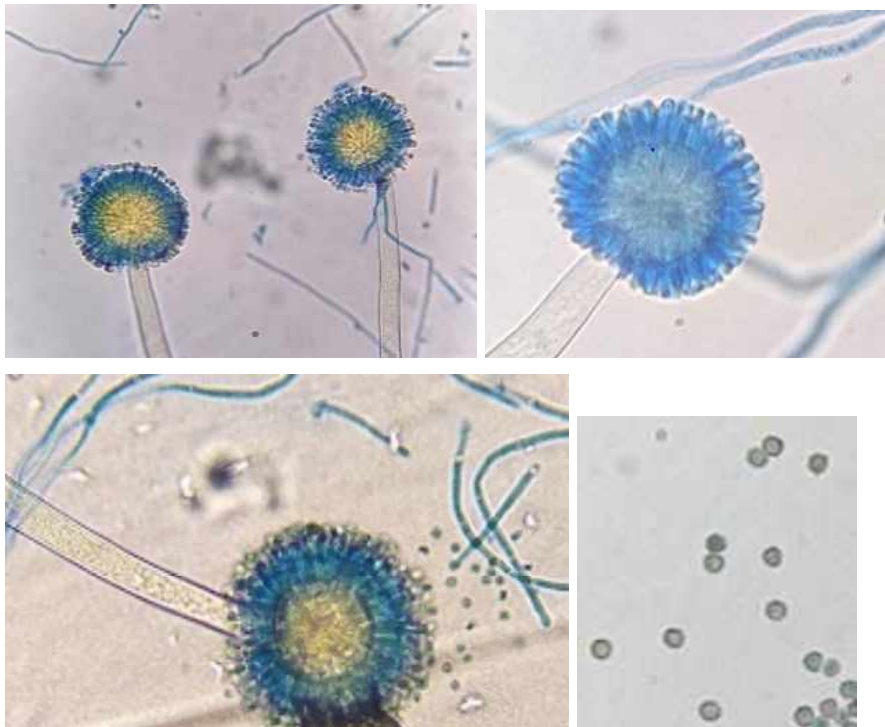
Descripción del anverso: Colonias color negro con márgenes blancos, de textura pulverulenta.

Pigmento difusible: Ausente.

Micelio vegetativo: Delgado, hialino y septado.

Propágulos: Ameroconidios esféricos, equinulados y dematiaceos. Se originan en fiálides (sucesión basipétala) ubicadas sobre una vesícula globosa en el ápice de los conidióforos.

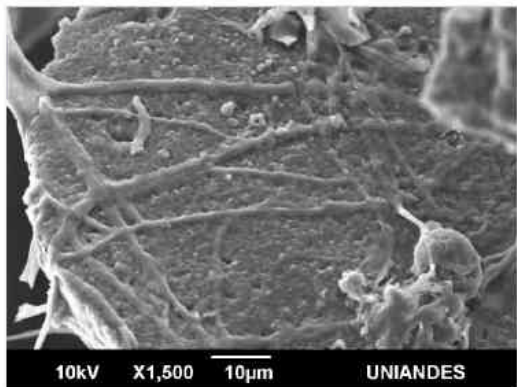
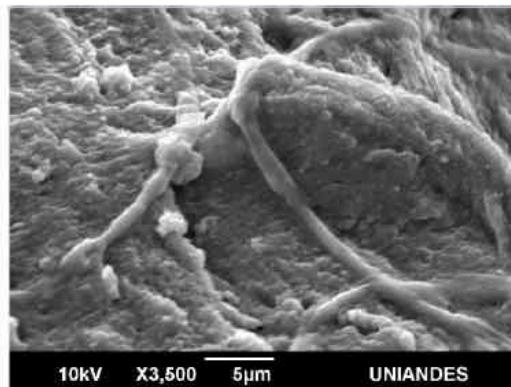
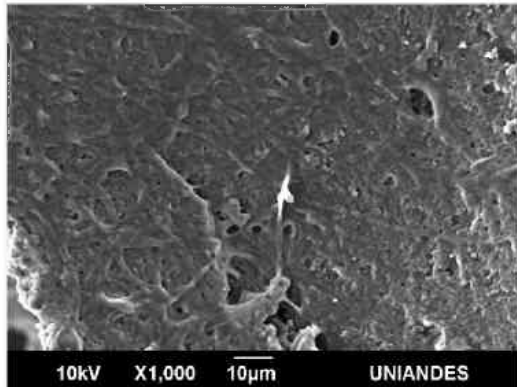
Fotografías de la microscopía:



Fotografía del Erlenmeyer (neumático+caldo Radha) tras 8 semanas en agitación:



Fotografía del SEM:



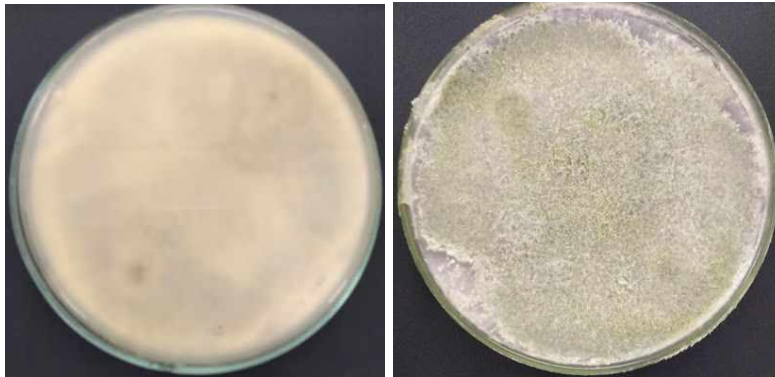
Código: 0202-3D

Medio de cultivo: Agar papa dextrosa + 50mg L⁻¹ clorafenicol.

Edad de la colonia: Cinco días.

Especie identificada: *Trichoderma* sp. 2

Fotografía del reverso y anverso:



Descripción del reverso:

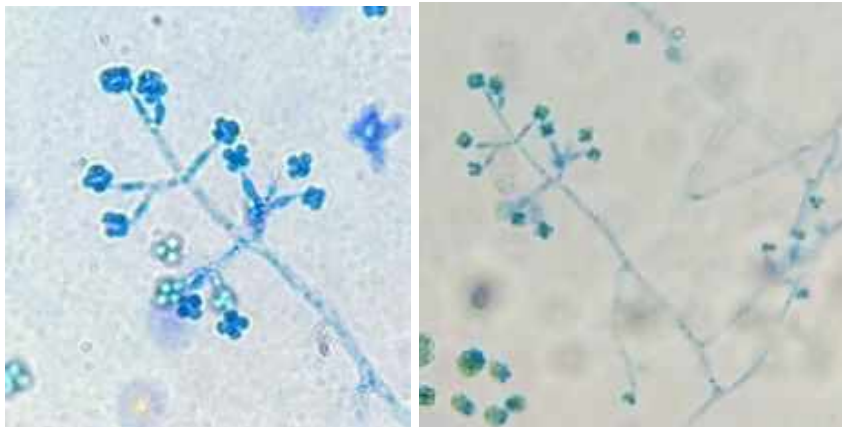
Descripción del anverso:

Pigmento difusible: Ausente.

Micelio vegetativo: Muy delgado, hialino y septado.

Propágulos: Ameroconidios esféricos, verdosos, en cabezas mucilaginosas. Se originan en fiálides con forma de botella (sucesión basipétala, origen blástico), de conidióforos ramificados.

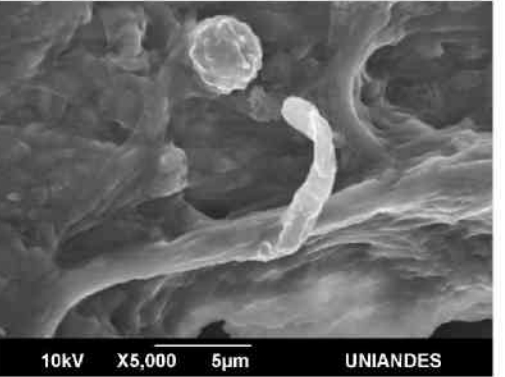
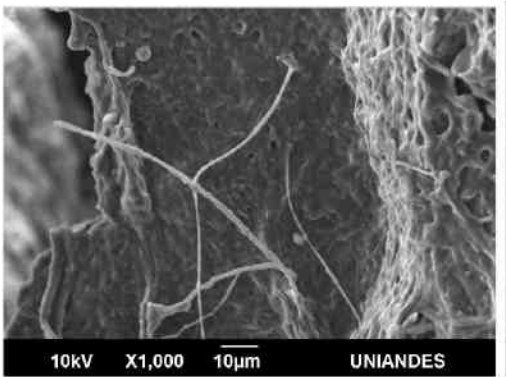
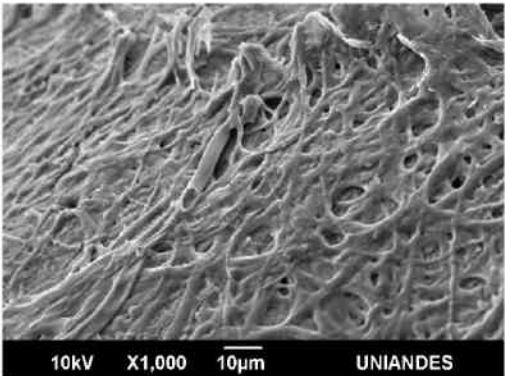
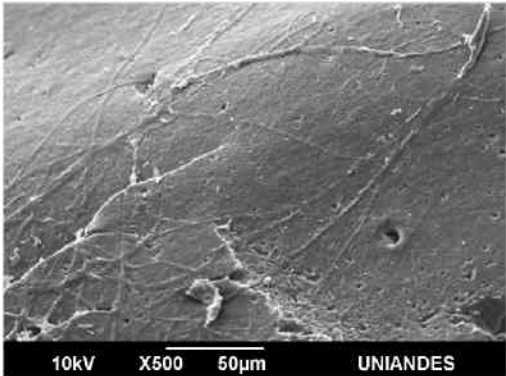
Fotografías de la microscopía:



Fotografía del Erlenmeyer (neumático+caldo Radha) tras 8 semanas en agitación:



Fotografía del SEM:



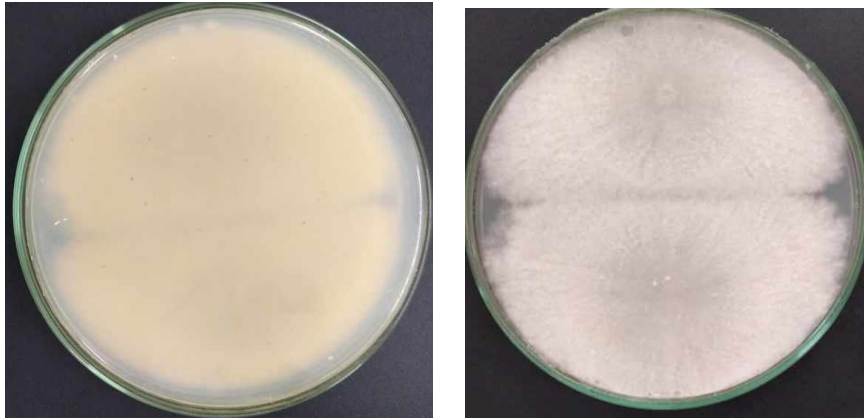
Código: 0502-3D

Medio de cultivo: Agar papa dextrosa + 50mg L⁻¹ clorafenicol.

Edad de la colonia: 30 días.

Especie identificada: No identificada

Fotografía del reverso y anverso:



Descripción del reverso: Color crema.

Descripción del anverso: Colonias de color blanco, radiadas y de textura algodonosa muy compacta.

Pigmento difusible: Ausente.

Micelio vegetativo: Delgado, hialino y septado.

Propágulos: No se observan

Fotografías de la microscopía:



Fotografía del Erlenmeyer (neumático+caldo Radha) tras 8 semanas en agitación:



Fotografía del SEM:

