



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

TESIS

Presentada para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

por

Paola Elizabeth Campos Tejada
Ingeniero Químico Industrial

TITULO DE LA TESIS

Biodegradación de ácido tereftálico es sistemas modelos aerobios

Dirigida por

Dr. Claudio Garibay Orijel
Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas

México, D.F. Noviembre de 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 14:00 horas del día 28 del mes de Octubre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de UPIBI-IPN para examinar la tesis titulada:

Biodegradación de ácido tereftálico en sistemas modelos aerobios

Presentada por el alumno:

Campos	Tejada	Paola Elizabeth
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)
		Con registro: B 0 9 1 4 9 6

aspirante de:
Maestro en Ciencias en Bioprocesos

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Claudio Garibay Orijel

Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas

Dr. Edgar Salgado Manjarrez

Dr. Jesús Agustín Badillo Corona

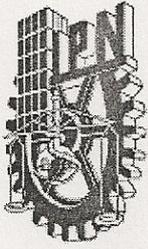
Dr. Alberto Ordaz Cortés

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dra. María Guadalupe Ramírez Sotelo



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL
INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACION



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día 5 del mes de octubre del año 2011, la que suscribe Paola Elizabeth Campos Tejada alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Bioprocesos con número de registro B091496, adscrito a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Claudio Garibay Orijel y el Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas y cede los derechos del trabajo intitulado Biodegradación de ácido tereftálico en sistemas modelos aerobios, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, las gráficas o los datos del trabajo sin el permiso expreso del autor o del director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección garibayo@ipn.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

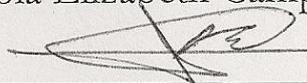
A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized 'P' and 'E' followed by a horizontal line, positioned above a solid horizontal line.

Paola Elizabeth Campos Tejada

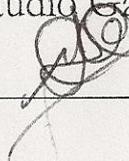
Declaración de originalidad

“Yo declaro que esta tesis, así como los resultados en ella reportados, son producto de mi trabajo y que hasta donde yo sé, no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, ni tampoco contiene material que haya sido utilizado para obtener algún grado o diploma en alguna otra institución educativa excepto donde se reconoce como tal. Declaro igualmente que hago justo reconocimiento en la tesis a las personas que contribuyeron con su trabajo y, finalmente, declaro que esta tesis es producto de mi propio trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita.”

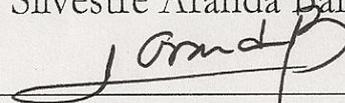
Paola Elizabeth Campos Tejada



Dr. Claudio Garibay Orijel



Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas



Comisión revisora

Dr. Claudio Garibay Orijel

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Alberto Ordaz Cortés

ASESOR

Dr. Jesús Agustín Badillo Corona

ASESOR

Dr. Edgar Salgado Manjarrez

ASESOR

Resumen

El ácido tereftálico (AT) es un compuesto orgánico tóxico; debido a que su aplicación más fuerte es la producción de tereftalato de polietileno (PET por sus siglas en inglés) es uno de los compuestos que encabezan la lista de los 50 productos más producidos a nivel mundial por lo que es inevitable que sea detectado en distintos ambientes como el aire, suelos y aguas naturales lo cual ha conllevado a preocupaciones por el impacto ambiental y daños a la salud que origina.

Distintos proyectos de investigación han generado líneas de estudio para la degradación de éste compuesto xenobiótico como los procesos químicos de oxidación avanzada pero también existen los procesos biológicos, en donde diversos estudios han demostrado que los microorganismos son eficientes para degradar el AT. La degradación biológica puede llevarse a cabo por rutas anaerobias y rutas aerobias de acuerdo al tipo de metabolismo de los microorganismos.

En el presente trabajo la investigación se centra en la biodegradación aerobia del ácido tereftálico como única fuente de carbono y energía con dos microorganismos desconocidos capaces de biodegradar este compuesto xenobiótico. Estos microorganismos fueron identificados por medio de la caracterización molecular del gen 16S rDNA y del análisis microscópico por microscopía electrónica de barrido obteniendo los géneros de bacteria *Arthrobacter sp.* y *Rhodococcus sp.* ambos degradadores de isómeros ftálicos (ácido tereftálico, ácido ftálico y ácido isoftálico). La concentración inicial de sustrato a biodegradar fue de 5 g/L y se demostró que sólo *Rhodococcus sp.* puede biodegradar eficientemente esta concentración por lo cual se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento celular y biodegradación de AT a distintas concentraciones de sustrato (3, 4, 5.035, 7.1, 9.7 y 14.5) g/L para determinar la máxima concentración que *Rhodococcus sp.* pudiese degradar y caracterizar el microorganismo.

Rhodococcus sp. biodegradó AT a todas las concentraciones de sustrato probadas siendo la más eficiente 5 g/L de acuerdo a la velocidad específica de crecimiento celular y a la velocidad de biodegradación de AT, los parámetros de velocidad máxima (μ_{max}), constante de saturación (K_s) y constante de inhibición (K_i) fueron calculados de acuerdo a la ecuación de Andrews de inhibición por sustrato, el modelo se ajustó a las cinéticas de biodegradación y crecimiento celular para cada concentración de sustrato utilizando los parámetros obtenidos de μ_{max} , K_s y K_i con el software Model Maker versión 4.

Abstract

Terephthalic acid is one of the top 50 most produced industrial organic compounds worldwide because it is a precursor of polyethylene terephthalate (PET), explaining its abundant presence in air, water and soil environments as a contaminant. This fact has led to several concerns about the environmental impact and health risk related to terephthalic acid pollution.

Several research projects have originated lines of study on terephthalic acid degradation, most of which are chemical processes of advanced oxidation, but also there exist the biological processes, dealing with the microorganisms able to metabolize this xenobiotic compound. The biological degradation can be accomplished by both anaerobic and aerobic pathways, depending on the metabolism of the degrading microorganisms.

This research is focused on the aerobic biodegradation of terephthalic acid as the unique carbon and energy source in cultures with two microorganisms able to biodegrade this xenobiotic compound. These microorganisms were identified by molecular characterization of the 16s rDNA gen and electronic microscopic scanning, resulting in *Arthrobacter s.p* and *Rhodococcus sp.* both strains are phthalic isomer degraders (terephthalic acid, phthalic acid and isophthalic acid). The initial concentration of substrate to degrade was of 5 g/L and it was proved that just *Rhodococcus sp.* can biodegrade efficiently this concentration, so cell kinetics growth and terephthalic acid biodegradation at different substrate concentrations were carried out (3, 4, 5.035, 7.1, 9.7 and 14.5) g/L in order to determine the maximum concentration that *Rhodococcus sp.* could degrade and characterize this microorganism.

Rhodococcus sp. biodegraded AT in all the substrate concentrations proved, being the most efficient 5 g/L according to the specific speed of cell growth and the TA biodegradation, the parameters of maximum speed (μ_{max}), saturation constant (Ks) and inhibition constant (KI) were calculated according to the Andrews equation of substratum inhibition, the model was fitted to the biodegradation kinetics and cell growth using the parameters obtained from μ_{max} , Ks, Ki with Model Marker software version 4.

Créditos

El trabajo de esta tesis se realizó en el laboratorio de Bioingeniería y de Biología Molecular de la sección de posgrado de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional (UPIBI-IPN) bajo la dirección del Dr. Claudio Garibay Orijel y del Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas, con el apoyo de la beca No. 44552 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Este trabajo contó con el financiamiento otorgado por el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (PICS08-56).

Al Dr. Enrique Durán y al Dr. Gustavo Valencia del laboratorio de Bioconversiones de la UPIBI-IPN por el préstamo del equipo de Electroforesis Capilar modelo MDQ marca Beckman Coulter para cuantificar la biodegradación de ácido tereftálico.

Al Dr. Jesús Agustín Badillo Corona del laboratorio de Biotecnología Molecular de la UPIBI-IPN por su apoyo en la caracterización molecular de los microorganismos del presente proyecto.

Al Dr. Alberto Ordaz Cortés del laboratorio de Bioingeniería de la UPIBI-IPN por su ayuda en la caracterización cinética.

A la Dra. Mayahuel Ortega del laboratorio de caracterización del centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías del Instituto Politécnico Nacional (CNMN-IPN) por la asistencia brindada en el análisis microscópico de los microorganismos por microscopía electrónica de barrido.

Dedicatoria

Sin ustedes nunca lo hubiera logrado, GRACIAS:

Al Gran Arquitecto del Universo.

A mis padres Rubén Campos Ruíz y Maluyí Tejada Méndez por todo el amor y apoyo que siempre me dan día tras día, gracias por todos sus consejos y por hacerme fuerte cuando estoy débil, les debo todo lo que soy. Gracias por enseñarme a ser mejor persona. Los amo inmensamente.

A tí Rubí por ser la mejor hermana, mi mejor amiga, mi confidente, gracias por apoyarme en los momentos difíciles.

A Yair por todo el amor que día a día me demuestras cuidándome y apoyándome en todo momento, gracias por tu paciencia y por abrirme las puertas a un mundo ideal.

A mis abuelitas, mis abuelitos, a mis tíos, tías y a todos mis primos, gracias por siempre desearme lo mejor.

Visita Interiora Terras Rectificatur Invenies Occultum Lapidum

Agradecimientos

Le agradezco al Dr. Claudio Garibay Orjuel por aceptarme en este proyecto de investigación que me dejó experiencias inigualables creciendo como persona y como profesionista.

Gracias por su ayuda y apoyo para la realización del proyecto.

Al Dr. Juan Aranda Barradas por su apoyo, por su comprensión y por las asesorías que me brindó para terminar con éxito el presente proyecto.

Al Dr. Alberto Ordaz Cortés, M.C Rubén Medina y M.C Yolanda Gómez por las asesorías y consejos que me brindaron, sin ustedes hubiera sido muy difícil, de todo corazón Gracias.

A los asesores que forman parte del comité tutorial, gracias por sus críticas constructivas y orientación para la mejoría de la investigación.

A mis compañeros y amigos de aula, pasamos grandes momentos (buenos y malos) les agradezco su apoyo y su amistad.

A todos y cada uno de mis compañeros de los laboratorios de Bioingeniería, Biotecnología Molecular, Bioconversiones y Bioprocesos, Gracias.

A la UPIBI-IPN por aceptarme en su posgrado y enseñarme un mundo tan hermoso como los Bioprocesos.

Contenido

Resumen	vi
Abstract.....	vii
Contenido.....	xi
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tablas.....	xv
1. Introducción	1
1.1. Ácido tereftálico, sus propiedades y su producción.....	2
1.2. Exposición y efectos tóxicos	6
1.2.1. En humanos.....	6
1.2.2. En animales de laboratorio	6
1.3. Legislación nacional e internacional sobre el ácido tereftálico	7
1.4. Tecnologías existentes para la degradación de ácido tereftálico.....	8
1.4.1. Tratamientos químicos	8
1.4.2. Tratamientos biológicos.....	8
1.4.2.1 Degradación anaerobia del ácido tereftálico	9
1.4.2.2 Degradación aerobia del ácido tereftálico.....	11
1.5. Biodegradación de isómeros ftálicos y sus ésteres en sistemas aerobios	13
2. Justificación.....	16
3. Objetivos	17
3.1. Objetivo general	17
3.2. Objetivos específicos	17
4. Materiales y métodos	18
4.1. Plan de Trabajo.....	18
4.2. Procedimientos y métodos.....	19
4.2.1. Obtención de microorganismos aerobios degradadores de AT.....	19
4.2.2. Etapa 1. Caracterización molecular de los microorganismos capaces de degradar AT en condiciones aerobias.....	20
4.2.2.1 Extracción y purificación del DNA genómico	20
4.2.2.2 Electroforesis en gel de agarosa.....	21
4.2.2.3 Identificación molecular y secuenciación del gen 16S rDNA	21
4.2.2.4 Criterios para la identificación.....	22
4.2.3. Etapa 2. Análisis microscópico de los microorganismos aerobios	23
4.2.3.1 Microscopía electrónica.....	23
4.2.4. Etapa 3. Establecimiento de las condiciones de cultivo para los microorganismos	23
4.2.4.1 Medio de cultivo sólido de AT.....	24
4.2.4.2 Medio de cultivo líquido de AT	25
4.2.4.2.1 Cinéticas de crecimiento celular en medio de cultivo líquido de AT a 5 g/L a distintas velocidades de agitación	25
4.2.5. Etapa 4. Evaluación de Cinéticas de biodegradación y crecimiento celular a distintas concentraciones de sustrato.....	25
4.2.5.1 Cuantificación de la biodegradación de AT	26
4.2.5.2 Cuantificación del crecimiento celular	27
4.2.5.2.1 Peso constante	28

4.2.5.2.2 Densidad óptica.....	28
4.2.6. Etapa 5. Caracterización molecular de los microorganismos al finalizar las cinéticas de biodegradación	28
4.3. Modelos cinéticos.....	29
5. Resultados y discusión.....	31
5.1. Caracterización molecular de los microorganismos capaces de degradar ácido tereftálico..	31
5.2. Análisis microscópico de los microorganismos aerobios.....	35
5.3. Establecimiento de las condiciones de cultivo para los microorganismos	38
5.3.1. Medio de cultivo sólido de AT.....	38
5.3.2. Medio de cultivo líquido de AT	39
5.4.2.1 Cinéticas de crecimiento celular en medio de cultivo líquido de AT a 5 g/L a distintos pHs.....	39
5.4.2.2 Cinéticas de crecimiento celular en medio de cultivo líquido de AT a 5 g/L a distintas velocidades de agitación.....	42
5.4. Cuantificación de la biodegradación de AT	43
5.5. Evaluación de cinéticas de biodegradación y crecimiento celular a distintas concentraciones de sustrato	45
5.5.1. Rendimiento celular ($Y_{x/s}$)	54
5.6. Caracterización molecular del microorganismo al finalizar las cinéticas de biodegradación de ácido tereftálico y crecimiento celular.....	56
6. Conclusiones.....	58
7. Perspectivas para trabajos futuros	60
8. Referencias	61
9. anexos	67

Índice de Figuras

Figura 1-1. Síntesis química del ácido tereftálico a partir del p-xileno	2
Figura 1-2. Proceso Henkel para la producción de ácido tereftálico.....	4
Figura 1-3. Proceso de carboxilación del ácido benzoico para la producción de ácido tereftálico.....	4
Figura 1-4. Compuestos intermediarios principales en la biodegradación de compuestos aromáticos	11
Figura 4-1. Diagrama de flujo del plan de trabajo experimental	18
Figura 5-1. Colonias pertenecientes a los microorganismos aerobios que degradan ácido tereftálico tomadas a una amplificación de 10X.....	31
Figura 5-2. Amplificación del gen 16S rDNA.....	32
Figura 5-3. Electroferograma y alineamiento perteneciente al microorganismo tipo A.....	33
Figura 5-4. Electroferograma y alineamiento perteneciente al microorganismo tipo B	33
Figura 5-5. Morfología de <i>Arthrobacter sp</i>	35
Figura 5-6. Morfología de <i>Rhodococcus sp</i>	36
Figura 5-7. Morfología de <i>Rhodococcus sp</i> . amplificada a 2,500X.....	37
Figura 5-8. Morfología de <i>Rhodococcus sp</i> . amplificada a 5,000X.....	37
Figura 5-9. <i>Rhodococcus sp</i> . en un medio de cultivo sólido de ácido tereftálico a una concentración de 5 g/L.....	39
Figura 5-10. Curva de calibración entre la densidad óptica y peso constante de cinéticas de biodegradación y crecimiento celular a distintas concentraciones de sustrato	40
Figura 5-11. Cinéticas de crecimiento celular a distintos pHs	41
Figura 5-12. Velocidad específica de crecimiento celular a distintos pHs	41
Figura 5-13. Cinéticas de crecimiento celular a distintas velocidades de agitación.....	42
Figura 5-14. Velocidad específica de crecimiento celular a distintas agitaciones.....	43
Figura 5-15. Electroferograma típico correspondiente al ácido tereftálico.....	44
Figura 5-16. Curva de calibración para cuantificar la biodegradación de AT.....	45
Figura 5-17. Velocidades específicas de crecimiento celular a distintas concentraciones de sustrato	46
Figura 5-18. Comparación de las velocidades específicas de crecimiento experimentales y modeladas vs concentración de sustrato.....	47
Figura 5-19. Cinética de biodegradación de AT y crecimiento celular a 3 g/L de sustrato inicial	48
Figura 5-20. Cinética de biodegradación de AT y crecimiento celular a 4 g/L de sustrato inicial	49

Figura 5-21. Cinética de biodegradación de AT y crecimiento celular a 5.035 g/L de sustrato inicial	50
Figura 5-22. Cinética de biodegradación de AT y crecimiento celular a 7.1 g/L de sustrato inicial...	51
Figura 5-23. Cinética de biodegradación de AT y crecimiento celular a 9.7 g/L de sustrato inicial...	52
Figura 5-24. Cinética de biodegradación de AT y crecimiento celular a 14.5 g/L de sustrato inicial.	53
Figura 5-25. Coloración formada por algún tipo de pigmento caroteinado en las cinéticas de biodegradación y crecimiento celular a distintas concentraciones de sustrato	54
Figura 5-26. Rendimiento celular experimental en las cinéticas de biodegradación a distintas concentraciones de sustrato	54

Índice de Tablas

Tabla 1-1. Propiedades físicas y químicas del ácido tereftálico	3
Tabla 1-2. Valores de producción, importación y exportación de ftalatos y sus precursores.....	5
Tabla 1-3. Ejemplos representativos de bacterias anaerobias degradando isómeros ftálicos y sus ésteres	10
Tabla 1-4. Ejemplos representativos de bacterias aerobias degradando isómeros ftálicos y sus ésteres	12
Tabla 1-5. Biodegradación de isómeros ftálicos y sus ésteres por medio de microorganismos aerobios	15
Tabla 4-1. Reactivos y concentraciones finales para la amplificación de la región 16S rDNA	21
Tabla 4-2. Iniciadores utilizados para la amplificación por PCR de la región 16S rDNA	22
Tabla 4-3. Reactivos y concentraciones necesarias para la preparación de medio de cultivo sólido de AT con una concentración de 5 g/L.....	24
Tabla 4-4. Condiciones del capilar, de operación y de la solución electrolítica para llevar a cabo una buena separación.....	26
Tabla 5-1. Identificación molecular de los microorganismos aerobios degradadores de ácido tereftálico por la similitud de la región 16S rDNA.....	34
Tabla 5-2. Resultados de crecimiento de los microorganismos <i>Arthrobacter sp.</i> y <i>Rhodococcus sp.</i>	38
Tabla 5-3. Parámetros cinéticos obtenidos de la ecuación de Andrews	47
Tabla 5-4. Concentraciones de las moléculas que participan en la reacción	55
Tabla 5-5. Biomasa generada y rendimientos experimentales vs teóricos	56
Tabla 5-6. Caracterización molecular del microorganismo al finalizar las cinéticas de biodegradación y crecimiento celular.....	57

1. INTRODUCCIÓN

Los isómeros ftálicos: ácido ftálico, ácido isoftálico y ácido tereftálico (AT) han sido usados desde las últimas 7 u 8 décadas como plastificadores (Latini, 2005). Estos isómeros tienen una baja solubilidad en agua pero un alto coeficiente de partición octanol/agua, la hidrofobicidad aumenta con el incremento de longitud de la cadena alquilo (Autian, 1973; Chang *et al.*, 2004; Latini, 2005). Debido a sus propiedades como una alta estabilidad química, flexibilidad, fácil fabricación y un bajo costo de producción, los isómeros ftálicos han sido usados con distintas formulaciones químicas (Vamsee-Krishna y Phale, 2008). Fueron sintetizados por vez primera en la década de 1920, no obstante, su venta a gran escala se dio hasta 1950 con la aparición de la industria del cloruro de polivinilo (PVC por sus siglas en inglés) (Fernández, 2004). Los ésteres de los isómeros ftálicos presentan un uso muy difundido entre distintos productos, por ejemplo: pinturas, materiales de construcción, empaques, plásticos, etc. (Fernández, 2004; Thiruvengkatachari *et al.*, 2007; Vamsee-Krishna y Phale, 2008)

Un incremento de 2 a 14.4 millones de toneladas en la producción de los ésteres ftálicos durante el periodo que va del año 1980 al año 2007, ilustra el aumento significativo en su producción (Vamsee-Krishna y Phale, 2008). El dimetil tereftalato y el AT encabezaron la lista de los 50 productos más producidos a nivel mundial en el año 2006 (Li y Gu, 2006) de modo que estos isómeros y sus ésteres son liberados y detectados en distintos ambientes, incluyendo el aire, suelos, y aguas naturales como resultado de su enorme producción y aplicaciones extensivas; por lo que merecen la descripción de contaminantes ambientales ubicuos (Thiruvengkatachari *et al.*, 2007).

De esta manera, las preocupaciones que conllevan al impacto ambiental y daños a la salud, han suscitado distintas líneas de estudio para la degradación de estos compuestos xenobióticos.

Aunque existen tratamientos químicos para su degradación, como por ejemplo procesos de oxidación avanzada (Thiruvengkatachari *et al.*, 2007), también existen procesos biológicos, en donde diversos estudios han demostrado que los microorganismos pueden ser muy eficientes en la degradación de los ftalatos en el medio ambiente bajo distintas condiciones (Vamsee-Krishna y Phale, 2008).

Es por esto que en este capítulo se darán a conocer algunas generalidades del AT, así como antecedentes sobre la degradación biológica del mismo.

1.1. Ácido tereftálico, sus propiedades y su producción

El AT es un compuesto orgánico con fórmula $C_6H_4(CO_2H)_2$. Su aplicación más fuerte es para la producción de tereftalato de polietileno (PET por sus siglas en inglés), por lo que ha experimentado el mismo crecimiento en la producción en estas últimas dos décadas que las fibras y láminas obtenidas de PET (Speight, 2002; Weissermel y Arpe, 2003).

La molécula de AT deriva, tanto estructuralmente como en la práctica (obtención industrial con más aplicación) de una molécula de p-xileno, el cual es sometido a un proceso de oxidación de los grupos $-CH_3$ (Figura 1-1).

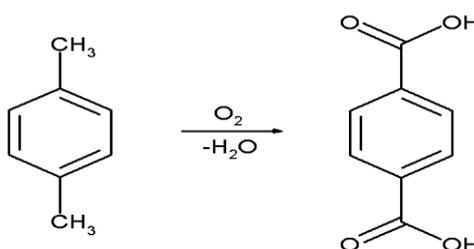
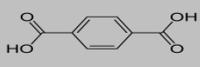


Figura 1-1. Síntesis química del ácido tereftálico a partir del p-xileno

El AT es un sólido blanco y cristalino, sus grupos carboxilos permiten formar puentes de hidrógeno y unir moléculas circundantes, esto genera que sea sólido a temperatura ambiente. Su propiedad químicamente importante es el carácter ácido de sus dos radicales, por lo que puede formar enlaces éster en cada extremo (Atkins, 2003). Cristaliza en agujas incoloras que subliman alrededor de los 300°C (573 °K), no forma anhídridos y es difícilmente soluble en agua y en los disolventes orgánicos (Beyer y Walter, 1997).

En la Tabla 1-1 se presentan algunas propiedades físicas y químicas del ácido tereftálico, siendo la solubilidad uno de los factores más importantes para los procesos de degradación (Speight, 2002; Weissermel y Arpe, 2003).

Tabla 1-1. Propiedades físicas y químicas del ácido tereftálico

Propiedades Físicas y Químicas	Ácido Tereftálico
Estructura Química	
Otros Nombres	Ácido p-benzenodicarboxílico Ácido 1,4-benzenodicarboxílico
PM (g/mol)	166.13
Estado Físico (Aspecto)	Polvo cristalino, blanco
Punto de Sublimación, °C	402
Densidad, g/cm ³	1.522
Punto de Inflamación, °C	260
Solubilidad en agua, g/L a 20°C	2.8
Acidez, pK _a a 25°C	pK _a 1 = 3.54 pK _a 2 = 4.46

El AT fue por primera vez fabricado a escala comercial en Inglaterra por la Imperial Chemical Industries (ICI) en 1949 y en los Estados Unidos por Dupont en 1953 por procesos antiguos de oxidación de p-xileno con HNO_3 , hoy en día estos procesos no tienen importancia industrial por la dificultad para purificar el AT que contiene impurezas nitrogenadas (Weissermel y Arpe, 2003).

En la actualidad, a escala industrial se fabrica principalmente a partir de la oxidación del p-xileno (Figura 1-1). La oxidación se realiza con ácido acético como disolvente y un catalizador compuesto de sales de cobalto y manganeso. La impureza más común es el ácido 4-formilbenzoico, que se elimina mediante la hidrogenación de una solución acuosa caliente. La solución se enfría de manera gradual para cristalizar el ácido tereftálico de alta pureza. (Emerson *et al.*, 1949; Gee *et al.*, 1993; Kingsley *et al.*, 1994).

Como alternativa, pero no de importancia comercial, es el llamado "proceso de Henkel" o "proceso de Raecke" (Figura 1-2), el nombre de la empresa y titular de la patente respectivamente. Este proceso implica la isomerización térmica del ftalato de dipotasio a 20 atm y 400°C (673 °K), en dióxido de carbono como gas protector y con catalizador de Zn/Cd teniendo un rendimiento del 95% (Beyer y Walter, 1997).

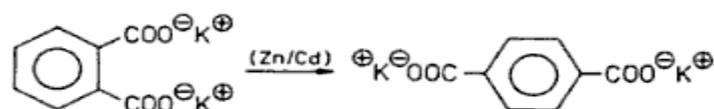


Figura 1-2. Proceso Henkel para la producción de ácido tereftálico

El ácido tereftálico también puede obtenerse, no de importancia industrial, por medio de carboxilación del ácido benzoico a 340°C (613 K) y 300 atm en presencia de hidrogenocarbonato de potasio (Figura 1-3), según el principio de la síntesis del Kolbe-Schmitt, con un rendimiento del 60% (Beyer y Walter, 1997).

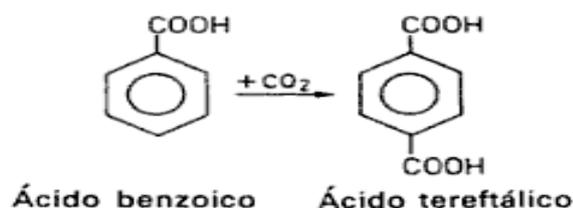


Figura 1-3. Proceso de carboxilación del ácido benzoico para la producción de ácido tereftálico

De acuerdo con el Anuario Estadístico de la industria petroquímica de la Secretaría de Energía (SENER), en México existen numerosas empresas que producen o utilizan los ftalatos o sus precursores (ácido ftálico, ácido isoftálico y ácido tereftálico). Los datos de producción, importación y exportación del ácido tereftálico en comparación con el anhídrido ftálico, ácido isoftálico y el dimetil tereftalato se resumen en la Tabla 1-2, la cual indica que se producen más toneladas anuales de ácido tereftálico desde año 2002, aproximadamente un millón, siendo el 70% del volumen total para mercado nacional y el 30% restante para la exportación. (Fernández, 2004; INEGI, 2011; SENER, 2008)

Tabla 1-2. Valores de producción, importación y exportación de ftalatos y sus precursores

Capacidad instalada para la producción de petroquímicos intermedios por productos seleccionados.						
(Toneladas)						
Compuesto	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Ácido tereftálico	1,510,000	1,510,000	1,510,000	1,510,000	1,560,000	2,070,000
Anhídrido ftálico	78,000	78,000	79,000	79,000	79,000	84,600
Dimetil tereftalato	460,000	460,000	460,000	460,000	460,000	460,000
Volumen de la producción de petroquímicos intermedios por productos seleccionados.						
(Toneladas)						
Compuesto	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Ácido tereftálico	1,234,213	1,001,050	1,001,050	988,800	1,000,000	1,365,000
Anhídrido ftálico	61,900	57,646	64,028	68,938	65,458	69,635
Dimetil tereftalato	259,117	274,600	274,600	175,000	0	0
Valor de la producción de petroquímicos intermedios por productos seleccionados.						
(Miles de pesos)						
Compuesto	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Ácido tereftálico	4,853,832	5,600,000	5,600,000	9,891,000	11,500,000	16,240,000
Anhídrido ftálico	381,753	462,918	658,667	732,763	745,943	859,457
Dimetil tereftalato	1,160,912	1,714,000	1,714,000	1,570,000	0	0
Volumen de las exportaciones de petroquímicos intermedios por productos seleccionados.						
(Toneladas)						
Compuesto	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Ácido tereftálico	315,877	336,298	315,690	324,321	189,078	399,415
Anhídrido ftálico	9,092	9,613	12,487	12,828	13,354	13,041
Dimetil tereftalato	185,971	184,285	159,750	164,118	122,487	85,383
Volumen de las importaciones de petroquímicos intermedios por productos seleccionados.						
(Toneladas)						
Compuesto	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Ácido tereftálico	416	74,454	120,321	137,147	2,873	10,880
Anhídrido ftálico	2,159	2,751	1,679	1,914	117	391
Dimetil tereftalato	0	0	NS	0	0	12,591
Ácido isoftálico	11,973	15,086	19,397	22,110	21,749	23,934

Fuente: INEGI 2011; SENER 2010

Actualmente, en México existe una de las compañías más importantes a nivel mundial que se encargan de la producción de ácido tereftálico, Alpek, que cuenta con una capacidad de producción de 1 millón de toneladas al año. Abastece el mercado nacional y de exportación a Sudamérica, Asia, Europa y Estados Unidos. Alpek es el más grande negocio petroquímico privado de México y uno de los más importantes en Norteamérica. Los negocios de producción de ácido tereftálico puro (PTA por sus siglas en inglés) y PET representan el 75% de los ingresos de esta compañía (ALFA, 2011).

1.2. Exposición y efectos tóxicos

1.2.1. En humanos

La exposición humana a los isómeros ftálicos y/o sus esteres puede ocurrir a través de la ingestión de agua o alimentos contaminados, la inhalación de aire contaminado o por el contacto dérmico con productos de plástico que los contengan (Fernández, 2004).

El ácido tereftálico es un compuesto tóxico peligroso debido a que presenta propiedades teratogénicas, mutagénicas, carcinogénicas (Den Hond y Schoeters, 2006; Dillingham y Autian, 1973; Gesler, 1973; Ito *et al.*, 2005; Koch *et al.*, 2003; Lerda, 1998; Thiruvengkatachari *et al.*, 2007; Vamsee-Krishna y Phale, 2008).

Los ftalatos inducen malformaciones en el sistema reproductivo causando hipospadias y criptorquidia. Estos compuestos han sido detectados en fluidos corporales y son conocidos por inducir la formación de piedras en la vejiga, irritación en la piel y ojos, y daños en el sistema respiratorio (Dai *et al.*, 2005; Gray *et al.*, 2000; Grifoll *et al.*, 1994; Heck y Tyl, 1985; Jaeger y Rubin, 1970; Li *et al.*, 1998; Pan *et al.*, 2006; Vamsee-Krishna y Phale, 2008; Wang y Gu, 2006; Zhu *et al.*, 2006).

Hasta el momento no existen informes que describan casos de muerte de personas por exposición directa a los isómeros ftálicos y a sus ésteres; sin embargo, ciertos efectos tóxicos sistémicos, reproductivos y durante el desarrollo fetal han sido documentados (Fernández, 2004).

1.2.2. En animales de laboratorio

En comparación con los humanos, los estudios de los efectos tóxicos de los isómeros ftálicos y sus esteres en animales de experimentación son numerosos, sin embargo, la mayoría de ellos están enfocados a evaluar la toxicidad hepática, reproductiva y durante el desarrollo embrionario y fetal. Además, una gran proporción de ellos se ha realizado en roedores, particularmente en rata y ratón, siendo escasas las investigaciones en otras especies (Fernández, 2004). Las evidencias de hepatotoxicidad incluyen: aumento del peso del hígado (hiperplasia e hipertrofia) (Brown *et al.*, 1978; Marsman, 1995), cambios morfológicos (aparición grasosa, cambios ultra estructurales en los ductos biliares, pigmentación o palidez) (Mann *et al.*, 1985; Muhlenkamp y Gill, 1998), inflamación crónica, necrosis, proliferación de peroxisomas, inducción de la actividad de las enzimas de los peroxisomas y de las monooxigenasas de función mixta (Murakami *et al.*, 1986; Walseth *et al.*, 1982), aumento del catabolismo de lípidos (triacilglicéridos, colesterol) y

carbohidratos, disminución de la síntesis de esteroides (Gerbracht *et al.*, 1990; Poon *et al.*, 1997) y alteraciones de las proteínas y lípidos de membrana (Bartles *et al.*, 1990). Los efectos tóxicos reproductivos identificados también son numerosos, en machos incluyen: disminución del peso de los órganos reproductivos (testículos, vesículas seminales, epidídimo y próstata) (Lamb *et al.*, 1987), infertilidad, atrofia testicular e inhibición de la espermatogénesis (Ganning *et al.*, 1990; Gray *et al.*, 1999), daños en las células de sertoli y efectos anti-androgénicos (feminizantes) (Chapin *et al.*, 1988). Por su parte, en hembras se ha observado: disminución en los niveles de estradiol y anovulación (Davis *et al.*, 1994), disminución en el índice de cruzamiento y fertilidad (Marsman, 1995). Asimismo, cuando los animales son expuestos durante el embarazo o el periodo de lactancia, los efectos encontrados son: aumento de las reabsorciones, pérdidas post-implantación, abortos tardíos, muerte fetal, disminución del peso corporal de los fetos, malformaciones externas, entre otras (Gray *et al.*, 1999; Lamb *et al.*, 1987; Marsman, 1995; Ritter *et al.*, 1987). Aunque menos estudiados, existen datos de efectos en otros órganos, tales como: disminución en la ganancia de peso corporal (Kawano, 1980; Lamb *et al.*, 1987; Muhlenkamp y Gill, 1998), aumento en el peso de diferentes órganos (riñones, corazón, estómago e intestinos, glándulas adrenales, hipófisis, tiroides, cerebro, pulmones y bazo) (BIBRA, 1986; Brown *et al.*, 1978; Kawano, 1980; Morrissey *et al.*, 1989; Murakami *et al.*, 1986; Poon *et al.*, 1997), nefropatía y lesiones en riñón y páncreas (Rao *et al.*, 1990), alteraciones en los niveles de eritrocitos y hemoglobina (Brown *et al.*, 1978; Poon *et al.*, 1997; Schilling *et al.*, 1992).

1.3. Legislación nacional e internacional sobre el ácido tereftálico

En México, la norma oficial mexicana NOM- 052-SEMARNAT-1993 que establece las características de los residuos peligrosos y el listado de los mismos y los límites que hacen a un residuo peligroso por su toxicidad al ambiente, considera que el AT es un residuo peligroso, sin embargo las normas NOM-001-SEMARNAT-1996, NOM-002-SEMARNAT-1996, NOM-003-SEMARNAT-1997, que regulan las cantidades máximas permisibles de un residuo en aguas nacionales, de alcantarillado o aguas tratadas, no mencionan la cantidad de AT que debe de haber en este tipo de aguas.

Por otro lado, la legislación que concierne a la secretaría del trabajo y previsión social, en su Norma Oficial Mexicana NOM-010-STPS-1999 que indica las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo en donde se manejen, transporten, procesen o almacenen sustancias químicas capaces de generar contaminación en el medio ambiente laboral, tampoco presenta límites

permisibles referidos al AT, aunque se sabe que no debe almacenarse con oxidantes fuertes ya que si hay exposición entre estas sustancias el AT podría reaccionar violentamente.

En cuanto a transportación, la NOM-002-SCT-2003 que indica las sustancias y materiales peligrosos más usualmente transportados no hace referencia al AT.

Dentro de la legislación internacional, el AT ha sido añadido a la lista de contaminantes de prioridad por la Agencia de Protección Ambiental en Estados Unidos (US EPA) ya que puede interferir con el sistema reproductivo alterando el buen desarrollo embrionario de animales y humanos (Thiruvengkatachari *et al.*, 2007).

1.4. Tecnologías existentes para la degradación de ácido tereftálico

1.4.1. Tratamientos químicos

En los últimos años se han estudiado procesos químicos para la degradación del ácido tereftálico (Shafaei *et al.*, 2010; Thiruvengkatachari *et al.*, 2007). Se han desarrollado procesos de oxidación avanzada con ciertos compuestos de alto poder oxidante, que son capaces de destruir moléculas no biodegradables, descomponiéndolas totalmente en CO₂ y H₂O o transformándolos en otros compuestos menos peligrosos. La oxidación avanzada del agua residual se realiza con alguno de los siguientes oxidantes: ozono, peróxido de hidrógeno H₂O₂, una combinación de O₃ y radiación UV, una combinación de O₃ radiación UV y H₂O₂ y a altas presiones y temperaturas (oxidación húmeda) (Palomares *et al.*, 1998). En investigaciones recientes se ha detallado la oxidación fotocatalítica del AT utilizando TiO₂, los resultados de esta investigación demuestran que los procesos de oxidación fotocatalítica con TiO₂ son efectivos en la degradación de PTA (Shafaei *et al.*, 2010). Aunque estas técnicas son rápidas, tienen costos muy elevados disminuyendo así su eficiencia y productividad para la industria.

1.4.2. Tratamientos biológicos

La biorremediación es el uso de microorganismos para degradar contaminantes del medio ambiente. Las técnicas de biorremediación dependen de tener los microorganismos adecuados en el lugar correcto y con las condiciones ambientales necesarias para que ocurra. Los factores ambientales como la temperatura, nutrientes inorgánicos (principalmente nitrógeno y fósforo),

aceptores de electrones (oxígeno, nitratos, sulfatos) y el pH pueden ser modificados para optimizar el medio ambiente que propicie una buena remediación (Liss y Baker, 1994).

Los procesos biológicos de degradación pueden ser de 4 tipos: aerobios, anaerobios, anóxicos y facultativos. Los procesos aerobios son los que requieren oxígeno disuelto; en cambio, en los anaerobios hay ausencia de éste. Los anóxicos se llevan a cabo en presencia de oxígeno combinado con NO_3^- , SO_4^{2-} , etc. En los procesos facultativos existen poblaciones mixtas, además de que intervienen microorganismos, denominados facultativos, que son indiferentes a la presencia o ausencia de oxígeno (Jiménez, 2002).

Para degradar isómeros posicionales, en este caso el AT, los microorganismos han adaptado nuevas rutas metabólicas. La degradación por bacterias es eficiente ya que dichos componentes son totalmente biotransformados o mineralizados, la degradación puede llevarse a cabo por rutas anaerobias y rutas aerobias de acuerdo al tipo de metabolismo de los microorganismos (Vamsee-Krishna y Phale, 2008).

Muchos géneros de bacterias han sido reportados para degradar ésteres ftálicos como única fuente de carbono, mientras que algunos géneros como *Rhodococcus rhodochrous* y *Closterium lunula* necesitan la adición externa de un hexadecano para eficientar la degradación (Nalli *et al.*, 2002; Yan y Pan, 2004).

1.4.2.1 Degradación anaerobia del ácido tereftálico

La degradación anaerobia de los isómeros posicionales y sus ésteres se ha llevado a cabo principalmente por consorcios metanogénicos (Tabla 1-3) (Vamsee-Krishna y Phale, 2008). Estos consorcios degradan los isómeros ftálicos y sus ésteres produciendo acetato y metano como productos finales (Chang *et al.*, 2005; Ejlertsson y Svensson, 1996; Kleerebezem *et al.*, 1999a; Kleerebezem *et al.*, 1999b; Liss y Baker, 1994; Qiu *et al.*, 2004). Las bacterias metanogénicas son anaerobias estrictas que requieren para su desarrollo potenciales REDOX muy bajos (-300 mv), son muy susceptibles al oxígeno molecular y al pH y son inhibidas por los ácidos volátiles no ionizados (Mejía, 1996).

Las ventajas de los procesos anaerobios son la baja producción de lodos y la eficiencia en la producción de gas metano, que puede utilizarse como fuente de energía para calefacción en el lugar o para generar electricidad (Siles *et al.*, 2008).

Los procesos anaerobios tienen varias desventajas ya que son menos estables biológicamente además de que el crecimiento de las bacterias es mucho más lento (Mejía, 1996), otra de las desventajas de estos procesos en relación con los procesos aerobios es que los efluentes tratados en forma anaerobia pueden requerir un post-tratamiento ya que conservan aun cierto contenido de materia orgánica y no contienen oxígeno disuelto (Liss y Baker, 1994). La necesidad de realizar el post-tratamiento estará determinada por las condiciones particulares de la empresa o municipio, en la mayoría de los casos, el post-tratamiento será aerobio.

Tabla 1-3. Ejemplos representativos de bacterias anaerobias degradando isómeros ftálicos y sus ésteres

<i>Organismo</i>	<i>Compuesto metabolizado</i>	<i>Metabolitos intermediarios</i>
<i>Pelotomaculum terephthalicum</i> , <i>Pelotomaculum isophthalicum</i>	Isoftalato, ftalato y Tereftalato	Benzoato, acetato, metano
<i>Pseudomonas sp</i> , P136	Isómeros ftálicos	CoA ésteres de ftalato, benzoato, ciclohex-1-ene-carboxilato, 2- oxociclohexano carboxilato, pimelato, acetato, benzoato, acetato.
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> , <i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> , <i>Desulfotomaculum thermobenzoyicum</i> , <i>Desulfotomaculum nigrificans</i> , <i>Desulfotomaculum thermosapovorans</i> , <i>Syntrophobacter fumaroxidans</i> , <i>Syntrophus gentianae</i> , <i>Methanospirillum hungateid</i> , <i>Methanosaeta concilii</i> .	Isómeros ftálicos	Benzoato, acetato
Microorganismo no caracterizado en lodos	Benzoato, isómeros ftálicos, dimetil ftalato, dimetil tereftalato	Monometil Tereftalato, Tereftalato, monometil ftalato, ftalato, ésteres de CoA
Microorganismo no caracterizado en lodos	Di-n-butil ftalato, dietil ftalato, dimetil ftalato, butilbenzil ftalato	Monofthalato ester, metano, ftalato, Benzoato
Microorganismo no caracterizado en lodos	Dimetil ftalato, di-n-butil ftalato, di-n-octil ftalato	Metano

La degradación de isómeros ftálicos por consorcios metanogénicos (Tabla 1-3) siguen una ruta metabólica la cual llega hasta entrar a la ruta de β -oxidación (Vamsee-Krishna y Phale, 2008).

1.4.2.2 Degradación aerobia del ácido tereftálico

En presencia de oxígeno suficiente y otros nutrientes elementales, los microorganismos degradarán los contaminantes orgánicos hasta convertirlos finalmente en CO₂, H₂O, y nueva biomasa celular. Este tipo de biodegradación emplea en forma de oxígeno el 65% de la energía del sustrato en la síntesis de nuevas células, mientras que la fracción restante será utilizada para llevar a cabo esas y otras funciones metabólicas que finalmente será disipada en forma de calor. Esta distribución energética del sustrato se refleja en los lodos (células) (Bolívar, 2007) producidos los cuales repercuten en la disposición de los lodos de purga (Droste, 1997).

Durante la degradación aerobia de la materia orgánica, el crecimiento de los microorganismos aerobios es más rápido, esto incide positivamente en un menor tiempo necesario para la puesta en marcha de los sistemas o en la recuperación de la eficacia en caso de sobrecargas, entrada de tóxicos, etc. (Méndez *et al.*, 2007).

De forma general, la ruta catabólica aerobia de un compuesto aromático implica la acción de mono- y dioxigenasas que lo transforman en un fenol dihidrico. El número de este tipo de moléculas es relativamente pequeño en comparación con la amplia variedad de sustratos susceptible de ser degradados. Se trata, por tanto, de vías catabólicas convergentes. Entre los intermediarios a los que convergen tales vías, hay que considerar tres como las más frecuentes: el catecol, el protocatecuato y el gentisato (Figura 1-4) (Parés y Juárez, 1997).

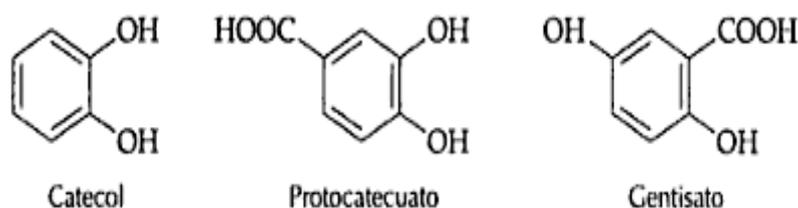


Figura 1-4. Compuestos intermediarios principales en la biodegradación de compuestos aromáticos

Evans, en 1955, fue el primero en reportar la degradación aerobia de los isómeros ftálicos por bacterias (Evans, 1955). Numerosos microorganismos aerobios son los encargados de biodegradar estos compuestos (Tabla 1-4) (Vamsee-Krishna y Phale, 2008). Estos microorganismos aerobios mesofílicos suelen crecer a pHs cercanos a la neutralidad, entre 6 - 8 y temperaturas óptimas de crecimiento intermedias, normalmente entre 20°C y 45°C (Chang *et al.*, 2004; Chang y

Zylstra, 1998; Chatterjee y Dutta, 2003; Choi *et al.*, 2005; Eaton, 2001; Eaton y Ribbons, 1982; Li y Gu, 2006; Patil *et al.*, 2006; Quan *et al.*, 2005; Stingley *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2003; Wang y Gu, 2006; Wang *et al.*, 1995; Yan y Pan, 2004). La presencia de ftalatos en el medio induce proteínas que están involucradas en su transporte y degradación (Choi *et al.*, 2005; Eaton y Ribbons, 1982; Hara *et al.*, 2007; Sasoh *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 1995).

Tabla 1-4. Ejemplos representativos de bacterias aerobias degradando isómeros ftálicos y sus ésteres

Organismo	Compuesto metabolizado	Metabolitos intermediarios
<i>Pseudomonas aureofaciens</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Sphingomonas paucimobilis</i> , <i>Xanthomonas maltophilia</i>	Ftalato y dimetil ftalato	Monometil ftalato
<i>Rhodococcus sp. Strain DK17</i>	Ftalato, tereftalato	3,4-dihidroxitfalato 3,4-dihidroxibenzoato
<i>Gordonia sp. Strain MTCC 4818</i>	Butilbenzil ftalato, Di-n-butil ftalato, Diisobutil ftalato, Difenil ftalato	Mono-n-butil ftalato, monobenzil ftalato
<i>Shingomonas sp. DK 4</i> , <i>Corynebacterium sp O18</i>	Di-(2- etilhexil)ftalato Di-n-butilftalato, Dietilftalato, Dipropilftalato, Difenilftalato, Dihexilftalato, Benzilbutilftalato, Diclohexilftalato	Ftalato
<i>Shingomonas yanoikuyae DOS01</i> , <i>Variovorax Paradoxus T4</i>	Dimetil tereftalato	Monometil Tereftalato, tereftalato
<i>Closterium lúnula</i>	Dimetil ftalato	Ftalato
<i>Pasteurella multocida Sa.</i>	Dimetil tereftalato	Monometil Tereftalato, monoetil Tereftalato, tereftalato
<i>Delftia sp. TBKNP-05</i>	Di-n-butilftalato	Monobutil ftalato, ftalato, 4,5-dihidroxitfalato, 3,4-dihidroxibenzoato
<i>Arthrobacter keyseri 12B</i>	Dibutil ftalato, ftalato	Ftalato, 3,4-dihidroxitfalato, 3,4-dihidroxibenzoato
<i>Bacillus subtilis No.66</i>	Di-2-etilhexil ftalato, Dibutil ftalato	Monobutil ftalato, mono-2-etil ftalato, 3,4-dihidroxibenzoato
<i>Comamonas testosteroni YZW-D</i>	Isoftalato, Tereftalato	3,4-dihidroxibenzoato
<i>Mycobacterium vanbaalenii PYR 1</i>	Ftalato	3,4-dihidroxitfalato 3,4-dihidroxibenzoato
<i>Moraxella sp. VG45</i>	Ftalato	4,5-dihidroxitfalato 3,4-dihidroxibenzoato
<i>Micrococcus sp. 12B</i>	Dibutilftalato, ftalato	Monobutil ftalato, ftalato, 3,4-dihidroxitfalato, 3,4-dihidroxibenzoato
<i>Burkholderia cepacia DBO1</i>	Ftalato	4,5-dihidroxitfalato 3,4-dihidroxibenzoato

De los estudios metabólicos identificados como perfil de crecimiento microbiano en los procesos aerobios, inducción de las enzimas, del consumo de oxígeno de las células, etc, se ha podido elucidar la ruta metabólica completa de los isómeros ftálicos y sus ésteres (Nomura *et al.*, 1989; Vamsee-Krishna *et al.*, 2006; Vamsee-Krishna y Phale, 2008; Wang *et al.*, 1995; Yan y Pan, 2004).

Todos los isómeros ftálicos tienen en su ruta metabólica al compuesto 3,4-dihidroxi benzoato como un intermediario central, en este punto pueden participar las enzimas protocatecuato 4,5-dioxigenasa (referido como extradiol, vía meta) ó la enzima protocatecuato 3,4-dioxigenasa (referido como intradiol, vía orto). La protocatecuato 4,5-dioxigenasa cataliza la conversión del compuesto 3,4-dihidroxi benzoato al compuesto semialdehído 4-carboxi-2-hidroxi-mucónico que es posteriormente oxidado a piruvato y oxalacetato a través de 4-oxalocitramalato (Eaton, 2001; Eaton y Ribbons, 1982). La protocatecuato 3,4-dioxigenasa cataliza el compuesto 3,4-dihidroxi benzoato para producir β -carboxi-cis,cis- ácido mucónico (Vamsee-Krishna *et al.*, 2006), que posteriormente es oxidado a succinato y acetyl-CoA a través de β -keto adipato (Zylstra *et al.*, 1989a; Zylstra *et al.*, 1989b).

1.5. Biodegradación de isómeros ftálicos y sus ésteres en sistemas aerobios

Existen proyectos de investigación que evalúan la actividad enzimática en los procesos de biodegradación de isómeros ftálicos y sus ésteres con microorganismos aerobios, pero son escasos los que evalúan parámetros cinéticos de estos compuestos (Tabla 1-5). *Dietzia sp.* cepa GS-1 metabolizó tereftalato di sódico (TD) a través de la molécula protocatecuato, esta cepa fue capaz de degradar TD a una concentración de 8000 mg/L a distintos valores de pH (de 8 a 10), siendo el más eficiente un pH de 8, la temperatura de biodegradación fue de 28°C (Sugimori y Sekiguchi, 2002).

Por otro lado, *Rhodococcus sp.* L4 degradó distintas concentraciones de ésteres del ácido ftálico (PAEs) como dimetil ftalato, dietil ftalato y di-n- butil ftalato a concentraciones de (150, 300, 450 y 600 mg/L) a pH 7-8 y temperaturas óptimas de 30 a 37°C, este microorganismo también fue capaz de degradar fenol, benzoato de sodio y naftaleno como única fuente de carbono y energía (Lu *et al.*, 2009).

La cepa *Delfia tsurubensis* sp. nov. fue capaz de degradar completamente tereftalato de sodio a una concentración de 3000 mg/L a un pH óptimo de 7 y una temperatura de 30°C en 12 horas (Shigematsu *et al.*, 2003).

Son pocos los microorganismos que han sido reportados en la degradación de ácido isoftálico y sus ésteres (Keyser *et al.*, 1976; Kimura y Ito, 2001; Vamsee-Krishna *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 1995), sin embargo hay degradación completa del dimetil isoftalato (DMI) con los microorganismos *Klebsiella oxytoca* Sc en cooperación con *Methylobacterium mesophilicum* Sr (Li y Gu, 2007). Por otra parte *Pseudomonas testosteroni* fue capaz de mineralizar dimetil isoftalato. El dimetil isoftalato fue transformado a isoftalato, seguido por el intermediario protocatecuato (Keyser *et al.*, 1976). En otro reporte, *Rhodococcus ruber* 1B y *Rhodococcus erythropolis* 5D degrada completamente DMI a bajas concentraciones en 168 horas (Aleshchenkova *et al.*, 1997).

Por otro lado, *Sphingomonas yanoikuyae* DOS01 sólo fue capaz de transformar el dimetil tereftalato (DMT) a monometil tereftalato (MMT) mientras que *Variovorax paradoxus* T4 demostró mineralizar el DMT como única fuente de carbono y energía degradando distintas concentraciones de DMT, MMT y AT (Wang y Gu, 2006).

Por su parte, *Comamonas acidovorans* tiene la habilidad de utilizar ácido ftálico como única fuente de carbono (Wang *et al.*, 2003) mientras que en otro reporte este microorganismo aerobio biodegrada DMT a una concentración de 500 mg/L en 72 horas (Patel *et al.*, 1998).

A pesar de que existe investigación referida a la biodegradación aerobia de isómeros ftálicos y algunos de sus ésteres (Tabla 1-5), la información sigue siendo escasa, principalmente para demostrar la caracterización cinética y estequiométrica de procesos de biodegradación de AT en condiciones aerobias.

Tabla 1-5. Biodegradación de isómeros ftálicos y sus ésteres por medio de microorganismos aerobios

Microorganismo	Biodegradación (mg/L)	Referencia
<i>Fusarium sp</i>	30 DMI-DMT-MMT	Hua Luo et al., 2009
<i>Pasteurella multocida Sa</i>	98 DMT	Li et al., 2005
<i>Klebsiella oxytoca Sc</i>	100 DMI- MMI- AI	Li y Gu, 2007
<i>Methylobacterium mesophilicum Sr</i>	100 MMI	
<i>Variovorax paradoxus T</i>	30 DMT 152 MMT 155 AT	Wang y Gu, 2006
<i>Comamonas acidovorans D-4</i>	500 DMT	Patel et al., 1998
<i>Rhodococcus sp LA</i>	150-300-450-600 PAEs	Lu et al., 2009
<i>Delftia tsurubataensis sp. nov</i>	3000 AT	Shigematsu et al., 2003
<i>Dietzia sp. Strain GS-1</i>	8000 TD	Sugimore y Sekiguchi., 2002

Notas: Abreviaturas de la columna 2. DMI: Dimetil isoftalato.- DMT: Dimetil tereftalato.- MMT: Monometil tereftalato.- MMI: Monometil isoftalato.- AT: Ácido tereftálico.- TD: Tereftalato di sódico.- AI: Ácido isoftálico.- PAEs: Esteres del ácido ftálico.

2. JUSTIFICACIÓN

Debido a que el ácido tereftálico se acumula en el medio ambiente, a su creciente demanda en la industria química, al deterioro ambiental que genera y a los problemas de salud que produce, es necesario establecer las condiciones de pH, temperatura y velocidad de agitación que permitan una degradación eficiente y rápida del AT, a su vez también llevar a cabo una caracterización cinética y estequiométrica del proceso, para lo cual se propone la utilización de microorganismos aerobios por la alta eficiencia de remoción que presentan.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad de biodegradación del ácido tereftálico con dos microorganismos aerobios desconocidos.

3.2. Objetivos específicos

- Identificar mediante el gen 16S rDNA dos diferentes tipos de microorganismos capaces de degradar ácido tereftálico en condiciones aerobias.
- Determinar la máxima concentración de ácido tereftálico que los microorganismos puedan degradar.
- Caracterizar cinética y estequiométricamente el proceso de biodegradación de ácido tereftálico con los microorganismos identificados.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Plan de Trabajo

El plan de trabajo desarrollado en el presente estudio consistió de cinco etapas constituidas de 7 actividades, el cual se ilustra en la figura 4-1.

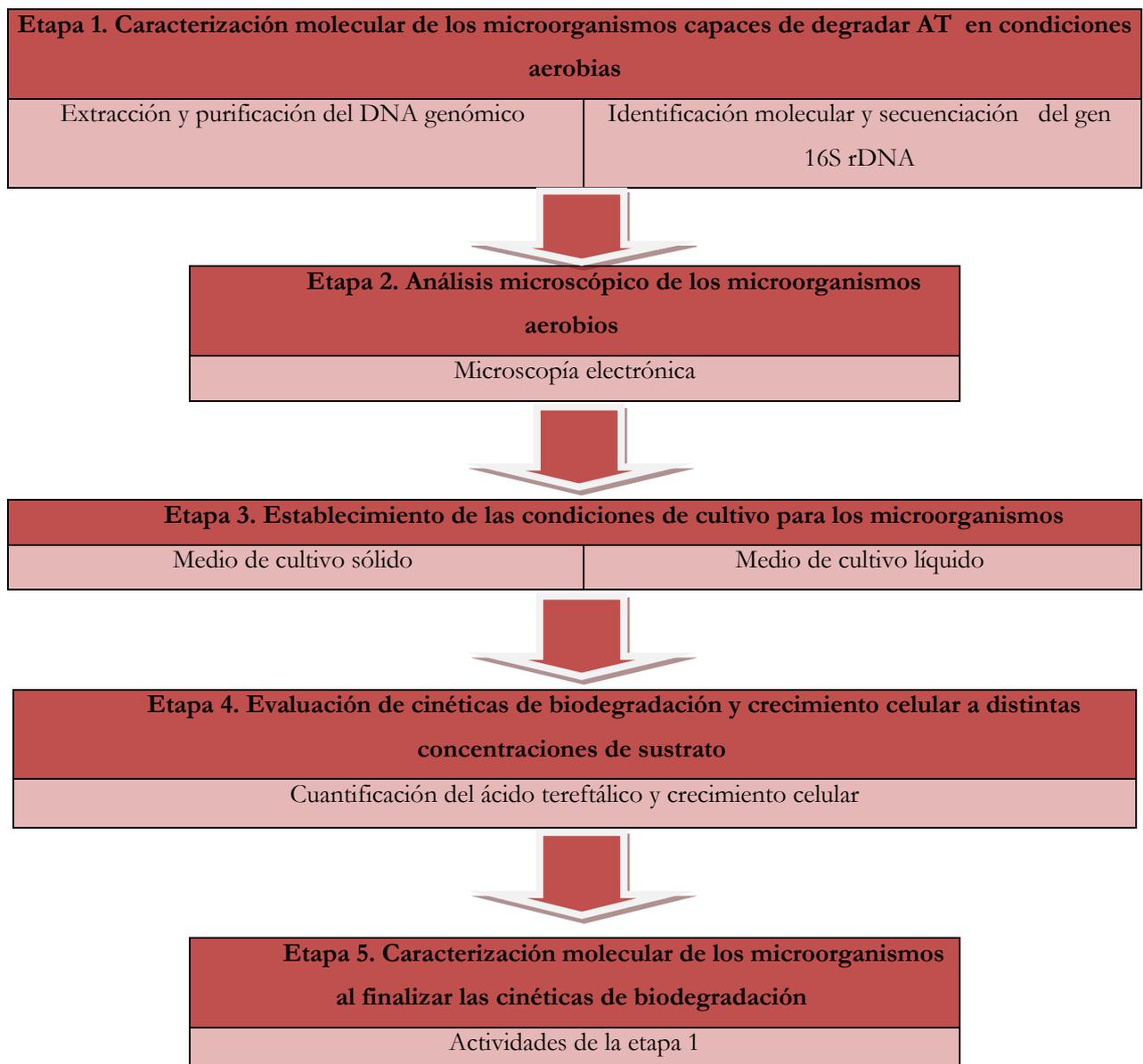


Figura 4-1. Diagrama de flujo del plan de trabajo experimental

A continuación se presentan los procedimientos para llevar a cabo las etapas y actividades que constituye la experimentación (Figura 4-1).

4.2. Procedimientos y métodos

4.2.1. Obtención de microorganismos aerobios degradadores de AT

Los microorganismos aerobios se obtuvieron de una mezcla compuesta que contenía un 15% de estiércol de vaca, burro y de borrego además un 15% de suelo y lixiviados de un tiradero a cielo abierto, estos microorganismos crecieron en un medio de cultivo líquido M1 (Zheng *et al.*, 2005) modificado con ácido tereftálico a 5 g/L como única fuente de carbono (Galindo y Garibay, 2005) los cuales crecieron en una incubadora orbital INO 650V-7 a 135 rpm y a una temperatura constante de 28°C. Posteriormente, se prepararon placas de medio de cultivo sólido que contenía el medio M1 modificado con AT a 5 g/L adicionándole agar-bacteriológico para obtener la consistencia sólida, a estas placas se le agregaron muestras diluidas de los matraces en agitación mencionados anteriormente, el aislamiento de los microorganismos se realizó mediante la técnica de aislamiento cuantitativo por varilla de vidrio y se incubaron a una temperatura de 28 y 37°C. Al crecer las colonias de microorganismos se obtuvieron los cultivos puros por estría cruzada sembradas en cajas de agar que contenían el mismo medio de cultivo M1 modificado con AT a la misma concentración, incubándolas a una temperatura de 28°C por presentar mayor crecimiento (Martínez, 2009).

Para fines del presente proyecto, se aislaron dos microorganismos aerobios desconocidos a los que se les llamó microorganismo tipo A y microorganismo tipo B creciendo en un medio de cultivo sólido de AT capaces de degradar 5 g/L de este sustrato como única fuente de carbono incubadas a una temperatura de 28°C.

4.2.2. Etapa 1. Caracterización molecular de los microorganismos capaces de degradar AT en condiciones aerobias

4.2.2.1 Extracción y purificación del DNA genómico

La extracción y purificación del DNA genómico se llevó a cabo utilizando el kit Charge Switch gDNA Mini bacteria perteneciente a invitrogen (Carlsbad, CA) el cual sigue una extracción eficiente de más de 12 µg de gDNA provenientes de 0.5 mL de bacterias Gram positivas o Gram negativas ó de colonias individuales extraídos de una placa de agar.

Para esta etapa, partiendo del crecimiento microbiano en placa de agar, se tomó una colonia por separado de los microorganismos desconocidos, cada uno se resuspendió en 100 µl de buffer de resuspensión (R4) con RNasa A y 5 µl de lisozima a una concentración de 50 mg/mL, se distribuyen las células por vortex, posteriormente se incubó la muestra por 10 minutos a 37°C, durante la incubación, se mezcló en otro tubo de centrifuga nuevo 500 µl de buffer de lisis (L14) con 10 µl de proteinasa K (5 mg/mL en 10 mM de TRIS-HCl, pH 8.5, 5 mM de $CaCl_2$, 50% de glicerol) el cual se adicionó (510 µl) al tubo de centrifuga que contenía el buffer de resuspensión, la lisozima y los microorganismos tipo A y B, se mezcló por inversión y se incubo a 80°C por 1.5 horas para bacterias Gram positivas y a 55°C por 10 minutos para bacterias Gram negativas. Después de la incubación de esta mezcla, se le adicionó 40 µl de las esferas magnéticas pipeteando suavemente sin formar burbujas, asimismo se le incorporó 300 µl del buffer de unión (B8) mezclando en vortex por 1 o 2 segundos, esta mezcla se llevó a incubación por 1 minuto a temperatura ambiente, posteriormente se colocó en el MagnaRack también perteneciente a invitrogen (Carlsbad, CA) hasta que se forme el paquete celular (pellet), una vez formado el pellet y sin remover el tubo de centrifuga del MagnaRack se desechó el sobrenadante. Una vez desechado este sobrenadante, se remueve el tubo que contiene el pellet con las esferas magnéticas que contienen el DNA del MagnaRack y se le adicionó 1 mL de buffer de lavado (W12) mezclando con pipeta sin formar burbujas, se colocó nuevamente el tubo en el MagnaRack hasta que se formó el pellet, este lavado de las esferas magnéticas se repitió 2 veces más. Después del tercer lavado, se removió el tubo que contiene las perlas magnéticas del MagnaRack y se le adicionó 200 µl de buffer de elución (E5; 10 mM de TRIS-HCl, pH 8.5) mezclando con pipeta sin formar burbujas, esta mezcla se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos el cual, para obtener un mejor rendimiento, se mezcló la muestra a los 2.5 minutos de incubación, pasado este tiempo, nuevamente se colocó el tubo de centrifuga en el MagnaRack hasta que se formó el pellet y sin remover el tubo se retiró el sobrenadante

(supernadante que contiene el DNA) para colocarlo en un tubo de centrifuga nuevo. Finalmente, la muestra de DNA se guardó a -20°C o se analizó por electroforesis en gel de agarosa.

4.2.2.2 Electroforesis en gel de agarosa

El DNA se separó por electroforesis en gel de agarosa al 0.7% en amortiguador Tris-borato-EDTA (1X: Tris-borato 0.45 M, EDTA 0.01 M, pH 8.3); como marcador de tamaño molecular se utilizó Hyperladder I de Bionline (Londres, UK) con una escalera de moléculas de DNA en múltiplos de 100 pares de bases (pb). Los ácidos nucleicos se tiñeron con rojo Texas a una concentración de 0.01 µl/mL, se visualizaron bajo luz ultravioleta y se fotografiaron y digitalizaron las imágenes en un equipo marca Kodak-MI (Sambrook y Russell, 2001).

4.2.2.3 Identificación molecular y secuenciación del gen 16S rDNA

Se amplificó la región 16S rDNA para su secuenciación por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). Los reactivos de la tabla 4-1 como buffer de amplificación, dNTPs, MgCl₂ y la enzima TAQ polimerasa provienen de invitrogen (Carlsbad, CA), el agua utilizada fue desionizada estéril y los iniciadores fueron elaborados en la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM) diseñados especialmente para amplificar esta región, estos iniciadores se muestran en la (Tabla 4-2) (Ríos, 2010; Rosas, 2010).

Tabla 4-1. Reactivos y concentraciones finales para la amplificación de la región 16S rDNA

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración final para la amplificación</i>
Buffer de amplificación	1 X
MgCl ₂	2.5 mM
dNTPs	0.2 mM
Iniciadores FW y RV	0.2 mM
DNA	100 ng/µl
Agua desionizada estéril	---

Tabla 4-2. Iniciadores utilizados para la amplificación por PCR de la región 16S rDNA

Nombre de secuencia	Secuencia 5'-3'
Bac 1 FW Bac 910 RV 16S- 800 FW 16S- 1400 RV	AGAGTTTGGATCVTGGCTCAG CTTGCGRCCGTACTCCCCAGG ATTAGATACCCTGGTAGTCCACG GCGGTGTGTACAAGGCCCG

El ensayo de PCR se llevó a cabo en un termociclador de la marca Corbette Research modelo Palm-Cycler (Sídney, Australia). Se emplearon volúmenes de reacción de 50 µl con concentraciones finales para la amplificación que se especifican en la tabla 4-1. Las condiciones de PCR fueron 1 ciclo de 94°C por 3 minutos, 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 30 ciclos a 57°C por 30 segundos, 30 ciclos a 72°C por 30 segundos, finalizando por un periodo de extensión adicional de 1 ciclo a 72°C por 3 minutos (Ríos, 2010; Rosas, 2010).

Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa como se describe en la sección 4.2.2.2, estos fragmentos obtenidos se purificaron mediante el kit de purificación GFX PCR DNA provenientes de General Electric Healthcare, primeramente, en un tubo de centrifuga de 1.0 mL se agregó 250 µl del buffer de captura tipo 3 a 50 µl de muestra (producto de PCR), se agitó en vortex y esta mezcla se adicionó a la columna la cual se incorporó a un tubo de centrifuga nuevo, se centrifugó por 30 segundos a 12,000 rpm, una vez centrifugada la mezcla, se le adicionó 500 µl del buffer de lavado tipo I a la columna y se volvió a centrifugar por 30 segundos a 12,000 rpm, el filtrado se desechó y nuevamente se centrifugó por 30 segundos a 12,000 rpm, la columna se colocó en un tubo de centrifuga nuevo a la cual se adicionó de 10 a 50 µl del buffer de elución tipo 4 o tipo 6 (EB), se esperó 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 minuto a 12,000 rpm. El líquido resultante contenía los fragmentos de interés los cuales se enviaron a secuenciar al Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) en la ciudad de México y en MACROGEN en Seúl, Corea.

4.2.2.4 Criterios para la identificación

La identificación de las bacterias se definió por la similitud de la secuencia 16S rDNA $\geq 98\%$ con la de la secuencia de la cepa prototipo en la base de datos del Centro Nacional de Investigación Biotecnológica (NCBI-GENBANK/<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Altschul *et al.*, 1997; Ríos, 2010; Zhang *et al.*, 2000).

4.2.3. Etapa 2. Análisis microscópico de los microorganismos aerobios

4.2.3.1 Microscopía electrónica

Se utilizó microscopía electrónica de barrido para observar morfología y tamaño celular de los microorganismos desconocidos, el equipo utilizado fue un microscopio de doble haz modelo Quanta 3D FEG (SEM/FIB) marca FEI company (Oregón, USA) con un modo de operación de bajo vacío (10 a 30) Pa y detector de electrones secundarios perteneciente al laboratorio de caracterización del centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías del Instituto Politécnico Nacional (CNMN-IPN).

La muestras de microorganismos tipo A y tipo B pertenecen a un medio de cultivo líquido de medio LB (Anexo 1) al cual se le inoculó una colonia de los microorganismos respectivos dejándolos en incubación por 48 horas a una temperatura de 30 °C a una agitación de 200 rpm, esta muestra (500 µL) se centrifugó a 12,000 rpm por 2 minutos para obtener la biomasa celular (pellet) que se formó por la centrifugación, se le quitó el sobrenadante y se le realizaron 3 lavados con solución salina al 0.85%, al finalizar los lavados, se le adicionó a la muestra (pellet) una solución de Glutaraldehído al 2.5% y se dejó en termoblock para incubación por 1 hora a 37°C con agitación leve, pasada la hora de incubación, a la muestra se le volvieron a realizar 3 lavados más con agua milli Q estéril centrifugando y quitando el sobrenadante por cada lavado que se realizó, finalmente, se realizaron diluciones 1:50, 1:100, 1:250 (Muestra-Agua estéril) para obtener una solución con poca carga bacteriana y así colocar una gota de esta solución en las rejillas para observar morfología y tamaño celular de ambos microorganismos en el microscopio electrónico de doble haz.

4.2.4. Etapa 3. Establecimiento de las condiciones de cultivo para los microorganismos

Se establecieron dos condiciones de cultivo, un medio de cultivo sólido para la proliferación de los microorganismos en placas petri y un medio de cultivo líquido para la evaluación de las cinéticas de biodegradación y crecimiento celular.

4.2.4.1 Medio de cultivo sólido de AT

Para la preparación del medio de cultivo sólido se empleó reactivo puro de ácido tereftálico proveniente de Sigma (San Luis, Misuri, USA) con una pureza del 98%. Este medio de cultivo fue preparado con los reactivos y concentraciones de la tabla 4-3 en donde se observa al AT como única fuente de carbono y energía (sustrato) con una concentración de 5 g/L, asimismo destaca la incorporación de hidróxido de sodio ($NaOH$) agregando 1:2 (AT: $NaOH$) para solubilizar en agua. Las sales que se incorporaron al medio sólido activan el crecimiento de los microorganismos. Este medio se esterilizó a una temperatura de 120°C por 15 minutos y una presión constante de 1.5 Kg/Cm^2 .

Tabla 4-3. Reactivos y concentraciones necesarias para la preparación de medio de cultivo sólido de AT con una concentración de 5 g/L

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración (g/L)</i>
Nitrato de amonio (NH_4NO_3)	0.814
Fosfato di ácido de potasio (KH_2PO_4)	0.15
Sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.075
Cloruro de sodio (NaCl)	0.075
Ácido tereftálico (AT)	5
Hidróxido de sodio ($NaOH$)	1:2
Agar bacteriológico	15

Los microorganismos aerobios que se han reportado en la biodegradación de isómeros ftálicos y sus ésteres son microorganismos aerobios mesofílicos, debido a esto se prepararon placas de agar de medio de cultivo sólido de AT a distintos pHs, entre 5 y 10 ajustando estos pHs con HCl a distintas concentraciones molares (Anexo 1), se sembró por estría el microorganismo tipo A y el microorganismo tipo B y se incubaron a 20, 30 y 37 °C para observar el efecto de la temperatura y el pH en el crecimiento de ambos microorganismos.

4.2.4.2 Medio de cultivo líquido de AT

Para la preparación del medio de cultivo líquido se empleó AT a 5 g/L como única fuente de carbono a distintos pHs. Para ello, se prepararon 100 mL de medio de cultivo adicionándole los reactivos de la tabla 4-3 con excepción del agar bacteriológico a pHs entre 6 y 9 en matraces erlenmeyer de 500 mL, estos medios se esterilizaron a una temperatura de 120°C por 15 minutos a una presión de 1.5 Kg/Cm^2 . El objetivo fue establecer el pH óptimo para una biodegradación efectiva, la temperatura de incubación se manejó como la reportada para el crecimiento óptimo de ambos microorganismos y la agitación inicial fue de 200 rpm (Jackson *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2005; Trinh Tan *et al.*, 2008).

Para obtener el pH óptimo se evaluó y se cuantificó el crecimiento celular por técnicas que serán descritas posteriormente en la sección 4.2.5.1 de materiales y métodos, la variable de respuesta fue la velocidad específica de crecimiento celular.

4.2.4.2.1 Cinéticas de crecimiento celular en medio de cultivo líquido de AT a 5 g/L a distintas velocidades de agitación

Con la obtención del pH óptimo y temperatura óptima de incubación se realizaron cinéticas de crecimiento celular a 3 agitaciones distintas como son 150 rpm, 200 rpm y 250 rpm con el fin de que se obtuviera la agitación ideal a la cual los microorganismos degradarían una concentración de 5 g/L, para llevar a cabo estas evaluaciones se cuantificó el crecimiento celular por técnicas descritas posteriormente, con esto, se obtuvo la velocidad específica de crecimiento la cual fue la variable de respuesta para la elección de la mejor agitación.

4.2.5. Etapa 4. Evaluación de Cinéticas de biodegradación y crecimiento celular a distintas concentraciones de sustrato.

Una vez que se obtuvo la agitación óptima así como el pH y temperatura ideal de crecimiento para la biodegradación de 5 g/L de AT, se hicieron pruebas para la biodegradación de concentraciones mayores y menores a 5 g/L con el objetivo de que se obtuviera la caracterización cinética y estequiométrica de los microorganismos degradando este sustrato. Estas concentraciones fueron de 3, 4, 5.035, 7.1, 9.7 y 14.5 g/L de ácido tereftálico como única fuente de carbono.

Para llevar a cabo estas evaluaciones se cuantificó la biodegradación de AT y se cuantificó el crecimiento celular a través del tiempo. Para esto, se tomaron 4 mL de muestra por cada tiempo de muestreo los cuales se volvieron a verter en medio de cultivo fresco de AT. De los 4 mL que se obtuvieron del muestreo, 3 mL se filtraron con membranas de 25 mm de diámetro y un tamaño de poro de 0.22 micras de la marca Millipore (Bedford, MA, USA), el filtrado se ocupó para cuantificar el ácido tereftálico a través de los tiempos de muestreo y a la membrana que sirvió para este filtrado se aprovechó para la cuantificación celular por peso constante. Finalmente, el mililitro restante se usó para obtener la turbidimetría del medio a través del tiempo.

4.2.5.1 Cuantificación de la biodegradación de AT

Para cuantificar la biodegradación de ácido tereftálico se empleó un equipo de electroforesis capilar modelo MDQ marca Beckman Coulter (Fullerton, CA) acoplado a un detector UV. Las condiciones del capilar de igual manera marca Beckman Coulter (Fullerton, CA), condiciones de operación para llevar a cabo el flujo electroosmótico y la movilidad electroforética y las concentraciones para la preparación del buffer (medio electrolítico) que será el encargado de conducir la corriente (Wu *et al.*, 2003) están indicadas en la tabla 4-4.

Tabla 4-4. Condiciones del capilar, de operación y de la solución electrolítica para llevar a cabo una buena separación

<i>Condiciones del capilar</i>	<i>Condiciones de operación del equipo de EC</i>	<i>Condiciones para preparar la solución electrolítica (Wu et al., 2003)</i>
Neutro de sílice fundida 57 Cm longitud total/ 50 Cm longitud efectiva 75 µm ID x 375 µm OD	V= 25 Kv Tseparación= 25°C Tmuestra= 15°C I= 0.3 psi/ 3 seg Vel Adq= 2 Hz C= 50-62 µA LO= 214 nm	10 mM de fosfato de potasio dibásico 4 mM de α-ciclodextrinas 8 mM de β-ciclodextrinas 0.5% de PEG 8000 pH= 11 Agua Milli Q

Nota: Abreviaturas:

V= Voltaje; T= Temperatura; I= Inyección; Vel Adq= Velocidad de adquisición; C= Corriente; LO= Longitud de onda

Los reactivos α y β ciclodextrinas de la marca Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri, USA) son de vital importancia para la preparación del medio electrolítico ya que actuaron como surfactantes, el pH del buffer se ajustó a 11 con una solución de NaOH 1 molar (Anexo 1), se filtró con membranas de 25 mm de diámetro y 0.22 micras de tamaño de poro de la marca Millipore y finalmente se llevó a refrigeración. El buffer de separación además de identificar el ácido tereftálico también identifica otros compuestos como ácido p-Acetamidobenzoico, monometil tereftalato, aspirina, ácido p-Hidroxibenzoico, ácido p-Tolueico, 2-Carboxibenzaldehído, 4-Carboxibenzaldehído, ácido benzoico, ácido salicílico, ácido ftálico, ácido isoftálico (Wu *et al.*, 2003). También se preparó una solución de NaOH 0.1 M (Anexo 1) filtrada con las membranas Millipore con el fin de lavar el capilar y evitar impurezas.

El método que se creó en el equipo para la identificación del ácido tereftálico consta de 3 lavados, un lavado con NaOH a una concentración 0.1 M, un lavado con agua Milli Q, un lavado con la solución electrolítica, estos lavados fueron hechos a una presión de 30 psi por 5 minutos cada uno, posteriormente se llevó a cabo la inyección de la muestra que contiene el ácido tereftálico la cual se efectuó a 0.3 psi/ 3 seg, finalmente se realizó la separación según la relación masa/carga de las distintas moléculas, para que esto fuese posible se aplicó una diferencia de potencial entre los dos extremos del capilar que hizo que las moléculas se movieran hacia un extremo u otro del capilar y se fueran separando entre sí. Este método se puede programar para leer varias muestras, una tras otra, ya que el equipo MDQ funciona de manera automatizada.

A las muestras recolectadas a través del tiempo se le hicieron diluciones de tal forma que quedara 1 g/L al inicio de las cinéticas y así tener una cuantificación del electroferograma estable y mucho más fina, una vez obtenido el electroferograma de ácido tereftálico se integró manualmente para obtener el área bajo la curva y así, con ayuda de una regresión lineal de una curva de calibración de concentración de sustrato (AT) vs áreas obtenidas de estas concentraciones se obtuvo la concentración de ácido tereftálico que teníamos en las cinéticas de biodegradación a través del tiempo.

4.2.5.2 Cuantificación del crecimiento celular

El crecimiento celular se cuantificó por cada tiempo de muestreo tomado, para esto, se llevaron a cabo dos técnicas como son peso constante para cuantificación de la biomasa celular y densidad óptica la cual nos sirvió para medir la turbidimetría del cultivo en crecimiento. Como se mencionó anteriormente, de los 4 mL que obtuvimos por cada punto de muestreo, 3 mL sirvieron

para realizar peso constante con las membranas Millipore y el mililitro restante para medir la turbidimetría por densidad óptica.

4.2.5.2.1 Peso constante

El procedimiento para la cuantificación de la biomasa celular fue como sigue:

Se puso a peso constante (100°C por 3 horas) charolas de aluminio que contenían membranas Millipore, al pasar las tres horas, las charolas se pesaron en una balanza analítica registrando el peso, en seguida, la membranas se filtraron con 3 mL de muestra de las cinéticas de crecimiento (el filtrado se ocupó para cuantificar la biodegradación de AT), una vez filtradas las membranas, éstas se vuelven a poner en las charolas y así volverlas a poner a peso constante (100°C por 3 horas), pasado este tiempo, las charolas que contenían las membranas filtradas se volvieron a pesar registrando el peso obtenido. Finalmente, por la diferencia de pesos se obtuvo la cuantificación de la biomasa perteneciente a los tiempos de muestreo.

4.2.5.2.2 Densidad óptica

A partir de la muestra obtenida de la cinética de crecimiento, se obtuvo la densidad óptica a 600 nm (Hara *et al.*, 2007). Las lecturas no debían ser mayores a 1 de absorbancia, por lo cual fue necesario realizar diluciones. El blanco fue el medio de cultivo fresco utilizado, mismo con el cual se hicieron las diluciones pertinentes (Wang y Gu, 2006).

La densidad óptica se graficó vs el peso seco para correlacionarlas entre sí y obtener la curva de calibración adecuada a los microorganismos degradadores de AT con la cual se obtuvieron las concentraciones de crecimiento celular a través del tiempo.

4.2.6. Etapa 5. Caracterización molecular de los microorganismos al finalizar las cinéticas de biodegradación

Se caracterizaron molecularmente los microorganismos al finalizar las cinéticas de biodegradación a distintas concentraciones de sustrato con el fin de corroborar que los microorganismos que se caracterizaron en la etapa 1 sean los mismos al finalizar la experimentación. Los procedimientos y métodos para concluir esta etapa son los mismos descritos en la etapa 1.

4.3. Modelos cinéticos

Se utilizaron ecuaciones matemáticas con el objetivo de interpretar los datos experimentales de las cinéticas de biodegradación y crecimiento celular (Abuhamed *et al.*, 2004; Andrews, 1968; Mathews *et al.*, 2000).

La velocidad de biodegradación de ácido tereftálico se calculó de la siguiente manera:

$$V_b = \frac{\ln\left(\frac{S_1}{S_2}\right)}{(t_2 - t_1)}$$

La velocidad específica de crecimiento celular fue calculada en la fase exponencial usando la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{X_2}{X_1}\right)}{(t_2 - t_1)}$$

En donde:

V_b: Velocidad de biodegradación de AT (h^{-1})

S: Concentración de sustrato (g/L)

X: Concentración de biomasa (g/L)

t: tiempo (h)

La ecuación de Andrews de inhibición por concentración de sustrato fue utilizada para describir la velocidad específica de crecimiento:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}}$$

En donde:

S: Concentración del sustrato (g/L)

t: Tiempo (h)

μ : Velocidad específica de crecimiento celular (h^{-1})

X: Concentración de biomasa (g/L)

μ_{max} : Velocidad máxima de crecimiento (h^{-1})

Ks: Constante de saturación (g/L)

Ki: Constante de inhibición por sustrato (g/L)

El rendimiento celular experimental se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$Y_{\frac{X}{S}}^{exp} = \frac{XM - X0}{CS - C0}$$

En donde:

XM: Concentración máxima de biomasa (g/L)

X0: Concentración inicial de biomasa (g/L)

CS: Concentración de sustrato a la máxima concentración de biomasa (g/L)

C0: Concentración inicial de sustrato (g/L)

El modelo de Andrews se ajustó a las cinéticas de biodegradación y crecimiento celular para cada concentración de sustrato, se utilizó el método de Runge-Kutta y los parámetros μ_{max} , Ks y Ki, fueron optimizados con el método de Marquardt utilizando un software comercial (Model Maker V. 4, Cherwell Scientific Publishing, UK).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización molecular de los microorganismos capaces de degradar ácido tereftálico

Se tienen dos microorganismos desconocidos a los que en primera instancia se les llamó microorganismo tipo A y microorganismo tipo B (Figura 5-1), estos microorganismos crecen en una placa de agar que contiene reactivos descritos en la tabla 4-3 de materiales y métodos creciendo a una temperatura de 28°C en una incubadora VWR.



Figura 5-1. Colonias pertenecientes a los microorganismos aerobios que degradan ácido tereftálico tomadas a una amplificación de 10X

Las colonias de la figura 5-1 fueron tomadas en un microscopio Olympus modelo CX31 a una amplificación de 10X, para identificar estas colonias se realizó la extracción de DNA, posteriormente se amplificó por PCR el gen 16S rDNA y en ambos casos (microorganismo A y B) se obtuvieron fragmentos de 600 pb y de 910 pb los cuales se verificaron al separarlos por electroforesis en un gel de agarosa, para corroborar que los fragmentos obtenidos fueran de los microorganismos aerobios también se llevaron a cabo reacciones de PCR que actuaron como controles, una reacción para el control negativo que correspondió a una reacción con todos los reactivos de la tabla 4-1 con excepción del DNA por lo cual no hubo amplificación indicándonos que los reactivos utilizados no presentaban contaminación y una reacción para el control positivo

que correspondió a una reacción con todos los reactivos para la amplificación con DNA del microorganismo *Escherichia Coli* en donde se presentó amplificación del DNA de este microorganismo, debido a esto se pudo concluir que efectivamente las bandas pertenecían al DNA de los microorganismos aerobios degradadores de ácido tereftálico (Figura 5-2).

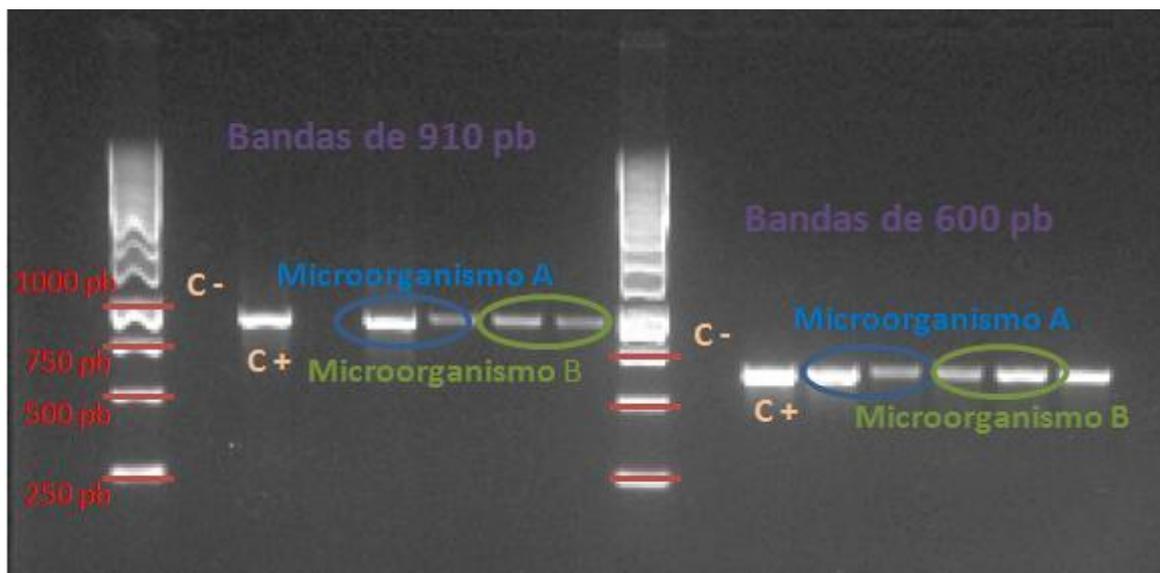


Figura 5-2. Amplificación del gen 16S rDNA

Una vez que se realizó la amplificación de ambos microorganismos, los productos de PCR se purificaron, posteriormente los productos de PCR purificados se secuenciaron en el INMEGEN y en MACROGEN, de esta manera se identificaron ambos microorganismos (Tabla 5-1). Los electroferogramas y la extracción de la secuencia fue realizado con el software MEGA 5.0 (Figura 5-3 y 5-4), en el caso del alineamiento de los nucleótidos se efectuó por el programa nucleotide blast perteneciente a la base de datos Genbak. En el anexo 2 se muestran las secuencias completas del gen 16S rDNA para ambos microorganismos.

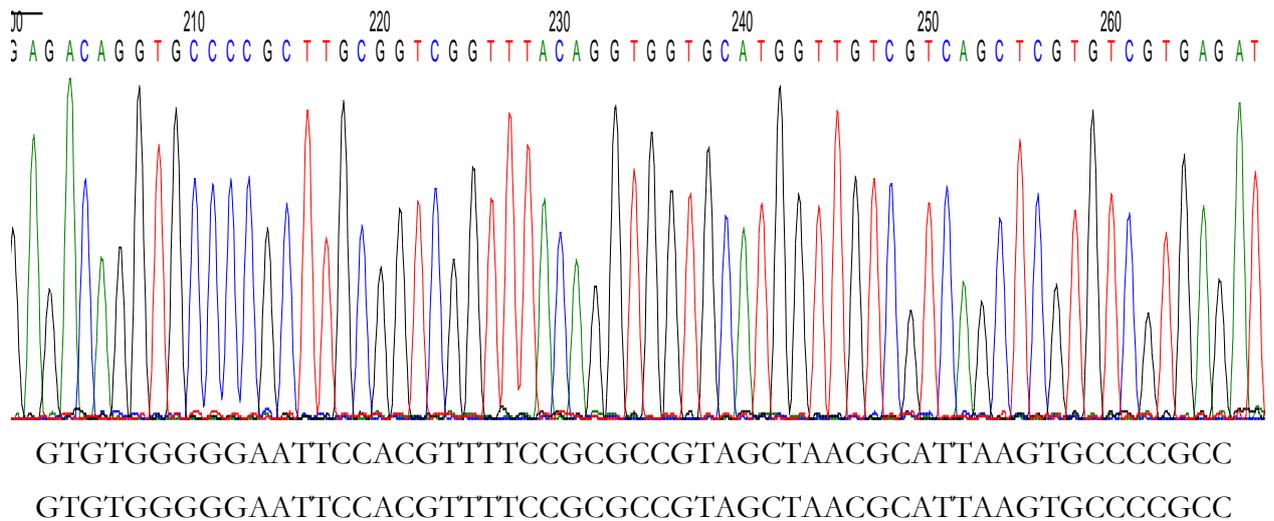


Figura 5-3. Electroferograma y alineamiento perteneciente al microorganismo tipo A

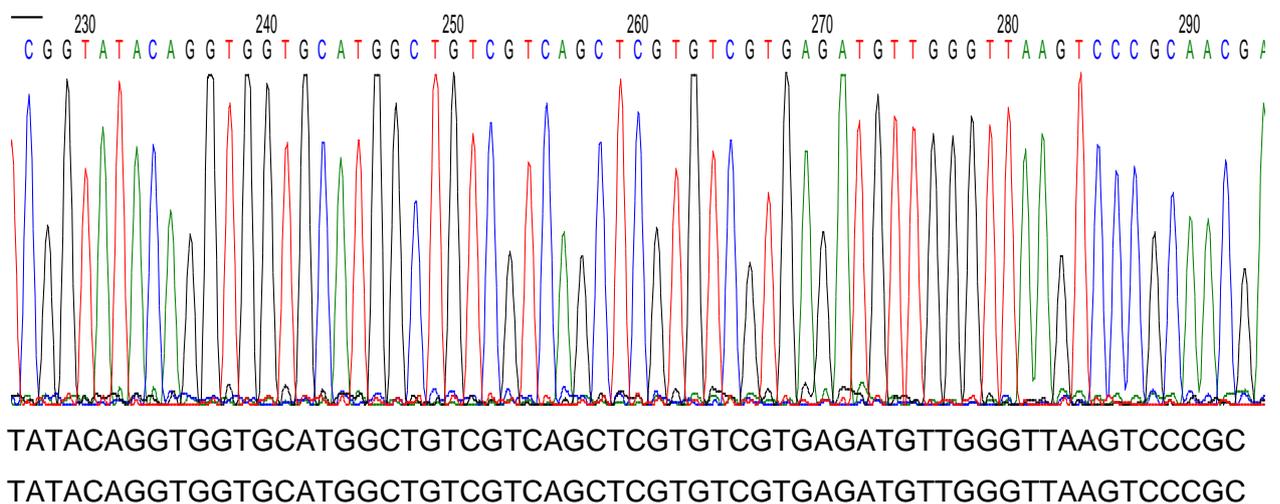


Figura 5-4. Electroferograma y alineamiento perteneciente al microorganismo tipo B

Tabla 5-1. Identificación molecular de los microorganismos aerobios degradadores de ácido tereftálico por la similitud de la región 16S rDNA

Microorganismo tipo	Presunto microorganismo identificado	Similitud (%)	Número de acceso al banco de genes (www.ncbi.nlm.nih.gov)
A	<i>Arthrobacter sp.</i>	99	HQ323449.1
B	<i>Rhodococcus sp.</i>	100	DQ337561.1

Una vez lograda la identidad de los microorganismos se obtuvo información bibliográfica de estos, información que fue de ayuda para realizar las cinéticas crecimiento celular y biodegradación de ácido tereftálico.

Arthrobacter es un género de microorganismo aerobio estricto Gram positivo (O'Loughlin *et al.*, 1999). Crece a temperaturas entre 25-30°C (MacFaddin, 2003) y a un pH entre 7 y 8 (Sharma *et al.*, 2009).

Se ha reportado que *Arthrobacter sp.* puede transformar el dimetil ftalato a monometil ftalato (Gu, 2007), de igual manera *Arthrobacter Keyseri* 12B puede metabolizar compuestos ésteres de ftalatos como Dibutil ftalato (Vamsee-Krishna y Phale, 2008).

En el caso de *Rhodococcus* este es un género de microorganismo aerobio Gram positivo (Bergey y Holt, 1994), presentan colonias de tipo mucoide, lisas o rugosas y pigmentadas de color crema, rojo o anaranjado, el crecimiento de estas colonias duran de 1-3 días. Presentan un tipo de metabolismo oxidativo de los carbohidratos. Su pared celular contiene ácidos micólicos con 34 a 52 átomos de carbono y hasta 3 dobles enlaces, siendo la mayor parte de la cadena de carbonos de tipo saturada e insaturada y con la presencia de ácidos grasos 10-metil-(tubérculo esteárico)-ramificado (Sánchez *et al.*, 2004).

El género *Rhodococcus* forma pigmentos caroteinados y dependiendo de su especie forma el compuesto β -caroteno, γ -caroteno u otros compuestos caroteinados (Ichiyama *et al.*, 1989).

Rhodococcus sp. crece bien a temperaturas de 30°C a 37°C siendo la temperatura óptima 30°C y un pH óptimo de 7.0 (Sánchez *et al.*, 2004). En algunos proyectos de investigación se ha reportando que este microorganismos tiene la habilidad de degradar un amplio rango de compuestos aromáticos (Díaz, 2004; Larkin *et al.*, 2005; Larkin *et al.*, 2006; Martínková *et al.*, 2009) como

isómeros ftálicos y sus ésteres (Choi *et al.*, 2005; Hara *et al.*, 2007; Nalli *et al.*, 2002; Vamsee-Krishna y Phale, 2008; Walter *et al.*, 1991) siendo escasos los reportes de cinéticas de biodegradación de estos compuestos.

5.2. Análisis microscópico de los microorganismos aerobios

El análisis microscópico se realizó por microscopia electrónica para la obtención de forma y tamaño de los microorganismos; las fotos obtenidas provienen de una muestra diluida 1:50 (Muestra-Agua) y una amplificación a 10,000X, 5,000X y 2,500X para ambos microorganismos.

Para el microorganismo A correspondiente a *Arthrobacter sp.* con una amplificación a 10,000X se ven microorganismos en forma de bacilos (1.30×0.7) μm aproximadamente y de cocos $0.95 \mu\text{m}$ de diámetro aproximadamente, estos microorganismos se tomaron de un medio de cultivo líquido en fase exponencial entrando a fase estacionaria (Figura 5-5). Bibliográficamente se sabe que *Arthrobacter sp.* tiene forma de bacilo durante la fase de crecimiento exponencial y de cocos aislados dispuestos en forma aislada o en pares o en grumos irregulares durante la fase estacionaria (MacFaddin, 2003). Los cocos son resistentes a la falta de nutrientes. El género se distingue por su hábito de “snapping division” en la que la pared celular exterior se rompe por una juntura (de aquí su nombre), de tal forma que los bacilos se rompen en cocos (O'Loughlin *et al.*, 1999).

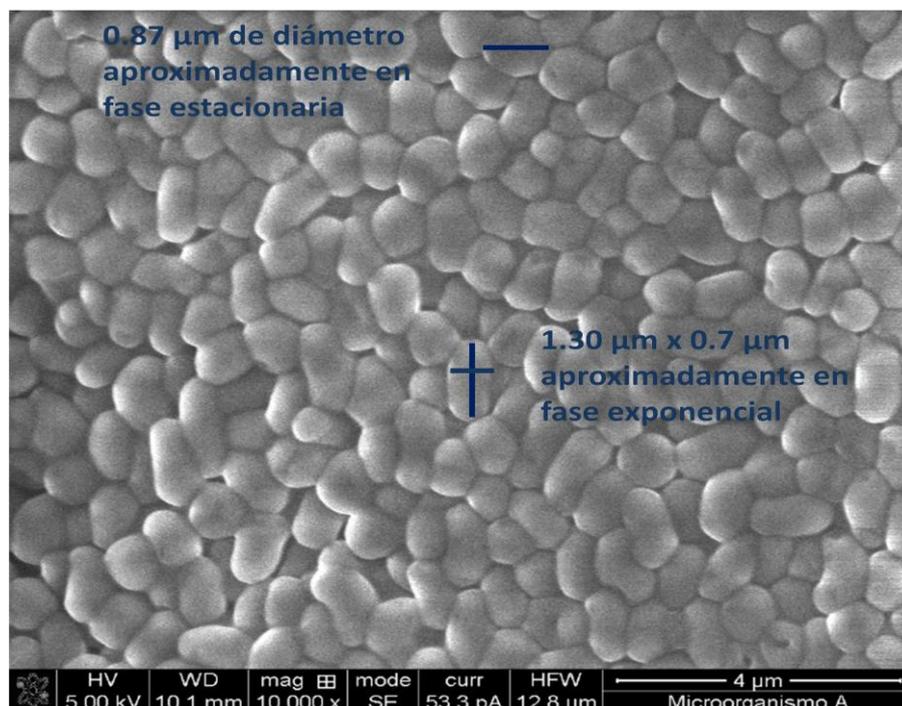


Figura 5-5. Morfología de *Arthrobacter sp*

En el caso del microorganismo B correspondiente a *Rhodococcus sp.*, con una amplificación a 10,000X se ven microorganismos en forma de bacilos cortos ó cocobacilos ($0.87 \times 0.7 \mu\text{m}$) aproximadamente (Figura 5-6). Teóricamente se sabe que este género se caracteriza por agrupar bacterias de forma bacilar, las cuáles pueden llegar a formar filamento vegetativo ramificado, el cual es septado y se fragmenta en formas bacilares y cocoidales (Bell *et al.*, 1998; Sánchez *et al.*, 2004). Generalmente las especies de *Rhodococcus* muestran cocobacilos cortos (Koneman *et al.*, 1997).

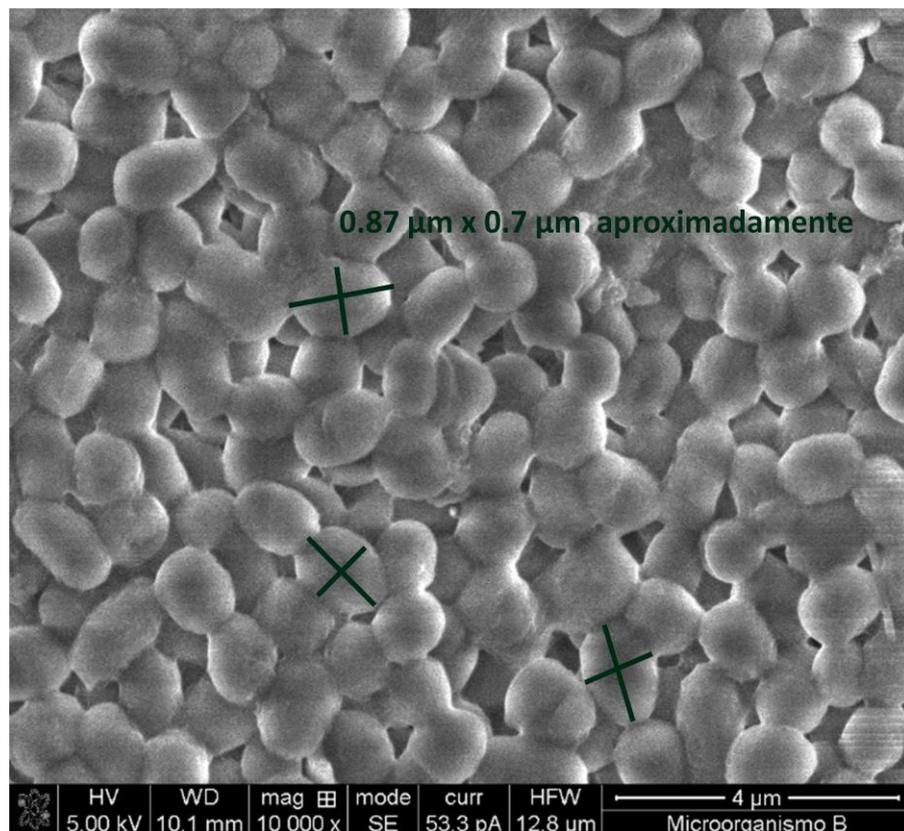


Figura 5-6. Morfología de *Rhodococcus sp.*

Con una amplificación de 2,500X (Figura 5-7) y 5,000X (Figura 5-8) se ven microorganismos en forma de cocobacilos ramificados.

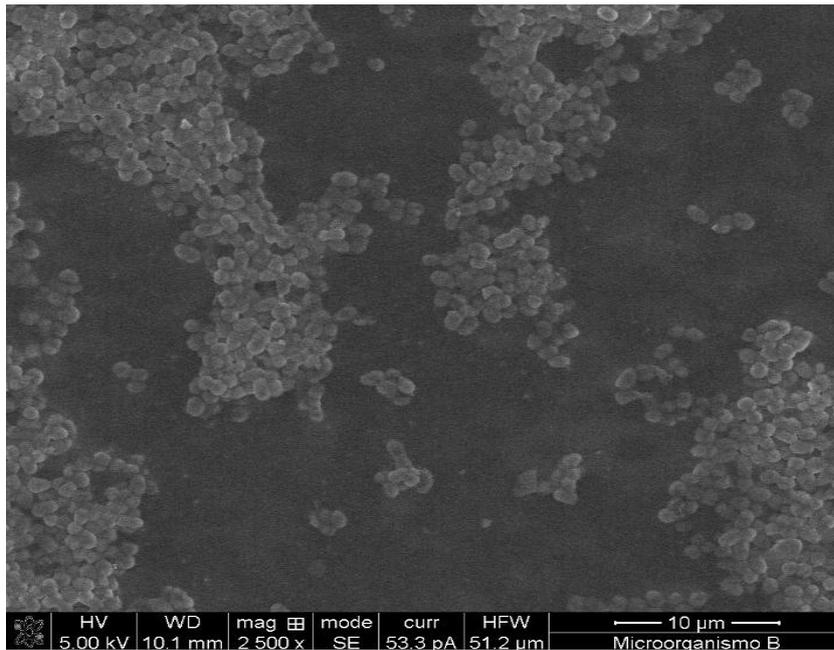


Figura 5-7. Morfología de Rhodococcus sp. amplificada a 2,500X

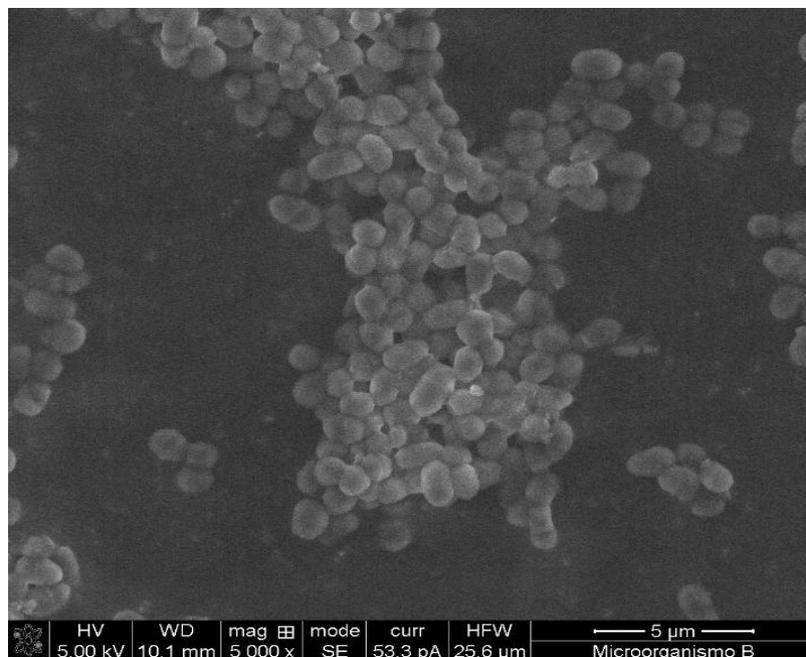


Figura 5-8. Morfología de Rhodococcus sp. amplificada a 5,000X

5.3. Establecimiento de las condiciones de cultivo para los microorganismos

5.3.1. Medio de cultivo sólido de AT

Para tener las condiciones óptimas de crecimiento de pH y temperatura de los microorganismos *Arthrobacter sp.* y *Rhodococcus sp.* se pusieron a crecer en medio de cultivo sólido de ácido tereftálico con una concentración de 5 g/L a distintos pHs, entre 5-10, y a tres temperaturas de incubación (20, 30 y 37)°C (Tabla 5-2) para ambos microorganismos.

Tabla 5-2. Resultados de crecimiento de los microorganismos *Arthrobacter sp.* y *Rhodococcus sp.*

<i>Arthrobacter sp.</i>				<i>Rhodococcus sp.</i>			
	Temperatura de incubación (°C)				Temperatura de incubación (°C)		
pH	20	30	37	pH	20	30	37
5	-	-	-	5	+++	+++	+++
6	+	+	+	6	+++	+++	+++
7	+	+	+	7	+++	+++	+++
8	+	+	+	8	+++	+++	+++
9	+	+	+	9	+++	+++	+++
10	+	+	+	10	+++	+++	+++

Simbología: -Muy poco crecimiento +Poco crecimiento ++Crecimiento medio +++Buen crecimiento

Como se mencionó anteriormente *Arthrobacter sp.* crece óptimamente a una temperatura de 25 a 30°C (MacFaddin, 2003) y a un pH óptimo entre 7 y 8 (Sharma *et al.*, 2009) en un medio de cultivo de agar nutritivo, en el medio de cultivo sólido de ácido tereftálico a 5 g/L siendo el AT la única fuente de carbono el crecimiento que se observó fue lento y gradual por lo que la biodegradación fue ineficiente ya que el microorganismos sufrió inhibición por concentración de sustrato.

En el caso de *Rhodococcus sp.* (Figura 5-9), sabemos que este microorganismo crece óptimamente a un pH de 7 y a una temperatura de 30°C (Choi *et al.*, 2005; Hara *et al.*, 2007; Nalli *et al.*, 2002; Walter *et al.*, 1991) en agar nutritivo, en el caso del medio de cultivo sólido de AT a 5 g/L

se observó un buen crecimiento en todos los pH probados de 5 a 10 y a las temperaturas de incubación probadas (20, 30, 37)°C.

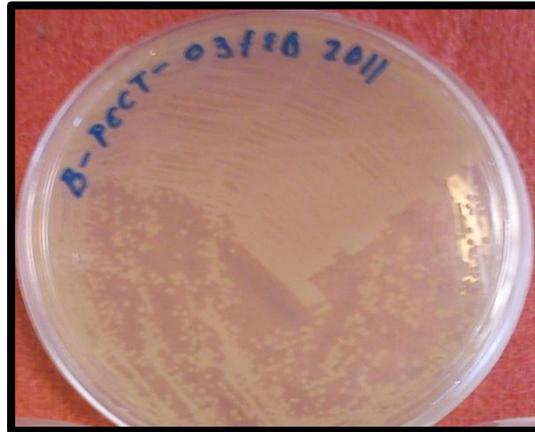


Figura 5-9. *Rhodococcus sp.* en un medio de cultivo sólido de ácido tereftálico a una concentración de 5 g/L

Con estos resultados, se optó por realizar cinéticas de biodegradación y crecimiento celular de ácido tereftálico a 5 g/L como única fuente de carbono con el microorganismo *Rhodococcus sp.* y optimizarla nivel laboratorio. Para el caso de *Arthrobacter sp.*, futuras investigaciones se encargarán de evaluar la biodegradación de ácido tereftálico con este microorganismo.

5.3.2. Medio de cultivo líquido de AT

5.4.2.1 Cinéticas de crecimiento celular en medio de cultivo líquido de AT a 5 g/L a distintos pHs

Para el establecimiento de las condiciones óptimas de pH en medio de cultivo líquido para el microorganismo *Rhodococcus sp.* se inoculó una concentración de 0.03 g/L de biomasa en fase exponencial a medios de cultivo líquido de AT 5 g/L a distintos pH, entre 6 y 9, los cuales se incubaron a una temperatura de 30°C en una incubadora orbital INO 650 V-7 a 200 rpm (Jackson *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2005; Trinh Tan *et al.*, 2008). Se escogió esta temperatura ya que experimentalmente *Rhodococcus sp.* tiene crecimiento a 20, 30 y 37°C pero teóricamente su óptima se encuentra en 30°C.

Para obtener el pH óptimo se midió el crecimiento celular a través del tiempo con las técnicas de densidad óptica y peso constante, la variable de respuesta fue la velocidad específica de crecimiento celular. Para cuantificar la concentración de biomasa, se relacionó la densidad óptica vs peso constante a distintas concentraciones de sustrato (Figura 5-10) en donde se tienen curvas de calibración obteniendo coeficientes de correlación de 0.9959 \pm 0.0015 y pendientes similares entre sí, es importante notar de que a pesar de que las pendientes son muy cercanas la biomasa obtenida aumenta por el incremento de sustrato.

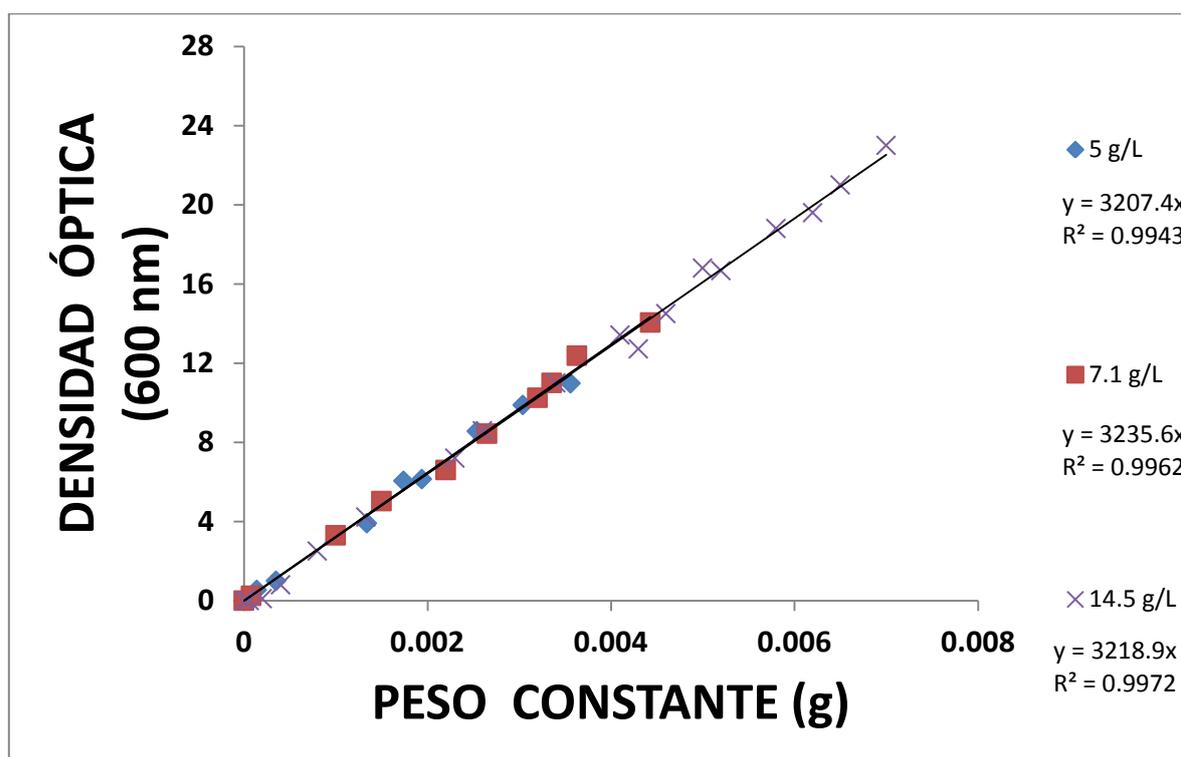


Figura 5-10. Curva de calibración entre la densidad óptica y peso constante de cinéticas de biodegradación y crecimiento celular a distintas concentraciones de sustrato

Cuantificando las concentraciones del crecimiento celular a través de tiempo (Figura 5-11) a distintos pH se observó que en todos hay crecimiento celular llegando a una concentración de 1.13 g/L en todos los casos solo que la velocidad específica de crecimiento celular es mucho mayor en pH de 7 con una velocidad específica de 0.059 \pm 0.00014 h^{-1} (Figura 5-12) la cual hace que sea la más indicada para la biodegradación de AT a 5 g/L. Es interesante notar que a pH de 9 el crecimiento es nulo para el medio de cultivo establecido.

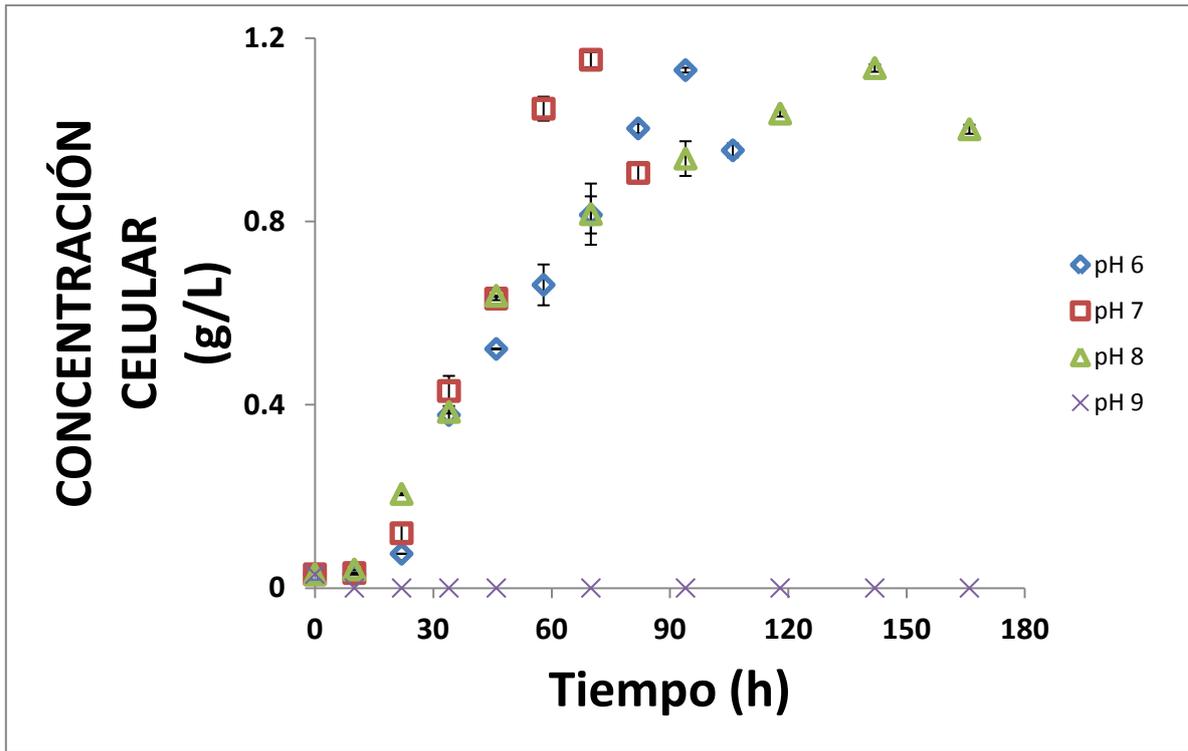


Figura 5-11. Cinéticas de crecimiento celular a distintos pHs

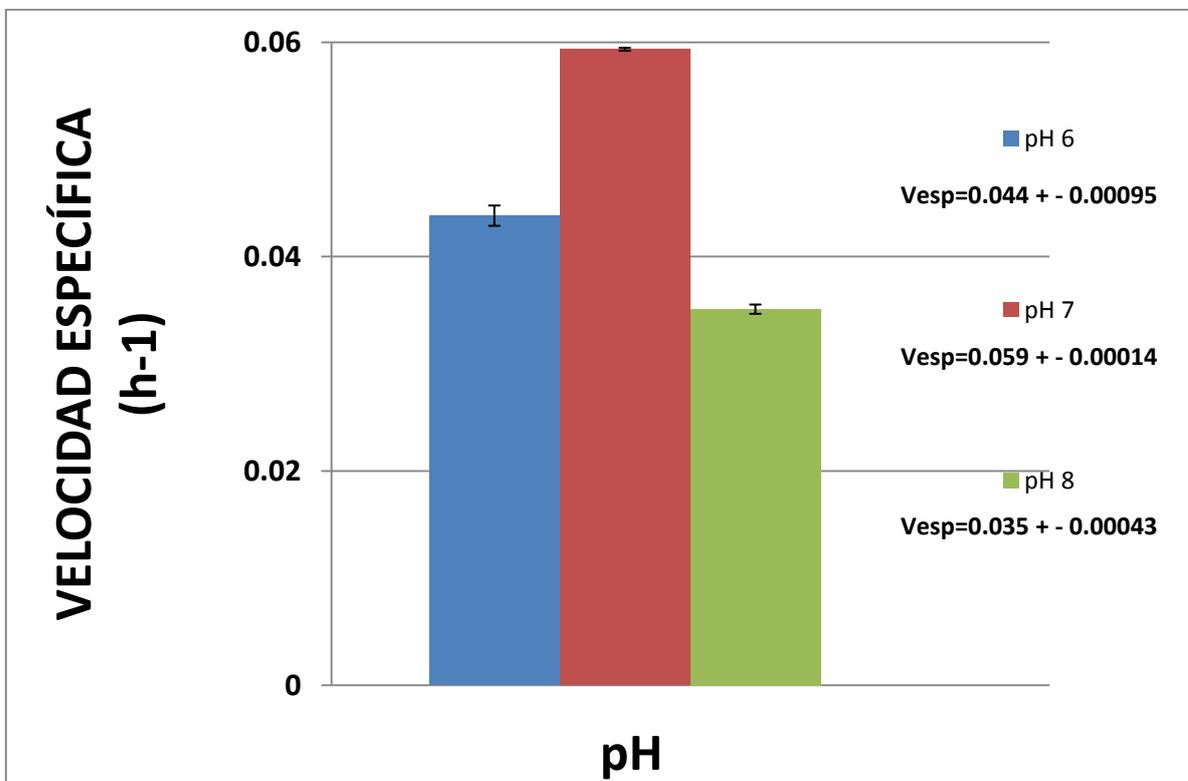


Figura 5-12. Velocidad específica de crecimiento celular a distintos pHs

5.4.2.2 Cinéticas de crecimiento celular en medio de cultivo líquido de AT a 5 g/L a distintas velocidades de agitación

Con respecto a la selección de la mejor agitación, como se mencionó anteriormente, se pusieron a prueba medios de cultivo de AT a 5 g/L con las condiciones de temperatura y pH establecidas previamente a distintas agitaciones como 150 rpm, 200 rpm y 250 rpm (Figura 5-13) en donde se observó un mayor crecimiento celular a 150 rpm y 200 rpm llegando a una concentración máxima de 1.13 g/L en comparación con 250 rpm donde sólo se alcanzó una concentración máxima de 0.78 g/L producido por inhibición del crecimiento celular a causa de la fuerte agitación lo cual pudo haber sido causado por estrés en las células de *Rhodococcus sp*, con este resultado, se sabe que si hay inhibición en el crecimiento celular, no hay una biodegradación eficiente de AT.

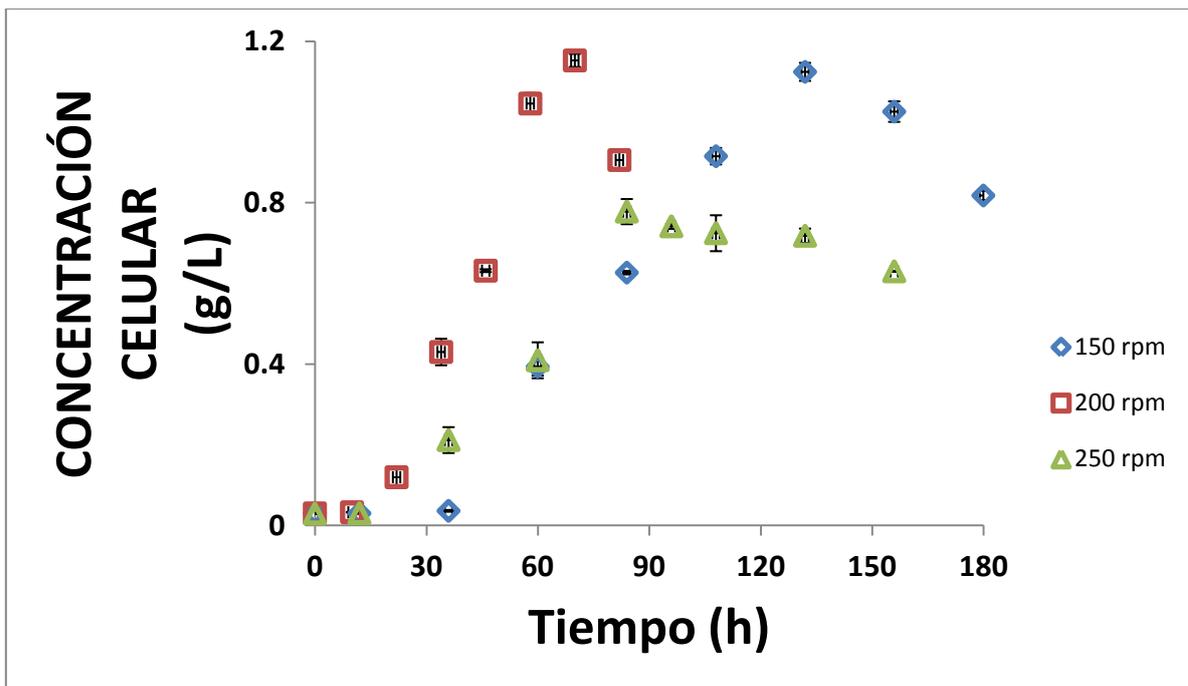


Figura 5-13. Cinéticas de crecimiento celular a distintas velocidades de agitación

Para obtener la mejor agitación se comparó la velocidad específica de crecimiento celular entre agitaciones de 150 rpm y 200 rpm como lo indica la figura 5-14, la velocidad específica eficiente es de la cinética de crecimiento celular a 200 rpm siendo de $0.059 \pm 0.00014 h^{-1}$.

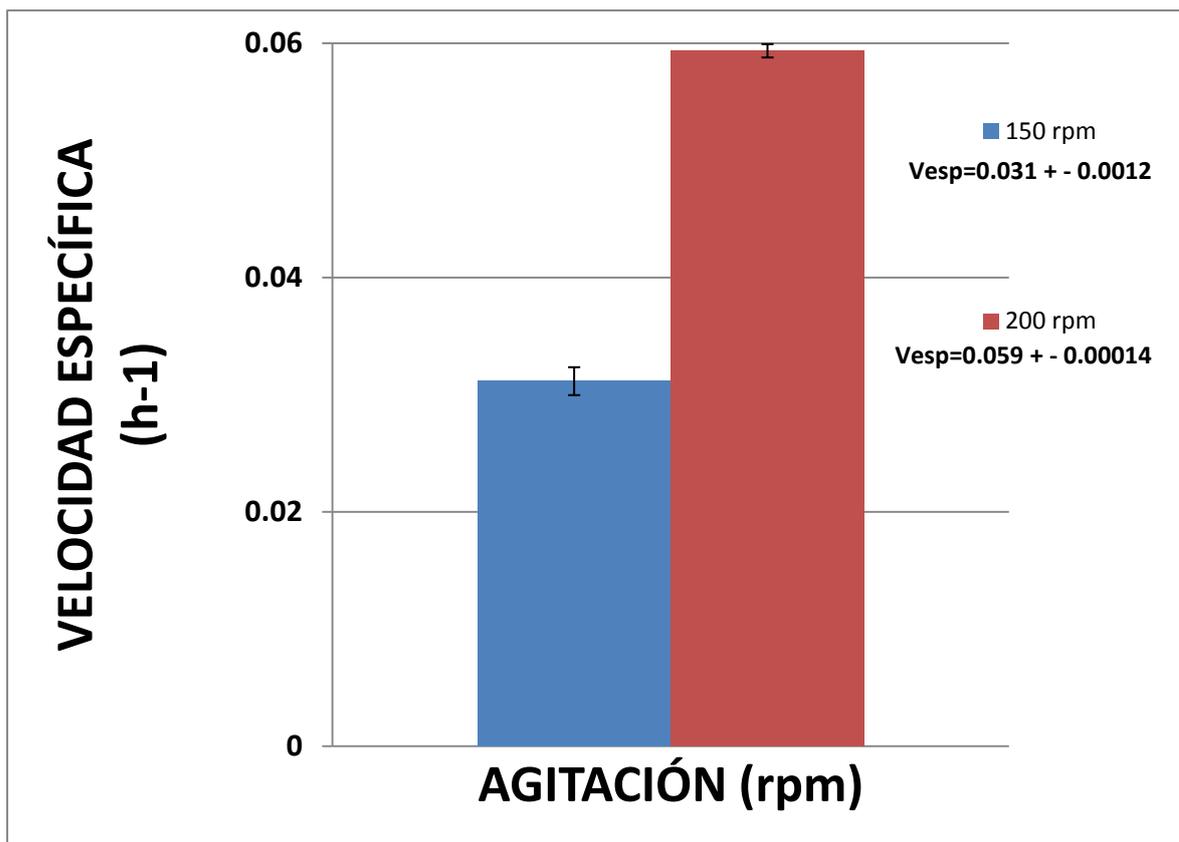


Figura 5-14. Velocidad específica de crecimiento celular a distintas agitaciones

5.4. Cuantificación de la biodegradación de AT

Previamente se mencionaron los procedimientos para la cuantificación de la biodegradación de AT con el equipo de electroforesis capilar, desde la preparación de la solución electrolítica hasta el procedimiento que se efectuó en el equipo para llevar a cabo la separación, como se sabe, la solución electrolítica no solo identifica ácido tereftálico sino también otras moléculas similares (Wu *et al.*, 2003).

Una vez preparada la solución electrolítica, se preparó un estándar de ácido tereftálico a 0.2 g/L para demostrar la utilidad del método, posteriormente se programaron las actividades a seguir en el equipo de electroforesis capilar realizando lavados para limpiar y activar el capilar con NaOH 0.1 molar (Anexo 1), agua Milli Q y con la solución electrolítica, posteriormente se inyectó la muestra estándar preparada a 0.2 g/L de AT y se llevó a cabo la separación según la relación masa/carga aplicándole al equipo una diferencia de potencial entre los extremos del capilar por

varios minutos hasta que se obtuvo el electroferograma correspondiente al estándar de la muestra inyectada (Figura 5-15) en donde se observa la línea base de la solución electrolítica y un electroferograma típico de AT con un tiempo de migración entre 8 y 8.2 minutos. Wu et al., 2003 reporta una alta precisión, linealidad y resolución para este método sin embargo también reportó que el tiempo de migración es afectada por las ciclodextrinas para el caso de los isómeros ftálicos, la movilidad electroforética decrecerá incrementando la concentración de estas ciclodextrinas en especial la concentración de β -ciclodextrinas. En otro reporte de investigación, se observó que el tiempo de migración óptimo para la molécula de ácido tereftálico en un equipo de electroforesis capilar es de 8 minutos aproximadamente (Moraes *et al.*, 2004).

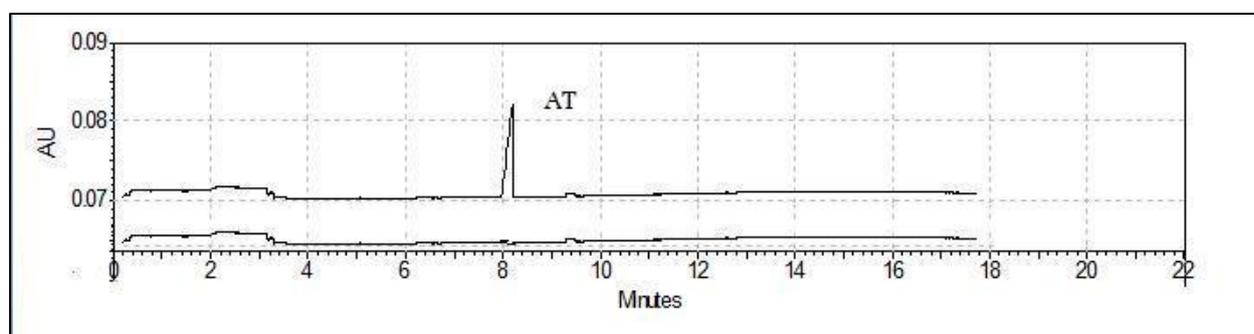


Figura 5-15. Electroferograma típico correspondiente al ácido tereftálico

Una vez que se comprobó la factibilidad del método se prepararon distintas concentraciones de ácido tereftálico con el fin de realizar la curva de calibración y así cuantificar la biodegradación de AT a través del tiempo, estas muestras se leyeron en el equipo de electroforesis capilar y se obtuvieron los electroferogramas pertenecientes a distintas concentraciones de AT a los cuales se les determinó el área bajo la curva, con estos datos, se correlacionaron las distintas concentraciones de AT vs áreas correspondientes a cada concentración (Figura 5-16) en donde se observa un coeficiente de correlación promedio de 0.99.

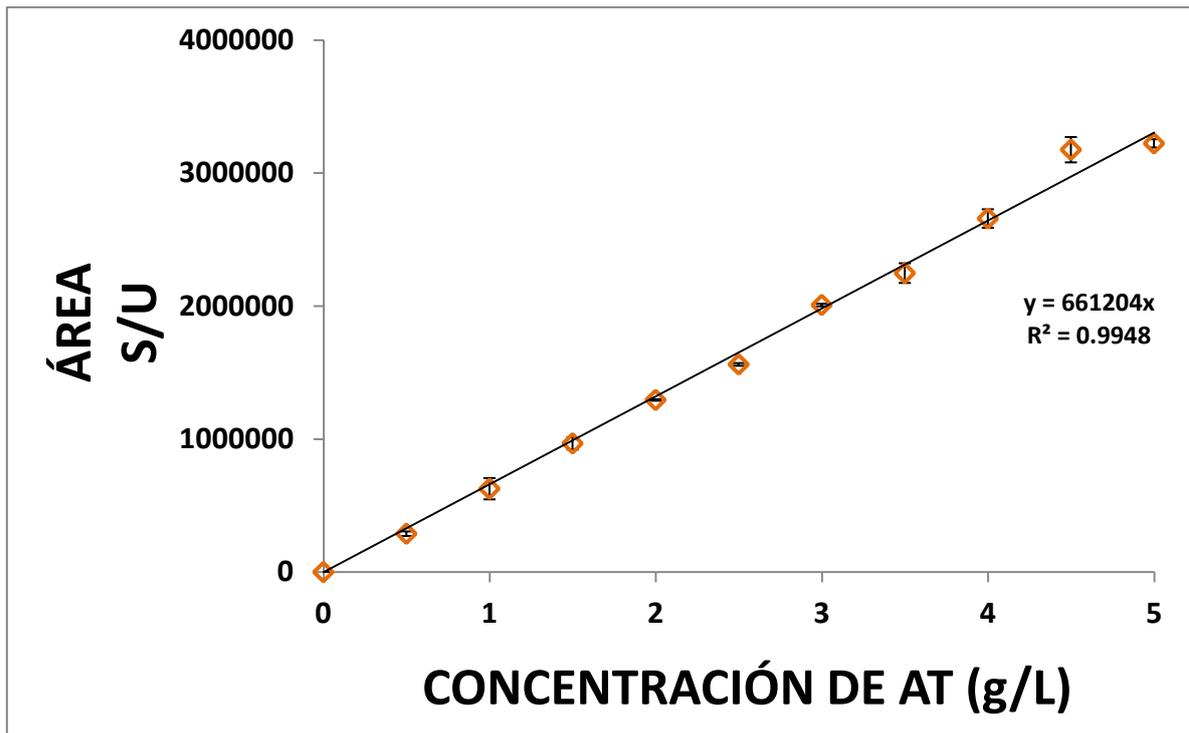


Figura 5-16. Curva de calibración para cuantificar la biodegradación de AT

5.5. Evaluación de cinéticas de biodegradación y crecimiento celular a distintas concentraciones de sustrato

Una vez obtenidas las condiciones óptimas del medio de cultivo líquido se realizaron cinéticas de biodegradación y crecimiento celular a distintas concentraciones de sustrato (3, 4, 5.035, 7.1, 9.7 y 14.5) g/L habiendo degradación total en cada uno de los sistemas.

La velocidad específica de crecimiento fue mayor con una concentración de sustrato de 5.035 g/L la cual fue de $0.059 \pm 0.00006 \text{ h}^{-1}$, con concentraciones mayores la velocidad específica de crecimiento celular disminuía (Figura 5-17).

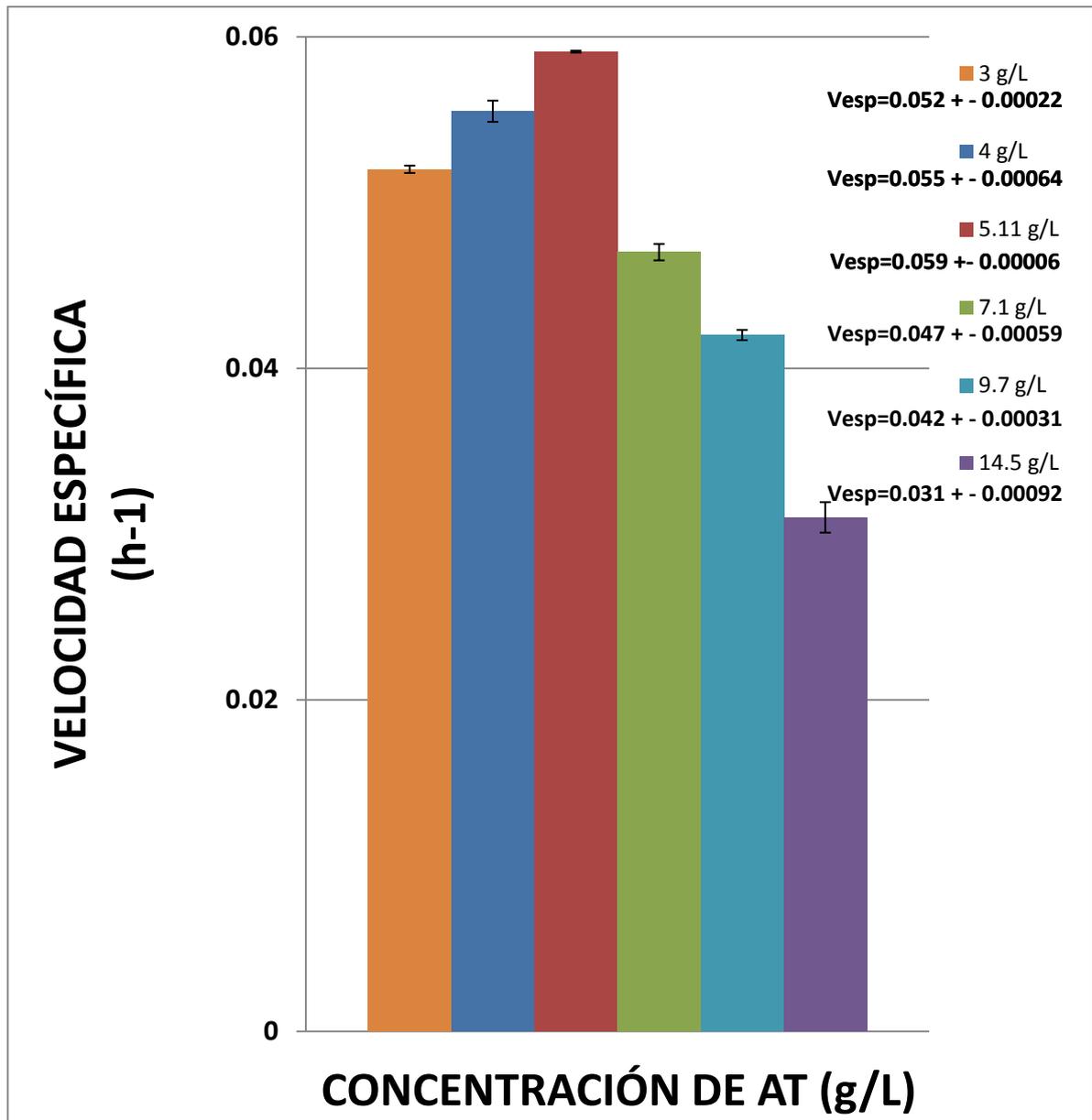


Figura 5-17. Velocidades específicas de crecimiento celular a distintas concentraciones de sustrato

Con la ecuación de inhibición por sustrato de Andrews de 1968 se obtuvieron los valores de velocidad máxima de crecimiento, constante de saturación y constante de inhibición (Tabla 5-3), la simulación se realizó con los valores previamente calculados (Figura 5-18) en donde se observan datos experimentales de velocidades específicas de crecimiento y datos pertenecientes al simulado vs las distintas concentraciones de sustrato. La correlación promedio fue de 0.9694.

Tabla 5-3. Parámetros cinéticos obtenidos de la ecuación de Andrews

$\mu_{max} (h^{-1})$	$K_s (gS/L)$	$K_i (gS/L)$
0.20	5	3

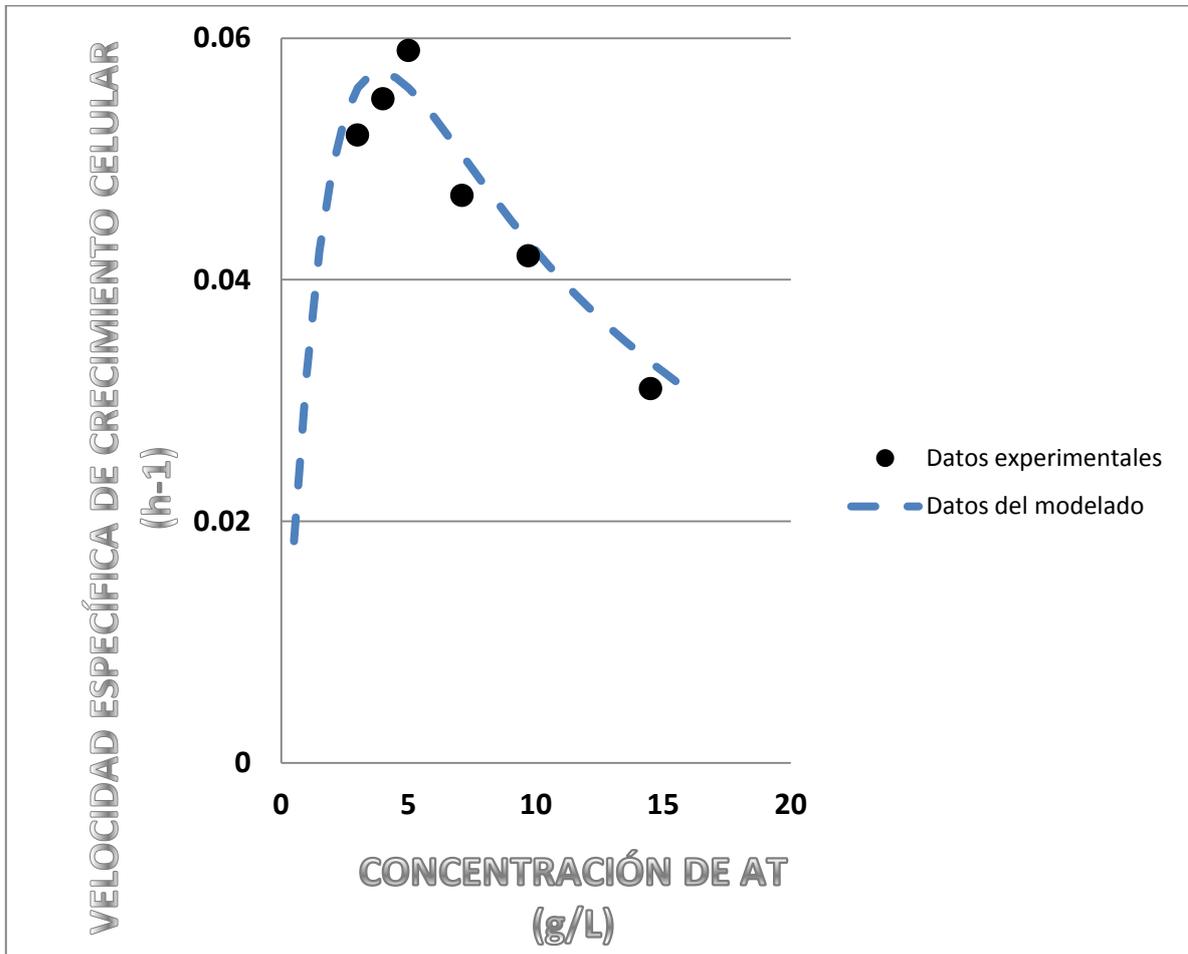


Figura 5-18. Comparación de las velocidades específicas de crecimiento experimentales y modeladas vs concentración de sustrato

A continuación se describen de manera general las cinéticas de biodegradación de ácido tereftálico y crecimiento celular a distintas concentraciones de sustrato. La concentración inicial de biomasa agregada fue de 0.03 g/L en fase exponencial para todos los casos, como se menciona en materiales y métodos, el modelo de inhibición por concentración de sustrato se ajustó a las cinéticas de biodegradación y crecimiento celular utilizando el software Model Maker versión 4.

Con una concentración de sustrato de ácido tereftálico a 3 g/L (Figura 5-19) la concentración de biomasa máxima fue de 0.685 +/- 0.0071 g/L, a las 106 horas después de la inoculación la concentración de ácido tereftálico fue nula, la velocidad específica de crecimiento celular fue de 0.052 +/- 0.00022 h^{-1} y la velocidad de biodegradación de ácido tereftálico de 0.0515 +/- 0.00071 h^{-1} , el rendimiento celular fue del 23% y el ajuste del modelo a los datos obtenidos experimentalmente tiene un coeficiente de correlación promedio de 0.976223.

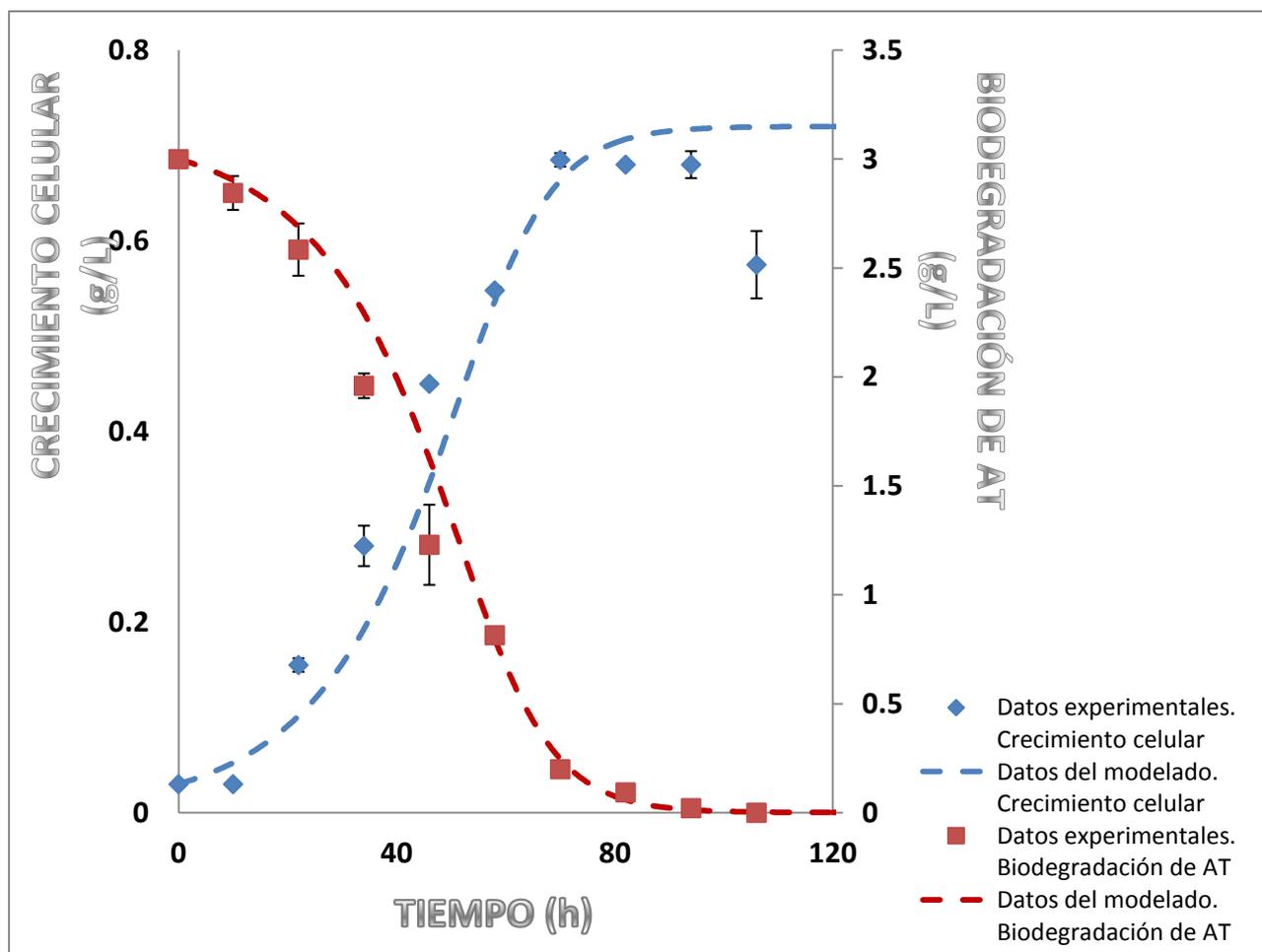


Figura 5-19. Cinética de biodegradación de AT y crecimiento celular a 3 g/L de sustrato inicial

En las cinéticas de biodegradación de AT con una concentración de ácido tereftálico a 4 g/L (Figura 5-20) la concentración de biomasa fue mayor que el sistema anterior con un valor de 0.91 ± 0.015 g/L y hubo degradación total a las 94 horas desde la inoculación, la velocidad específica de crecimiento fue de $0.055 \pm 0.00064 \text{ h}^{-1}$, la velocidad de biodegradación de AT fue de $0.062 \pm 0.00089 \text{ h}^{-1}$ y el rendimiento fue del 23%. El ajuste del modelo a los datos experimentales tiene un coeficiente de correlación promedio de 0.97767. Es importante notar que la concentración de biomasa en la fase estacionaria casi no se mantiene ya que enseguida entra a la fase de muerte celular.

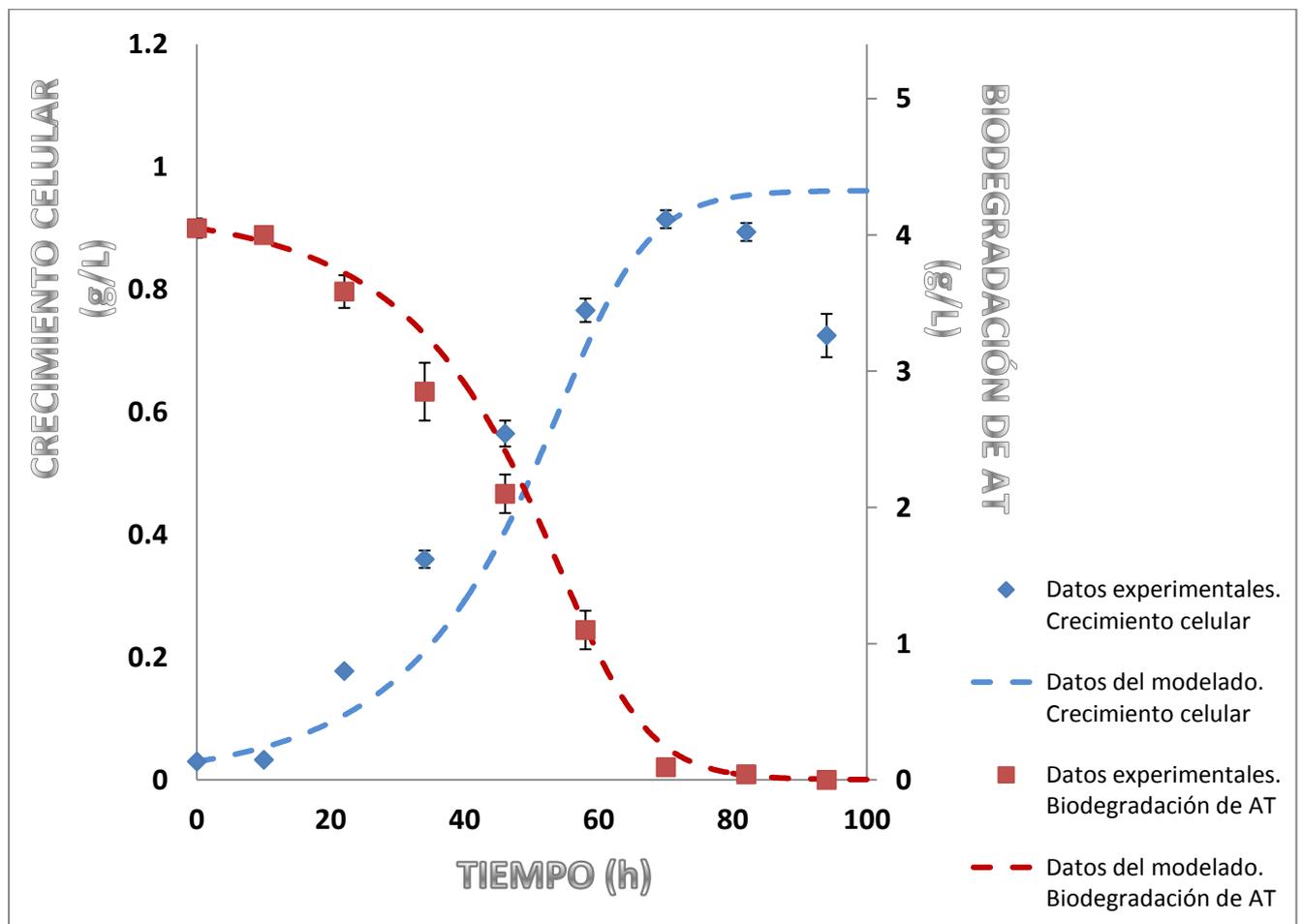


Figura 5-20. Cinética de biodegradación de AT y crecimiento celular a 4 g/L de sustrato inicial

Evaluando las cinéticas de biodegradación con una concentración de sustrato a 5.035 g/L (Figura 5-21) se observa incremento celular ya que la concentración de sustrato es mayor que en los medios de cultivo anteriores, este valor es de 1.15 ± 0.01626 g/L, la velocidad específica de crecimiento fue de 0.059 ± 0.00006 h^{-1} siendo el valor más alto de todas las cinéticas de biodegradación y crecimiento celular a distintos valores de sustrato que se probaron experimentalmente, de la misma manera, la velocidad de consumo de biodegradación de AT es la más alta y fue de 0.077 ± 0.00093 h^{-1} , a las 82 horas la biodegradación del sustrato es casi total. El rendimiento celular experimental fue del 23%. Por otro lado, el ajuste del modelo a los datos experimentales tiene un coeficiente de correlación promedio de 0.97585.

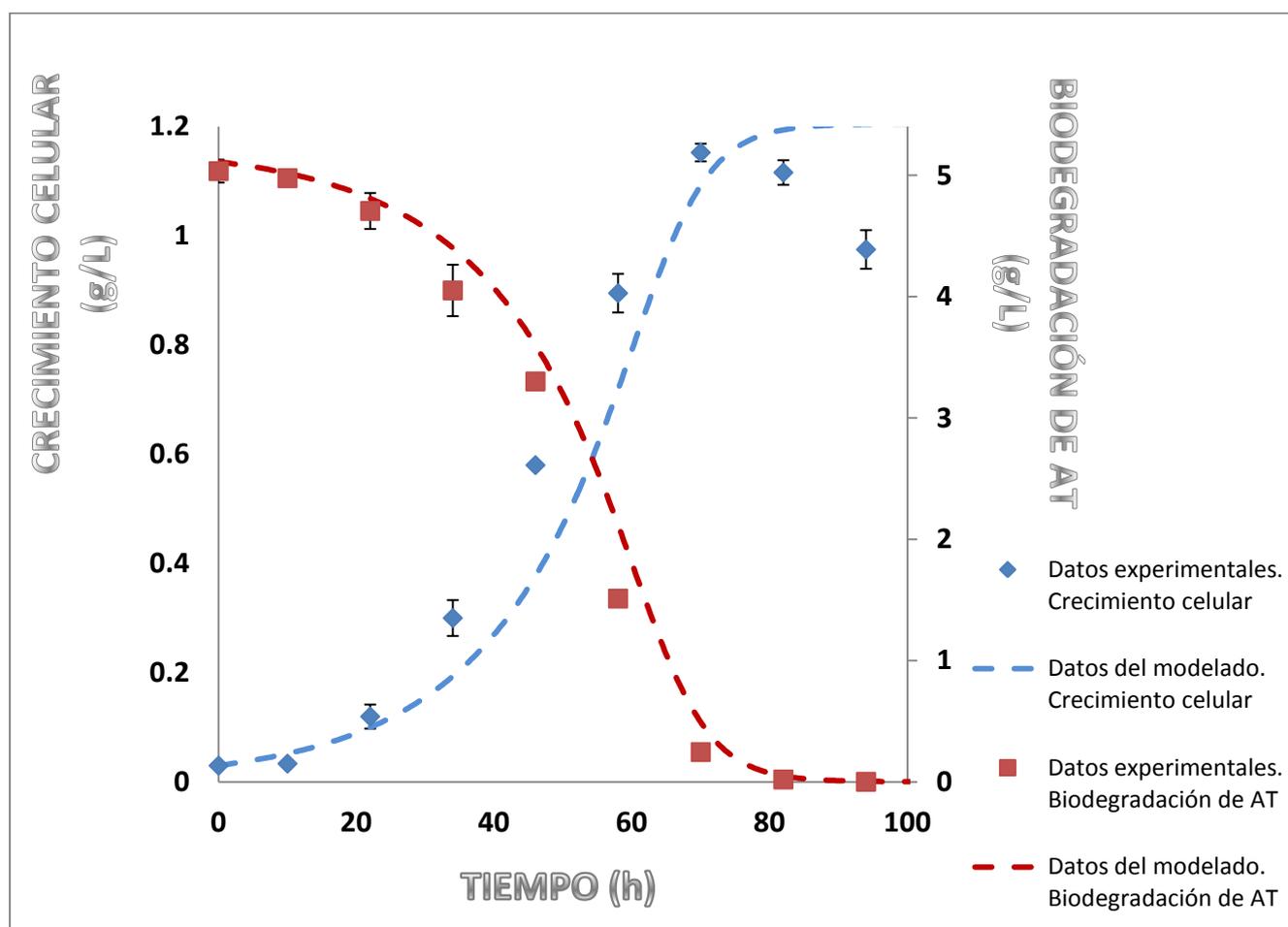


Figura 5-21. Cinética de biodegradación de AT y crecimiento celular a 5.035 g/L de sustrato inicial

Con una concentración de sustrato de 7.1 g/L (Figura 5-22) como se esperaba, la concentración de biomasa máxima aumento y fue de 1.5 +/- 0.035 g/L, en comparación con el sistema anterior de 5.035 g/L la velocidad específica de crecimiento celular fue más baja 0.047 +/- 0.00059 h^{-1} al igual que la velocidad de consumo con un valor de 0.04 +/- 0.001 h^{-1} , a las 124 horas no se detecta concentración de ácido tereftálico en el medio de cultivo. El rendimiento celular disminuyo siendo del 21%. El ajuste del modelo a los datos obtenidos experimentalmente tiene una correlación promedio de 0.944.

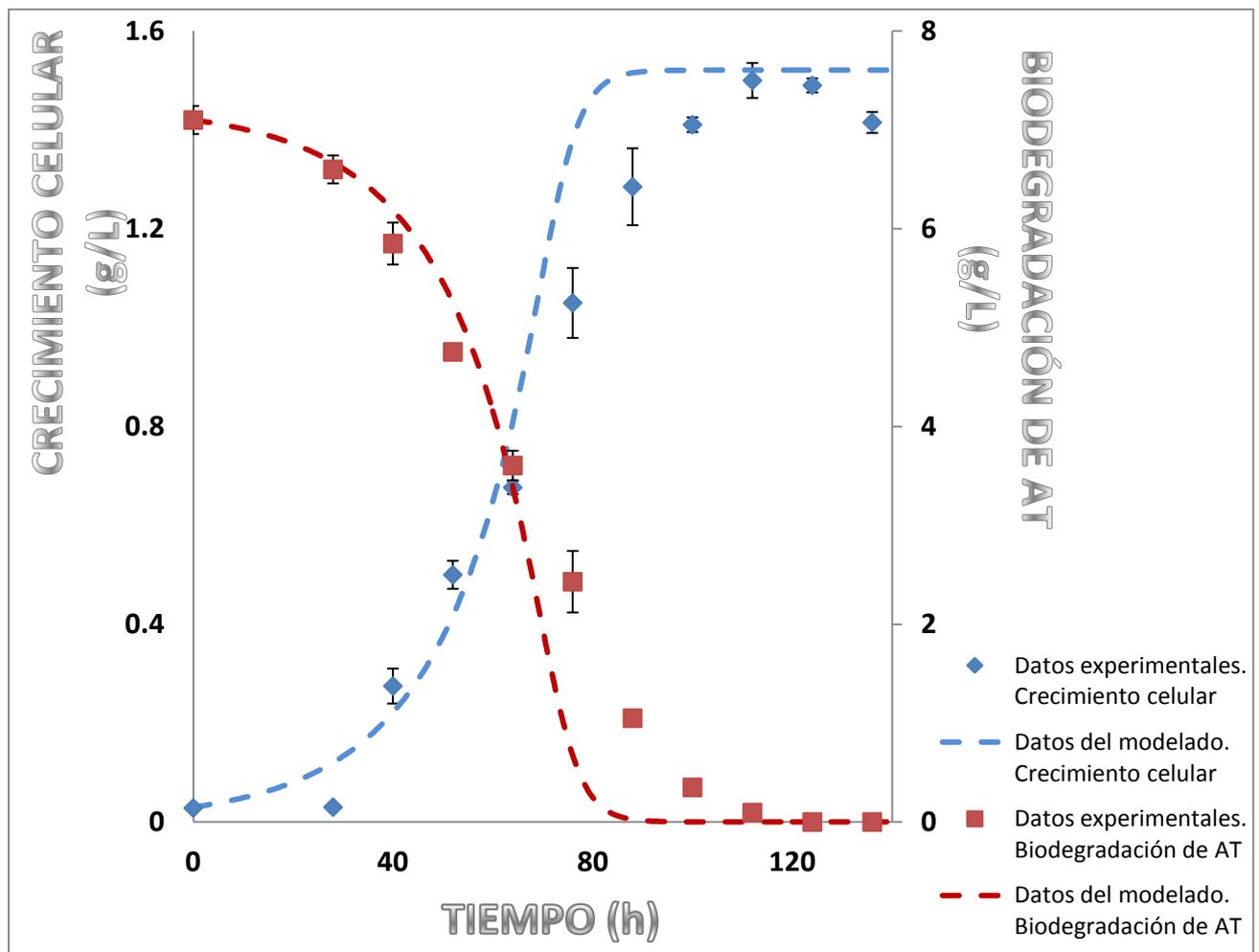


Figura 5-22. Cinética de biodegradación de AT y crecimiento celular a 7.1 g/L de sustrato inicial

Evaluando las cinéticas de biodegradación de ácido tereftálico con una concentración de 9.7 g/L (Figura 5-23) se observó que aunque fue una concentración alta la biodegradación es total a las 148 horas después de la inoculación. El rendimiento celular disminuyó considerablemente siendo del 17% a pesar de que hubo incremento en la biomasa ya que la concentración máxima de células fue de 1.69 ± 0.021 g/. La velocidad específica de crecimiento celular disminuyó en comparación de los medios de cultivo con una concentración de ácido tereftálico de 5.035 y 7.1 g/L, este valor fue de 0.042 ± 0.00031 h^{-1} y la velocidad de consumo al igual que la velocidad de crecimiento disminuyó con un valor de 0.036 ± 0.00063 h^{-1} . El ajuste del modelo a los datos experimentales tiene una correlación promedio de 0.93139.

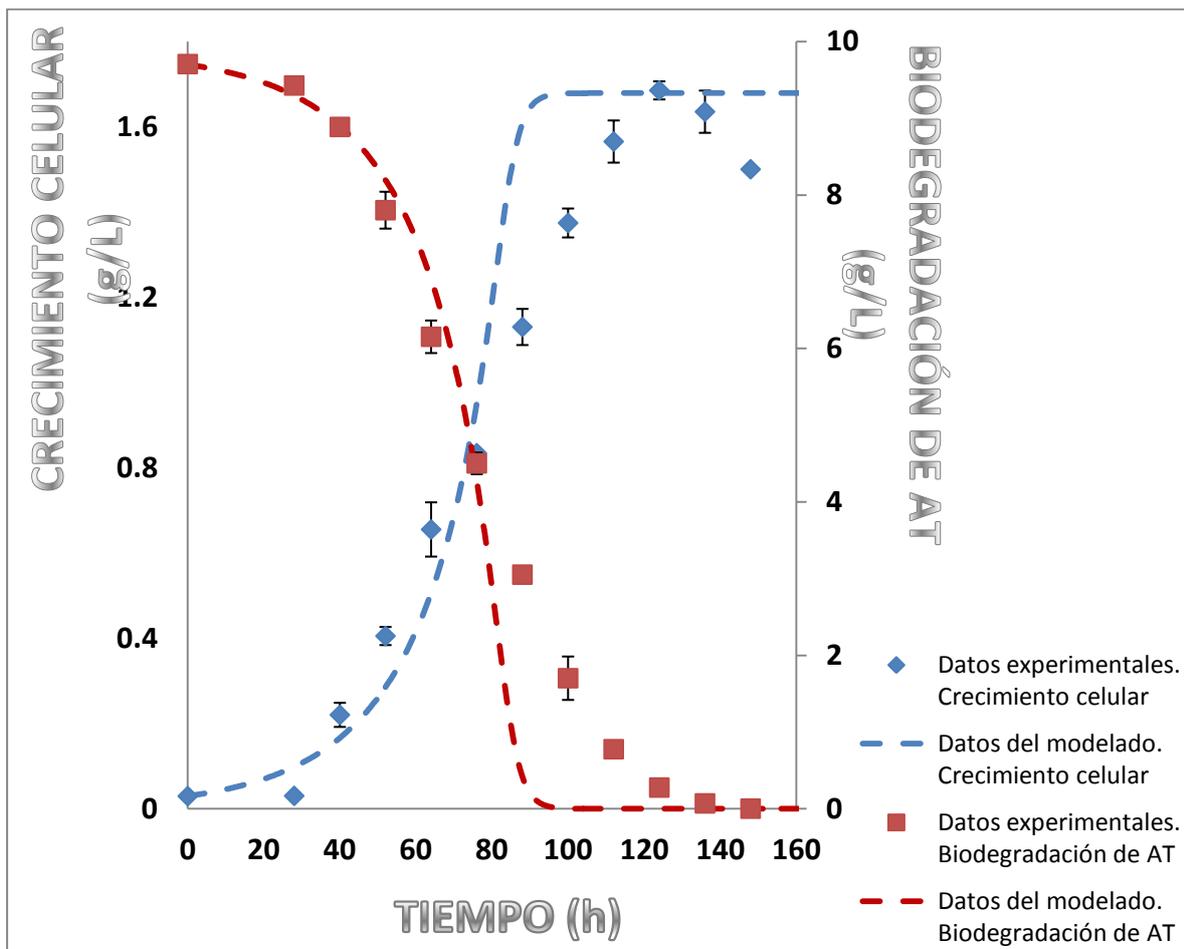


Figura 5-23. Cinética de biodegradación de AT y crecimiento celular a 9.7 g/L de sustrato inicial

Analizando los datos experimentales de las cinéticas de biodegradación de ácido tereftálico con una concentración de 14.5 g/L (Figura 5-24) que fue la concentración de sustrato más alta probada se observó que también hubo biodegradación total de AT a las 212 horas después de la inoculación sin embargo el rendimiento celular disminuye aun más que en el medio de cultivo anterior siendo del 15% a pesar de que hay incremento en la biomasa siendo la concentración celular más alta registrada de todas las cinéticas con un valor de 2.25 ± 0.071 g/L. La velocidad específica de crecimiento disminuye siendo la más baja con valor de 0.031 ± 0.00092 h^{-1} al igual que existe disminución en la velocidad específica de consumo 0.032 ± 0.00032 h^{-1} . El ajuste del modelo a los datos obtenidos experimentalmente tiene un coeficiente de correlación promedio de 0.94156.

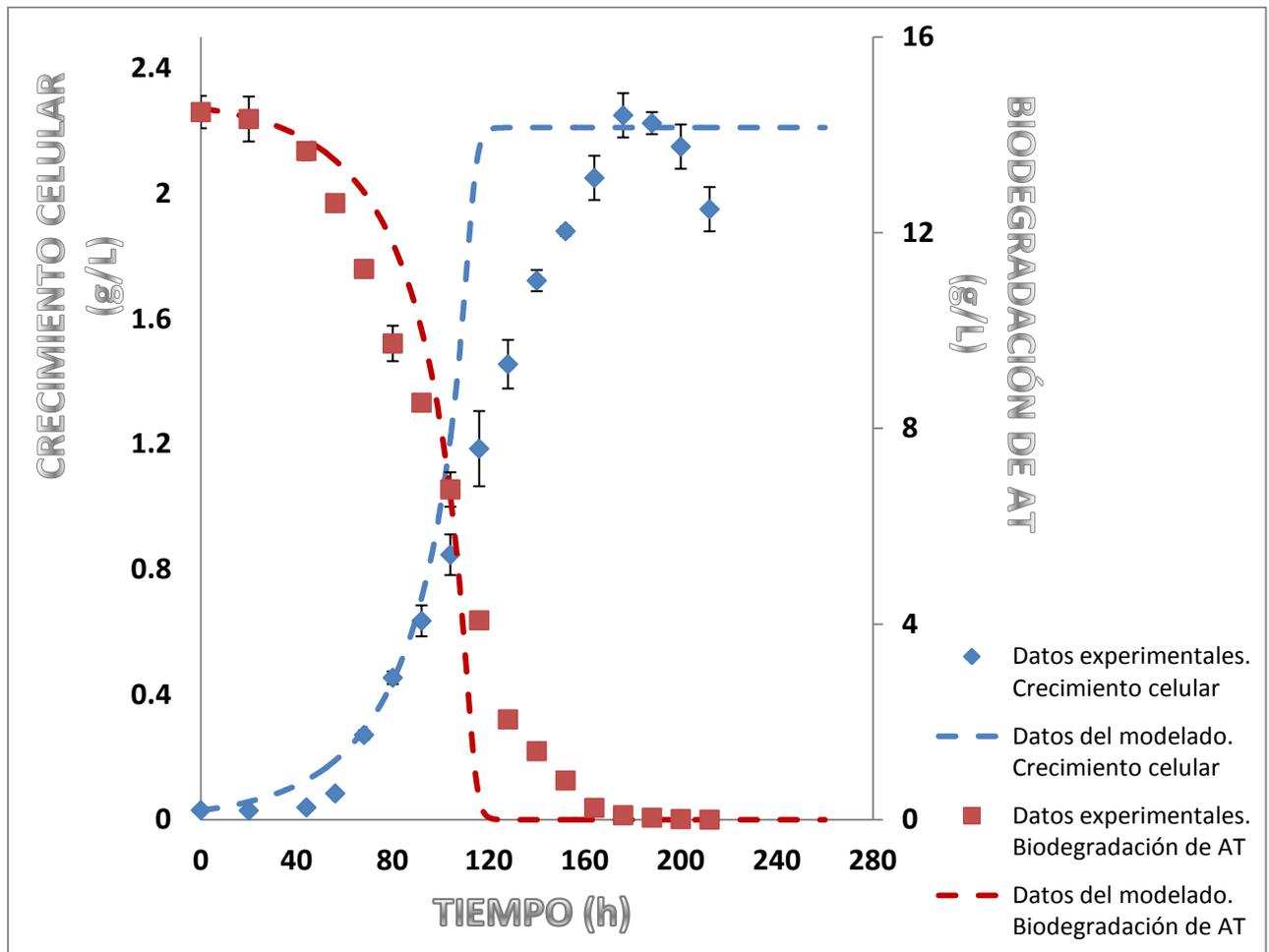


Figura 5-24. Cinética de biodegradación de AT y crecimiento celular a 14.5 g/L de sustrato inicial

Como se corroboró experimentalmente mientras más sustrato se le agregó al medio de cultivo se generaba más concentración de biomasa, esto implicaba que los medios del cultivo se tornaran cada vez más rojizos (Figura 5-25) se sabe que el género *Rhodococcus* forma pigmentos caroteinados y dependiendo de su especie forma el compuesto β -caroteno, γ -caroteno u otros compuestos caroteinados (Ichiyama *et al.*, 1989).



Figura 5-25. Coloración formada por algún tipo de pigmento caroteinado en las cinéticas de biodegradación y crecimiento celular a distintas concentraciones de sustrato

5.5.1. Rendimiento celular ($Y_{x/s}$)

El rendimiento celular experimental (Figura 5-26) se calculó como se menciona en la sección 4.3 de materiales y métodos para cada cinética de biodegradación y crecimiento celular a distintas concentraciones de sustrato, en la gráfica se observa un rendimiento constante en los medios de cultivo con concentraciones de sustrato de 3, 4 y 5.1 g/L, con concentraciones de ácido tereftálico mayores (7.1, 9.7 y 14.5) g/L el rendimiento disminuye siendo el más bajo a la concentración más alta de sustrato.

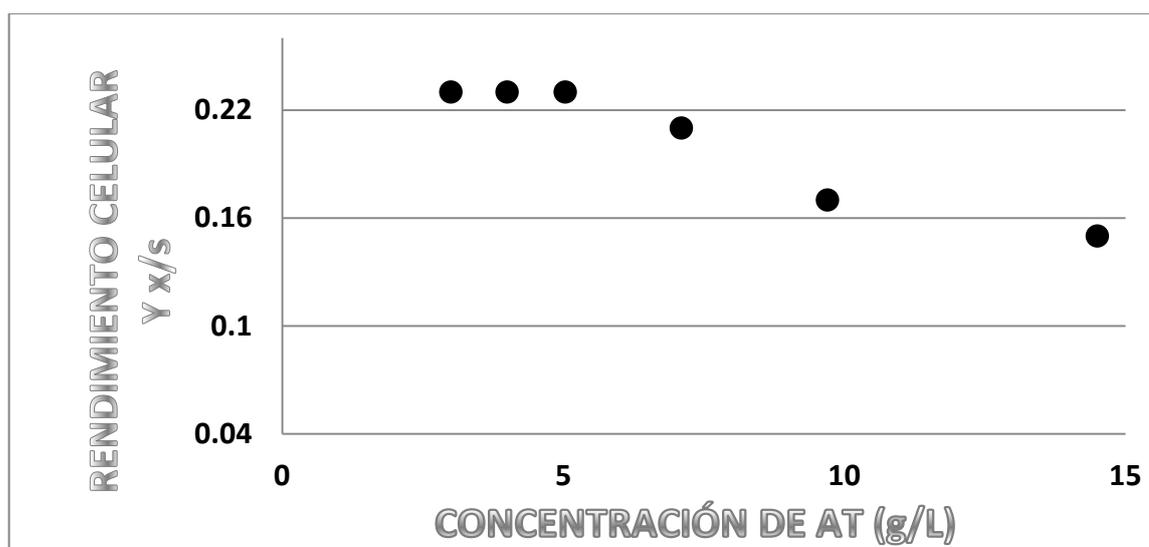
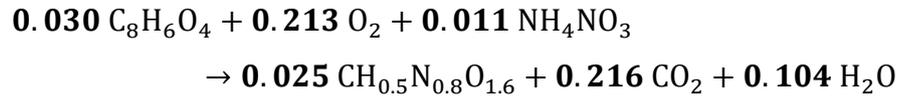


Figura 5-26. Rendimiento celular experimental en las cinéticas de biodegradación a distintas concentraciones de sustrato

Para la obtención del rendimiento teórico para una concentración de sustrato de 5 g/L y una concentración de Nitrato de amonio de 0.814 g/L, se balanceó la siguiente ecuación por el método algebraico, la fórmula reducida de la biomasa pertenece al microorganismo *Escherichia Coli* ya que no se encontró la fórmula reducida de *Rhodococcus sp.*



Con los números de moles obtenidos de la ecuación se calculó la concentración de biomasa generada, la concentración de O_2 que se requirió para llevar a cabo la reacción y las concentraciones de CO_2 y H_2O que se generaron (Tabla 5-4).

Tabla 5-4. Concentraciones de las moléculas que participan en la reacción

<i>Moléculas de la reacción</i>	<i>Concentración (g/L)</i>
$\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_4$ inicial	5
NH_4NO_3 inicial	0.814
O_2 que se requiere	6.8
$\text{CH}_{0.5}\text{N}_{0.8}\text{O}_{1.6}$ generada	1.305
CO_2 producido	9.48
H_2O producida	1.87

El rendimiento teórico celular se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Rendimiento celular} = \left(\frac{1.305 \text{ gB/L}}{5 \text{ gS/L}} \right) = 0.26$$

Para todas las concentraciones de sustrato la ecuación se balanceó para obtener la biomasa teórica que se debió generar en cada sistema y mantener constante el rendimiento de 0.26 (Tabla 5-5) en donde se muestra una comparación con la concentración de biomasa y los rendimientos generados experimentalmente con los teóricos.

Tabla 5-5. Biomasa generada y rendimientos experimentales vs teóricos

Concentración de AT (g/L)	Biomasa generada experimentalmente (g/L)	Rendimiento experimental $Y_{X/S}^{exp}$	Biomasa teórica (g/L)	Rendimiento teórico $Y_{X/S}^t$
3	0.685 +- 0.007	0.23	0.783	0.26
4	0.91 +- 0.015	0.23	1.04	0.26
5.035	1.15 +- 0.016	0.23	1.28	0.26
7.1	1.5 +- 0.035	0.21	1.8	0.26
9.7	1.69 +- 0.021	0.17	2.44	0.26
14.5	2.25 +- 0.071	0.15	3.8	0.26

Como se observa, mientras más sustrato se le agregó al medio de cultivo más biomasa produjo, la baja en el rendimiento experimental pudo deberse a la inhibición por concentración de sustrato que se presenta en los sistemas a altas concentraciones de ácido tereftálico, aún así, como se comprueba en las cinéticas de biodegradación y crecimiento celular, en todos los medios de cultivo probados hubo biodegradación total de AT.

5.6. Caracterización molecular del microorganismo al finalizar las cinéticas de biodegradación de ácido tereftálico y crecimiento celular

Para comprobar que la biodegradación de ácido tereftálico y crecimiento celular se llevó a cabo por el microorganismo *Rhodococcus sp*, al finalizar las cinéticas a distintas concentraciones de sustrato se extrajo DNA el cual posteriormente se amplificó por PCR.

Una vez amplificado el DNA los productos de PCR purificados se secuenciaron, secuencias que identificaron al microorganismo degradador de AT para cada cinética de biodegradación y crecimiento celular (Tabla 5-6) con ayuda de la base de datos del Centro Nacional de Investigación Biotecnológica. Las secuencias completas se encuentran en el anexo 2.

Tabla 5-6. Caracterización molecular del microorganismo al finalizar las cinéticas de biodegradación y crecimiento celular

<i>[CAT](g/L)</i>	<i>Microorganismo identificado</i>	<i>Similitud (%)</i>
3	<i>Rhodococcus sp.</i>	100
4	<i>Rhodococcus sp.</i>	100
5.035	<i>Rhodococcus sp.</i>	100
7.1	<i>Rhodococcus sp.</i>	100
9.7	<i>Rhodococcus sp.</i>	100
14.5	<i>Rhodococcus sp.</i>	100

6. CONCLUSIONES

1. Los microorganismo degradadores de ácido tereftálico tipo A y B fueron identificados por medio del gen 16S rDNA como *Arthrobacter sp.* y *Rhodococcus sp.* respectivamente, además, por medio del análisis microscópico se determinó la morfología celular que confirmó la identidad de ambas especies.
2. *Arthrobacter sp.* tuvo muy poco crecimiento en medio de cultivo sólido de AT con una concentración de sustrato de 5 g/L en los distintos pHs (5, 6, 7, 8, 9 y 10) y temperaturas de incubación (20, 30 y 37 °C) probadas, por lo que se considera que 5 g/L no es una concentración de sustrato favorable para el óptimo crecimiento de esta cepa, es por esto que no se realizaron cinéticas de crecimiento celular y biodegradación de AT con este microorganismo.
3. *Rhodococcus sp.* tuvo excelente crecimiento en medio de cultivo sólido de ácido tereftálico con una concentración de sustrato de 5 g/L en pHs de 5, 6, 7, 8, 9, 10 y temperaturas de incubación de (20, 30 y 37)°C.
4. El pH óptimo y la agitación ideal se encontró por medio de la velocidad específica de crecimiento celular, la velocidad de crecimiento más alta fue de 0.059 h^{-1} e indicó que el pH y la agitación ideal es de 7 y 200 rpm.
5. *Rhodococcus sp.* degradó totalmente concentraciones de ácido tereftálico de 3, 4, 5.035, 7.1, 9.7 y 14.5 g/L. La velocidad específica de crecimiento presentó un máximo en el medio de cultivo perteneciente a una concentración de sustrato de 5 g/L siendo de $0.059 \pm 0.00006 \text{ h}^{-1}$ con una velocidad específica de consumo de $0.077 \pm 0.00093 \text{ h}^{-1}$, a concentraciones superiores a 5 g/L de ácido tereftálico (7.1, 9.7 y 14.5)g/L la velocidad específica de crecimiento celular fue disminuyendo al igual que la velocidad específica de consumo. La disminución en la velocidad específica de crecimiento nos indica inhibición por concentración de sustrato.
6. Con la ecuación de inhibición por sustrato de Andrews se determinaron los parámetros de Velocidad máxima siendo de 0.2 h^{-1} , la constante de saturación fue de 5 gS/L y la constante de inhibición de 3 gS/L.

7. El rendimiento celular teórico fue de 0.26 gBiomasa/gSustrato mientras que experimentalmente en las cinéticas de biodegradación y crecimiento celular para concentraciones de sustrato de 3, 4 y 5.035 g/L el rendimiento se mantuvo en 0.23 gBiomasa/gSustrato sin embargo, en los sistemas de 7.1, 9.7 y 14.5 g/L el rendimiento disminuyó considerablemente debido a la inhibición por concentración de sustrato que se presentó.

7. PERSPECTIVAS PARA TRABAJOS FUTUROS

Rhodococcus sp.

1. Analizar los flujos metabólicos lo cual permitirá la cuantificación de los flujos intracelulares del metabolismo central de *Rhodococcus sp.* proveyendo una visión completa del mismo y así optimizar la biodegradación de AT.
2. Identificar el gen o los genes involucrados en la biodegradación de ácido tereftálico
3. Establecer rutas metabólicas por los productos que genere la biodegradación y por las enzimas responsables de la biodegradación y así corroborar estas rutas metabólicas con otras existentes en bibliografía.
4. Escalar a biorreactor y optimizar la biodegradación de AT

Arthrobacter sp.

1. Optimizar la biodegradación de ácido tereftálico a distintas concentraciones de sustrato con el fin de determinar la máxima concentración que *Arthrobacter sp.* pueda biodegradar.

8. REFERENCIAS

- Abuhamed T, Bayraktar E, Mehmetoglu T, Mehmetoglu Ü. 2004. Kinetics model for growth of *Pseudomonas putida* F1 during benzene, toluene and phenol biodegradation. *Process Biochemistry* 39(8):983-988.
- Aleshchenkova ZM, Samsonova AS, Semochikina NF, Baikova SV, Tolstolutskaia LI. 1997. Utilization of isophthalic acid esters by rhodococci. *Trad. de : Mikrobiologiya* 66(5):556-600.
- ALFA SABdCV. 2011. Presentación corporativa. México: www.alfa.com.mx.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25(17):3389-3402.
- Andrews JF. 1968. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. *Biotechnology and Bioengineering* 10(6):707-723.
- Atkins PW. 2003. *Chemistry and Industry: Atkins' molecules* Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press. 244 p.
- Autian J. 1973. Toxicity and health threats of phthalate esters: review of the literature. *Environ Health Perspect* 4:3-26.
- Bartles JR, Khuon S, Lin X, Zhang L, Reddy JK, Rao MS, Isoye ST, Nehme CL, Fayos BE. 1990. Peroxisome Proliferator-induced Alterations in the Expression and Modification of Rat Hepatocyte Plasma Membrane Proteins. *Cancer Research* 50(3):669-676.
- Bell, Philp, Aw, Christofi. 1998. The genus *Rhodococcus*. *Journal of Applied Microbiology* 85(2):195-210.
- Bergey DH, Holt JG. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins. xviii, 787 p. p.
- Beyer H, Walter W. 1997. *Beyer/Walter organic chemistry : a comprehensive degree text and source book*. Chichester: Albion Pub. xx, 1037 p. p.
- BIBRA. 1986. A 21 feeding study of di-n-butyl phthalate to rats: Effects on the liver and liver lipids. Report to chemical manufacturers association. Carshalton, Surrey, UK.
- Bolivar FG. 2007. *Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna*. Ciudad de México, México: El Colegio Nacional. 599-621 p.
- Brown D, Butterworth KR, Gaunt IF, Grasso P, Gangolli SD. 1978. Short-term oral toxicity study of diethyl phthalate in the rat. *Food and Cosmetics Toxicology* 16(5):415-422.
- Chang BV, Liao CS, Yuan SY. 2005. Anaerobic degradation of diethyl phthalate, di-n-butyl phthalate, and di-(2-ethylhexyl) phthalate from river sediment in Taiwan. *Chemosphere* 58(11):1601-1607.
- Chang BV, Yang CM, Cheng CH, Yuan SY. 2004. Biodegradation of phthalate esters by two bacteria strains. *Chemosphere* 55(4):533-538.
- Chang H-K, Zylstra GJ. 1998. Novel Organization of the Genes for Phthalate Degradation from *Burkholderia cepacia* DBO1. *J. Bacteriol.* 180(24):6529-6537.
- Chapin RE, Gray TJB, Phelps JL, Dutton SL. 1988. The effects of mono-(2-ethylhexyl)-phthalate on rat Sertoli cell-enriched primary cultures. *Toxicology and Applied Pharmacology* 92(3):467-479.
- Chatterjee S, Dutta TK. 2003. Metabolism of butyl benzyl phthalate by *Gordonia* sp. strain MTCC 4818. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 309(1):36-43.
- Choi KY, Kim D, Sul WJ, Chae J-C, Zylstra GJ, Kim YM, Kim E. 2005. Molecular and biochemical analysis of phthalate and terephthalate degradation by *Rhodococcus* sp. strain DK17. *FEMS Microbiology Letters* 252(2):207-213.
- Dai G, Cui L, Song L, Cheng J, Zhong Y, Zhao R, Wang X. 2005. Bladder epithelial cell proliferation of rats induced by terephthalic acid-calculi. *Food and Chemical Toxicology* 43(2):217-224.
- Davis BJ, Maronpot RR, Heindel JJ. 1994. Di-(2-ethylhexyl) Phthalate Suppresses Estradiol and Ovulation in Cycling Rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 128(2):216-223.

- Den Hond E, Schoeters G. 2006. Endocrine disrupters and human puberty. *Int J Androl* 29(1):264-71; discussion 286-90.
- Díaz E. 2004. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *International Microbiology* 7:173-180.
- Dillingham EO, Autian J. 1973. Teratogenicity, mutagenicity, and cellular toxicity of phthalate esters. *Environ Health Perspect* 3:81-9.
- Droste RL. 1997. Theory and practice of water and wastewater treatment. New York: J. Wiley. xiv, 800 p. p.
- Eaton RW. 2001. Plasmid-Encoded Phthalate Catabolic Pathway in *Arthrobacter keyseri* 12B. *J. Bacteriol.* 183(12):3689-3703.
- Eaton RW, Ribbons DW. 1982. Metabolism of dimethylphthalate by *Micrococcus* sp. strain 12B. *J. Bacteriol.* 151(1):465-467.
- Ejlertsson J, Svensson BH. 1996. Degradation of bis(2-ethylhexyl) phthalate constituents under methanogenic conditions. *Biodegradation* 7(6):501-506.
- Emerson WS, Lucas VE, Heimsch RA. 1949. The Preparation of Aromatic Acids by Liquid Phase Oxidation. *Journal of the American Chemical Society* 71(5):1742-1743.
- Evans WC. 1955. The early intermediate formed in the oxidative metabolism of phthalic acid by certain soil bacteria. *Biochem* 61:x.
- Fernández A. 2004. Las sustancias tóxicas persistentes en México. *Ecología INd*, editor. Ciudad de México. 257 p.
- Galindo CP, Garibay OC. 2005. Efecto de la fuente de carbono y del ácido tereftálico a través del tiempo en la comunidad microbiana de distintos inóculos. In: UPIBI, editor. Ciudad de México, México: Departamento de Bioprocesos-UPIBI.
- Ganning AE, Olsson MJ, Brunk U, Dallner G. 1990. Effects of Prolonged Treatment with Phthalate Ester on Rat Liver. *Pharmacology & Toxicology* 67(5):392-401.
- Gee JC, Rosenfeld JI, Bartos TM; Amoco Corporation, Chicago Ill, assignee. 1993. Process for preparation of crude terephthalic acid suitable for reduction to prepare purified terephthalic acid. United States
- Gerbracht U, Einig C, Oesterle D, Deml E, Schlatterer B, Eigenbrodt E. 1990. Di(2-ethylhexyl)phthalate alters carbohydrate enzyme activities and foci incidence in rat liver. *Carcinogenesis* 11(12):2111-2115.
- Gesler RM. 1973. Toxicology of di-2-ethylhexyl phthalate and other phthalic acid ester plasticizers. *Environ Health Perspect* 3:73-9.
- Gray LE, Jr., Wolf C, Lambright C, Mann P, Price M, Cooper RL, Ostby J. 1999. Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, iprodione, chlozolinate, p,p'-DDE, and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl- and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat. *Toxicol Ind Health* 15(1-2):94-118.
- Gray LE, Ostby J, Furr J, Price M, Veeramachaneni DNR, Parks L. 2000. Perinatal Exposure to the Phthalates DEHP, BBP, and DINP, but Not DEP, DMP, or DOTP, Alters Sexual Differentiation of the Male Rat. *Toxicological Sciences* 58(2):350-365.
- Grifoll M, Selifonov SA, Chapman PJ. 1994. Evidence for a novel pathway in the degradation of fluorene by *Pseudomonas* sp. strain F274. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(7):2438-2449.
- Gu J-D. 2007. Microbial colonization of polymeric materials for space applications and mechanisms of biodeterioration: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation* 59(3):170-179.
- Hara H, Eltis LD, Davies JE, Mohn WW. 2007. Transcriptomic Analysis Reveals a Bifurcated Terephthalate Degradation Pathway in *Rhodococcus* sp. Strain RHA1. *J. Bacteriol.* 189(5):1641-1647.
- Heck Hd, Tyl RW. 1985. The induction of bladder stones by terephthalic acid, dimethyl terephthalate, and melamine (2,4,6-triamino-s-triazine) and its relevance to risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 5(3):294-313.
- Ichiyama S, Shimokata K, Tsukamura M. 1989. Carotenoid pigments of genus *Rhodococcus*. *Microbiol Immunol* 33(6):503-8.

- INEGI INdEyG-. 2011. La industria química en México 2010, serie estadísticas sectoriales. México.
- Ito R, Seshimo F, Haishima Y, Hasegawa C, Isama K, Yagami T, Nakahashi K, Yamazaki H, Inoue K, Yoshimura Y and others. 2005. Reducing the migration of di-2-ethylhexyl phthalate from polyvinyl chloride medical devices. *International Journal of Pharmaceutics* 303(1-2):104-112.
- Jackson M, Labeda D, Becker L. 1996. Isolation for bacteria and fungi for the hydrolysis of phthalate and terephthalate esters. *Journal of Industrial Microbiology* 16:301-304.
- Jaeger RJ, Rubin RJ. 1970. Plasticizers from Plastic Devices: Extraction, Metabolism, and Accumulation by Biological Systems. *Science* 170(3956):460-462.
- Jiménez BE. 2002. Contaminación ambiental en México: Limusa. 925 p.
- Kawano M. 1980. [Toxicological studies on phthalate esters. 2. Metabolism, accumulation and excretion of phthalate esters in rats (author's transl)]. *Nippon Eiseigaku Zasshi* 35(4):693-701.
- Keyser P, Pujar BG, Eaton RW, Ribbons DW. 1976. Biodegradation of the phthalates and their esters by bacteria. *Environ Health Perspect* 18:159-66.
- Kimura T, Ito Y. 2001. Two bacterial mixed culture systems suitable for degrading terephthalate in wastewater. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 91(4):416-418.
- Kingsley JP, Roby AK, Litz LM; Praxair Technology, Inc., Danbury, Conn., assignee. 1994. Terephthalic acid production. United States.
- Kleerebezem R, Hulshoff Pol LW, Lettinga G. 1999a. Anaerobic biodegradability of phthalic acid isomers and related compounds. *Biodegradation* 10(1):63-73.
- Kleerebezem R, Pol LWH, Lettinga G. 1999b. Anaerobic Degradation of Phthalate Isomers by Methanogenic Consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(3):1152-1160.
- Koch HM, Drexler H, Angerer J. 2003. An estimation of the daily intake of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and other phthalates in the general population. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 206(2):77-83.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC. 1997. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Philadelphia, PA: Lippincott Publishers. xv, 1395 p. p.
- Lamb JC, Chapin RE, Teague J, Davis Lawton A, Reel JR. 1987. Reproductive effects of four phthalic acid esters in the mouse. *Toxicology and Applied Pharmacology* 88(2):255-269.
- Larkin MJ, Kulakov LA, Allen CCR. 2005. Biodegradation and *Rhodococcus* - masters of catabolic versatility. *Current Opinion in Biotechnology* 16(3):282-290.
- Larkin MJ, Kulakov LA, Allen CCR. 2006. Biodegradation by Members of the Genus *Rhodococcus*: Biochemistry, Physiology, and Genetic Adaptation. In: Allen I, Laskin SS, Geoffrey MG, editors. *Advances in Applied Microbiology*: Academic Press. p 1-29.
- Latini G. 2005. Monitoring phthalate exposure in humans. *Clinica Chimica Acta* 361(1-2):20-29.
- Lerda D. 1998. Estudio de la genotoxicidad de los compuestos del polietilenglicol tereftalato (PET): Dimetiltereftalato (DMT) y ácido tereftálico (TPA). *Acta toxicol. Argent.* 6(1):11-13.
- Li J, Gu J-D. 2006. Biodegradation of dimethyl terephthalate by *Pasteurella multocida*; Sa follows an alternative biochemical pathway. *Ecotoxicology* 15(4):391-397.
- Li J, Gu J-D. 2007. Complete degradation of dimethyl isophthalate requires the biochemical cooperation between *Klebsiella oxytoca* Sc and *Methylobacterium mesophilicum* Sr Isolated from Wetland sediment. *Science of The Total Environment* 380(1-3):181-187.
- Li J, Gu J-D, Pan L. 2005. Transformation of dimethyl phthalate, dimethyl isophthalate and dimethyl terephthalate by *Rhodococcus ruber* Sa and modeling the processes using the modified Gompertz model. *International Biodeterioration & Biodegradation* 55(3):223-232.
- Li L-H, Jester WF, Orth JM. 1998. Effects of Relatively Low Levels of Mono-(2-Ethylhexyl) Phthalate on Cocultured Sertoli Cells and Gonocytes from Neonatal Rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 153(2):258-265.
- Liss SN, Baker KH. 1994. Anoxic/Anaerobic Biorremediation. United States: Mc Graw Hill. 297-313 p.

- Lu Y, Tang F, Wang Y, Zhao J, Zeng X, Luo Q, Wang L. 2009. Biodegradation of dimethyl phthalate, diethyl phthalate and di-n-butyl phthalate by *Rhodococcus* sp. L4 isolated from activated sludge. *Journal of Hazardous Materials* 168(2-3):938-943.
- MacFaddin JF. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica: Médica panamericana.
- Mann AH, Price SC, Mitchell FE, Grasso P, Hinton RH, Bridges JW. 1985. Comparison of the short-term effects of di(2-ethylhexyl) phthalate, di(n-hexyl) phthalate, and di(n-octyl) phthalate in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 77(1):116-132.
- Marsman D. 1995. NTP technical report on the toxicity studies of Dibutyl Phthalate (CAS No. 84-74-2) Administered in Feed to F344/N Rats and B6C3F1 Mice. *Toxic Rep Ser* 30:1-G5.
- Martínez EM. 2009. Identificación de microorganismos involucrados en la remoción de ácido tereftálico por técnicas de biología molecular. Ciudad de México, México: UPIBI. 59 p.
- Martínková L, Uhnáková B, Pátek M, Nesvera J, Kren V. 2009. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environment International* 35(1):162-177.
- Mathews CK, Van Holde KE, Ahern KG. 2000. *Biochemistry*. San Francisco, Calif.: Benjamin Cummings. xxviii, 1186 p. p.
- Mejía GM. 1996. Digestión Anaerobia, Volumen 1. In: Yucatán UAd, editor. Mérida, Yucatán, México.
- Méndez R, Vidal G, Lorber KE, Márquez F. 2007. Producción limpia en la industria de curtiembre: Servicio de publicaciones e intercambio científico. 401 p.
- Moraes MdLL, Rubim JC, Realpozo RR, Tavares MFM. 2004. Analysis of impurities in crude and highly-purified terephthalic acid by capillary electrophoresis. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 15(3):400-406.
- Morrissey RE, Lamb JC, Morris RW, Chapin RE, Gulati DK, Heindel JJ. 1989. Results and evaluations of 48 continuous breeding reproduction studies conducted in mice. *Fundamental and Applied Toxicology* 13(4):747-777.
- Muhlenkamp CR, Gill SS. 1998. A Glucose-Regulated Protein, GRP58, Is Down-Regulated in C57B6 Mouse Liver after Diethylhexyl Phthalate Exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology* 148(1):101-108.
- Murakami K, Nishiyama K, Higuti T. 1986. Toxicity of dibutyl phthalate and its metabolites in rats. *Nippon Eiseigaku Zasshi* 41(4):775-81.
- Nalli S, Cooper DG, Nicell JA. 2002. Biodegradation of plasticizers by *Rhodococcus rhodochrous*. *Biodegradation* 13(5):343-352.
- Nomura Y, Harashima S, Oshima Y. 1989. A simple method for detection of enzyme activities involved in the initial step of phthalate degradation in microorganisms. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 67(4):291-296.
- O'Loughlin EJ, Sims GK, Traina SJ. 1999. Biodegradation of 2-methyl, 2-ethyl, and 2-hydroxypyridine by an *Arthrobacter* sp. isolated from subsurface sediment. *Biodegradation* 10(2):93-104.
- Palomares AE, Montañes MT, Mendoza JA. 1998. *Ciencia y tecnología del medio ambiente*. Valencia, España: Universidad Politécnica de Valencia. 241 p.
- Pan G, Hanaoka T, Yoshimura M, Zhang S, Wang P, Tsukino H, Inoue K, Nakazawa H, Tsugane S, Takahashi K. 2006. Decreased serum free testosterone in workers exposed to high levels of di-n-butyl phthalate (DBP) and di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP): a cross-sectional study in China. *Environ Health Perspect* 114(11):1643-8.
- Parés R, Juárez A. 1997. *Bioquímica de los microorganismos*. Barcelona, España: Reverté 224 p.
- Patel DS, Desai AJ, Desai JD. 1998. Biodegradation of dimethylterephthalate by *Comamonas acidovorans* D-4. *Indian J Exp Biol* 36(3):321-4.
- Patil N, Kundapur R, Shouche Y, Karegoudar T. 2006. Degradation of a Plasticizer, di-n-Butylphthalate by *Delftia* sp. TBKNP-05. *Current Microbiology* 52(3):225-230.

- Poon R, Lecavalier P, Mueller R, Valli VE, Procter BG, Chu I. 1997. Subchronic oral toxicity of di-n-octyl phthalate and di(2-ethylhexyl) phthalate in the rat. *Food and Chemical Toxicology* 35(2):225-239.
- Qiu Y-L, Sekiguchi Y, Imachi H, Kamagata Y, Tseng I-C, Cheng S-S, Ohashi A, Harada H. 2004. Identification and Isolation of Anaerobic, Syntrophic Phthalate Isomer-Degrading Microbes from Methanogenic Sludges Treating Wastewater from Terephthalate Manufacturing. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(3):1617-1626.
- Quan CS, Liu Q, Tian WJ, Kikuchi J, Fan SD. 2005. Biodegradation of an endocrine-disrupting chemical, di-2-ethylhexyl phthalate, by *Bacillus subtilis*; No. 66. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66(6):702-710.
- Rao MS, Yealdani AV, Subbarao V. 1990. Quantitative analysis of hepatocellular lesions induced by di (2-ethylhexyl) phthalate in F-344 rats. *Toxicol. Environ. Health* 30:85-89.
- Ríos MM. 2010. Producción de inóculos para incrementar la producción de cultivos de carica papaya. Ciudad de México: UPIBI. 81 p.
- Ritter EJ, Scott WJ, Randall JL, Ritter JM. 1987. Teratogenicity of di(2-ethylhexyl) phthalate, 2-ethylhexanol, 2-ethylhexanoic acid, and valproic acid, and potentiation by caffeine. *Teratology* 35(1):41-46.
- Rosas RL. 2010. Identificación de microorganismos de sedimentos de ventilas. Ciudad de México, México: UPIBI.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez N, Sandoval A, Díaz-Corrales, Serrano J. 2004. El género *Rhodococcus*. Una revisión didáctica. *Revista de la sociedad venezolana de microbiología* 24:1-2.
- Sasoh M, Masai E, Ishibashi S, Hara H, Kamimura N, Miyauchi K, Fukuda M. 2006. Characterization of the Terephthalate Degradation Genes of *Comamonas* sp. Strain E6. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(3):1825-1832.
- Schilling K, Kaufman W, Hildebrand B. 1992. Study on the oral toxicity of dibutyl phthalate in wistar rats-administration via the diet over 3 months. Microfiche NO. OTS0535640; Document ID 86-920000903. Ludwigshafen, Germany: BASF Corporation.
- SENER SdE-. 2008. Anuario Estadístico de la Industria Petroquímica 2007. México.
- Shafaei A, Nikazar M, Arami M. 2010. Photocatalytic degradation of terephthalic acid using titania and zinc oxide photocatalysts: Comparative study. *Desalination* 252(1-3):8-16.
- Sharma A, Bardhan D, Patel R. 2009. Optimization of physical parameters for lipase production from *Arthrobacter* sp. BGCC#490. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* 46:178-183.
- Shigematsu T, Yumihara K, Ueda Y, Numaguchi M, Morimura S, Kida K. 2003. *Delftia tsuruhatensis* sp. nov., a terephthalate-assimilating bacterium isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53(5):1479-1483.
- Siles JA, Martín MA, Chica A, Borja R. 2008. Kinetic modelling of the anaerobic digestion of wastewater derived from the pressing of orange rind produced in orange juice manufacturing. *Chemical Engineering Journal* 140(1-3):145-156.
- Speight JG. 2002. Chemical and process design handbook. New York: McGraw-Hill. 1 v. (various pagings) p.
- Stingley RL, Brezna B, Khan AA, Cerniglia CE. 2004. Novel organization of genes in a phthalate degradation operon of *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Microbiology* 150(11):3749-3761.
- Sugimori D, Sekiguchi T. 2002. Bioconversion of terephthalate by resting cells of alkaliphilic *Dietzia* sp. strain GS-1. *Sen'i Gakkaishi* 58(5):188-190.
- Thiruvengatachari R, Kwon TO, Jun JC, Balaji S, Matheswaran M, Moon IS. 2007. Application of several advanced oxidation processes for the destruction of terephthalic acid (TPA). *J Hazard Mater* 142(1-2):308-14.
- Trinh Tan F, Cooper DG, Marić M, Nicell JA. 2008. Biodegradation of a synthetic co-polyester by aerobic mesophilic microorganisms. *Polymer Degradation and Stability* 93(8):1479-1485.

- Vamsee-Krishna C, Mohan Y, Phale P. 2006. Biodegradation of Phthalate Isomers by *Pseudomonas aeruginosa*, PP4, *Pseudomonas* sp. PPD and *Acinetobacter lwoffii*, ISP4. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72(6):1263-1269.
- Vamsee-Krishna C, Phale P. 2008. Bacterial degradation of phthalate isomers and their esters. *Indian Journal of Microbiology* 48(1):19-34.
- Walseth F, Toftgård R, Nilsen OG. 1982. Phthalate esters I: effects on cytochrome P-450 mediated metabolism in rat liver and lung, serum enzymatic activities and serum protein levels. *Archives of Toxicology* 50(1):1-10.
- Walter U, Beyer M, Klein J, Rehm HJ. 1991. Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. *Applied Microbiology and Biotechnology* 34(5):671-676.
- Wang Y, Fan Y, Gu JD. 2003. Microbial Degradation of the Endocrine-Disrupting Chemicals Phthalic Acid and Dimethyl Phthalate Ester Under Aerobic Conditions. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 71(4):0810-0818.
- Wang Y, Gu J-D. 2006. Degradability of dimethyl terephthalate by *Variovorax paradoxus*, T4 and *Sphingomonas yanoikuyae*, DOS01 isolated from deep-ocean sediments. *Ecotoxicology* 15(6):549-557.
- Wang YZ, Zhou Y, Zylstra GJ. 1995. Molecular analysis of isophthalate and terephthalate degradation by *Comamonas testosteroni* YZW-D. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 5:9-12.
- Weissermel K, Arpe H-J. 2003. *Industrial organic chemistry*. Weinheim ; New York: Wiley-VCH. xix, 491 p., [20] folded leaves of plates p.
- Wu C-H, Lo Y-S, Nian H-C, Lin Y-Y. 2003. Capillary electrophoretic analysis of the derivatives and isomers of benzoate and phthalate. *Journal of Chromatography A* 1003(1-2):179-187.
- Yan H, Pan G. 2004. Increase in biodegradation of dimethyl phthalate by *Closterium lunula* using inorganic carbon. *Chemosphere* 55(9):1281-1285.
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. 2000. A Greedy Algorithm for Aligning DNA Sequences. *Journal of Computational Biology* 7(1-2):203-214.
- Zheng Y, Yanful EK, Bassi AS. 2005. A Review of Plastic Waste Biodegradation. *Critical Reviews in Biotechnology* 25(4):243-250.
- Zhu J, Phillips SP, Feng Y-L, Yang X. 2006. Phthalate Esters in Human Milk: Concentration Variations over a 6-Month Postpartum Time. *Environmental Science & Technology* 40(17):5276-5281.
- Zylstra GJ, Olsen RH, Ballou DP. 1989a. Cloning, expression, and regulation of the *Pseudomonas cepacia* protocatechuate 3,4-dioxygenase genes. *J. Bacteriol.* 171(11):5907-5914.
- Zylstra GJ, Olsen RH, Ballou DP. 1989b. Genetic organization and sequence of the *Pseudomonas cepacia* genes for the alpha and beta subunits of protocatechuate 3,4-dioxygenase. *J. Bacteriol.* 171(11):5915-5921.

9. ANEXOS

ANEXO 1

Soluciones de ácido clorhídrico e hidróxido de sodio que se utilizaron para ajustar el pH de los medios de cultivo de ácido tereftálico

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración (M)</i>	<i>Volumen del reactivo (mL)</i>	<i>Volumen total (mL)</i>
HCl	3	25	100
HCl	5	42	100
HCl	7	58	100

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración (M)</i>	<i>Peso del reactivo (g)</i>	<i>Volumen total (mL)</i>
NaOH	1	4	100
NaOH	5	20	100

Solución de hidróxido de sodio que se utilizó para lavar el capilar perteneciente al equipo de EC para la cuantificación del ácido tereftálico

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración (M)</i>	<i>Peso del reactivo (g)</i>	<i>Volumen total (mL)</i>
NaOH	0.1	0.4	100

Medio de cultivo líquido LB

<i>Reactivo</i>	<i>Peso del reactivo (g)</i>	<i>Volumen total (mL)</i>
Triptona	5	500
Extracto de levadura	2.5	
Cloruro de sodio	5	
Maltosa	1	

Procedimiento:

1. Agitar hasta disolver los solutos y ajustar el pH a 7.0 con una solución de hidróxido de sodio 5 M
2. Esterilizar por 20 minutos a 1.5 Kg/Cm^2

ANEXO 2

Secuencias de la región 16S rDNA de los microorganismos degradadores de ácido tereftálico

Microorganismo tipo A

Arthrobacter sp.

Longitud: 1368 pb

GCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCTCACTTGTGGGGGGATTAGTGGCG
AACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTAACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGT
CTAATACCGGATATGACTCCTCATCGCATGGTGGGGGGTGGAAAGCTTTATTGTGGTTTTGG
ATGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGGTGAGGTAATGGCTTACCAAGGCGACGACGGGTA
GCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTGGGGAATATTTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGG
GATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTG
CAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTT
ATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTTCGCGTCTGCCGTGAAAGTCCG
GGGCTCAACTCCGGATCTGCGGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGATGTAGGGGAGACTGG
AATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGG
TCTCTGGGCATTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACC
CTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGGACATCCACGTTTCCGCGCCGT
AGCTAACGCACGCCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGGACATTCACGTTTTCCGCGCC
GTAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAA
TTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACC
TTACCAAGGCTTGACATGAACCGGTAACGCCTGGAGACAGGTGCCCCGCTTGCGGTTCGGTTT
ACAGGTGGTGCATGGTTGTCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGA
GCGCAACCCTCGTTCTATGTTGCCAGCACGTGATGGTGGGGACTCATAGGAGACTGCCGGG
GTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTTCA
CGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGTTGCGATACTGTGAGGTGGAGCTAATCCCAAAAA
GCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAAT
CGCAGATCAGCAANGC

Microorganismo tipo B

Rhodococcus sp.

Longitud: 1363 pb

TGCAGTCGACGATGAAACCCAGCTTGCTGGGTGGATTAGTGCCGAACGGGTGAGTAACACG
TGGGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAACGAC
CACGGGATGCATGTCCTGTGGTGGAAAGGTTTACCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATC
AGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCG
ACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
TTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTT
GTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCA
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTAAGGGCG
TAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGCGTCGTCTGTGAAAACCCGCAGCTCAACTGCGGGCTT
GCAGGCGATACGGGCAGACTCGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTG
AAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGAC
GCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTTCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATCCTGG
TAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTTCTTCCACGGGATCCGTGCCGT
GCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTG
ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTA
CCITGGGTTTGACATATAACGGACGACTGCAGAGATGTGGTTTCCCTTGTGGTTCGGTATACAG
GTGGTGCATGGCTGTCGTGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG
CAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCGCAGGAGACTGCCGGGGTCA
ACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACACA
TGCTACAATGGTCCGTACAGAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCC
GGTCTCAGTTCGGATCGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGC
AGATCAGCAACG

Secuencias de la región 16S rDNA de *Rhodococcus sp.* después de las cinéticas de crecimiento celular y biodegradación de AT

Microorganismo obtenido del medio de cultivo de AT a 3 g/L

Longitud: 1362 pb

GGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAACCCAGCTTGCTGG
GTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAG
CCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATACGACCACGGGATGCATGTCTGTGGTGGAAAGG
TTTACCGGTGCAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAG
GCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGA
CGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTGTAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAA
GTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG
GGTGCAGCGTGTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCCGGTTTGTTCGCGTCGT
CTGTGAAAACCCGCAGCTCAACTGCGGGCTTGCAGGGCGATACGGGCAGACTCGAGTACTGCA
GGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTG
GCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACA
GGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTTGGTAGT
CCACGCCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTA
ACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACG
GGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCT
GGGTTTGACATATAACCGGACGACTGCAGAGATGTGGTTTCCTTGTGGTCCGTATAACAGGTG
GTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
CCTGTCTGTGTGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCGCAGGAGACTGCCGGGGTCAACTC
GGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCT
ACAATGGTCCGTACAGAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTC
TCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGAT
CAGCAACGCTGC

Microorganismo obtenido del medio de cultivo de AT a 4 g/L

Longitud: 1303 pb

CCCAGCTTGCTGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGC
ACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATACGACCACGGGATGCATGTCCT
GTGGTGGAAAGGTTTACCGGTGCAGGATGAGCCC GCGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTA
ATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACT
GAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAG
CCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGG
GACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGTAGGGTGCAGCGCTTGTCCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGG
TTTGTTCGCGTCTGTGTGAAAACCCGCAGCTCAACTGCGGGCTTGCAGGCGATACGGGCAGA
CTCGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGG
AGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCG
TGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTG
TGGGTGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTCCTTCCACGGGATCCG
TGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAA
GGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAG
AACCTTACCTGGGTTTGACATATACCGGACGACTGCAGAGATGTGGTTTTCCCTTGTGGTCCG
TATACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA
CGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTGGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCGCAGGAGACTGCCG
GGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTT
CACACATGCTACAATGGTCCGTACAGAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTA
AAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTA
ATCGCAGATCAG

Microorganismo obtenido del medio de cultivo de AT a 5.035 g/L

Longitud: 1342 pb

CATGCAAGTCGAACGATGAAACCCAGCTTGCTGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAA
CACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATA
CGACCACGGGATGCATGTCTGTGGTGGAAAGGTTTACCGGTGCAGGATGAGCCCCGGCC
TATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGG
GCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
ATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGG
GTTGTAAACCTCTTTACAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGG
CCAACACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGGGAGCGTTGTCCGGAATTACTGG
GCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGTCGCGTCGTCTGTGAAAACCCGCAGCTCAACTGCGGG
CTTGCAGGCGATACGGGCAGACTCGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCG
GTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAACT
GACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
TAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTTTATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGT
GGGCGCTAGGTGTGGGTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCC
GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCG
GCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGGTTTGACATATACCG
GACGACTGCAGAGATGTGGTTTCCCTTGTGGTTCGGTATACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCA
GCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCC
AGCACGTAATGGTGGGGACTCGCAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGA
CGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGTCCGTACAG
AGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGG
TCGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAA

Microorganismo obtenido del medio de cultivo de AT a 7.1 g/L

Longitud: 1358 pb

GGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAACCCAGCTTGCTGG
GTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAG
CCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATACGACCACGGGATGCATGTCTGTGGTGGAAAGG
TTTACCGGTGCAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAG
GCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGA
CGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTGTAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAA
GTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG
GGTGCAGCGTGTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCCGGTTTGTGCGGTCTGT
CTGTGAAAACCCGCAGCTCAACTGCGGGCTTGCAGGGGATACGGGCAGACTCGAGTACTGCA
GGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTG
GCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACA
GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTTGGTAGT
CCACGCCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTA
ACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACG
GGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCT
GGGTTTGACATATAACCGGACGACTGCAGAGATGTGGTTTCCCTTGTGGTCCGTATAACAGGTG
GTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
CCTGTCTGTGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCGCAGGAGACTGCCGGGGTCAACTC
GGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCT
ACAATGGTCCGTACAGAGGGCTGCGATAACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTC
TCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGAT
CAGCAACG

Microorganismo obtenido del medio de cultivo de AT a 9.7 g/L

Longitud: 1364 pb

ACGATGAAACCCAGCTTGCTGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGAT
CTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATACGACCACGGGAT
GCATGTCCTGTGGTGGAAAGGTTTACCGGTGCAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTTG
GTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCAC
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAAT
GGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTC
TTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTG
CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGC
TCGTAGGCGGTTTGTTCGCGTCGTCTGTGAAAACCCGCAGCTCAACTGCGGGCTTGCAGGCGA
TACGGGCAGACTCGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGC
AGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGA
GCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGG
CGCTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTTATTAGATACCCT
GGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCC
GTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAA
TTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACC
TTACCTGGGTTTGACATATAACCGGACGACTGCAGAGATGTGGTTTCCCTTGTGGTCCGTATA
CAGGTGGTGCATGGCTGTTCGTTCAGCTCGTGTTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGA
GCGCAACCCTTGTCTGTGTGTCAGCACGTAATGGTGGGACTCGCAGGAGACTGCCGGG
GTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCA
CACATGCTACAATGGTCCGTACAGAGGGCTGCGATACCCTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAA
GCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAAT
CGCAGATCAGCAA

Microorganismo obtenido del medio de cultivo de AT a 14.5 g/L

Longitud: 1304 pb

CTTGCTGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTC
GGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATACGACCACGGGATGCATGTCCTGTGG
TGAAAGGTTTACCGGTGCAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGGTGGGGTAATGG
CCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGA
CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTG
ATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAC
GAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACGTAGGGTGCAGCGTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTT
GTCGCGTCGTCTGTGAAAACCCGCAGCTCAACTGCGGGCTTGCAGGCGATACGGGCAGACTC
GAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGG
AACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGG
GTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGG
GTTTCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTCCTTCCACGGGATCC
GTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAA
AGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAA
GAACCTTACCTGGGTTTGACATATACCGGACGACTGCAGAGATGTGGTTTCCCTTGTGGTCC
GTATACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA
ACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCGCAGGAGACTGCC
GGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGC
TTCACACATGCTACAATGGTCCGTACAGAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCT
TAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAG
TAATCGCAGATCAGCA