



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS



LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES
MICROBIOLÓGICAS "DRA. CELINA ARAUJO DE PÉREZ".

**"BUSQUEDA DE MICROORGANISMOS EXTREMÓFILOS
BIODEGRADADORES DE CAUCHOS, AISLADOS DE CAUCHERAS DE LA
CIUDAD DE MÉRIDA"**

www.bdigital.ula.ve

Mérida, Febrero del 2019



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS



LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES
MICROBIOLÓGICAS “DRA. CELINA ARAUJO DE PÉREZ”.

**“BUSQUEDA DE MICROORGANISMOS EXTREMÓFILOS
BIODEGRADADORES DE CAUCHOS, AISLADOS DE CAUCHERAS DE LA
CIUDAD DE MÉRIDA”**

(Para optar por el título de Licenciada en Bioanálisis)

www.bdigital.ula.ve

Elaborado por:

Br. Ladymar Coromoto Mideros Vielma.

C.I: 20.849.454

Tutor: MSc. José Manuel Jiménez Medina

Mérida, Febrero del 2019

Agradecimientos

Primeramente, a Dios Todopoderoso por siempre estar ahí, por darme la fe y la paciencia para seguir adelante, y no abandonar, por hacerme ver que vale la pena luchar por lo que se quiere.

A mi Mami por ser un gran apoyo incondicional, por impulsarme y apoyarme en cada paso que he dado, por confiar en mí y en mis capacidades y nunca abandonarme, a mi Papi, por estar presente en todo momento en este largo camino, y ser ese gran apoyo.

A mi hermana Betzabe, por apoyarme y siempre ser fortaleza cuando todo se veía tan difícil, por amar y cuidar de mi amor como si fuera su hijo, a mi hermana Andreina, gracias por ser esa guía que aclaraba mis dudas y me orientaba en aquello que no entendía, mi guía de redacción y mi apoyo.

A mi Tía Vilza por ser tan incondicional en todo momento, a mis madres putativas y amigas Alis Herlinda, Maritza y Mariluz gracias por ser tan especiales conmigo. A mi amigo Alfredo por ser tan especial y único, a mi amiga Yasmeli, Marlet, y a todo el personal de la biblioteca.

Al Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia, por su apoyo durante el proceso de investigación, al departamento de Medios de cultivo, y muy especialmente a la Licenciada María Eugenia Nieves por ser una profesora más y reavivar en mí ese amor al Bioanálisis.

A mi tutor MSc. José Manuel Jiménez Medina por aceptar ser esa guía en este trabajo de investigación. A todos lo que aún faltan por nombrar y que han estado ahí, que me han hecho sentir que no estoy sola y que siempre hay alguien a mi lado apoyándome, a todos y cada uno de ustedes mis más sinceros agradecimientos, ustedes han hecho que este largo camino sea más feliz, llevadero y placentero, gracias muchas gracias por formar parte de mi vida, que Dios se los pague y multiplique en bendiciones.

Dedicatoria.

A Dios y a mi Jesús de Nazareth a ustedes les dedico este trabajo, porque sin ustedes no habría luz en el camino.

A mi Mami y a mi Papi por guiarnos bajo el camino de la enseñanza por querer verme como toda una profesional.

A mi pequeño Noah Santiago, a ti mi hermosa bendición de Dios, tú que aun cuando estás tan pequeño me has apoyado y sueñas con ver a tu mami con esa bata blanca y el título en mano.

A mis hermanas, mi mamita, mi papito, mi tía Vilza y todos los que me han apoyado, a ustedes de corazón dedico este trabajo de investigación, ustedes han sido fortaleza e inspiración en este camino.

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE

	Pág.
Resumen	1
Introducción	2
Capítulo I	4
Planteamiento del problema	4
Justificación	6
Hipótesis	7
Objetivos	7
Objetivo General	8
Objetivos específicos	8
Alcances	8
Limitaciones	8
Capítulo II	9
Mundo microbiano	9
Bacterias	10
Hongos	11
Parásitos	12
Virus	12
Microorganismos extremófilos	13
Tipos de organismos extremófilos	13

	Pág.
Microbiota del suelo	14
Características de algunos microorganismos del suelo	16
Historia del caucho	20
Historia del caucho natural	22
Caucho natural, estructura y composición	24
Propiedades físicas y químicas del caucho natural	25
Caucho sintético	26
Trabajos de investigación realizados con caucho	28
Biotecnología	33
Tipos de Biotecnología	35
Biorremediación	36
Espectroscopia infrarroja	37
Capítulo III	44
Marco metodológico	44
Diseño de la investigación	44
Tipo de investigación	44
Unidad de investigación	45
Población	45
Muestra	45
Variable independiente	45
Variable dependiente	46

	Pág.
Procedimiento o metodología	46
Experimento N°1	47
Experimento N°2	48
Espectroscopia de infrarrojo	53
Capítulo IV	54
Resultados y discusiones	54
Capítulo V	63
Conclusiones	63
Recomendaciones	64
Anexos	65
Referencias Bibliohemerográficas	77

Resumen

Analizando la situación a nivel mundial de contaminación, y viendo el gran auge que corresponde al descarte de los cauchos es desusos se buscaron nuevas alternativas de biorremediación para el descarte y reciclaje de los mismos, por lo tanto, se recolectaron muestras del suelo de diferentes caucheras y se inocularon en el medio tripticasa soya a temperatura ambiente, se obtuvieron microorganismos y se sometieron a crecimiento en un medio restrictivo conocido como M9 suplementado con caucho biodisponible y caucho lijado, se observó crecimiento de 4 muestras las cuales, mediante tinción de Gram, resultaron ser bacterias grampositivas con diferentes morfologías. Teniendo que la muestra N°9, eran bacilos grampositivos, muestra N°11 cocos grampositivos, muestra N°12 bacilos grampositivos y finalmente la muestra N°22 bacilos grampositivos. Todos estos microorganismos fueron sometidos a pruebas bioquímicas y se concluyó que la muestra N°9 correspondía a bacilos grampositivos, catalasa positivo no esporulados, muestra N°11 *Micrococcus* spp, muestra N°12 *Bacillus* spp1 y muestra N°22 *Bacillus* spp2. Para verificar el crecimiento de las bacterias a partir del carbono del caucho, se realizó espectroscopia infrarroja sobre los medios inoculados y sin inocular, obteniendo que las bacterias utilizan las sustancias formadas de la unión de las sales con el caucho, demostrando de esta manera y confirmando que existen bacterias capaces de crecer utilizando como única fuente de carbono el caucho y pudiendo ser clasificados como microorganismos extremófilos con capacidad biodegradadora del caucho.

INTRODUCCIÓN.

En la actualidad a nivel mundial la industria automotriz ha agrandado su auge teniendo un alcance de 1.2 billones de vehículos aproximadamente¹, y esto ha traído como consecuencia beneficios de transporte, movilidad y comodidad para la sociedad, pero este avance ha ocasionado grandes problemas de contaminación ambiental; ya que cada vehículo al pasar por el proceso de la combustión de la gasolina, gasoil o gas generan monóxido de carbono el cual es un contaminante muy potente para la atmosfera, además cada vehículo necesita cambio de aceite y neumáticos cada cierto tiempo, en muchas industrias reutilizan el aceite para darle una segunda vida útil, pero la cantidad de neumáticos que se descartan por automóvil es más grande y las técnicas de reutilización o degradación aun no son suficientes para evitar que los cauchos generen contaminación y deterioro del ambiente.

www.bdigital.ula.ve

Como bien se sabe, el caucho es un material que no es biodegradable, es un producto obtenido por medio de la coagulación del látex emanado de algunas plantas, en especial del árbol de caucho *Hevea brasiliensis*². El látex obtenido del sangrado de los árboles es procesado, con lo que se obtienen las distintas calidades de caucho natural³. El caucho natural, solo o mezclado con el caucho sintético, o mezclas de ambos, es utilizado por la industria para la elaboración de semi productos o formas básicas como por ejemplo caucho sin vulcanizar, hilos y cuerdas de caucho vulcanizado y otros artículos de diverso uso. Estos, a su vez, se utilizan en la producción de numerosos productos como llantas neumáticas para camiones, neumáticos para vehículos de pasajeros y de producción agrícola, guantes, impermeables y otros³.

En Venezuela se le conoce al neumático como caucho, sin tomar en cuenta si son elaborados a partir de caucho natural o sintético, nuestro país posee una gran cantidad de caucheras, que se dedican a reparar neumáticos o al cambio y venta de los mismos, observando el descarte de muchos de ellos. En muchas partes se reciclan los cauchos, y se les usa usan de diferentes maneras; la forma de los neumáticos favorece el crecimiento de microorganismos y organismos patógenos y esto conlleva a generar con el tiempo enfermedades que deterioran la salud de la sociedad.

El Bioanálisis permite identificar microorganismos y participar en el desarrollo de nuevos productos y en la producción de fármacos y vacunas entonces trabajando de la mano con la biorremediación, se plantea poder identificar algún microorganismo extremófilos que degrade el caucho y sirva como una posible solución para el descarte de los mismos. Actualmente se utilizan técnicas avanzadas que normalmente no se utilizan en procesos microbiológicos como es la espectroscopia infrarroja la cual detecta los movimientos vibracionales de los grupos moleculares presentes en muestras químicas y biológicas⁴, se usa normalmente para elucidar y determinar compuestos químicos, además de, clasificar microorganismos, en el presente trabajo se utiliza como herramienta para verificar la modificación de los medios de cultivo utilizados para crecer los microorganismos aislados.

CAPÍTULO I

Planteamiento del problema

En la actualidad el problema de contaminación ambiental ha ocasionado grandes problemas en el cambio climático a nivel mundial. El hombre en su afán de crear mejor calidad de vida, lo ha llevado a utilizar materiales que son altamente contaminantes, y que en su caso tardan miles de años para que se degraden. Sin tomar en cuenta que estos materiales aparte de contaminar el medio ambiente dañan ecosistemas y alteran el equilibrio tanto de la flora como de la fauna.

Existen miles de contaminantes a nivel mundial, unos agregan sustancias tóxicas al medio, otros alteran el estado nutricional del agua y la tierra, y otros favorecen el crecimiento de microorganismos que afectan a otros seres vivos, en este último grupo corresponde el caucho (neumático), que luego de cumplir su vida útil son descartados de manera inadecuada, dando usos pocos favorables para el medio ambiente, en muchas ciudades el caucho (neumático) se utiliza para realizar muros de contención, arrecifes en el mar, pisos, paredes, y se le dan otros usos que permitan su reciclado⁵.

Sin embargo, el exceso de neumáticos en un ambiente determinado evita el uso adecuado de este medio y favorece la contaminación por otros agentes debido al diseño del neumático que cuando cae agua de lluvia reiteradamente es difícilísimo sacarla una vez que ha entrado en ella y siempre quedará un fondo dentro de la cubierta. Esa agua es el caldo de cultivo ideal para que aniden ratas, insectos y otros animales o microorganismos que pueden

resultar más peligrosos que los que se multiplican en una charca que puedan contribuir al daño y destrucción de dicho espacio. Aun cuando los avances científicos son de tan gran magnitud, estos no se dan abasto para solucionar este problema que afecta la ecología.

En muchos casos para descartar el caucho(neumático) los incineran, pero al ser sometidos a dicho proceso este genera productos altamente tóxicos, que crean un problema ambiental de otro ámbito, debido a este problema con el pasar de los años se buscaron nuevas alternativas que generaran soluciones y alrededor de la década de los 80 observaron que era posible aplicar estrategias de remediación que fuesen biológicas, basadas en la capacidad de los microorganismos de realizar procesos degradativos, y le dieron el nombre de biorremediación siendo una rama de la biotecnología⁶.

Esta ciencia ha generado grandes soluciones a los problemas de contaminación, y tomando en cuenta la gran cantidad de neumáticos y de productos derivados del caucho nace el enfoque de esta investigación, que nos lleva a formular las siguientes interrogantes:

¿Serán capaces algunos microorganismos de degradar el caucho utilizándolo como única fuente de carbono?

¿Modificara las condiciones del medio de cultivo con caucho los microorganismos?

Justificación

Anualmente la fabricación de caucho (neumático) a nivel nacional es enorme y debido a esta gran cantidad resulta un gran problema cuando deben ser desechados ya que muchos terminan en lotes baldíos, ríos, carreteras, dicha situación no solo arruina nuestros paisajes, sino que se convierte en un factor generador de incendios. Este último es el problema más serio ya que ocasiona severos daños a nuestra salud, pues como se ha verificado, varios estudios técnicos han demostrado que la quema de llantas libera sustancias de máxima peligrosidad para el ser humano, tales como monóxido de carbono, dióxido de azufre, furanos, tolueno, benceno y óxido de plomo, los efectos dañinos que estos pueden ocasionar a nuestra salud son irreversibles⁷.

Aun cuando se conocen muchas maneras de reciclar los neumáticos sumamente interesantes y que logran éxitos parciales de suma importancia este sigue siendo un gran factor de contaminación, la falta de conciencia por parte del ser humano y la poca información que es transmitida, lleva a la población a darle usos que no son los mejores, generando un problema medio ambiental de primer orden en todo el mundo.

Si bien es conocido que en la actualidad el caucho neumático se encuentra compuesto de un polímero del isopreno o metil butadieno, su peso molecular es muy elevado y se estima superior a 10.000 Daltons por lo que su combustión en presencia de escaso aire es dificultosa y emite gran cantidad de sustancias de naturaleza carbo-alquitranosas⁸, además dependiendo de la compañía son agregadas otras sustancias que favorecen a la formación del neumático y su duración, todos estos compuestos y componentes si no son

degradados o descartados de la manera adecuada, ocasionan efectos secundarios altamente peligrosos.

En Mérida uno de los usos más comunes de los neumáticos para ser reciclados es en la fabricación de muros de contención, y aun cuando son muy buenos y efectivos, la alta demanda de neumáticos fuera de uso es más grande, generando un problema de gran magnitud.

Hipótesis

Si se colocan a crecer microorganismos recolectados de suelos de caucheras y se someten al crecimiento en un medio restrictivo con caucho, entonces se observarán microorganismos capaces de utilizar el caucho como única fuente de carbono, demostrando su capacidad de biodegradación sobre el mismo.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar la capacidad de degradación de caucho de los microorganismos aislados de diferentes caucheras del Estado Mérida.

Objetivos específicos.

- Aislar microorganismos tomados a partir de muestras del suelo de las caucheras del Estado Mérida.
- Caracterizar los microorganismos tomados a partir de muestras del suelo de las caucheras del Estado Mérida.
- Comprobar la capacidad de los microorganismos de degradar el caucho al exponerlo a medio mínimo suplementado con caucho y verificar con espectroscopia infrarroja.
- Clasificar los microorganismos capaces de degradar el caucho.

Alcances

- El trabajo de investigación explorara los microorganismos presentes en los suelos de las caucheras del estado Mérida con capacidad de biodegradar el caucho.
- La investigación permitirá identificar por género los microorganismos con dicha capacidad.

Limitaciones

- El poco acceso a material microbiológico limitara la toma de muestra de las caucheras, solo aquellas cercanas a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis
- La poca información de espectroscopia infrarrojo con respecto al crecimiento de microorganismos en el medio M9.

CAPÍTULO II

Mundo microbiano

En 1674 el biólogo holandés Antón Van Leeuwenhoek cuando examinó con sus lentes de microscopio una gota de agua y descubrió un mundo formado por millones de diminutos «animáculos», conocidos actualmente como microorganismos. Los microorganismos son los seres más primitivos y numerosos que existen en la Tierra, colonizan todo ambiente: suelo, agua y aire, participan de forma vital en todos los ecosistemas y están en interacción continua con las plantas, los animales y el hombre. Los microorganismos son clave para el funcionamiento de los sistemas biológicos y el mantenimiento de la vida sobre el planeta, pues participan en procesos metabólicos, ecológicos y biotecnológicos de los cuales dependemos para sobrevivir y enfrentar los retos del futuro. Estos retos son gigantescos para la continuidad de la vida, en particular, para satisfacer la demanda de alimentos y medicamentos y resolver problemas ecológicos y de contaminación ambiental⁹.

Aproximadamente cien años después el biólogo danés Otto Müller amplió los estudios de van Leeuwenhoek y, siguió los métodos de clasificación de Carlos Linneo, organizó a las bacterias en géneros y especies. Se trató del inicio de la clasificación taxonómica de los microorganismos. En 1840, el anatomopatólogo alemán Friedrich Henle propuso unos criterios para demostrar que los microorganismos eran responsables de la aparición de enfermedades en el ser humano¹⁰.

El mundo descubierto por Van Leeuwenhoek era complejo y estaba formado por protozoos y bacterias de todas las formas y tamaños. Sin embargo, la complejidad de la microbiología médica actual se acerca al límite de la imaginación. Así, en la actualidad se sabe que existen miles de diferentes tipos de microorganismos que viven en el interior, la superficie o alrededor del ser humano y, asimismo, pueden contarse por centenares los que son capaces de provocar en él enfermedades graves. Para entender esta información y organizarla de una forma útil, es importante conocer algunos de los aspectos básicos de la microbiología. En principio, los microorganismos pueden subdividirse en cuatro grupos: virus, bacterias, hongos y parásitos (dotado cada uno de ellos de su propia complejidad)¹⁰.

Bacterias

Las bacterias poseen una estructura relativamente simple. Son microorganismos procariotas, es decir, unos microorganismos unicelulares sencillos, sin membrana nuclear, mitocondrias, aparato de Golgi ni retículo endoplásmico que se reproducen por división asexual. La pared celular que rodea a las bacterias es compleja, y existen dos formas básicas: una pared celular grampositiva con una gruesa capa de peptidoglucano y una pared celular gramnegativa con una delgada capa de peptidoglucano, así como una membrana externa. Algunas bacterias carecen de pared celular y compensan su ausencia sobreviviendo tan sólo en el interior de células del organismo anfitrión o en un ambiente hipertónico¹¹.

Para realizar una clasificación preliminar de las bacterias se utiliza su tamaño (de 1 a 20 μm o más), forma (esferas, bastoncillos, espirales) y disposición espacial (células aisladas, en cadenas y formando cúmulos); mientras que su

clasificación definitiva se refiere a sus propiedades fenotípicas y genotípicas. El organismo humano está habitado por miles de especies bacterianas distintas; mientras algunas mantienen una relación parasitaria temporal, otras habitan en el ser humano de manera permanente¹¹.

También se encuentran bacterias en el ambiente, como el aire que se respira, el agua que se bebe y los alimentos que se comen; aunque muchas de ellas son relativamente avirulentas, otras son capaces de provocar enfermedades potencialmente mortales. La enfermedad puede deberse a los efectos tóxicos de los productos bacterianos (toxinas) o bien a la invasión de regiones corporales que acostumbran a ser estériles¹¹.

Hongos

www.bdigital.ula.ve

A diferencia de las bacterias, la estructura celular de los hongos es más compleja. Son microorganismos eucariotas que poseen un núcleo bien definido, mitocondrias, aparato de Golgi y retículo endoplásmico. Los hongos pueden existir en una forma unicelular (levadura) capaz de replicarse de manera asexual, o en una forma filamentosa (moho), capaz de replicarse de forma tanto asexual como sexual. La mayor parte de los hongos existen en forma de levadura o bien en forma de moho. Sin embargo, algunos de ellos pueden adoptar ambas morfologías; se trata de los llamados hongos dimórficos, como *Histoplasma*, *Blastomyces* y *Coccidioides*¹¹.

Parásitos

Los parásitos son los microorganismos con mayor grado de complejidad. Aunque todos los parásitos se clasifican como eucariotas, algunos son unicelulares y otros son pluricelulares. Su tamaño oscila desde diminutos protozoos de 1-2 μm de diámetro (es decir, el tamaño de muchas bacterias) a los artrópodos y cestodos que llegan a medir hasta 10 m de largo. De hecho, resulta difícil imaginar cómo pudo clasificarse a estos microorganismos como «microbios» teniendo en cuenta el tamaño de algunos de ellos. Su ciclo de vida es, igualmente, complejo, de forma que algunos establecen una relación permanente con el ser humano y otros atraviesan un conjunto de etapas de desarrollo en una serie de anfitriones animales¹¹.

Virus www.bdigital.ula.ve

Los virus son las partículas infecciosas de menor tamaño, con un diámetro que oscila entre los 18 hasta casi los 300 nm (el tamaño de la mayor parte de los virus es inferior a 200 nm y no pueden visualizarse mediante el microscopio óptico). Se han descrito más de 25 familias víricas que contienen más de 1.550 especies de virus, muchas de las cuales se asocian a enfermedad en el ser humano. Los virus están formados por ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) (no por ambos a la vez) así como por las proteínas necesarias para su replicación y patogenia. Estos componentes se encuentran rodeados por una capa de proteínas, asociada o no a una envoltura membranosa lipídica¹¹.

Microorganismos extremófilos

La participación activa de los microbios en la vida diaria se debe a su versatilidad, diversidad y rapidez de crecimiento afectan a casi todas las esferas de nuestra vida, desde la agricultura hasta la industria y del medio ambiente a la salud. En vista de su papel en la sociedad humana, los microbios han sido el centro de atracción para los investigadores y durante el siglo pasado varios puntos de inflexión y se establecieron hitos. Sin embargo, a pesar de la significativa desarrollos en la biología molecular, las actividades microbianas siguen estando bajo un conjunto limitado de condiciones debido a diferentes restricciones en el cultivo de la población natural, solo se conoce la fracción (1-10%) del mundo microbiano¹².

La supervivencia de los microbios en condiciones extremas proporcionaría pistas importantes sobre el origen y evolución de la vida. Los microorganismos extremófilos son los seres vivos más antiguos de la tierra. Los extremófilos pueden ser bastante útiles para predecir y buscar vida en otros planetas. Los hábitats extremos constituyen un componente importante del vasto potencial biológico inexplorado. Los entornos extremos pueden clasificarse según la naturaleza de sus propiedades físicas y químicas, tomando en cuenta con respecto a sus propiedades microbianas, incluyendo ambientes altamente salinos con salinidad variable, temperaturas extremas¹².

Tipos de microorganismos extremófilos:

- Acidófilo: vive a pH igual o menor que 3¹².
- Alcalófilo: vive a pH igual o mayor que 9.¹²
- Barófilo o piezófilo: vive en ambientes con alta presión líquida o

gaseosa¹².

- Endolito: vive en espacios microscópicos en rocas¹².
- Halófilo: requiere al menos 2M de sales (NaCl) para vivir.
- Hipertermófilo: vive a temperaturas mayores a 80-121 °C, como los sistemas hidrotermales¹².
- Hipolito: vive dentro de las rocas de los desiertos fríos¹².
- Litoautotrofo: pueden obtener energía por reducción de compuestos minerales como la pirita, por ejemplo¹².
- Metalotolerante: capaz de tolerar altas concentraciones de metales pesados en solución, como cobre, cadmio, arsénico, y zinc¹².
- Oligotrofo: que puede crecer en ambientes con nutrientes limitados¹².
- Osmófilo: que puede crecer en ambientes con alta concentración de azúcares¹².
- Poliextremófilo: extremófilo para más de una categoría¹².
- Psicrófilo o criófilo: que vive a temperaturas de 15 °C o menos¹².
- Radio-resistente: que resiste a altos niveles de radiaciones ionizantes, como UV, o radiación nuclear¹².
- Termófilo: que vive a temperaturas entre 60 y 80 °C¹².
- Xerófilo: que puede vivir en ambientes extremadamente secos, como los desiertos¹².

Microbiota del suelo

La microbiota del suelo tiene una gran variedad de microorganismos formada por una mezcla microscópica de miles y millones de bacterias, actinomicetos, hongos, protozoos, y otros, por cada gramo de suelo, que cumplen un rol esencial en los procesos biogeoquímicos de la materia. Existen muchos microorganismos del suelo reportados como productores de metabolitos

biológicamente activos, se tiene a los hongos, a las bacterias y Actinomycetos; además hay muchos microorganismos antagónicos que existen naturalmente en los suelos de los campos de cultivo y ejercen cierto grado de control biológico sobre uno o muchos fitopatógenos¹³.

Los microorganismos del suelo contribuyen al mantenimiento de la fertilidad química, física y biológica del suelo. Transforman nutrientes inorgánicos, que de otra forma no pueden ser absorbidos por la planta; además favorecen la descomposición y mineralización de la materia orgánica¹⁴. La mayoría de la población bacteriana organotrófica aerobia de gran parte de los suelos está compuesta por géneros Gram positivos. No se generaliza los porcentajes de varios grupos, pero no es extraño que hasta el 70% de la totalidad de los aislamientos bacterianos del suelo se clasifican dentro de las denominadas bacterias grampositivas del género *Arthrobacter* sp, siendo la mayoría de la microflora restante *Bacillus* sp y *Micrococcus* sp¹⁵.

La población Gram negativa generalmente está compuesta en su mayor parte por *Pseudomonas* sp y *Flavobacterium* sp. Otros géneros relativamente frecuentes considerados nativos incluyen a *Acinetobacter* sp, *Agrobacterium* sp, *Alcaligenes* sp y *Nocardia* sp. La variabilidad de las comunidades microbianas del suelo depende mayormente de la viabilidad para metabolizar una fuente de carbono, la disponibilidad de macro y microelementos, el contenido de agua, el pH y el tamaño de las partículas. Cuando estas características se alternan producen ambientes anaerobios, saturados o tóxicos según sea el nivel de presencia, ahí es donde se encuentran especies bacterianas con propiedades metabólicas incomparables y procesos adaptativos regidos por componente enzimáticos desconocidos¹⁵.

Muchos géneros de bacterias aisladas de climas extremos se han utilizados en biorremediación de hidrocarburos en diferentes tipos de terrenos con un óptimo resultado frente a otros mecanismos físicos o químicos, más demorados, costosos o con residuos no tan tóxicos, pero de difícil degradación. De estos géneros se han creado diferentes inóculos de varios tipos de microorganismos que interaccionan de forma más insuperable y cómodo control¹⁵.

Ciertos hongos que degradan la celulosa, la quitina y el fósforo que se encuentran como microbiota del suelo son *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Verticillum*, y *Chaetomium*, algunas bacterias como *Bacillus*, *Clostridium*, *Nocardia*, *Streptomyces* y otros hongos como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* ayudan a reducir la acumulación de agroquímicos en el suelo, ya que pueden utilizar algunos de ellos como fuente de carbono¹⁶. Entre algunos parásitos aislados a partir de muestras de suelo se encuentran *Trichuris* sp., *Ascaris lumbricoides* y otros¹⁷.

Características de algunos microorganismos del suelo.

- *Arthrobacter* spp.: Bacilos aerobios. Bastante resistentes a la desecación y falta de nutrientes. Ciclo de vida en el que alternan las formas de coco y bacilo. Son bacterias del suelo. Degradan moléculas de difícil degradación, tales como herbicidas, pesticidas y derivados del petróleo (Mineralización)¹⁸.
- *Bacillus* spp: Las bacterias del género *Bacillus* típicamente son bacilos grampositivos que producen endosporas. Se les encuentra con

frecuencia en el suelo y sólo algunas son patógenas para los seres humanos. Varias especies producen antibióticos¹¹.

- *Micrococcus* spp: Son cocos grampositivos, aerobios estrictos, forman asociaciones en pareja, tétradas o racimos, tienen presencia de carotenoides amarillo, naranja o rojo. Ampliamente distribuidos en la superficie de objetos inanimados, partículas de polvo y suelos. No son patógenos¹⁸.
- *Pseudomonas* spp. Este género es muy importante, consiste en bacilos gramnegativos aerobios que se mueven por medio de flagelos polares, sean únicos o en mechones. Estos microorganismos son muy comunes en el suelo y en otros ambientes naturales. Muchas especies de *Pseudomonas* segregan pigmentos hidrosolubles extracelulares que se difunden en el medio¹¹.
- *Flavobacterium* spp: Son bacterias gramnegativas en forma de bacilos, se encuentran en el suelo y en agua dulce. Causantes de las enfermedades en los salmónidos¹¹.
- *Acinetobacter* spp: son bacilos o cocobacilos gramnegativos, muchas veces dispuestos en parejas. No fermentan la glucosa y son aerobios estrictos, inmóviles, catalasa positivos y oxidasa negativos. Crecen bien en todos los medios de cultivo de rutina, siendo su temperatura óptima de crecimiento de 33 a 35° C, su hábitat natural son las aguas y el suelo¹⁸.
- *Agrobacterium* spp: bacilos gramnegativos no esporulantes, móviles, que crecen en el suelo. Es una bacteria fitopatógena capaz de ocasionar la aparición de agallas y tumores¹¹.
- *Clostridium* spp: Los miembros de este género son anaerobios estrictos. Las células con forma de bacilo contienen endosporas que suelen distenderlas son grampositivas. Su hábitat natural son el suelo, el intestino de los animales y el hombre¹¹.

- *Alcaligenes* spp: Bacilos gramnegativos, con flagelos, aerobios. Habitan en el suelo y agua¹¹.
- *Nocardia* spp: sus miembros son aerobias, bacilos grampositivos, filamentoso ramificado, aerobio, inmóvil, catalasa positiva, Las especies de *Nocardia* son habituales en el suelo¹¹.
- *Streptomyces*: el género mejor conocido de los actinomicetos, es una de las bacterias grampositivas micelio aereo, filamentos ramificados, y cadenas de conidias largas, aisladas con mayor frecuencia del suelo. Las esporas reproductivas asexuales de *Streptomyces* se forman en los extremos de los filamentos aéreos. Estos microorganismos son aerobios estrictos¹¹.
- *Trichoderma*: hongos, sus conidios presentan un tamaño regular, son esféricos y firmemente arracimados, habitan en el suelo¹⁹.
- *Penicillium*: son hongos y sus colonias son granulares, de bordes lisos, por lo general con varias tonalidades de verde, aunque a veces se encuentran variantes amarillas y amarillo castañas. Como se observa con el microscopio, el "penicilio" (cepillo) se produce por la bifurcación del conidióforo en la metula primaria y las fialides secundarias, a partir de cuyos extremos se originan cadenas de conidios¹⁹.
- *Aspergillus*: Las especies de *Aspergillus* están extensamente distribuidas en la naturaleza; se encuentran en el suelo, en la vegetación en descomposición y en una amplia variedad de materia orgánica, son hongos filamentosos con hifas relativamente pequeñas (3-6 μm) de tamaño regular que se ramifican en forma dicotómica en ángulos de 45° con tabiques diferenciados transversales, se encuentran fácilmente en la materia orgánica distribuidos por todo el mundo,¹⁹.
- *Fusarium*: son hongos casi siempre algodonosos o vellosos y tienen una superficie lavanda, rosada a roja o magenta distintiva y pigmentación en el reverso, De los hongos filamentosos hialinos, las

especies de *Fusarium* son las únicas que producen microconidias y macroconidias, habitan en el suelo¹⁹.

- *Verticillium*: es un hongo saprófito vive en el suelo y atacan las plantas cuyas raíces están bajo condiciones de estrés¹⁹.
- *Chaetomium*: son hongos, sus colonias al comienzo son blancas, pero pueden tornarse amarillas, amarillo verdosas o cobre en la madurez. En la microscopia pueden observarse hifas especuladas y grandes que se extienden a través de la pared de las estructuras saculares que constituyen los cleistotecios, dando el aspecto de patas de una araña que se extienden¹⁹.
- *Trichuris* sp: son parásitos, los huevos miden alrededor de 54 x 22 μm , están entre las formas que se reconocen con más facilidad en las preparaciones microscópicas por su forma de barril característica y los “tapones” polares hialinos, convexos y refringentes en cada extremo, se encuentran en el suelo¹⁹.
- *Ascaris lumbricoides*: es un parasito, nematodo, parásitos adultos Miden entre 15 y 35 cm de longitud, los machos son más pequeños y pueden identificarse por su cola curva (lamina en color 22-5A). La cutícula es lisa y carece de las estriaciones musculares anulares características de las lombrices de la tierra. Los huevos fecundados miden entre 45 y 60 μm y los huevos no fecundados, entre 90 x 40 μm . Son amarillo castaño (tenidos con bilis), ovales o esféricos y presentan una cáscara gruesa, transparente y hialina recubierta por una capa albuminoide. Habitan en el suelo¹⁹.

Historia del caucho

El caucho era conocido por los pueblos indígenas de América mucho antes de la llegada de los exploradores europeos en 1525, el Padre d' Anghieria informó que había visto tribus jugando con pelotas elásticas. El primer estudio científico del caucho lo realizó Charles de la Condamine, cuando lo encontró durante su viaje a Perú en 1735. El ingeniero francés que se reunió con Condamine en Guayana, Fresnau estudió el caucho en su casa, llegando a la conclusión de que esto no era más que un "tipo de aceite resinoso condensado"²⁰.

La palabra para goma en portugués era borracha: se originó a partir de una de las primeras aplicaciones para este producto, cuando se usó para hacer jarras reemplazando las borrachas de cuero que usaban los portugueses para enviar vino. Volviendo a las obras de Condamine, Macquer sugirió que el caucho podría usarse para producir tubos flexibles. Desde entonces, innumerables artesanos se han involucraron con el caucho. En 1820, el industrial británico Nadier produjo hilos de goma e intentó usarlos en accesorios para la ropa. Este fue el momento en que América fue capturada por la fiebre del caucho, y la del calzado impermeable usado por los pueblos indígenas se convirtió en un éxito²⁰.

Después de un largo período de intentos desarrollar un proceso para mejorar las cualidades del caucho (como la inclusión del ácido nítrico) que casi lo arruinó, en 1840 Goodyear descubrió la vulcanización, por accidente. En 1815, un humilde aserrador, Hancock, se convirtió en uno de los líderes fabricantes en el Reino Unido, había inventado un colchón de goma y por medio de una asociación con Mac Intosh produjo la famosa capa impermeable conocida

como "macintosh". Además, descubrió cómo cortar, enrollar y prensar caucho a escala industrial, el también notó la importancia del calor durante el proceso de prensado, y construyó una máquina para este propósito. Mac Intosh descubrió el uso de benceno como disolvente, mientras que Hancock descubrió que se requirieron de astillado previo y calentamiento para asegurar que el caucho se disolviera completamente. Hancock también descubrió cómo fabricar bolas elásticas²⁰.

Finalmente, en 1842, Hancock tomó posesión del caucho vulcanizado producido por Goodyear, buscando encontrar el secreto de la vulcanización que le trajo una gran fortuna. En 1845, RW Thomson inventó el neumático, el tubo interior e incluso la textura. En 1850 se fabricaban juguetes de goma, bolas sólidas y huecas para golf y tenis. La invención del velocípede por Michaux en 1869 condujo a la invención del sólido caucho, seguido de caucho hueco y, finalmente, la reinención del neumático, porque el invento de Thomson había sido olvidado²⁰.

Se estudiaron las propiedades físicas del caucho por Payen, así como Graham, Wiesner y Gérard. Finalmente, Bouchardt descubrió cómo polimerizar el isopreno entre 1879 y 1882. El primer neumático de bicicleta se remonta a 1830, y en 1895, Michelin tuvo la atrevida idea de adaptar el neumático al automóvil. Desde entonces, el caucho ha ocupado una posición destacada en el mercado global²⁰.

Como el caucho es una materia prima importante que desempeña un papel importante en la civilización moderna, los químicos pronto sintieron curiosidad por aprender más sobre su composición para sintetizar. En el siglo XIX, el trabajo se centró en este objetivo, descubriendo pronto que el caucho es un

polímero de isopreno. Los rusos y los alemanes abrieron nuevos caminos en sus esfuerzos por sintetizar el caucho. Pero los productos resultantes no pudieron competir con el caucho natural. Fue solo durante la primera Guerra Mundial que Alemania, presionada por las circunstancias, tuvo que desarrollar en versión industrializada de este producto sintético. Este fue el trampolín para el masivo desarrollo de la industria del caucho sintético en todo el mundo, produciendo elastómeros²⁰.

Historia del caucho natural

El caucho natural es un producto sólido obtenido mediante la coagulación del látex producido por ciertas plantas, particularmente el árbol de caucho brasileño *Hevea brasiliensis*. Este material crudo generalmente se extrae del árbol del caucho, que es nativo de la Amazonia. A pesar de que hay una gran cantidad de especies que exudan secreciones similares al látex cuando la corteza se corta, solo unos pocos producen cantidades suficientes de una calidad adecuada para la explotación. La historia del caucho natural en Brasil es una historia tan emocionante como la fiebre del oro en Brasil. En Brasil la revolución industrial se estaba expandiendo rápidamente, como el mundo vivió un tiempo de prosperidad y descubrimientos que se reflejó en todos los sectores, automóviles, tranvías, teléfonos, luz eléctrica y otras innovaciones²⁰.

Gracias a sus múltiples aplicaciones, particularmente en la creciente industria del automóvil, el caucho producido a partir de látex extraído de árboles se convirtió en un producto de gran demanda en todo el mundo. Esto trajo un auge en el norte de Brasil, que en ese momento era uno de los más pobres y menos poblados del país. Con ganas de trabajar los huertos de Amazonia, los

principales bancos extranjeros y las empresas establecieron tiendas en las ciudades de Belém y Manaus²⁰.

La capital del estado de Amazonas se convierte en el corazón económico de Brasil. Estaba equipado con suministros de agua y electricidad, además de teléfonos y grandes edificios como el teatro Amazonas, todavía hoy un símbolo de la riqueza traída por el auge del caucho en Brasil. Durante la década de 1870, invadieron el bosque para aprovechar el látex y convertirlo en caucho. La producción de la Amazonia alcanzó las 42,000 toneladas por año²⁰.

Esta euforia duró hasta 1910, cuando la situación comenzó a cambiar: las exportaciones de caucho comenzaron a aparecer en el mercado desde las colonias británicas y Brasil no pudo soportar esta feroz competencia. En 1876, los británicos sacaron de contrabando semillas de árboles de caucho de la Amazonia a la botánica jardines en Londres. A través del injerto, desarrollaron variedades más resistentes que fueron más tarde enviados a las colonias en Asia, donde se establecieron masivas plantaciones de caucho, particularmente en Malasia, Ceilán y Singapur²⁰.

La diferencia entre las técnicas de producción de látex en Brasil y Asia fue significativa en el desarrollo de este negocio, la goma los árboles de Asia estaban separados por cuatro metros, a veces era necesario caminar millas entre un árbol y el siguiente en Amazonia, limitando la cantidad de látex recolectado y aumentando su precio. Obviamente, las plantaciones bien organizadas del lejano Oriente dieron lugar a un aumento significativo de la productividad, haciéndolos más competitivos²⁰.

En Brasil, el gobierno no estaba dispuesto a cambiar estos métodos creía que aprovechar estos árboles de caucho aseguraría la presencia de brasileños en la región del Amazonas, garantizando la soberanía nacional sobre esta área en gran parte despoblada. La producción comenzó a disminuir, lo que puso fin a las décadas de auge en gran parte del norte Brasil. Las empresas que se habían instalado en Manaus y Belém se fueron en busca de otras regiones más productivas. Los inmigrantes se fueron a casa, esta edad de oro de la opulencia se deslizó en la historia²⁰.

Caucho Natural, estructura y composición.

El caucho natural está constituido por cadenas largas y flexibles, el cual está conectado por enlaces intermoleculares con capacidad suficiente para evitar el deslizamiento de las moléculas y con la flexibilidad necesaria para extenderse con facilidad y volver al desorden. Debido a que las cadenas lineales se deslizan con facilidad unas sobre otras, el caucho natural se convierte en un material viscoso y pegajoso, y al enfriarse se torna quebradizo (10-11) El caucho es *cis*-1,4-poliisopreno y corresponde a un elastómero, el cual es capaz de ser estirado o deformado y volver a su forma original. La sucesión de unidades isopreno en la cadena polimérica es perfectamente regular y cada cuatro átomos de carbono presenta un grupo metilo como grupo lateral (11). El poliisopreno es un polímero dieno, es decir está formado a partir de un monómero que contiene dos enlaces dobles carbono-carbono²¹.

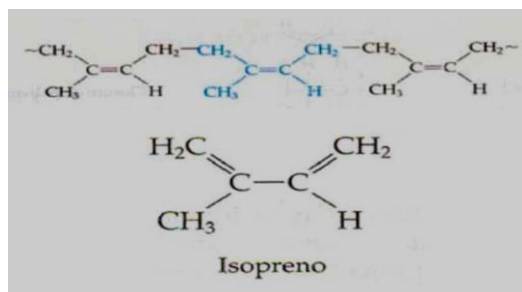


Figura N°1: Estructura del caucho natural.

Propiedades físicas y químicas del caucho natural

En su estado natural es un elastómero blanco o incoloro. Las propiedades físicas del caucho bruto (sin vulcanizar) varían de acuerdo a la temperatura. Cuando se expone a -195°C se presenta como un caucho duro y transparente. A la temperatura de 0 a 10°C , el caucho se torna frágil y opaco, y por encima de los 20°C se vuelve blando, flexible y translucido. Cuando se expone a 50°C adquiere una textura de plástico pegajoso y si la temperatura se eleva hasta los 250°C , los enlaces dobles se separan y se da la formación de anillos. La densidad del caucho a 0° es de $0,950$ y a 20°C es de $0,934$ y su punto de fusión es de 180°C . El caucho puro o bruto es insoluble en agua, álcalis o ácidos débiles y es soluble en benceno, petróleo, hidrocarburos clorados y disulfuro de carbono. Se oxida rápidamente a la exposición de agentes oxidantes químicos, pero con el O_2 de la atmosfera es relativamente lento²¹.

Caucho sintético

Los cauchos sintéticos (elastómeros) son polímeros de cadena larga con propiedades químicas, físicas y mecánicas especiales. Estos materiales tienen estabilidad química, alta resistencia a la abrasión, resistencia y buena estabilidad dimensional. Muchas de estas propiedades se imparten al polímero original a través de agentes de reticulación y aditivos²².

Antes de la Segunda Guerra Mundial, los desarrollos se perseguían activamente en Alemania en la producción de un polímero como reemplazo del caucho natural, es decir, para fines generales. A través de contactos comerciales entre fabricantes alemanes y estadounidenses, muchos de los detalles de estos materiales y su fabricación fueron conocidos en los Estados Unidos. En tiempos de guerra, para compensar la deficiencia de los suministros de caucho natural a los aliados, comenzó la fabricación a gran escala de los polímeros de estireno-butadieno con un 25% de estireno y un 75% de contenido de butadina en los EE. UU²⁰.

Desde entonces, entró en el mercado una serie de elastómeros sintéticos, tanto de uso general como especial. Los cauchos para fines especiales son aquellos producidos en cantidades mucho más pequeñas y que tienen un grado diferente de resistencia al aceite y solvente y / o resistencia al calor de aquellos en la clase de propósito general, que se producen en grandes cantidades para complementar y reemplazar el caucho natural con el que están comparable en propiedades no resistentes al aceite. Los cauchos para propósitos especiales desarrollados inicialmente son los cauchos de neopreno y acrilonitrilo-butadieno, que siguen siendo los caballos de batalla debido a su

costo y su resistencia al aceite. El mercado del neopreno²⁰.

Las gomas se han ampliado mucho por la explotación de su excelente resistencia al ozono y al clima, y por su uso en aplicaciones resistentes al fuego, como el revestimiento de cables y las bandas transportadoras para minas. Las salidas más grandes para cauchos de nitrilo se encuentran en las industrias de ingeniería para sellos de aceite, juntas tóricas, juntas y mangueras de combustible y aceite. Posteriormente, se desarrollaron y establecieron gomas de polietileno clorosulfonado para aplicaciones en las que se requieren disolventes, sustancias químicas, ozono y resistencia a la intemperie²⁰.

Los cauchos de fluorocarbono, con propiedades inferiores a las bajas temperaturas que el caucho de nitrilo, pero con una resistencia superior al aceite y al calor, representan mejoras, que han sido aceptables en el Industrias aeronáuticas y automovilísticas. El alto precio del caucho de fluorocarbono y los cauchos de silicona restringe su uso generalizado, aunque los cauchos de silicona son únicos en su amplio rango de temperatura de servicio. Los cauchos de poliuretano poseen ciertas propiedades destacadas. Pueden tener resistencias a la tracción más altas que cualquier otro caucho, excelente resistencia al desgarrar y la abrasión, y sobresaliente resistencia al ozono, oxígeno e hidrocarburos alifáticos²⁰.

Los elastómeros termoplásticos son una nueva clase única de polímeros en los que las propiedades de uso final de los elastómeros vulcanizados se combinan con las ventajas de procesamiento de termoplásticos. Estos polímeros producen artículos útiles que tienen verdaderas propiedades

elastoméricas sin composición ni vulcanización. Por lo tanto, es evidente que los compositores de caucho tienen ahora un amplio espectro de elastómeros para elegir, para cumplir con uno o más de los requisitos para el uso final específico²⁰.

Trabajos de investigación realizados con caucho

Desde hace muchos años se han realizados trabajos de investigación que buscan la degradación del caucho o sus derivados entre los cuales estas las siguientes: En 2000 Berekaa y colaboradores, “Efecto del tratamiento previo del material de caucho en su biodegradabilidad por varias bacterias que degradan el caucho”, ellos examinaron el efecto del tratamiento previo de varios cauchos que contienen *cis* -1,4-poliisopreno en su biodegradabilidad. Se realizaron pruebas con seis bacterias recientemente aisladas y caracterizadas que degradan el caucho perteneciente a los géneros *Gordonia* (cepas Kb2, Kd2 y VH2), *Mycobacterium*, *Micromonospora* y *Pseudomonas*. Todas las cepas pudieron usar caucho natural (NR) y guantes de látex NR como única fuente de carbono. Por otro lado, el crecimiento de *Gordonia* sp. (cepa Kb2 y Kd2), *Mycobacterium fortuitum* NF4 y *Micromonospora aurantiaca* W2b sobre *cis* -1,4-poliisopreno sintético solo ocurrió después de la eliminación de los antioxidantes, que generalmente se agregan durante la fabricación para prevenir el envejecimiento de los materiales. Estudios detallados de degradación realizados con *Gordonia* sp. Kb2 reveló una mineralización mejorada de los guantes de látex NR pretratados y la mineralización del caucho natural purificado (NR), lo que indica la mineralización real del componente de caucho de *cis* -1,4-poliisopreno incluso después de la eliminación del componente no de caucho que puede actuar como sustrato co-metabólico y apoyar el crecimiento microbiano. Análisis

adicionales mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) demostró claramente la mayor eficiencia de colonización de estas bacterias hacia los guantes de látex NR pretratados. La colonización se visualizó adicionalmente mediante la tinción de los guantes de látex NR demasiado crecidos con reactivo de Schiff, y el color púrpura producido en el área de degradación fue una evidencia de la acumulación de aldehídos que contienen oligómeros. Se podría lograr una mayor mejora de la degradación de los guantes de látex después de la sustitución sucesiva del medio de sales minerales durante el cultivo. Por lo tanto, una rápida desintegración del material de los guantes de látex NR sin tratar se llevó a cabo por *Gordonia* sp. cepa VH2²³.

En 2001, Arenskötter y colaboradores, investigaron sobre “Caracterización taxonómica de dos bacterias degradadoras del caucho que pertenecen a la especie *Gordonia polyisoprenivorans* y análisis de regiones hiper variables de secuencias de ADNr 16S”. Identificaron dos bacterias degradantes del *cis*-1,4-poliisopreno (caucho de isopreno), cepas VH2 y Y2K, como cepas de la especie *Gordonia polyisoprenivorans* pertenecientes a *Corynebacteriaceae*, un suborden del orden *Actinomycetales*. Ambos mostraron un crecimiento y degradación característicos del caucho de isopreno). Para la cepa VH2, investigaron las propiedades quimiotaxonómicas, y los experimentos de hibridación ADN-ADN con la cepa, revelaron la afiliación a la especie *G. polyisoprenivorans*. La comparación de las secuencias de 16S rDNA, y especialmente las regiones hiper variables de estos, condujeron a la clasificación de la cepa Y2K a la misma especie. En la actualidad, la especie *G. polyisoprenivorans* comprende tres aislamientos diferentes que comparten la capacidad de degradar el caucho de isopreno de manera potente, pero que se obtuvieron de diferentes regiones geográficas²⁴

“Degradación oxidativa de *cis* y *trans* -1,4-poliisoprenos y caucho natural vulcanizado con sistemas mediador de enzimas” (2003) dicha investigación consistió en la degradación oxidativa de *cis* y *trans*-1,4-poliisoprenos por dos tipos de sistemas de enzima mediadora, lipoxigenasa / ácido linoleico y peroxidasa de rábano picante / 1-hidroxibenzotriazol, se investigaron a 37 ° C en medios acuosos y se analizaron mediante cromatografía de permeación de gel. La lipoxigenasa y la peroxidasa de rábano activan sus sustratos, ácido linoleico y 1-hidroxibenzotriazol, respectivamente, para la escisión de las cadenas principales de ambos 1,4-poliisoprenos. Los pesos moleculares de 1,4-poliisoprenos disminuyeron durante el tratamiento con ambos sistemas de enzima mediadora, y la despolimerización se inhibió completamente mediante la adición de hidroxitolueno butilado. Cuando se omitió la enzima o el mediador de un sistema de reacción, la despolimerización no progresó, lo que indica que la escisión de la cadena de polímero se induce por los radicales generados solo en presencia de la enzima y el mediador. El reactivo de Fenton con ácido linoleico también fue eficaz contra la degradación de ambos 1,4-poliisoprenos. Los guantes de látex de caucho natural vulcanizados se trataron con estos tres métodos y se observó una degradación de la superficie con formación de orificios con una micrografía electrónica de barrido²⁵.

En el 2012 Moncada Yandy realizó un trabajo de investigación titulado “Biorremediación de aguas contaminadas con compuestos nitrogenados en la F107D, NPK y F105D de PEQUIVEN, ubicada en Morón Estado Carabobo”, con el objeto de disminuir los niveles de compuestos nitrogenados, en aguas colectadas de la Planta, diseñaron ensayos ex situ a escala de laboratorio y escalamiento intermedio de biorremediación. Los ensayos FD107D y F107DA disminuyeron sus concentraciones por debajo de 100ppm, que es el límite de detección del método; los ensayos NPKA, disminuyeron la concentración de nitrógeno en 70,59% (E1) y 41,18% (E2), la biomasa disminuyó el 100% en

todos los F107DB y para NPKA 11,82 (E1) y 44,44% (E2); para F105D aumentaron a razón de 101,2% (E1) y 173,33% (E2). Hubo un incremento de los sólidos en la mayoría de los ensayos, siendo la excepción el FD105DA (E2) que disminuyó 100%, concluyeron que la concentración de nitrógeno, de las aguas ensayadas disminuyó, con la consecuente biorremediación de las mismas²⁶.

Durante ese mismo año Hernández Gregory realizó una investigación titulada “Capacidad de Biorremediación de Bacterias aeróbicas aisladas de muestras provenientes de la industria petrolera”, aislaron y caracterizaron bacterias provenientes del petróleo, con especial énfasis en aquellas que fueran termo y baro resistentes, además de tener la capacidad de degradar fracciones de hidrocarburos. Se tomaron muestras de crudo Morichal, se aislaron microorganismos en medios de composición indefinida (Agar Trypticosa Soya) y composición definida (Medio Mínimo M2/MM2 y Bushnell-Hass/BH), se evaluó su capacidad de degradar sustratos hidrocarbonados y su termo y baro resistencia luego de ser cultivados en medio BH con parafina, clasificando preliminarmente los microorganismos por técnicas convencionales tales como Gram, Kin Young y pruebas metabólicas y enzimáticas. Los microorganismos aislados resultaron fundamentalmente resistentes a temperatura y presión de 2,5 psi, que crecen en presencia de petróleo, asfáltenos y naftaleno, de manera metabólica y/o cometabólica. La presencia de bacilos Gram+, la disposición de los filamentos, ramificación y fragmentación, además de la característica de ser negativos para bacilo-alcohol-resistencia, permitió caracterizar los principales microorganismos como pertenecientes al Orden Actinomicetales, con un posible *Thermoactinomyces* spp. Se concluye que es importante el pasaje por petróleo en condiciones de biocompatibilidad, para poder aislar y reproducir microorganismos del petróleo²⁷.

En el 2015 Reyes Eugenio otro trabajo de investigación titulado “Biodegradación del caucho por *Alternaria alternata*”, dicha investigación empleó el microorganismo *A. alternata* como potencial microorganismo degradador de caucho, el objetivo del estudio era evaluar el crecimiento y la actividad degradativa de *A. alternata* frente al caucho natural y mezcla comercial (caucho natural y sintético). La metodología se realizó mediante la medición del peso del caucho natural y mezcla comercial en condiciones de aerobiosis sin agua, con agua y anaerobiosis por 33 días, se evaluó el crecimiento de *A. alternata* sobre la superficie del caucho natural y mezcla comercial mediante microscopía óptica y además se evaluó cualitativamente los productos del caucho natural y mezcla comercial mediante el uso del reactivo de Schiff. Los resultados de la medición del peso mostraron que en aerobiosis sin agua no presentó disminución del peso; aerobiosis con agua una disminución que osciló entre 11,62% a 15,50%; anaerobiosis una disminución entre 0,3%-1,19%. En la evaluación del crecimiento de *A. alternata*, la mezcla comercial presentó un desarrollo escaso a nulo en la mezcla comercial y en caucho natural presentó un desarrollo abundante (+++). El reactivo de Schiff presentó reacción positiva en caucho natural en aerobiosis con agua y negativa en mezcla comercial, caucho natural en aerobiosis sin agua y anaerobiosis. Se concluyó que *A. alternata* es capaz de degradar caucho natural y mezcla comercial, presentando un mayor potencial de degradación en el caucho natural en condiciones de aerobiosis con agua (15,50%)²¹.

En el 2016 Molgina Eduardo y colaboradores, realizaron una evaluación preliminar como una alternativa microbiana para el tratamiento de neumáticos en desuso, 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 birreactor 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. 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, 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, se identificó que ambas especies son capaces de biodegradar el caucho natural y sintético²⁸.

www.bdigital.ula.ve

Biotecnología

La palabra biotecnología empezó a utilizarse en la década de los 60 y resulta de la combinación de “bio” que significa vida y “tecnología” que se refiere a la aplicación de conocimientos para la solución de un problema e incluye la utilización de seres vivos. Según el convenio sobre diversidad biológica del año 1992, la biotecnología se refiere a “toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación y modificación de productos o procesos para usos específicos”²⁹.

La biotecnología tiene una larga historia que se remonta a cuando los seres

humanos descubrieron que pudieron obtener vino de la fermentación de la uva, así como transformar la leche en queso o en yogurt o hacer cerveza fermentando soluciones de malta y lúpulo. Durante miles de años las mujeres y los hombres de todas las poblaciones del mundo practicaron esas técnicas, sin saber los detalles de los procesos que les permitía obtener esos productos. Mucho tiempo después, en la segunda mitad del siglo XIX, las investigaciones realizadas por Louis Pasteur permitieron demostrar que los procesos de fermentación son consecuencia de la actividad microbiana. Los trabajos de Mendel permitieron el desarrollo de la genética y con ella la biotecnología³⁰.

En el momento que se empezaron a utilizar microorganismos seleccionados, tales como: bacterias, protozoarios algas y hongos se comenzó a considerar a la fermentación tradicional como biotecnología tradicional. Las aplicaciones del conocimiento científico, cualquiera sea esta, más tarde o más temprano repercute en la vida del individuo y de su comunidad. Con las aplicaciones biotecnológicas modernas los científicos están manipulando la naturaleza en una forma tal que los futurólogos del siglo XIX nunca se lo imaginaron³⁰.

Hay muchos ejemplos de aplicación biotecnológica algunos beneficiosos porque han mejorado la calidad de vida de los humanos, en cambio, otros pueden ser dañinos o potencialmente peligrosos. Mientras mayor es el conocimiento que se tenga sobre una situación mayor es la probabilidad que la decisión que se tome sea la más acertada. En consecuencia, como ciudadanas y ciudadanos que formamos parte de una sociedad que cada día está más tecnificada, hay que estar muy bien informado y asomarse con mucho cuidado a las posibilidades de las aplicaciones biotecnológicas ya que pueden repercutir en el bienestar de la humanidad, interpretándose bienestar no solo desde el punto de vista de la salud humana, sino desde el punto de

vista de la salud ambiental y del planeta³¹.

Tipos de Biotecnología.

Existe una gran variedad de biotecnologías como, por ejemplo:

- Biotecnología roja: comprende las aplicaciones terapéuticas diagnosticas de salud animal y de investigación medica, biotecnología verde se encarga de las aplicaciones relacionadas con las mejoras de plantas y cultivos vegetales.
- Biotecnología blanca: aplicada a procesos industriales, que emplean organismos vivos y enzimas para obtener productos de intgeres reemplazando tecnologia contaminantes.
- Biotecnología azul: se ocupa de la exploracion y explotacion de organismos marinos (o de aguas dulces) con objeto de crear nuevos productos
- Biotecnología gris: se centra en la creacion de soluciones tecnologicas que ayuden a la proteccion del medio ambiente.
- Biotecnología dorada: se encarga del desarrollo y procesos bioinformaticos , aplicación de metodos informaticos y computacion en el analisis de datos experimentales y simulacion de sistemas biologicos.
- Biotecnologia marron: aplicaciones veterinarias como farmacos veterinarios, vacunas, pruebas de dianostico, clonacion, biofactorias y otros.
- Biotecnología naranja: divulgacion y formacion en Biotecnología.
- Biotecnología púrpura: engloba las medidas de seguridad, la legislacion y los valores y principios eticos-morales establecidos por la

sociedad en materias y aplicaciones biotecnológicas.

- Biotecnología amarilla: biotecnología nutricional enfocada en alimentos.
- Biotecnología negra: prevención del bioterrorismo³².

Biorremediación.

La biorremediación es la utilización de organismos vivos para reducir o eliminar riesgos medioambientales resultantes de la acumulación de compuestos químicos tóxicos y otros residuos peligrosos. El ámbito de aplicabilidad de la biorremediación es amplio, pudiendo considerarse como objeto cada uno de los estados de la materia³³.

www.bdigital.ula.ve

Las aplicaciones más importantes de la biorremediación han sido aquellas que modifican el ambiente para estimular la actividad de los organismos que allí se encuentran. El empleo de cultivos de microorganismos (muchas compañías venden preparados de éstos, ya sea como esporas, liofilizados u otros formulados, para favorecer la degradación de distintos contaminantes) parece no producir ninguna ayuda o ventaja en el proceso³⁴.

El uso de microorganismos mejorados genéticamente, que pueden ser protegidos bajo patente, puede optimizar algunos procesos de degradación de moléculas especialmente resistentes (como los PAHs o compuestos muy clorados), pero debido a que las legislaciones aún no establecen el procedimiento a seguir o bien prohíben la liberación masiva de microorganismos recombinantes al medio ambiente, las compañías no han

desarrollado estrategias para su uso en biorremediación in situ³⁴.

Las técnicas de biorremediación son una buena estrategia de limpieza para ciertos tipos de contaminación, como la producida por el petróleo y otros compuestos orgánicos no demasiado tóxicos. Cuando existe una acumulación de sustancias tóxicas o no biodegradables la biorremediación no funciona, ya que la colonización y crecimiento de los microorganismos se encuentra inhibida³⁴.

Espectroscopia infrarroja.

Cuando la materia es expuesta a la radiación electromagnética, ésta puede ser absorbida, transmitida, reflejada, dispersada, o bien puede producirse fotoluminiscencia. Este último término es utilizado para designar diferentes efectos como fluorescencia, fosforescencia y dispersión³⁵. Cuando la luz incidente interactúa con la materia y es absorbida surge lo que se conoce como espectroscopia de absorción, que puede ser ultravioleta (UV), visible (V), o espectroscopia de absorción infrarroja (IR), según la energía de la luz incidente. La espectroscopia infrarroja media (MIR) se basa entonces, en la absorción de luz infrarroja (4000 a 400 cm^{-1}) por parte de las moléculas³⁵(Figura N°2).

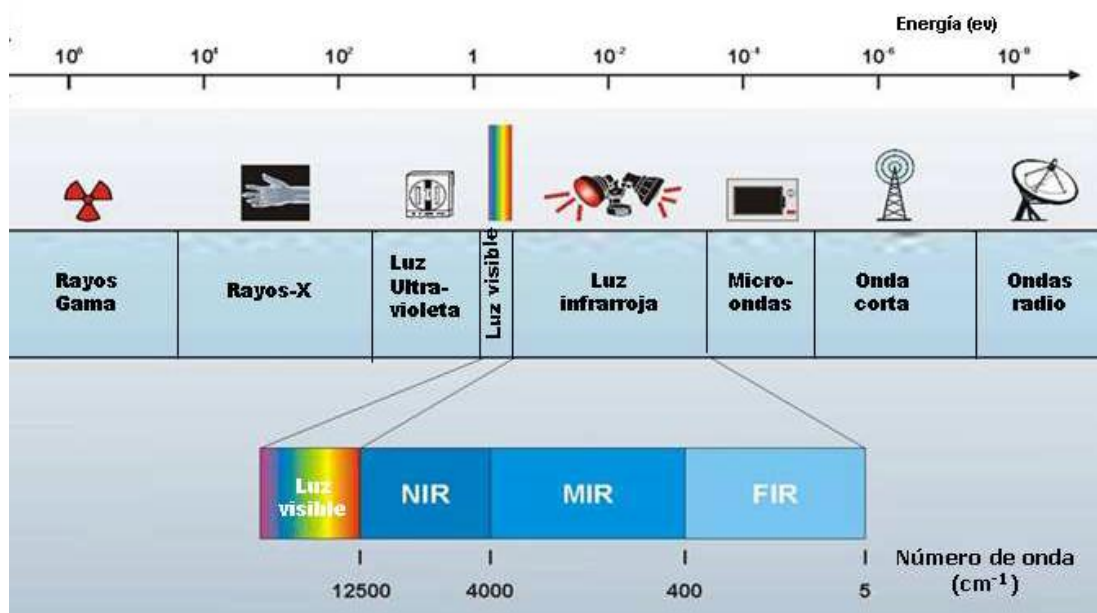


Figura N°2: Espectro electromagnético. La región infrarroja está dividida en tres intervalos espectrales: infrarrojo cercano (NIR), mediano (MIR) y lejano (FIR). Las fronteras entre uno y otros son algo arbitrarias, pero están determinadas principalmente por el tipo de tecnología que emplean los detectores y los efectos producidos sobre la materia. La espectroscopia FT-IR emplea la radiación MIR³⁵.

Esta absorción produce la excitación de los estados vibracionales, estiramientos y balanceos y estados rotacionales de algunas moléculas, que poseen una frecuencia de vibración en el rango infrarrojo del espectro el electromagnético, como las de vapor de agua. Los espectros infrarrojos medios presentarán entonces, bandas debidas a las vibraciones correspondientes a los estiramientos, que ocurren a alta energía y bandas debidas a vibraciones correspondientes al balanceo de los enlaces que ocurren a baja energía³⁵.

La espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FT-IR) aplicada a materiales biológicos proporciona un reflejo de la composición química y estructural de los mismos. Los espectros de absorción de los materiales biológicos complejos están representados por bandas constituidas por una superposición de picos originados por la absorción de sus constituyentes (proteínas, carbohidratos, lípidos y otros compuestos de bajo peso molecular), representando “huellas digitales” altamente específicas de los mismos³⁶. FT-IR ha sido empleada a nivel mundial en el análisis de fluidos humanos (sangre, suero, orina, líquido sinovial, líquido amniótico, etc.) bacterias, hongos, virus, células individuales, tejidos, secciones de tejidos, etc., lo que ha permitido el diagnóstico de diversas enfermedades infecciosas, procesos oncológicos y odontología^{36,37}.

En el caso del estudio de microorganismos los espectros FT-IR revelan una imagen de la composición química de la pared celular, membranas plasmáticas, citoplasma, biopolímeros y moléculas pequeñas intracelulares. Estos constituyen entonces, una representación del fenotipo, el cual resulta altamente específico y reproducible bajo las mismas condiciones de operación. Para facilitar la interpretación de los espectros de materiales biológicos complejos se puede hacer una división de los mismos en lo que se denominan ventanas espectrales (Wi)³⁷.

La figura nº3 muestra un espectro típico de una suspensión microbiana deshidratada formando un film sobre una celda de ZnSe en el cual se indican dichas ventanas espectrales y las correspondientes asignaciones a macromoléculas y grupos funcionales más importantes.

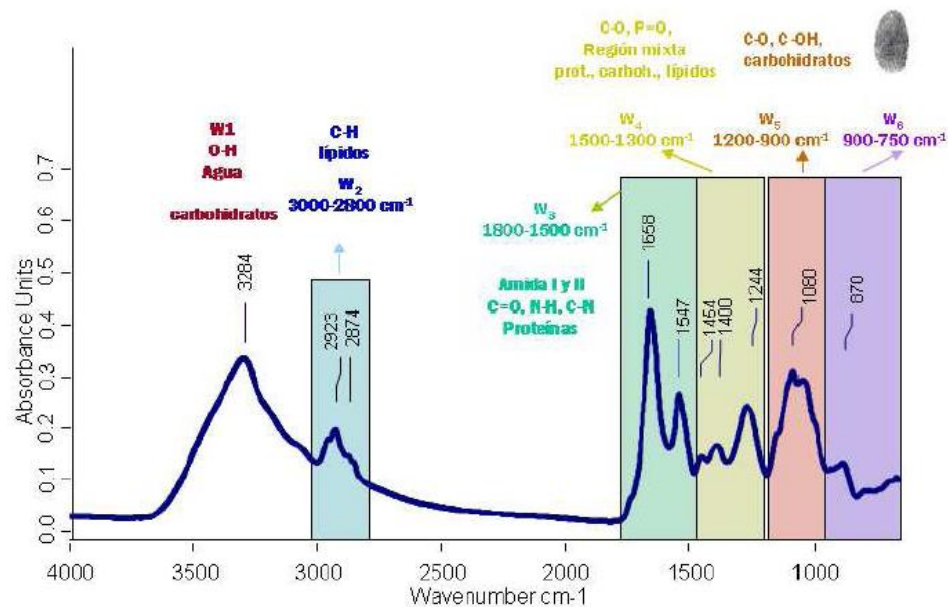


Figura N^o3: Asignación de los principales grupos funcionales y macromoléculas encontrados en espectros FT-IR de microorganismos. Se indican las seis ventanas espectrales (W1 a W6) en las que es posible dividir un espectro IR para facilitar su análisis³⁷.

A continuación se señalan los grupos funcionales y las principales macromoléculas que son posibles identificar en cada una de las ventanas espectrales:

- W1.- Es la región entre 4000 y 3100 cm^{-1} . Está dominada principalmente por una banda muy ancha debida al grupo O-H (3400 cm^{-1}) y a la absorción de dos modos vibracionales del estiramiento de N-H³⁶.
- W2.- La región 3100 a 2800 cm^{-1} , Exhibe las vibraciones correspondientes a los estiramientos y balanceos de C-H en los grupos funcionales CH₃ y CH₂. Aunque dicha región es atribuida por lo general a la absorción de las cadenas de ácidos grasos de membranas y a

fosfolípidos, también se le puede atribuir a vibraciones de cadenas laterales de algunos aminoácidos y carbohidratos³⁶.

- W3.- La región entre 1800 y 1500 cm^{-1} , es la región denominada Amida I y II. En dicha región se distinguen 3 bandas principales, 1745, 1650 y 1542 cm^{-1} correspondiente a ésteres, Amida I y Amida II, respectivamente. La banda Amida I (1700-1600 cm^{-1}) corresponde al estiramiento del grupo $>\text{C}=\text{O}$ del enlace peptídico. Esta es la banda más intensa, por lo general, en los espectros de microorganismos (por ser las proteínas un componente importante en la biomasa celular). Además, por ser sensible a los cambios conformacionales del grupo $>\text{C}=\text{O}$ dentro del enlace peptídico es indicativa de la estructura secundaria de las proteínas en el pool de proteínas totales de los microorganismos. Según la forma que adopte la banda de Amida I, es posible determinar la composición porcentual de proteínas en estructura alfa hélice o hoja beta. En esta ventana se observa la banda correspondiente al estiramiento del grupo $>\text{C}=\text{O}$ de ésteres ($\sim 1740 \text{ cm}^{-1}$) presente en lípidos y otras moléculas, y también, aunque de mucha menor intensidad, las bandas debidas a los estiramientos de los enlaces $>\text{C}=\text{O}$, $>\text{C}=\text{N}$, $>\text{C}=\text{C}<$ presentes en las bases heterocíclicas de los ácidos nucleicos, ADN y ARN³⁶.
- W4.- La región correspondiente al intervalo 1300 y 1500 cm^{-1} es la que se denomina región mixta, ya que involucra grupos funcionales presentes en lípidos, proteínas carbohidratos y ácidos nucleicos. En la región de mayor energía de esta ventana, cercana a 1450-1460 cm^{-1} se encuentran, como se mencionó previamente, los estados vibracionales de balanceo del C-H correspondientes al CH_2 y CH_3 . En 1400 cm^{-1} es posible observar una banda típica correspondiente al estiramiento simétrico del $-\text{COO}-$. Este grupo funcional puede ser indicativo de la presencia de carbohidratos ácidos, así como también a ácidos grasos libres, o cadenas laterales de aminoácidos. Por último,

en la zona de menor energía de esta ventana, cercana a 1240 cm^{-1} , se encuentra una banda ancha debido al estiramiento asimétrico del enlace $>P=O$, que constituye una superposición de bandas típicas que podrían provenir de fosfodiésteres, monoésteres, y fosfatos libres³⁵.

- W5.- La región espectral entre 1200 y 900 cm^{-1} , es generalmente dominada por el estiramiento simétrico del grupo PO_2 -correspondiente a ácidos nucleicos (1080 cm^{-1}) y fosfolípidos y por una secuencia compleja de picos debidos principalmente a un fuerte acoplamiento de los estiramientos C-C y C-O y de las deformaciones C-O-C y C-O-H de diversos oligo y polisacáridos. Es una región de intensidad significativamente alta en los espectros de hongos (debido a su composición macromolecular), muchas veces más intensa que Amida I³⁶.
- W6.- El intervalo de frecuencias entre 900 y 750 cm^{-1} , región de fingerprint (huella dactilar) exhibe una gran variedad de picos de relativa baja intensidad, pero extremadamente característicos. En esta región resulta muy poco probable poder efectuar una asignación de determinados grupos funcionales a frecuencias de vibración, ya que se encuentran las bandas correspondientes a movimientos de las macromoléculas. Sólo se puede asignar con certeza el pico correspondiente a 720 cm^{-1} por tratarse de una frecuencia de vibración característica de los modos vibracionales de torsión del $>CH_2$ de ácidos grasos. Debido a la complejidad que surge por la superposición de bandas espectrales provenientes de los distintos componentes celulares mencionados arriba, es necesario aplicar técnicas de aumento de resolución como son la derivada primera o segunda sobre los espectros (se discutirán posteriormente) a fin de lograr una mejor discriminación de los picos que componen las bandas anchas de los espectros de materiales biológicos complejos. Aplicando estas técnicas es posible diferenciar de un espectro con aproximadamente 10–15

bandas anchas como el arriba descrito, un total de 50-70 bandas más pequeñas que sumadas representan el espectro total³⁷.

La aplicación de las técnicas de aumento de resolución sobre los espectros FT-IR han permitido además de llevar a cabo una correcta asignación de bandas espectrales a grupos funcionales (Figura N°3), conocer la proporción relativa de las principales macromoléculas, componentes de los microorganismos o células, y determinar y analizar la presencia de diferentes componentes intracelulares presentes en los mismos³⁶. Sin embargo, una de las principales aplicaciones del uso de estas técnicas es la discriminación de organismos a nivel de género, especie y cepa³⁶.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

Marco Metodológico

Diseño de la investigación

La investigación es de diseño experimental según Fideas Arias³⁸, define la investigación experimental como un proceso que consiste en someter a un objeto o grupo de individuos, a determinadas condiciones, estímulos o tratamiento, para observar los efectos o reacciones que se producen, formando parte del ámbito de investigación experimental.

Tipo de investigación

Según Hernández et al., los estudios de tipo correlacionales miden dos o más variables que se desea conocer si están o no relacionadas³⁹ y así analizar la correlación, la presente investigación se enfocó en verificar si existía algún microorganismo aislado del suelo de caucheras del Estado Mérida, con capacidad de biodegradar el caucho.

Unidad de investigación.

Para la realización del trabajo de investigación se contó con el apoyo del Laboratorio de diagnóstico e investigaciones microbiológicas “Dra. Celina Araujo de Pérez”.

Población

La población de estudio de investigación fueron las caucheras del Estado Mérida.

Muestra

Se tomaron muestras del suelo de tres diferentes caucheras del Estado Mérida alrededor de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis durante el tercer trimestre del 2018, utilizando hisopos para la recolección siendo almacenados en tubos con agua peptonada para evitar la contaminación con otros agentes externos.

Variable independiente

Según Hernández et al³⁹., es un fenómeno al cual se le va a evaluar su capacidad para influir, incidir o afectar a otras variables, en dicho caso nuestra variable independiente fue el caucho.

Variable dependiente

Según Hernández et al³⁹., son cambios sufridos por los sujetos como consecuencia de la manipulación de la variable independiente por parte del experimentador. En este caso el nombre lo dice de manera explícita, va a depender de algo que la hace variar, utilizando este fundamento la variable dependiente fueron los microorganismos.

Procedimiento o Metodología

Al ser tomadas las muestras se transportan al laboratorio para ser sembradas en un ambiente aséptico y en un medio de cultivo rico agar tripticasa soya⁴⁰ (Anexo N°1). Después de ser recolectadas las muestras de 3 diferentes caucheras y sembradas en el medio de cultivo tripticasa soya (Anexo N°2), se procedió a observar en un periodo de 48 a 72 horas en temperatura ambiente el crecimiento de los microorganismos, obteniendo una gran variedad de microorganismos (Anexo N°3), aleatoriamente se procede a aislar cada colonia (23) de microorganismos en el mismo medio de cultivo para obtener colonias puras.

Luego de ser tomadas e inoculadas las muestras se procede a realizar la coloración o tinción de Gram (Anexo N°4), dicha tinción es uno de los métodos de tinción más importantes en el laboratorio bacteriológico, su técnica consiste: fijar el extendido por calor el portaobjeto a través de la llama del mechero, aplicar el colorante violeta de genciana por un minuto lavar con agua corriente aplicar el mordiente de Lugol por un minuto, lavar con agua corriente aplicar el decolorante alcohol-acetona durante 10 segundos, lavar con agua corriente

aplicar el colorante secundario safranina por 30 segundos, finalmente lavar con agua, secar al aire y observar al microscopio⁴¹.

Seguidamente se somete a las bacterias y al hongo a un medio de cultivo más restrictivo, agregando como única fuente de carbono el caucho. Se utiliza el medio de cultivo M9 medio mineral⁴² (Anexo N°5).

Para la realización de este medio de cultivo se sustituyó la glucosa por el caucho y no se agregó el cloruro de calcio 1M, biotina, tiamina y elementos traza, esta medida se tomó para evitar la presencia de algún otro compuesto que podría ser utilizado por los microorganismos como fuente de carbono. Para realizar el cultivo de los microorganismos en dicho medio se realizaron dos experimentos los cuales tenían como finalidad observar el posible crecimiento o inhibición de los microorganismos.

Experimento N°1.

Teniendo en cuenta las instrucciones para realizar el medio M9, se procede a crear una solución biodisponible de caucho la cual se obtiene agregando tween, metanol y caucho lijado (Anexo N°6), se deja actuar los tres compuestos por un periodo de 24 a 72 horas, luego de tener el caucho biodisponible se procede a utilizar como sustituto de la glucosa y se realiza de manera normal el medio agregando agar para solidificar el medio (Anexo N°7). Se inocularon cada uno de los microorganismos, al cabo de 7 días en temperatura ambiente, y en condiciones de aerobiosis se realizó la observación directa, para verificar si hubo algún crecimiento.

Experimento N°2:

Tomando en cuenta los pasos para realizar el medio M9, se procede a utilizar como sustituto de la glucosa el caucho lijado y se realiza de manera normal el medio agregando agar para solidificar el medio (Anexo N°8). Se inocularon cada uno de los microorganismos, al cabo de 7 días a temperatura ambiente y en condiciones de aerobiosis, se realizó la observación directa, para verificar si hubo algún crecimiento.

Como resultado de ambos experimentos se observa crecimiento bacteriano, se realiza coloración de Gram (Anexo N°9), y las pruebas bioquímicas para la identificación de las bacterias, es importante resaltar que se necesitó tener las bacterias inoculadas en un medio rico (Trypticase soya), teniendo un periodo de crecimiento de 24 horas, esto se realizó para evitar falsos positivos o resultados muy débiles que no permitan interpretar de manera adecuada los resultados, para la incubación de las bacterias se realizaron a 37° C y se interpretaron entre las 24 y 48 horas de inoculación, las pruebas realizadas fueron:

- **Prueba de la catalasa:** los microorganismos que producen la enzima catalasa descomponen el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) liberando oxígeno y agua. Para realizar esta prueba se toma una lámina, y se agrega una gota de peróxido de hidrogeno posteriormente con un palillo plano de madera tomar un poco de bacteria a partir de una colonia aislada, si se observa el burbujeo generalmente intenso significa que hay producción de oxígeno por lo tanto se entiende que hay presencia de la enzima catalasa, se debe reportar positiva (+)⁴¹.

- **Determinación de hemólisis (Agar sangre):** las hemolisinas son proteínas citolíticas producidas por algunos microorganismos pueden destruir parcial o totalmente los eritrocitos las α -hemolisinas producen una lisis parcial de los eritrocitos mientras las β - hemolisinas los lisan totalmente, cuando el microorganismo no produce ninguna hemólisis se denomina γ - hemolítico. Para realizar estas pruebas se necesitó tomar una colonia aislada y sembrar en una placa con agar sangre para identificar si las bacterias presentaban algún tipo de hemólisis, se toman en cuenta los siguientes aspectos α - hemólisis es una hemólisis parcial y la zona de crecimiento aparece rodeada de un halo de color verdoso, β -hemólisis en este caso la hemólisis es total y el halo que rodea a las colonias es totalmente transparente y finalmente γ -hemólisis el microorganismo en cuestión no es capaz de realizar la hemólisis y por tanto no existe halo alrededor de la colonia⁴¹.
- **Prueba de la oxidasa:** esta prueba se basa en la producción bacteriana de una enzima citocromo oxidasa la cual transfiere electrones al oxígeno, se realizó colocando un trozo de papel de filtro sobre una lámina, se añadió una gota del reactivo de oxidasa, luego se añadió masa bacteriana con un palillo de madera, y se esperó uno segundos, la reacción positiva la indica un color azul-violeta, se reporta positiva (+)⁴¹.
- **Prueba del manitol:** se encarga de detectar la capacidad que tienen las bacterias para fermentar el manitol, un subproducto ácido es creado que hace que el rojo de fenol cambie a amarillo, para su realización se necesitó una placa con agar manitol y con un asa en aro se toma una colonia aislada de las bacterias y se procede a sembrar con la técnica de estría. Si hay crecimiento bacteriano y el medio vira a amarillo se debe reportar positiva (+)⁴¹.
- **Prueba de Hugh y Leifson (O/F):** esta prueba determina el metabolismo oxidativo o fermentativo de un hidrato de carbono o su

falta de utilización se utiliza el rojo de fenol como indicador y en términos generales se pueden usar cualquier tipo de carbohidrato (glucosa, maltosa, sacarosa, fructosa y otros), para su realización se toman dos tubos por cada cepa a ensayar, la inoculación se realizó con asa en aguja y se tomó una colonia aislada y se inoculara hasta el fondo del tubo, luego uno de los tubos es cubierto con una capa de 1.0cm de parafina líquida estéril, para así generar las condiciones de anaerobiosis necesarias para el metabolismo fermentativo, para reportar si existe oxidación o fermentación el medio cuenta con el rojo de fenol como indicador, el cual debe virar a amarillo para reportar de manera positiva(+) la presencia de oxidación o fermentación por parte de las bacterias⁴¹.

- **Prueba arginina dihidrolasa:** La lisina, la arginina y la ornitina son enzimas descarboxilasas que generalmente se forman y se activan en condiciones de acidez y anaerobiosis, cuando hay fermentación de la arginina hay producción de la amina putrescina. En un tubo con un medio de cultivo con glucosa que incorpora la arginina, y el indicador púrpura de bromocresol, se inoculara la bacteria, y se agrega 1 cm de parafina estéril a cada tubo, si esta bacteria es capaz de fermentar la glucosa, se produce ácido que baja el pH del medio y cambia el color del medio de púrpura a amarillo, la condición ácida estimula la actividad descarboxilasa y si el organismo produce la enzima apropiada (descarboxilasa), el aminoácido es degradado a su correspondiente amina. La formación de estas aminas (cadaverina o putrescina), eleva el pH del medio de amarillo a púrpura o violeta, si el organismo no produce la enzima apropiada, el medio permanece amarillo, para reportar se debe color positivo (+) si el medio es púrpura y negativo (-) si es de color amarillo⁴¹.
- **Prueba agar kligler (KIA):** el agar KIA es un medio diferencial en tubo que cumple de doble propósito a) la determinación de la fermentación

de hidratos de carbono (glucosa y lactosa) y b) la determinación de la producción H_2S . Se utiliza un tubo que contenga agar Kligler, se inocula el medio con una colonia aislada con asa en aguja por punción y estría, la pruebas KIS siempre se leen en forma estándar: primero, el bisel: luego el taco, finalmente la producción de gas y H_2S . Para reportar positiva fermentación de la lactosa o glucosa se utilizan las siglas A/A, en el caso de gas se dice positivo (+) y para el H_2S positivo (+). En caso de ser negativas para ambas la no fermentación se expresa con las letras K, y sería entonces K/K --⁴¹.

- **Prueba de Voges Proskauer:** algunas bacterias utilizan una vía distinta a la de los ácidos mixtos permite detectar aquellos microorganismos que tienen la capacidad de utilizar la vía del butilenglicol. En esta vía se produce el acetilmetilcarbinol (acetoína) el cual en presencia de KOH y oxígeno atmosférico es convertido en diacetilo. Para la realización de esta prueba se inocula un tubo de caldo glucosado con la bacteria usando el asa en punta, luego de 24 horas se agrega 0,6 mL de α -naftol al 5%, seguido de 0,2 mL de KOH al 40%, se agita bien la mezcla y se deja reposar el tubo entre 10 y 15 minutos. Una prueba positiva (+) desarrollará un anillo color rojo 15 minutos después de agregar los reactivos⁴¹.
- **Hidrolisis de la gelatina:** determina la capacidad de algunos microorganismos de producir enzimas proteolíticas (proteinasas) detectadas por digestión o licuefacción de la gelatina. Para realizar la prueba se toma un tubo con el medio para licuefacción de la gelatina y con ayuda del asa en aguja, tomar un inóculo espeso de las bacterias y hacer una punción en el medio hasta una profundidad de 1.5 cm a 2.5 cm, observar a la 24 y 48 horas simultáneamente, una prueba positiva presenta un medio licuado con crecimiento, si se observa el medio con crecimiento, pero sin licuar se interpreta negativa (-)⁴¹.

- **Crecimiento NaCl 6,5%, 8%:** Se basa en la capacidad de la bacteria de desarrollarse en presencia de cantidades variadas de cloruro de sodio (NaCl). Es una propiedad que ha sido utilizada para caracterizar varios géneros y especies bacterianas, en este caso se utiliza la concentración de Cloruro de Sodio al 6,5%, 8%. Para realizar esta prueba con el asa en punta se toma una colonia aislada y se inocula en un tubo con caldo nutritivo que contenga NaCl al 6,5 %, 8 %, si la bacteria es capaz de crecer en dicho caldo se observara turbidez y se reportará positiva (+)⁴¹.
- **Agar nutriente:** es un medio de uso general para el cultivo de una amplia variedad de organismos bacterianos este medio se utiliza para detectar mediante la coloración de capsulas y esporas, para su realización se toma un tubo con el medio y con el asa en aguja se inocula una colonia aislada, si el microorganismo es capaz de crecer se observara crecimiento a las 48 horas, se reporta positiva (+).El crecimiento de estas bacterias en dicho permite realizar coloración de capsula, esporas y gránulos metacromáticos. Para la coloración de esporas se prepara un frotis de la bacteria y se fija al calor, se coloca papel de filtro sobre el frotis, se cubre el frotis con verde de malaquita al 7,6% y calentar por 10 minutos, observar el desprendimiento de humo blanco, se deja enfriar y lavar con agua corriente, agregar solución de safranina al 0,25 % por 1 minuto, lavar con agua corriente y secar al aire libre, observar al microscopio, si se observan esporas teñidas de verde se debe reportar positivo. La coloración de cápsula según la técnica de Anthony se prepara el frotis y se deja secar al aire libre, aplicar solución de cristal-violeta al 1% durante 2 minutos, se lava el preparado con solución de Sulfato de Cobre al 20%, escurrir y dejar secar al aire libre, se observa al microscopio con lente de inmersión, si se observa una zona clara sobre un fondo morado en las bacterias, se reporta positivo para capsula, en caso contrario sería negativo (-)⁴¹.

- **Prueba de la bilis-esculina:** esta prueba permite demostrar aquellos microorganismos capaces de desarrollarse en presencia de sales biliares y producir la enzima esculinasa que producen la hidrólisis de la esculina dando como resultado la formación de glucosa y un compuesto denominado esculetina. Para su realización, se toma un tubo con el medio que contenga bilis-esculina y se inocula una colonia de bacterias aisladas usando el asa en punta por estría, se incuba, si el tubo vira de color a castaño oscuro o negro se reporta la prueba como positiva (+), si no hay cambios es negativo (-)⁴¹.

Espectroscopia infrarroja.

Utilizando el medio M9 en estado líquido se inoculó en tubos separados los microorganismos que crecieron en el medio sólido y un medio sin inocular se utilizó como blanco, y se procedió a dejar crecer durante 7 días en temperatura ambiente, cumplido el tiempo se centrifugaron las muestras y el blanco por 20 minutos a 3000rpm, se sirvió el líquido en placas de Petri y se llevó a la estufa a 45°C por 24 horas. Luego de que las muestras estuvieran secas se realizó espectrometría infrarroja por la técnica FTIR con el equipo (Spectrum 2 Perkin Elmer), se obtuvieron espectros con patrones que proporcionan información estructural, que permitió analizar si el medio fue modificado por cada uno de los microorganismos (demostrando así la presencia de los mismos).

CAPÍTULO IV

Resultados y discusiones.

Después de sembrar las muestras en el medio rico Trypticasa soya, se seleccionaron 23 colonias a las cuales se les realizó la tinción de Gram, y se obtuvieron los siguientes resultados

- Muestra N°1: Bacilos grampositivos.
- Muestra N° 2: Cocos grampositivos.
- Muestra N° 3: Bacilos gramnegativos.
- Muestra N° 4: Bacilos grampositivos.
- Muestra N° 5: Cocos gramnegativos.
- Muestra N° 6: Bacilos grampositivos.
- Muestra N° 7: Cocos grampositivos.
- Muestra N° 8: Cocos grampositivos.
- Muestra N° 9: Bacilos grampositivos.
- Muestra N° 10: Cocobacilos grampositivos.
- Muestra N° 11: Cocos grampositivos.
- Muestra N° 12: Cocobacilos grampositivos.
- Muestra N° 13: Cocos grampositivos.
- Muestra N° 14: Cocos grampositivos.
- Muestra N° 15: Cocos grampositivos.
- Muestra N° 16: Cocos grampositivos.
- Muestra N° 17: Hongo.
- Muestra N° 18: Cocos grampositivos.
- Muestra N° 19: Cocobacilos grampositivos.
- Muestra N° 20: Cocos grampositivos.

- Muestra N° 21: Cocos grampositivos.
- Muestra N° 22: Bacilos grampositivos
- Muestra N° 23: Cocos grampositivos.

A los efectos de esto se decidió sembrar en el medio M9 utilizando dos métodos, las 22 bacterias y el hongo con caucho biodisponible y caucho aleatoriamente, y al cabo de 7 días se observó crecimiento bacteriano de 4 muestras, las cuales fueron, muestra N° 9, 11,12 y 22, el resto de las muestras inhibieron su crecimiento muriendo el dicho medio. Seguidamente se decidió repicar en dos sesiones por separado utilizando las bacterias que crecieron inicialmente en el medio suplementado con caucho, para verificar que crecen tomando el caucho como única fuente de carbono, al comprobar dicha conjetura se realiza la coloración de Gram, para verificar la pureza de las cepas y que se trate de los mismos microorganismos que se obtuvieron del crecimiento en el medio tripticasa soya, y los resultados fueron los siguientes:

- Muestra N° 9: Bacilos grampositivos (Anexo N°10).
- Muestra N° 11: Cocos grampositivos (Anexo N°11).
- Muestra N° 12: Bacilos grampositivos (Anexo N°12).
- Muestra N° 22: Bacilos grampositivos (Anexo N°13).

Tabla N°1: Resultados de las pruebas bioquímicas

Prueba	Muestra N°9	Muestra N°11	Muestra N°12	Muestra N°22
Disposición morfológica	Bacilos cortos	Cocos tétrada	Bacilos largos	Bacilos cortos
Morfología colonial	Blanca cremosa	Amarilla cremosa	Blanca sirop	Blanca cremosa
Catalasa	+	+	+	+
Agar Sangre	γ	γ	γ	B
Oxidasa	-	+	-	-
Manitol	-	-	-	+
Agar nutriente	+	+	+	+
Esporas	-	-	+	+
Cápsula	-	-	-	-

(+): Positivo; (-): Negativo; (γ): El microorganismo en cuestión no es capaz de realizar la hemólisis; (β): Hemólisis total;⁴¹.

Tomando los resultados de las pruebas bioquímicas y comparando con el manual de Bergey's⁴², se deduce que en la muestra N°9 existe la presencia de bacilos grampositivos, catalasa positiva, no esporulados, a su vez en la muestra N°11, se confirma la presencia de un *Micrococcus* spp, mientras que en las muestras N°12 y N°22 se corrobora la existencia de *Bacillus* spp y se denominaron *Bacillus* spp1 y *Bacillus* spp2. A su vez se realizaron otras pruebas bioquímicas que permitieron observar ciertas características de cada una de las bacterias presentes.

Es por eso que en la muestra N°9 conformada por los bacilos grampositivos, catalasa positiva, no esporulados, demostraron fermentación de la glucosa,

negativo para la oxidación de la glucosa, oxidación negativa de la maltosa, sacarosa y fructosa, negativo fermentación de la lactosa, no producción de H₂S, ni gas, Voges Proskauer negativo, hidrolisis de la esculina y licuefacción de la gelatina negativa.

Mientras que el *Micrococcus* spp demostró oxidación y fermentación de la glucosa, oxidación de la maltosa y fructosa, negativo para oxidación de la sacarosa, Voges Proskauer negativo, licuefacción de la gelatina y crecimiento en NaCl 6,5%, 8% positivo.

El *Bacillus* spp1 fermentó la glucosa, no oxido la glucosa, maltosa, sacarosa y fructosa, no fermenta la lactosa, no produce H₂S, ni gas, Voges Proskauer negativo, hidrolisis de la esculina y licuefacción de la gelatina negativa.

www.bdigital.ula.ve

Finalmente, el *Bacillus* spp2 fermentó la glucosa, no oxido la glucosa ni la maltosa, oxido la sacarosa y la fructosa, fermenta la lactosa, pero no produce H₂S, ni gas, Voges Proskauer positivo, hidrolisis de la esculina negativa y licuefacción de la gelatina positiva.

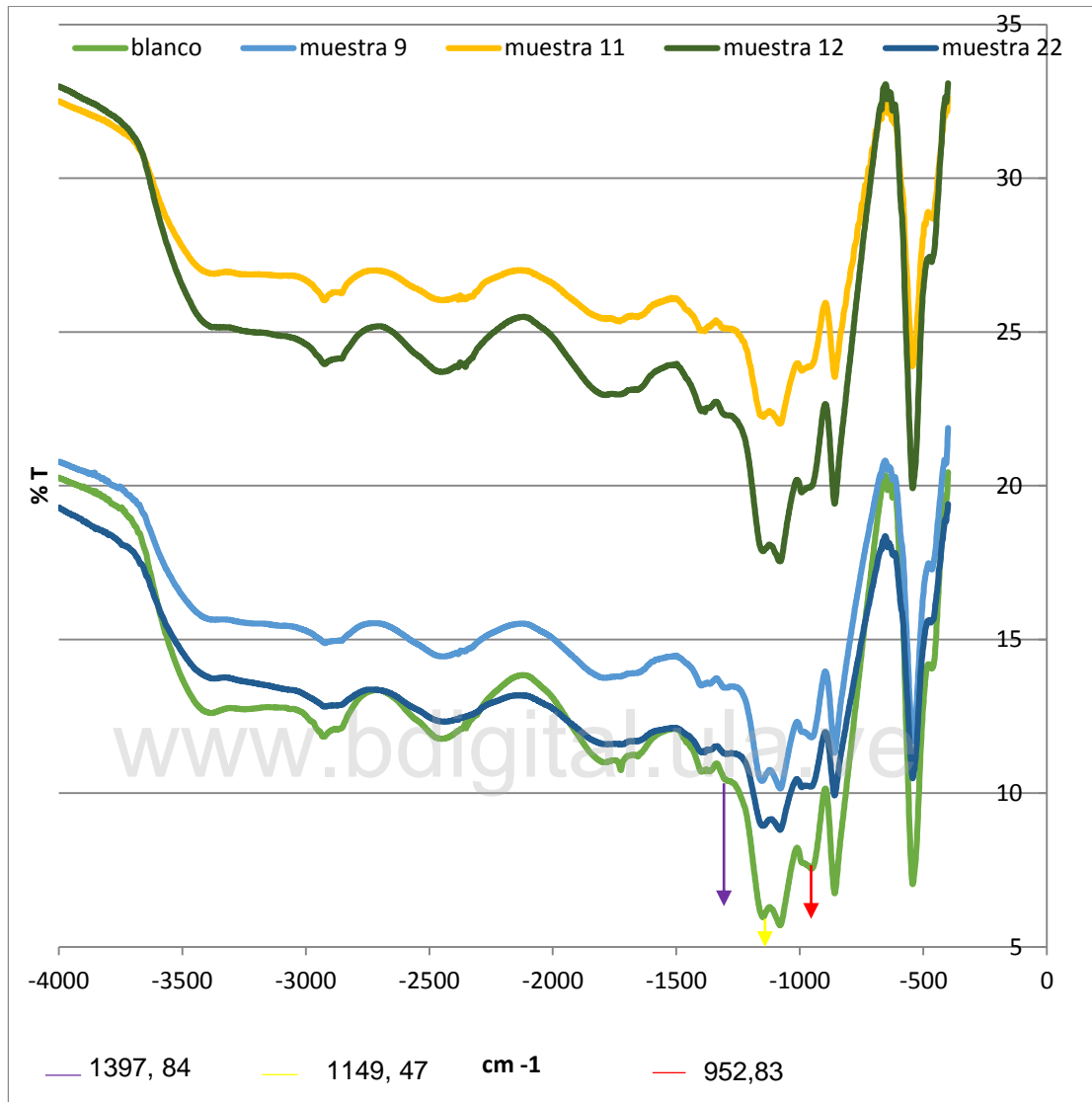
En el trabajo de investigación se lograron identificar bacterias pertenecientes al grupo grampositivos, específicamente a bacilos grampositivos, catalasa positiva no esporulados, al *Micrococcus* spp y a los *Bacillus* spp1 y *Bacillus* spp2, estos nuevos hallazgos no permiten hacer comparación con respecto a los microorganismos que han sido objeto de estudio y han demostrado tener la capacidad de biodegradar el caucho.

En EEUU, demostraron que las bacterias *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Micromonospora* y *Pseudomonas* degradaban el caucho natural, los guantes de látex y el caucho sintético cuando se eliminaban los antioxidantes presentes en los neumáticos. Para el 2004 en Alemania identifican dos nuevas cepas de *Gordonia polyisoprenivorans* capaces de degradar el caucho de isopreno. En el 2015 en Chile identifican a un hongo capaz de degradar el caucho natural y sintético en condiciones de aerobiosis con agua el cual fue identificado como *Alternaria alternata*, finalmente en Colombia descubren una nueva bacteria *Ochro-bactrumtritici* y un hongo *Penicillim citrinumy* capaz de degradar el caucho natural y sintético.

Cada uno de estos trabajos ofrecieron una nueva alternativa para el descarte de los cauchos, pero el presente trabajo de investigación, da inicio al uso de bacilos grampositivos, catalasa positiva, no esporulados, *Micrococcus* spp y *Bacillus* spp, los cuales demostraron utilizar el caucho lijado como única fuente de carbono sin necesidad de eliminar compuestos secundarios, además crecen en condiciones de aerobiosis y a temperatura ambiente facilitando la degradación del mismo.

Por lo tanto, se clasifican como microorganismos extremófilos capaz de biodegradar el caucho, además la toma de muestras de suelo de caucheras permitió demostrar que tanto los bacilos grampositivos, catalasa positiva, no esporulados, el *Micrococcus* spp como el *Bacillus* spp se encuentran en dicho espacio, y esto genera una ventaja ya que pueden ser recolectados de forma más accesible y utilizados para degradar el caucho y mejorar el deterioro y contaminación de nuestro ambiente.

Grafico N°1: Resultados de la espectroscopia de infrarrojo



Se analizó la gráfica, inicialmente se le realizo espectro al blanco (medio de cultivo sin inocular) el cual arrojó 9 picos, de los nueve picos se hizo una tabla donde se confronta la existencia o ausencia de los diferentes picos (cromóforos) con respecto a las muestras crecidas con los microorganismos, se observó que hubo ausencia de varios picos, esto debido a que las bacterias tomaron esa sustancia que forma ese cromóforo degradándolo o

disminuyendo su concentración a tal punto que no se detecta (Ver Anexo N°14).

Analizando la tabla y comparando los resultados con el material bibliográfico se encontró que a la longitud de onda 1376-1444 cm^{-1} hay presencia de una deformación simétrica y asimétrica del C-H en el grupo metilo⁴³, a 1140- 1150 cm^{-1} hay presencia del fosfato de sodio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)⁴⁴ y a la longitud de onda 950- 953 cm^{-1} hay un compuesto denominado tiosulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_2$)⁴⁴, por lo tanto el bacilo grampositivo, catalasa positivo no esporulado, utilizó el C-H del grupo metilo, el *Micrococcus* spp degradó el C-H del grupo metilo, el fosfato de sodio dibásico, el tiosulfato de amonio y el ión fosfato, mientras que el *Bacillus* spp1 degradó el C-H del grupo metilo y el fosfato de sodio dibásico, finalmente el *Bacillus* spp2 degradó el C-H del grupo metilo, esto nos lleva a deducir que de la unión de las sales junto con el caucho y los elementos que lo componen las bacterias degradaron y utilizaron dichos compuestos para crecer y desarrollarse.

Para el 2017 en Colombia⁴⁵ utilizan la espectroscopia de infrarrojo para caracterizar los exudados gomosos de cinco especies del eje cafetalero y dicha investigación les permitió demostrar que el pH de las muestras tiene tendencia ácida, lo que se asocia con los grupos funcionales característicos de los ácidos carboxílicos presentando espectros de FT-IR con longitudes de onda entre 3424 y 3584 cm^{-1} . Estos datos permiten afianzar y demostrar que la espectroscopia de infrarrojo cada día evoluciona y permite identificar la presencia de ciertos compuestos a una longitud de onda determinada.

En el trabajo de investigación se demostró mediante el uso de espectroscopia de infrarrojo utilizando el medio M9 suplementado con caucho lijado que las

bacterias utilizan el carbono presente en el grupo metilo de la molécula de isopreno, además algunos usaron los compuestos formados por la unión de las sales para crecer y desarrollarse en el medio con pocos nutrientes.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO V

Conclusiones

Los microorganismos se encuentran distribuidos al nivel mundial, muchos forman parte de la microbiota ambiental y de la microbiota del ser humano creando un intercambio al estar en contacto unos con otros, los suelos de las caucheras estudiadas demostraron tener un medio propicio para el desarrollo de un gran número de microorganismos, con esto se logró alcanzar los objetivos propuestos desde el inicio del trabajo investigativo.

Además, permitió comprobar la hipótesis formulada demostrando que existen microorganismos que tienen la capacidad de crecer en un medio restrictivo como el M9 suplementado con caucho biodisponible y caucho lijado. Entonces a efecto de los dos experimentos realizados, los microorganismos presentes en las muestras 9, 11, 12 y 22 crecen a temperatura ambiente en un periodo de 7 días, formando parte de la familia bacteriana. La muestra N°9 demostró la existencia de bacilos grampositivos, catalasa positiva, no esporulados, muestra N°11 *Micrococcus* spp, muestra N° 12 *Bacillus* spp1 y finalmente en la muestra N°22 se encuentra un *Bacillus* spp2.

Cada una de estas bacterias manifestaron tener la capacidad de crecer utilizando como única fuente de carbono el caucho, por lo tanto, al utilizar la espectroscopia infrarroja, se demostró que las bacterias modifican las condiciones del medio, utilizando las sustancias formadas a partir de la unión de las sales con el caucho.

Comparando el nombre de las bacterias con capacidad degradadora del caucho obtenida en la investigación y teniendo en cuenta su hábitat, cabe resaltar que estos forman parte de la microbiota habitual de dichos espacios y del ser humano en algunos casos. Conociendo la definición de microorganismos extremófilos, se determina que por tener la capacidad de utilizar el caucho como única fuente de carbono serían incluidos en tal término y considerados microorganismos de estudio para la biorremediación del ambiente por parte de compuestos realizados a partir de caucho natural o sintético.

www.bdigital.ula.ve

Recomendaciones

- Utilizar técnicas y pruebas bioquímicas que permitan identificar las bacterias descrita en el trabajo de investigación por género y especie.
- Aplicar las mismas técnicas de estudio utilizando como sustituto del caucho lijado, guantes de látex o algún otro compuesto derivado de caucho natural y sintético.
- Crear nuevas técnicas que permitan obtener partículas más pequeñas del caucho, para facilitar la degradación por parte de las bacterias.
- Someter a los bacilos grampositivos, catalasa positiva, no esporulados, *Micrococcus* spp, *Bacillus* spp al crecimiento directo sobre el caucho agregando las sales utilizadas en el medio M9.

www.bdigital.ula.ve

ANEXOS

www.bdigital.ula.ve



AGAR TRIPTICASA DE SOYA

Medio de cultivo Agar Tripticasa de Soya

INTRODUCCIÓN:

Es un medio de cultivo recomendado para la recuperación y aislamiento de toda clase de bacterias, grampositivas y gramnegativas aerobias.

COMPONENTES

1. Caja por 10 unidades
2. Inserto

MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS

1. Asas Bacteriológicas
2. Guantes Estériles
3. Tapabocas
4. Estufa a 37 °C
5. Mechero de Bunsen.

METODOLOGÍA:

Principio del método:

El agar tripticasa de soya garantiza el crecimiento de todos los microorganismos de importancia microbiológica tanto grampositivos como gramnegativos, hongos y levaduras, este medio tiene múltiples usos puede ser utilizado para el monitoreo microbiológico de áreas y superficies, para el mantenimiento de cepas ATCC y para el análisis de aguas y alimentos.

El agar tripticasa de soya contiene caseína digerida con enzimas pancreáticas 5.0 g, caseína digerida con papaina 5.0 g, Cloruro de Na 5.0 g Agar 15.0 g pH final (7.3 +/- 0.2).

CRITERIOS DE DESEMPEÑO Y LIMITACIONES DEL MÉTODO

El agar Tripticasa de Soya debe permitir el crecimiento abundante de todos los microorganismos en estudio después de 18 horas de incubación en atmósfera de aerobiosis.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS:

La placa de agar tripticasa de Soya viene lista para ser utilizada.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS:

El medio agar tripticasa de soya debe conservarse a T° de 4-8 °C colocando las placas en posición invertida para evitar que el agua de condensación pueda caer sobre la superficie del medio. Este producto debe manipularse con cuidado evitando movimientos bruscos o caídas que puedan resquebrajar la capa del medio. **La congelación arruina totalmente el medio.** Conservado en condiciones óptimas el medio es estable hasta la fecha de expiración señalada.

PROCEDIMIENTO:

Cualquier muestra puede ser procesada en este medio y puede sembrarse por diferentes métodos así:

- 1-Con asa bacteriológica estéril trabajando siempre a la llama del mechero, tomar una mínima muestra.
2. Sembrar suavemente sobre la superficie tersa del medio por el procedimiento de agotamiento.

Anexo N°1. Medio agar tripticasa soya.



Anexo N°2: Preparacion del medio de cultivo tripticasa soya.



Anexo N°3: Microorganismos recolectados de las muestras de caucheras en medio tripticasa soya.



Anexo N°4: Tinción de Gram.

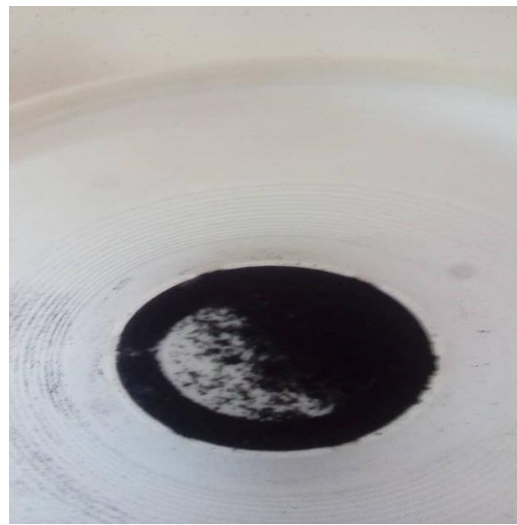
www.bdigital.ula.ve

M9 mineral medium

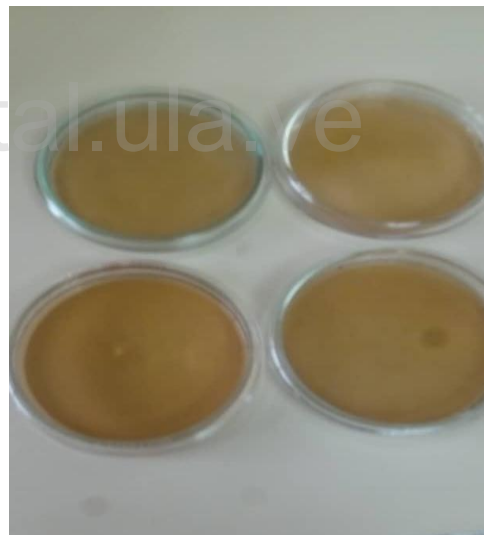
For 1 liter **M9 mineral medium** add to 867 ml sterile water:

100 ml	M9 salt solution (10X)	Na ₂ HPO ₄	33.7 mM
		KH ₂ PO ₄	22.0 mM
		NaCl	8.55 mM
		NH ₄ Cl	9.35 mM
20 ml	20% glucose	glucose	0.4 %
1 ml	1 M MgSO ₄	MgSO ₄	1 mM
0.3 ml	1 M CaCl ₂	CaCl ₂	0.3 mM
1 ml	biotin (1 mg/ml)	biotin	1 μg
1 ml	thiamin (1 mg/ml)	thiamin	1 μg
10 ml	trace elements solution (100X)	trace elements	1X

Anexo N°5: Medio M9.



Anexo N°6: Proceso de lijado del caucho.



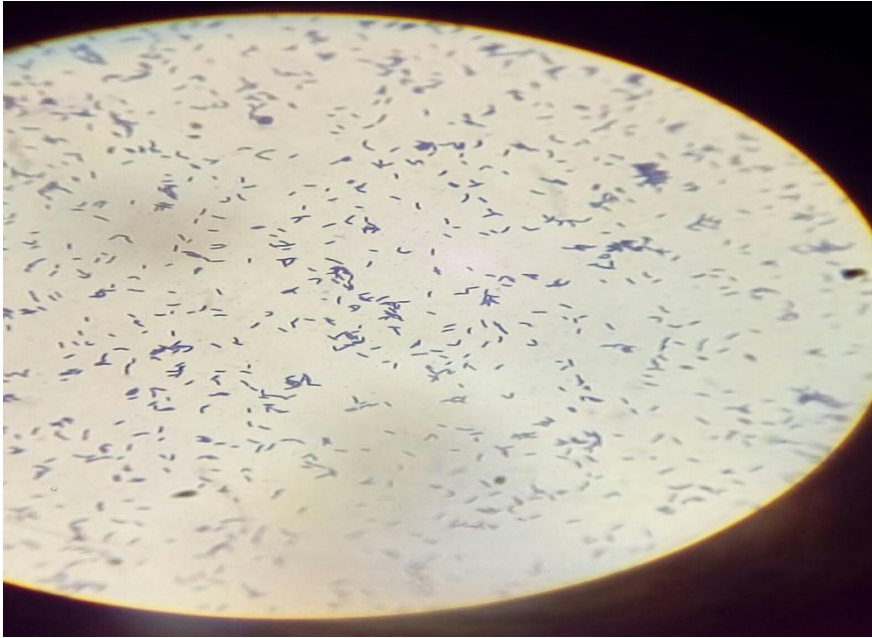
Anexo N°7: M9 con caucho biodisponible



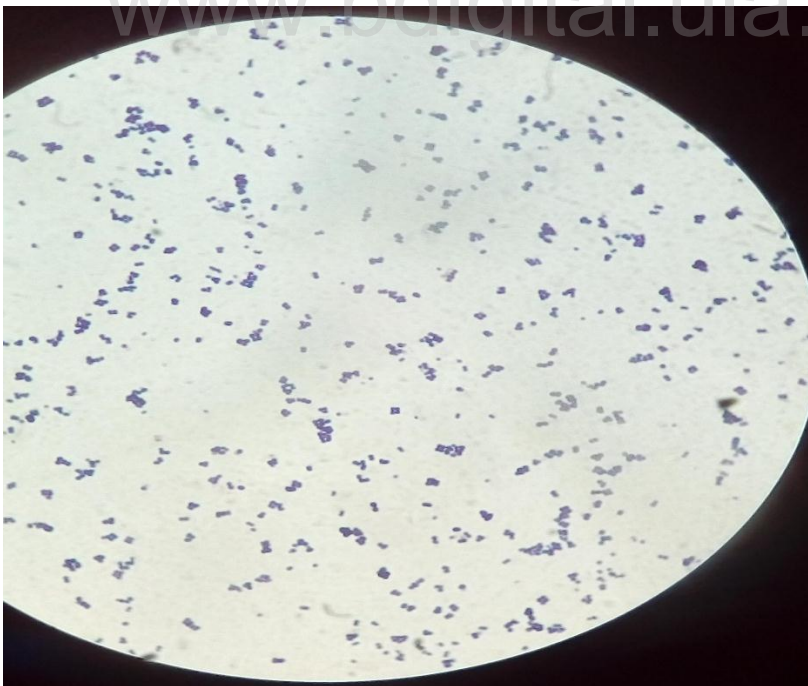
Anexo N°8: M9 con caucho lijado.



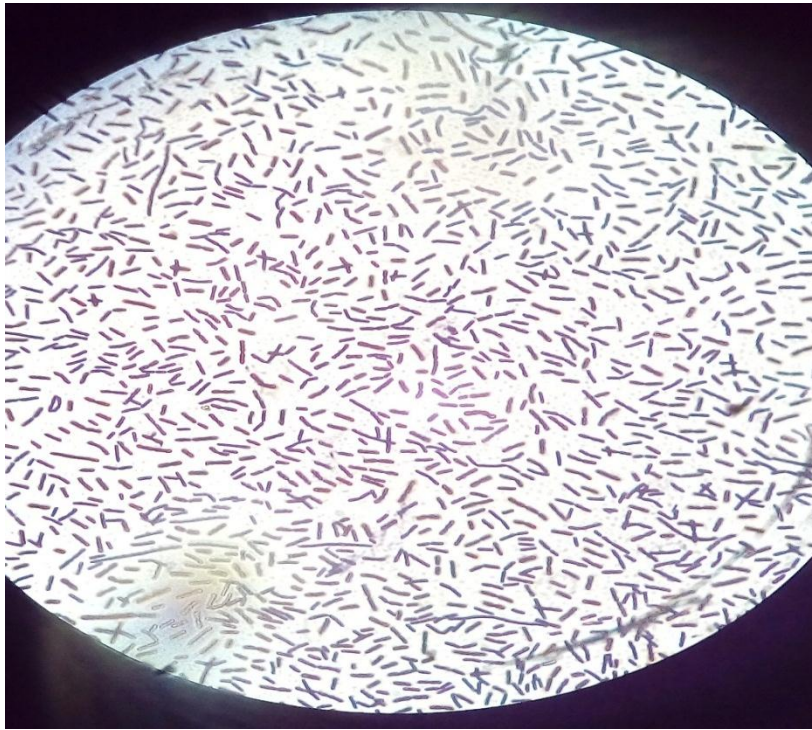
Anexo N°9: Tinción de Gram para los microorganismos que crecieron en el medio M9 con caucho biodisponible y lijado.



Anexo N°10: Microorganismo muestra N°9

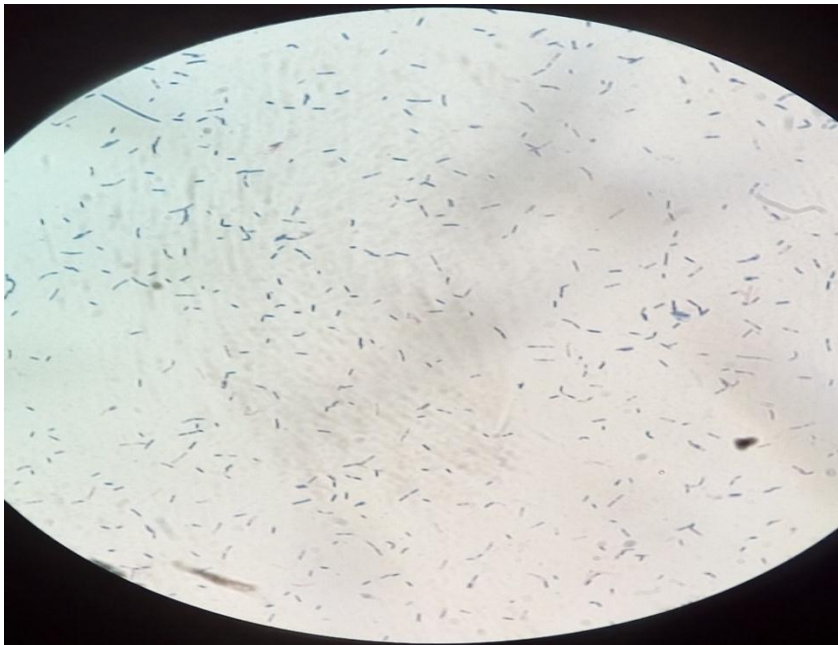


Anexo N°11: Microorganismo muestra N°11



Anexo N°12: Microorganismo muestra N°12

www.bdigital.ula.ve



Anexo N°13: Microorganismo muestra N°22

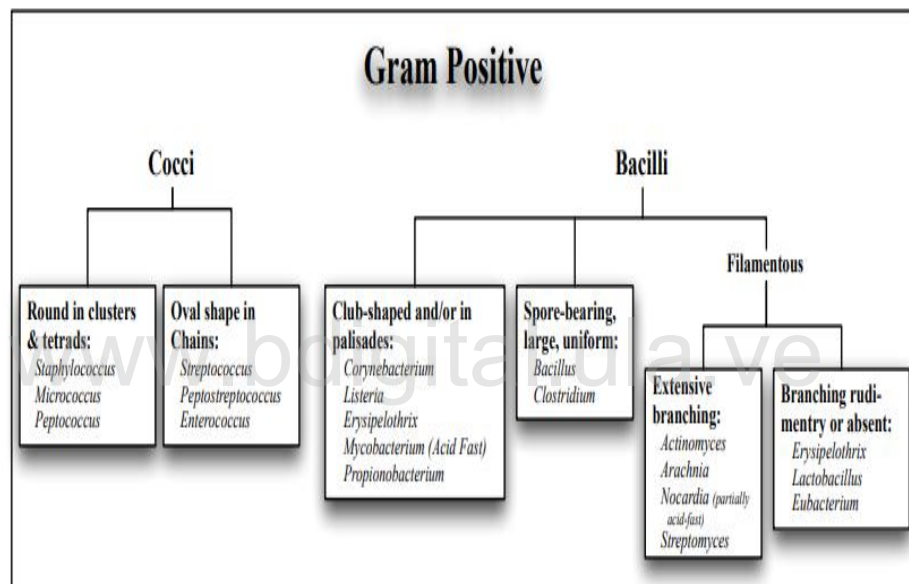
BLANCO		MUESTRA 9		MUESTRA 11		MUESTRA 12		MUESTRA 22	
cm-1	% T	cm-1	% T	cm-1	% T	cm-1	% T	cm-1	% T
2928,63	11,83	2921,78	14,88	2925,11	26,03	2923,15	23,95	2920,98	12,81
2448,17	11,77	2447,56	14,44	2442,23	26,03	2451,91	23,71	2437,16	12,32
1724,79	10,74	1791,91	13,75	1728,04	25,34	1788,13	22,95	1785,83	11,59
1397,84	10,7								
1149,47	5,96	1154,14	10,4					1149,05	8,93
1079,72	5,7	1078,8	10,15	1079,58	22,02	1079,52	17,54	1079,53	8,81
952,83	7,54	953,7	11,82			993,25	19,78	993,03	10,19
858,92	6,74	859,34	11,32	858,79	23,54	859,22	19,41	859,66	9,92
543,19	7,04	543,65	11,68	543,72	23,88	543,29	19,91	543,44	10,48

Anexo N°14. Tabla de espectroscopia de infrarrojo.

Differentiation via Gram stains and cell morphology.

Gram Stain & Morphological Flowchart

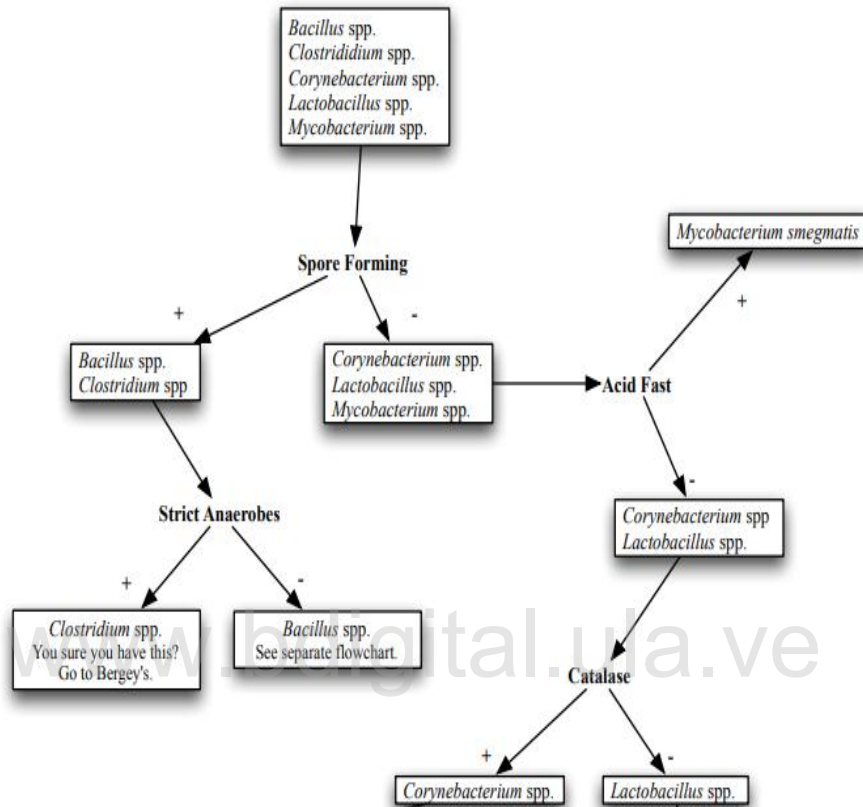
Some Examples



Anexo N°15: Esquema de identificación de las bacterias grampositivas según manual de Bergey's⁴².

Gram Positive Rods ID Flowchart

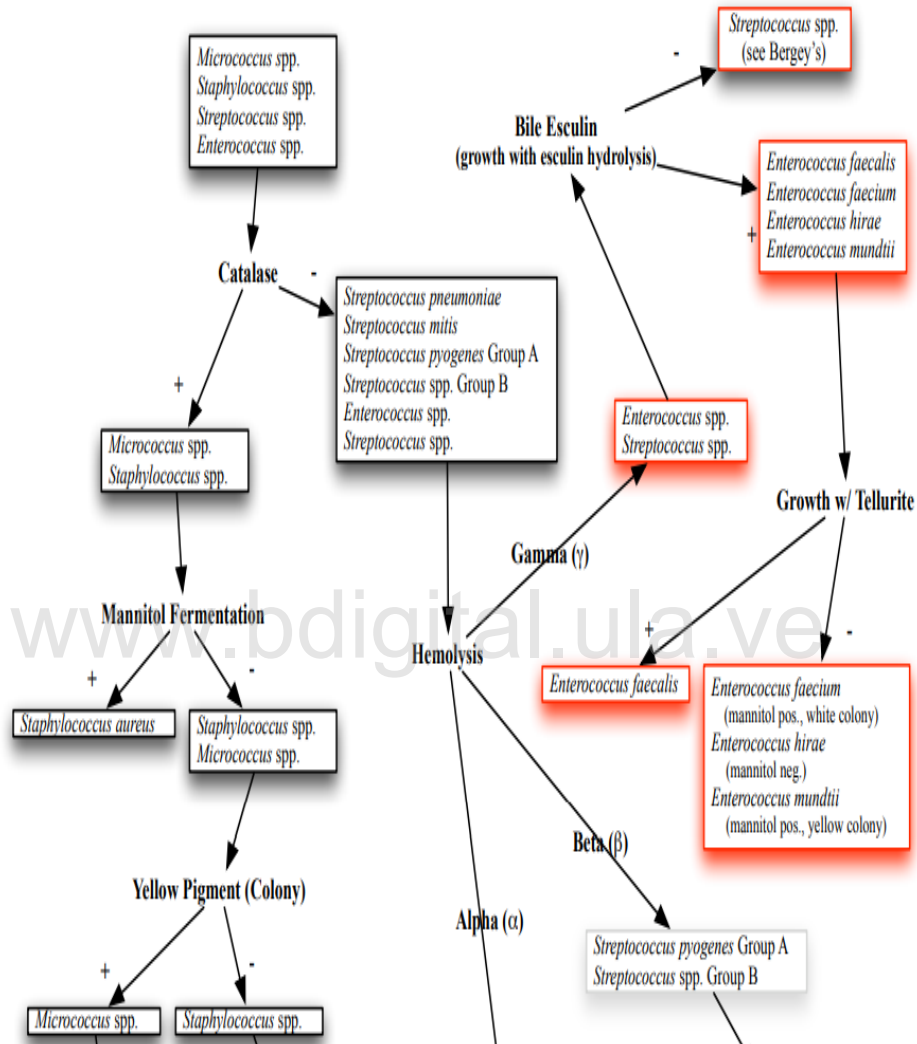
Gram Positive Rods



Anexo N°16: Esquema de identificación de las bacilos grampositivos según manual de Bergey's⁴².

Gram Positive Cocci ID Flowchart

Gram Positive Cocci



Anexo N°17: Esquema de identificación de las bacilos grampositivos según manual de Bergey`s⁴²

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

1. Kogan, Enrique. Cuántos autos hay en el mundo y cuántos se fabrican anualmente. Hoy. Octubre 6-2018. Disponible: <https://www.hoylosangeles.com/vidayestilo/autos/hoyla-aut-cuantos-autos-hay-en-el-mundo-y-cuantos-se-fabrican-anualmente-20160923-story.html>.
2. Larrotta, Ivan. "Inclusion del caucho (*Hevea brasiliensis*) en sistemas silvopstoriles en del municipio de san jose del guaviare". Universidad Nacional Abierta. 2016. Pp.
3. Spina Bifida Association. Látex en el hogar y la comunidad. 2015. Disponible: <http://spinabifidaassociation.org/wp-content/uploads/2015/07/latex-en-el-hogar-y-la-comunidad.pdf>.
4. Martínez, José. Espectroscopia infrarroja de muy alta resolución: construcción de un espectrómetro por diferencia de frecuencias. Universidad Complutense de Madrid. 1990.
5. Castells, Xavier. Reciclaje de residuos industriales. Ediciones Díaz de Santos. 2da edición. Madrid. 2009.
6. Rodríguez, Francisco. Biotecnología ambiental. Editorial TEBAR, S.L. Madrid. 2005
7. Bermejo, Roberto. La gran transición hacia la sostenibilidad. Editorial Catarata. Madrid. 2005.
8. Billmeyer, Fred. Ciencia de los polímeros. Editorial Reverte. España. 2004.
9. Stanier, Roger. Microbiología. Editorial Reverte. España. 1992.
10. Murray, Patrick. Microbiología médica. ELSEVIER. 6ta edición. España-Madrid. 2009.
11. Tortora G., Funke B., Case C. Diagnóstico microbiológico texto y atlas en color. 9^{na} edición. Editorial Médica Panamericana. 2007.

12. Satya p. Singh. Environmental Microbiology. Extreme and extremophile environments. Universidad de Saurashtra, Rajkot. Disponible: <https://pdfs.semanticscholar.org/165b/009499e1945fc03b3ffa0ff52bca b813474e.pdf>.
13. Rodriguez, V. Efecto Antagonico y Biocontrolador de algunos microorganismos saprofiticos contra Rhizoctoniasolani un fitopatogeno causante del (Damping Off) en plantas de tomate. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2002. Pp.1-2.
14. Instituto Nacional De Innovación Y Transferencia En Tecnología Agropecuaria (INTA- COSTA RICA). Análisis Microbiológico De Suelos Segunda edición. San José, Costa Rica. 2015. Disponible: <http://www.platicar.go.cr/images/buscador/documents/pdf/02/00532-brochures5.pdf>.
15. Benavides, G. Hermida, A. “Aislamiento e identificación de flora bacteriana nativa del suelo de los páramos Cruz Verde y Guasca”. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. 2008. Pp. 5-6.
16. 16. Google sites. Las propiedades bio- orgánicas del suelo. Parte 5. Disponible: <https://sites.google.com/site/cienciadelsueloutmach/LA-GNESIS-DE-LOS-SUELOS/las-propiedades-bio---organicas-del-suelo>.
17. Córdoba, A. Ciarmela, M. Presencia de parásitos intestinales en paseos públicos urbanos en La Plata Argentina. ParasitolLatinoam. 2002.57: 25 – 29.
18. Martín, Inés. Departamento de Microbiología de la UGR. Disponible: https://diversidadmicrobiana.com/index.php?option=com_content&view=article&id=284&Itemid=318.
19. Koneman, Elmer. Diagnostico microbiológico. Editorial médica panamericana. 6ta edición. España. 2006.
20. Philip J Watson. La historia de las estadísticas del caucho. Grupo Internacional de Estudios sobre el Caucho Casa Heron. 109/115 Wembley Hill Road Wembley HA9 8DA, Reino Unido.

21. Reyes, E. Biodegradación del caucho por *Alternaria alternata*. Universidad Nacional Andrés Bello. Chile. 2015. Pp. 1-5,6 22.
22. Miranda, José. Reacciones y sus mecanismos en la degradación de polímeros. Instituto Politécnico Nacional. 2015. Pp. 4,5,6.
23. Berekaa, M.M., Linos, A., Reichelt, R., Keller, U., Steinbuchel, A. Effect of pretreatment of rubber material on its biodegradability by various rubber degrading bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 2000. 184, 199e206.
24. Arenskötter, M. Baumeister, D. Berekaa, M. Pötter, G. Kroppensted, R. Linos, A. Steinbüchel, A. Taxonomic characterization of two rubber degrading bacteria belonging to the species *Gordonia polyisoprenivorans* and analysis of hyper variable regions of 16S rDNA sequences. *FEMS Microbiology Letters*. 205 (2001) 277-282.
25. Enoki, M., Doi, Y., Iwata, T. Oxidative degradation of cis- and trans-1,4-polyisoprenes and vulcanized natural rubber with enzyme-mediator systems. *Biomacromolecules*. 2003. 4, 314-320.
26. Moncada, Yandy. Biorremediación de aguas contaminadas en la F107D, NPK y F105D de PEQUIVEN ubicada en Morón, Estado Carabobo. Universidad de los Andes. Mérida- Venezuela. 2012.
27. Hernández G. Capacidad de biorremediación de bacterias aeróbicas aisladas de muestra provenientes de la industria petrolera. Universidad de los Andes. Mérida- Venezuela. 2012.
28. Molina E., Garcia C. Evaluación preliminar de una alternativa microbiana para el tratamiento de neumáticos en desuso. *Boletín Semillas Ambientales Bogotá, Colombia*. Vol. 10 No. 1. 2016. 59 – 65.
29. Aguirre, G., Blanco, M., Bordiga T., Browarnik, G. Tecnología- Computación. Edición especial para Cadena Capriles. Cadena Tricolor. Perú. 2007.
30. Barone, L., Rodríguez, C. Enciclopedia temática modular. Cultura librera americana. Buenos Aires- Argentina.

31. Gispert, C., Vidal, J., Garriz, J. (). Nueva Didáctica. Enciclopedia temática Universal. España. Pp. 801.
32. Alcántara, M.J. Hernáiz, J. M. Sánchez-Montero, M. D. Saco, M. S. Martín, M. Torres, A. Sanchez-Muñoz, C. Guillén, A. Heras, M. Elorza, B. Elorza, M. Molina, J. Pla, H. Martín, J. De La Fuente. Biotecnología Farmacéutica.
https://www.sem microbiologia.org/storage/secciones/publicaciones/semforo/58/articulos/19_AB T5_Biot_Farm_UCM.pdf.
33. González, Edwin. Ingeniería ambiental. Concepto y estrategias de biorremediación. Universidad Antonio Nariño. 2011. Pp. 20-22.
34. Cortón, Eduardo; VIALE, Alberto. "Solucionando grandes problemas ambientales con la ayuda de pequeños amigos: las técnicas de biorremediación". Ecosistemas. Vol. 15, n. 3 (sept.-dic. 2006). ISSN 1697-2473. 148-157.
35. Naumann, D. Helm, D. Labischinski, H. Giesbrescht, P. The characterization of microorganisms by Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR). In: Modern Techniques for Rapid Microbiological Analysis (Nelson WH, ed.). New York: Wiley- VCH. 1991.
36. Naumann D. Schultz CP. Helm D. What can infrared spectroscopy tell us about the structure and composition of intact bacterial cells. In: Infrared Spectroscopy of Biomolecules (Mantsch HH. Chapman D. eds). New York: Wiley-L iss. 1996.
37. Naumann, D. FTIR spectroscopy in microbiology. In: Encyclopedia of Analytical Chemistry (Meyers RA. ed.). Chichester: John Wiley&Sons. 2000.
38. Arias, F. Como se hace una tesis. Editorial Gedisa. Barcelona-España. 2000.
39. Hernández, S. Metodología de la investigación. Editorial Mc Graw Hill. México. 2014.

40. Bio- bacter. <https://es.slideshare.net/drancerboy1/agar-tripticasa-de-soya>.
41. Ramírez, A., García, E., Longa, A., Sánchez, K. Manual práctico de bacteriología general. Publicaciones. Vicerrectorado académico. Mérida- Venezuela. 2010. Pp. 70- 168.
42. David Hendricks Bergey's. Ninth Edition. Disponible:<https://static1.squarespace.com/static/54c7f25fe4b0447c7f8aed4b/t/5504c972e4b06ae7c7462e69/1426377074561/IDFlowcharts.pdf>.
43. Tamara, M., Reyes, H. Análisis y caracterización fisicoquímicas de la especie *Hevea brasiliensis*. ISSN 1909-8367. 2014.9-15.
44. Nyquist, Richard. Interpreting Infrared, Raman, and Nuclear Magnetic Resonance Spectra. ELSEVIER. New York. 1991.
45. Medina, Diana. Caracterización por espectroscopia infrarroja (ft-ir) de exudados gomosos de cinco especies de plantas presentes en el eje cafetero. IICS.5a13 -2017-v4-31-37.