



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN
EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA**

**COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO Y MICROBIOLÓGICO DE
BORREGOS ALIMENTADOS CON POLIETILENTEREFTALATO
COMO FUENTE DE FIBRA**

MARCOS PÉREZ SATO

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2006

La presente tesis titulada: **Comportamiento productivo y microbiológico de borregos alimentados con polietilentereftalato como fuente de fibra**, realizada por el alumno: **Marcos Pérez Sato**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

Dr. Mario A. Cobos Peralta

ASESOR

Dr. Sergio S. González Muñoz

ASESOR

Dr. David Hernández Sánchez

ASESOR

Dr. Ronald Ferrera Cerrato

ASESOR

Dra. María Esther Ortega Cerrilla

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	x
SUMMARY	xi
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	5
Generalidades de los plásticos	3
Propiedades y características de los plásticos	3
Producción de los plásticos	4
Composición y estructura química del polietilentereftalato (PET)	4
Principales usos y problemas de la contaminación ambiental del polietilentereftalato (PET)	5
Degradación del ácido tereftálico	6
Bacterias aerobias que degradan ácido tereftálico	9
Principales bacterias anaerobias que degradan ácido tereftálico	11
Degradación de ácido tereftálico en fase mesofílica	12
Degradación de ácido tereftálico en fase termofílica	19
Reciclado de desechos de fibras de polietilentereftalato	22
Métodos físicos	22
Métodos químicos	22
Métodos termomecánicos	23
Degradación microbiana de compuestos aromáticos naturales (lignina) en ecosistemas anaerobios	24

Degradación de fenoles en el rumen	25
Fibra y sustitutos de fibra en dietas para rumiantes	26
EXPERIMENTO 1	28
Polietilentereftalato (PET) como fuente de fibra en dietas para borregos en engorda	28
RESUMEN	28
SUMMARY	29
INTRODUCCIÓN	30
Objetivos	31
Hipótesis	31
MATERIALES Y MÉTODOS	32
Análisis químico de las dietas	32
Animales	32
Dietas	32
Molido de las botellas de polietilentereftalato (PET)	33
Tratamientos experimentales	33
Alimentación	33
Muestreo de líquido ruminal	34
Variables evaluadas	35
Consumo y rechazo de alimento	35
Cambios de peso vivo	35
Conversión alimenticia	35
pH ruminal	35

Concentración de nitrógeno amoniacal	36
Concentración de ácidos grasos volátiles (AGV)	36
Concentración de bacterias celulolíticas	37
Concentración de bacterias totales	38
Concentración de protozoarios	39
Diseño experimental y análisis estadístico	39
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
Análisis químico de las dietas	41
Ganancia diaria de peso	42
Consumo de materia seca	43
Conversión alimenticia	44
pH ruminal	45
Proporción molar de ácidos grasos volátiles (AGV)	47
Concentración de nitrógeno amoniacal	48
Concentración de bacterias totales	50
Concentración de bacterias celulolíticas	51
Concentración de protozoarios	52
CONCLUSIONES	54
EXPERIMENTO 2	55
Desaparición <i>in vitro</i> de la materia seca del polietilentereftalato (PET) y de las dietas del primer experimento	55
RESUMEN	55
SUMMARY	56

INTRODUCCIÓN	57
Objetivos	59
Hipótesis	59
MATERIALES Y MÉTODOS	60
Aislamiento del cultivo mixto bacteriano	60
Obtención del cultivo mixto bacteriano	60
Crecimiento del cultivo bacteriano en medio líquido	60
Aislamiento del cultivo bacteriano en medio sólido	61
Prueba de degradación <i>in vitro</i> de la materia seca de las dietas experimentales	62
Prueba de degradación <i>in vitro</i> de la materia seca del polietilentereftalato (PET)	65
pH	65
Diseño experimental	65
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
Aislamiento del cultivo mixto bacteriano	67
Prueba de degradación <i>in vitro</i> de la materia seca de las dietas experimentales	67
Prueba de degradación <i>in vitro</i> de la materia seca del polietilentereftalato (PET)	69
pH	70
CONCLUSIONES	72
LITERATURA CITADA	73

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Composición de las dietas experimentales (% BS) de cada tratamiento (T)	34
Cuadro 2. Composición del medio de cultivo para conteo de bacterias celulolíticas	38
Cuadro 3. Análisis bromatológico de las dietas experimentales y el polietilentereftalato (PET) (% MS)	42
Cuadro 4. Ganancia de peso promedio ($\text{g animal}^{-1} \text{d}^{-1}$) de borregos en engorda, con diferentes niveles de polietilentereftalato (PET)	43
Cuadro 5. Consumo de materia seca ($\text{kg animal}^{-1} \text{d}^{-1}$) de borregos en engorda con diferentes niveles de polietilentereftalato (PET)	44
Cuadro 6. Conversión alimenticia (GDP/CMS) de borregos en engorda con diferentes niveles de polietilenterftalato (PET)	45
Cuadro 7. pH del líquido ruminal obtenido 3 h después de la alimentación a borregos en engorda con diferentes niveles de polietilentereftalato (PET)	46
Cuadro 8. Concentración (mM) de ácidos grasos volátiles en líquido ruminal de borregos en engorda con diferentes niveles de polietilentereftalato (PET)	48
Cuadro 9. Concentración de nitrógeno amoniacal (mM) en líquido ruminal de borregos en engorda con diferentes niveles de polietilentereftalato (PET)	50

Cuadro 10. Concentración de bacterias totales (10^9 mL ⁻¹) en líquido ruminal de borregos en engorda con diferentes niveles de polietilentereftalato (PET)	51
Cuadro 11. Concentración de bacterias celulolíticas (10^6 mL ⁻¹) en líquido ruminal de borregos en engorda con diferentes niveles de polietilentereftalato (PET)	52
Cuadro 12. Concentración de protozoarios (10^5 mL ⁻¹) en líquido ruminal de borregos en engorda con diferentes niveles de polietilentereftalato (PET)	61
Cuadro 13. Composición del medio de cultivo líquido utilizado para el aislamiento del cultivo mixto de bacterias degradadoras de polietilentereftalato (PET)	62
Cuadro 14. Composición del medio de cultivo para la degradación <i>in vitro</i> de la MS del polietilentereftalato (PET) y de las dietas experimentales	64
Cuadro 15. Degradación <i>in vitro</i> de la MS de las dietas experimentales con dos fuentes de inóculo	68
Cuadro 16. Degradación <i>in vitro</i> (%) de la MS del polietilentereftalato (PET) durante 72 h	70

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Esquema y química del proceso para la obtención del polietilentereftalato (PET)	5
Figura 2. Degradación anaerobia del ácido tereftálico	9

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar el potencial del polietilentereftalato (PET) como una fuente de fibra en dietas para rumiantes, se adicionó 10 y 20 % de PET (en base a materia seca) en dietas para borregos en engorda. Se usaron 15 borregos machos criollos con un peso vivo promedio inicial de 23 kg. El experimento tuvo una duración de 60 d y se dividió en periodos de 15 d. Los tratamientos (T) consistieron en la inclusión de tres niveles de PET en la dieta; T1= 0 %, T2 = 10% y T3 = 20% de PET. Todas las dietas fueron formulada para cubrir lo requerimientos nutritivos de ovinos con una ganancia de peso vivo superior a 200 g por día. Las variables estimadas fueron ganancia diaria de peso (GDP), consumo de materia seca (CMS), eficiencia alimenticia (EE), pH ruminal, concentración de ácidos grasos volátiles (AGV), amoniaco, bacterias totales y bacterias celulolíticas. Para el análisis de los datos se utilizó un diseño completamente al azar con tres tratamientos y cinco repeticiones. No hubo diferencias significativas ($P>0.05$) en GDP, CMS ni en la concentración de bacterias totales y celulolíticas. El pH ruminal fue mayor en los T2 y T3 en el tercer periodo ($P\leq 0.05$) comparado con el que se determino en el tratamiento testigo. Tampoco se determinó una diferencia significativa en la concentración de AGV y amoniaco entre tratamientos. Se concluye que es posible alimentar ovinos en crecimiento con dietas que contienen 20 % de PET como fuente de fibra en sustitución de rastrojo de maíz, sin que se afecte negativamente la eficiencia productiva de los animales o variables microbiológicas y fermentativas del rumen. También se evaluó la capacidad para degradar la MS de dietas que contienen 0, 10 y 20% de polietilentereftalato (PET), entre un cultivo mixto de bacterias ruminales aisladas (BA) contra las presentes en liquido ruminal fresco (LRF). El estudio se realizó *in vitro* mediante técnicas anaerobias. El inóculo de BA se aisló a partir de líquido ruminal de cinco borregos con un peso vivo (PV) de 38 kg, alimentados durante 60 d con una dieta que contenía 20% de PET; mientras que el inóculo de LRF se obtuvo de ovinos alimentados con una dieta comercial libre de PET. Los tratamientos evaluados fueron se (T): T1 = dieta con 0% de PET + BA; T2 = dieta con 0 % PET + LRF; T3 = dieta con 10 % PET + BA; T4 = T3 +LRF; T5 = dieta con 20 % PET + BA; T6 = T5 + LRF. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente en un diseño completamente al azar con mediciones repetidas. A las 24 h de incubación las bacterias aisladas (BA) presentaron una mayor ($P<0.05$) degradación de la MS que las bacterias del LRF, en la dieta que contenía 10 % de PET (26.38 vs 8.72 %, respectivamente), y 20 % de PET (29.69 vs 18.79 %, respectivamente). A las 48h de incubación, se mantuvo una mayor degradación de MS por parte de las BA con respecto a las bacterias del LRF, de la dietas que contenían 10 % de PET (57.11 vs 8.51.99 %, respectivamente), pero en la dieta que contenía 20 % de PET la degradación de MS fue mayor cuando se utilizo LRF como inóculo (58.3 vs 48.77; LRF vs BA, respectivamente). A las 72 h de incubación, solamente se determinaron diferencias significativas ($P<0.05$) en la dieta con 10 % de PET, en donde las BA mostraron una mayor de gradación de la MS que las bacterias del LRF (67.55 vs 55.34 %). Se concluye que las bacterias aisladas de animales alimentados con 20 % de PET en la dieta, tienen una mayor capacidad para degradar dietas que contienen 10 % de PET.

Palabras claves: PET, polietilentereftalato, bacterias ruminales, degradación de PET

SUMMARY

With the objective to find up the potential of polyethylene-terephthalate (PET) as a fiber source for ruminants, it was added 10 and 20 % PET (dry matter basis) in diets for growing lambs. Fifteen crossbreeding male lambs with an initial average body weight of 23 kg were used. The experiment took place for 60 d and it was divided in 15 d periods. Treatments (T) consist of diets with addition three levels of PET. T1 = 0 %, T2 = 10% and T3 = 20 % PET (dry matter bases). All diets were formulated to meet nutritive requirements for growing lambs with an expected daily weight gain exceeding 200 g. The variables measured were daily weight gain (DWG), dry matter intake (DMI), feed efficiency (FE), ruminal pH, and concentration of volatile fatty acids (VFA), ammonia, and total and cellulolytic bacteria. Data from the animal performance experiment were statistically analyzed in a completely randomized design with three treatments and five replications. No significant differences ($P>0.05$) were observed in DWG and DMI, neither on total and cellulolytic bacteria concentration. Ruminal pH was only higher ($P<0.05$) in third period for T2 and T3 with respect to the control treatment. The VFA and ammonia concentration was similar among treatments. It is concluded that it is possible to feed growing lambs with diets containing 20 % of PET as a fiber source in replacement of corn stover, without a negative effect on animal performance or fermentative and microbiological rumen variables. Also it was compared the capacity of DM degradation of diets containing 0, 10 and 20 % polyethylenterephthalate (PET) between a mix culture of rumen bacteria isolated (AB) and bacteria present in fresh rumen liquid (FRL). The study was performed *in vitro* by means of anaerobic techniques. The (AB) inoculum was isolated from the rumen liquid of five lambs with an average body weight of 38 kg, feeding a diet containing 20 % PET for 60 d; while, the FRL inoculum was obtained from lambs feeding a PET-free diet. Treatments (T) evaluated were: T1 = 0 % PET diet + AB, T2 = 0 % PET diet + FRL, T3 = 10 % PET diet + AB, T4 = 10 % PET diet + FRL, T5 = 20 % PET diet + AB, T6 = 20 % PET diet + FRL. At 24 h of incubation, the AB showed an higher ($P<0.05$) DM degradation than bacteria on FRL on the diet containing 10 % PET (26.38 vs 8.72 %, respectively), and 20 % PET (26.69 vs 18.79 %, respectively). After 48 h of incubation the higher DM degradation was maintained by AB with respect to bacteria present FRL in diet containing 10 % PET (57.11 vs 51.99 %, respectively), but in the diet containing 20 % PET, DM degradation was higher with the FRL than with AB inoculum (58.3 vs 48.77 %, respectively). At 72 h of incubation a significant differences ($P<0.05$) was only observed with the diet containing 10 % PET, where the AB inoculum showed better DM degradation than FRL inoculum (67.55 vs 55.34 %). It is concluded that the isolated bacteria from lambs fed a diet containing 20 % PET, have a better capacity to degrade the DM content of diets containing 10 % PET.

Key Words: PET, polyethylenterephthalate, rumen bacteria, PET degradation

INTRODUCCIÓN

La producción de ácido tereftálico, un compuesto aromáticos sintético, es alta y aumenta constantemente porque se usa para la síntesis de polietilentereftalato (PET), utilizado en la producción de envases de plástico para refrescos (Warikoo *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2001). Hay dos tipos de PET, uno transparente y amorfo (A-PET) y otro blanquecino y cristalino (C-PET), y contiene 64 % de petróleo, 23 % de derivados líquidos de gas natural y 13 % de aire (Kleerebezem *et al.*, 1999a).

Los envases de PET se pueden reciclar y su acumulación es un problema serio de contaminación ambiental; La degradación del ácido tereftálico y sus correspondientes ésteres se realiza mediante procesos microbiológicos.

Existen sistemas de tratamiento aerobio de aguas residuales contaminadas con ácido tereftálico; así como sistemas anaerobios, los cuales pueden ser una mejor opción debido al menor requerimiento de energía y nutrientes (Kleerebezem *et al.*, 1999b). En forma similar a la degradación anóxica de compuestos aromáticos naturales (lignina); la degradación de ácido tereftálico, se basa en su transformación inicial a benzoato y en la interacción con bacterias metanogénicas para la conversión del benzoato en acetato, CO₂ y metano (Kleerebezem *et al.*, 1999b). La similitud se debe a que en ausencia de oxígeno las bacterias inician la degradación de compuestos aromáticos ya sean naturales (lignina) o artificiales (PET) mediante su transformación a benzoato (en forma de benzoil-CoA). El ácido tereftálico (1,4- ácido benzenodicarboxílico), y sus isómeros son componentes mayormente utilizados en la producción de fibras de

poliéster, membranas, adhesivos y envases de plástico (Franck y Stadelhofer, 1988). Las aguas residuales que contienen isómeros de ácido tereftálico son tratadas mediante sistemas biológicos aerobios, sin embargo; los procesos mediante tratamiento anaeróbicos pueden ser una mejor alternativa porque requieren menor energía y nutrientes que los procesos aeróbicos tradicionales, son una atractiva alternativa (Lettinga, 1995).

En consecuencia, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de adicionar 10 y 20 % de polietilentereftalato (PET) como fuente de fibra en dietas para borregos en engorda, en variables productivas, fermentativas y microbiológicas.

REVISIÓN DE LITERATURA

Generalidades de los plásticos

Los polímeros, moléculas que se forman por la repetición (poli) de unidades idénticas (meros), pueden ser de origen natural, como la celulosa, la cera y el caucho natural (hule), o sintéticas, como el polietileno y el nylon (Lstrok *et al.*, 2001). El término plástico se aplica a sustancias con distintas estructuras y naturaleza que carecen de un punto fijo de ebullición y poseen, durante un intervalo de temperaturas, propiedades de elasticidad y flexibilidad que permiten moldearlas y adaptarlas a diferentes formas. Sin embargo, en sentido estricto, este término denota materiales sintéticos obtenidos mediante polimerización o multiplicación artificial de los átomos de carbono en las largas cadenas moleculares de compuestos orgánicos derivados del petróleo y otras sustancias naturales (Espí *et al.*, 2006). Los plásticos son los materiales poliméricos orgánicos (compuestos por moléculas orgánicas gigantes) que pueden deformarse hasta una forma deseada por medio de extrusión, moldeo o hilado (Peláez, 2001).

Propiedades y características de los plásticos

Los plásticos se caracterizan por una relación resistencia/densidad alta, una propiedad excelente para el aislamiento térmico y eléctrico, y una buena resistencia a los ácidos, álcalis y disolventes. Las moléculas que forman un plástico pueden organizarse de forma lineal, ramificada o compuesta; las

estructuras lineales y ramificadas son termoplásticas (se ablandan con el calor), mientras que las compuestas son termoendurecibles (se endurecen con el calor) (Espí *et al.*, 2006).

Producción de los plásticos

La mayoría de los plásticos se fabricaban con resinas de origen vegetal, como la celulosa (del algodón), el furfural (de la cáscara de la avena), aceites (de semillas) y derivados del almidón o el carbón. Aunque el nylon 11 se fabrica con semillas de recino, la mayoría de los plásticos se elaboran con derivados del petróleo. Las existencias mundiales de petróleo tienen un límite, por lo cual se investigan otras fuentes de materias primas y procesos tecnológicos, como la gasificación del carbón (Sudesh *et al.*, 2000; Peláez, 2001). La fabricación de los plásticos y implica cuatro pasos básicos: obtener las materias primas, síntesis del polímero básico, composición del polímero como un producto utilizable industrialmente y moldeo o deformación del plástico a su forma definitiva.

Composición y estructura química del polietilenterftalato (PET)

Hay dos tipos de PET, un polímero fabricado a partir de etileno, glicoles y tereftalato, uno transparente y amorfo (A-PET) y otro blanquecino y cristalino (C-PET); el PET está compuesto 64 % de petróleo, 23 % de derivados líquidos de gas natural y 13% de aire (Kleerebezem *et al.*, 1999a). A partir del petróleo crudo

se extrae el paraxileno y se oxida con el aire para dar ácido tereftálico y el PET se hace combinando el ácido tereftálico y etilenglicol (Figura 1).

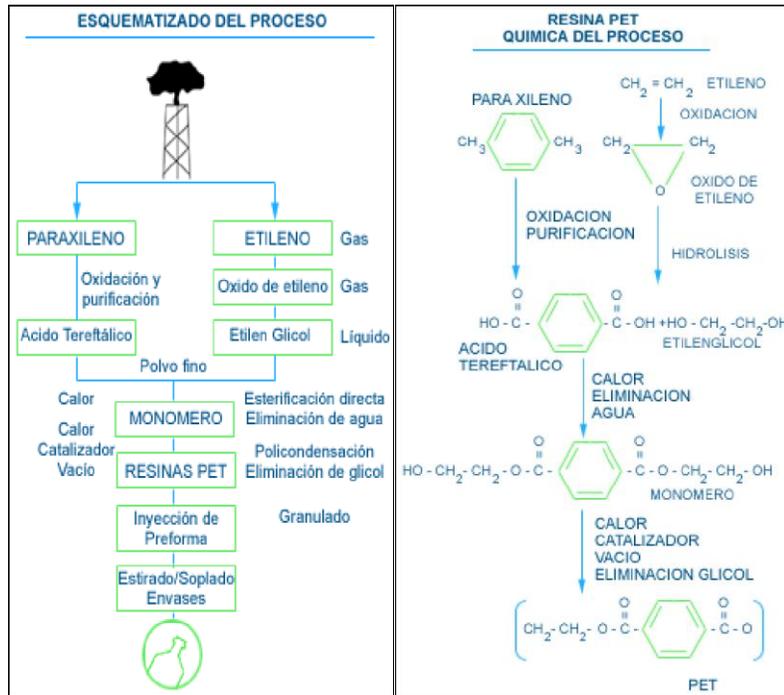


Figura 1. Esquema y química del proceso para la obtención del PET

Principales usos y problemas de contaminación ambiental del polietilentereftalato (PET)

El PET es el poliéster más utilizado en la industria textil y de envases plásticos, en el año 2000 se produjeron 30 millones t incluyendo empaques y entre las fibras sintéticas, el PET tiene mayor producción que polibutilentereftalato y politrimetilentereftalato (Ultun y Ulcay, 2004). La industria de los termoplásticos en México tiene una participación importante en los envases y el embalaje; en el año 2000 se usaron 3,204 t de plástico, de las cuales 413 mil t

fueron para la producción de PET. Los envases de PET son ligeros, transparentes y resistentes a impactos, no alteran las propiedades de su contenido y no son tóxicos; por ello el PET ha desplazado a otros materiales y tiene una demanda creciente.

En 1993 se produjeron 14,4 millones t de ácido tereftálico (ATF) purificado (1,4-ácido bencenodicarboxílico) y dimetil tereftalato (DTF) los dos monómeros principales utilizados en la fabricación de fibras de poliéster, resinas y películas plásticas (Fajardo *et al.*, 1997). La producción de ATF purificado se hace en dos etapas: primero el ATF crudo se produce por oxidación acuosa de *p*-xilano (1,4-dimetil benceno) con aire usando ácido acético como solvente, y en la segunda etapa el ATF crudo es hidrogenado.

Durante el proceso se generan aguas residuales que contienen altas concentraciones de contaminantes orgánicos (Kleerebezem *et al.*, 1999b). El ATF purificado también se puede considerar un producto de desecho y se genera en la fabricación de envases de PET usados para embotellar de bebidas carbonatadas. Los principales componentes de las aguas residuales producidas durante este proceso son ATF, ácido acético, ácido benzoico, y ácido *para*-tolúico (ácido 4-metilbenzoico), en forma decreciente a su concentración (Shigematsu *et al.*, 2003; Kleerebezem *et al.*, 1999c).

Degradación del ácido tereftálico

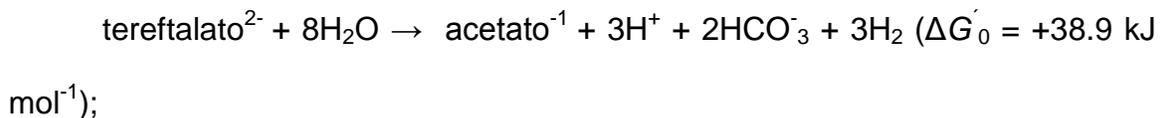
La biodegradabilidad de algunos compuestos se ha demostrado desde los estudios realizados por Buswell y Hatfield (1938; citado por Zeicus, 1980). La

principal ruta conocida inicia con la transformación de fenoles a benzoato (vía 4—hidroxi-benzoato, 4-hidroxibenzoil-CoA, seguido de reducción del anillo benzoico en lugar de una rotura oxidativa del anillo (en anaerobiósisis el oxígeno no puede intervenir en la oxidación de los compuestos aromáticos), rotura del anillo, dando origen a un ácido graso de cadena lineal o un ácido dicarboxílico y transformación de los ácidos intermediarios en acetil CoA, (que se puede utilizar tanto para procesos anabólicos y transformación de energía) (Figura 2). La característica bioquímica del catabolismo anaerobio de diversos compuestos aromáticos es que incluye un paso común de reducción. En cultivos mixtos anaerobios los productos finales de la degradación de los fenoles (formato, H₂, acetato y CO₂), se utilizan como fuente de energía para bacterias metanogénicas (*Methanosaeta* y *Methanospirillum*) y transformados a CH₄, CO₂ y H₂O; en cultivos mixtos con de bacterias desnitrificantes, los ácidos alifáticos se catabolizan a N₂, CO₂ y H₂O (Kleerebezem *et al.*, 1999a; Zeicus, 1980).

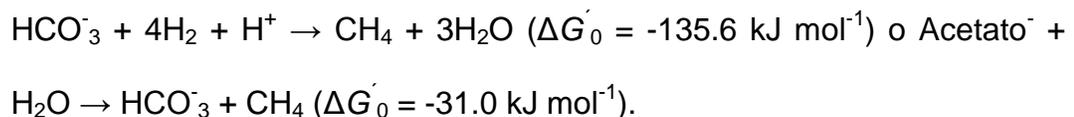
Microbiológicamente, se ha demostrado que la mayoría de los compuestos aromáticos son biodegradables en ambientes anaeróbicos; por lo que existe un gran interés científico y tecnológico con relación al desarrollo de tratamientos bacteriológicos de aguas residuales que contienen ATF, compuestos fenólicos y ácidos aromáticos (Kleerebezem *et al.*, 1999a).

Microbiológicamente la mayoría de los compuestos aromáticos se degradan biológicamente en ambientes anaerobios, por lo que es importante el desarrollo de tratamientos bacteriológicos de aguas residuales que contienen ATF, compuestos fenólicos y ácidos aromáticos (Kleerebezem *et al.*, 1999a). El

agua residual con ATF y sus isómeros se trata usando sistemas microbiológicos aerobios; sin embargo, el tratamiento anaeróbico representa una mejor alternativa ya que requiere menos energía y nutrientes. Con reactores tipo UASB (siglas en inglés de reactor anaerobio de lecho de lodos con flujo ascendente) se han tratado con éxito aguas residuales que contienen ATF. Mediante este sistema las poblaciones microbianas forman agregados de gránulos o micro-ecosistemas individuales; cada micro-ecosistema está compuesto por bacterias acetogénicas (*Methanosaeta*) y metanogénicas (*Methanobrevibacter* y *Methanobacterium*). Las bacterias acetogénicas degradan compuestos orgánicos complejos a una mezcla de acetato, hidrógeno y formiato, mientras que las bacterias metanogénicas mineralizan continuamente los productos intermedios a metano y dióxido de carbono. Estas poblaciones interactúan sintrópicamente, por que la transformación fermentativa de tereftalato a acetato es energéticamente desfavorable ($\Delta G'_0 > 0$):



y requieren de la metanogénesis, como una ruta de acoplamiento para continuar la reacción:



Mediante técnicas moleculares y análisis de secuencia de ADN_r 16S, Wu *et al.* (2001) identificaron en reactores UASB un grupo de bacterias denominado *δ-Proteobacteria*, responsable de la degradación de tereftalato a acetato e

hidrógeno. Estas bacterias tienen una estrecha asociación con diferentes poblaciones de bacterias metanogénicas y se han identificado los géneros: *Methanosaeta*, *Methanospirillum* y *Methanobacteriaceae* que convierten acetato, hidrógeno y dióxido de carbono a metano (Wu *et al.*, 2001).

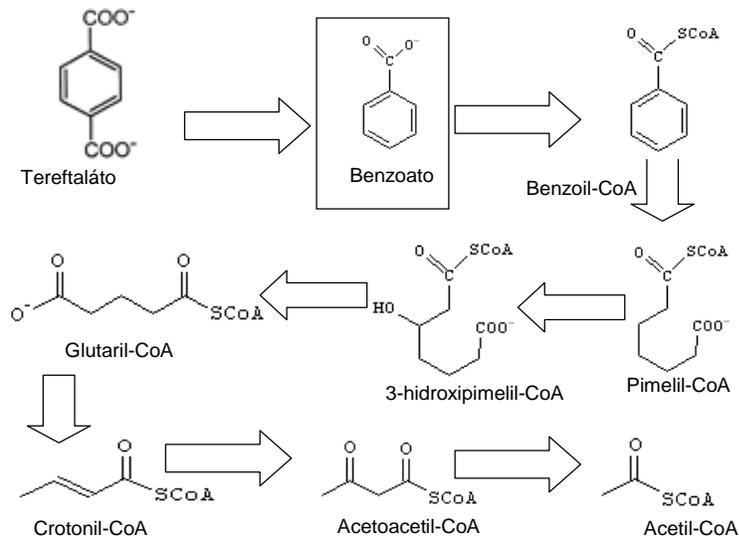


Figura 2. Degradación anaerobia del ácido tereftálico

Bacterias aerobias que degradan ácido tereftálico

Durante la producción de poliéster (tratamiento caústico) hay calentamiento y utilización de hidróxido de sodio y debido a la hidrólisis en condiciones alcalinas el agua residual contiene monómeros de poliéster de ácido tereftálico y etilen glicol (Kimura e Ito, 2001). Para estudiar la degradación de tereftalato disódico (TD), se aislaron cuatro cepas de bacterias aeróbicas del suelo mediante cultivos selectivos con 4.2 g (20 mM) TD L⁻¹ agua destilada, como única fuente de carbono para proporcionar energía (pH de 10) (Sugimori *et*

al., 2000). Luego se seleccionó la especie *Dietzia*, cepa GS-1 alcalifílica, identificada mediante análisis genético del ARN_r, como *Dietzia* sp., la cual tuvo una fase lag de 50 h antes de iniciar el crecimiento, la fase exponencial duró 72 h y la fase de estabilización se completó en 68 h. Este crecimiento fue muy lento comparado con el de otras especies de microorganismos que degradan tereftalato. A las 168 h la degradación fue 96.5 % (19.3 mM) de TD de una concentración inicial de 20 mM. La mayor degradación ocurrió entre 72 y 100 h y la velocidad máxima de degradación fue de 0.46 mM h⁻¹, pero no hubo cambio en el pH del medio durante el crecimiento. Por tanto, se observó que *Dietzia* sp. cepa GS-1 alcalifílica, puede utilizarse para la degradación biológica de tereftalato disódico, el principal desecho químico producido en la fabricación de textiles de poliéster (Sugimori *et al.*, 2000).

Se han observado respuestas positivas para degradar ácido tereftálico en condiciones aerobias con bacterias del género *Bacillus* aisladas del suelo. La bacteria aislada en un medio selectivo con ácido tereftálico como única fuente de carbono fue *Bacillus* sp (Karegoudar y Pujar, 1985); la cual creció bien en un medio con sal mineral y 0.2 % de tereftalato como única fuente de energía. El crecimiento máximo fue entre 16 a 18 h.

Aunque no hay una ruta bien identificada para la degradación de tereftalato, el primer paso sería la transformación a dihidrodiol tereftalato; se desconoce la formación de otros compuestos intermediarios que probablemente son metabolizados inmediatamente después de su producción. El producto final, después de de la formar de dihidrodiol tereftalato es protocatechuate

(Karegoudar y Pujar, 1985). Los microorganismos que degradan tereftalato, producen protocatechuate (PC), y la enzima clave es la 1,2-dioxigenasa (Shigematsu *et al.*, 2003).

En la degradación de los isómeros dicarboxilato de benceno, ftalato, isoftalato, y TER la oxigenasa mejor conocida es la dioxigenasa ftalato. La bacteria *Comamonas testosteroni* T-2 usa el compuesto xenobiótico *p*-toluenosulfonato y el producto *p*-tolúato vía un sistema de transporte específico y tres reacciones iniciales comunes para transformarlos a *p*-sulfobenzoato (PSB) y TER. La ruta bioquímica se divide por pasos incluyendo la dioxigenación antes de transformar el anillo del intermediario común PC; la reacción catalizada por el sistema dioxigenasa-TER es típica del metabolismo bacteriano de compuestos aromáticos naturales, como el TER y el *p*-tolúato (Schläfli *et al.*, 1994).

Principales bacterias anaerobias que degradan ácido tereftálico

En condiciones de anaerobiosis algunos microorganismos degradan tereftalato: la bacteria Gram (+) *Nocardia* sp. cepa DSM 43251 y microorganismos de los géneros *Proteobacteria*, *Bordetella* (cepa K1), *Pseudomonas* (cepa C4S) y *Comamonas testosteroni* (cepa T-2 y YZW-D) (Shigematsu *et al.*, 2003); además, δ -*Proteobacteria* (Wu *et al.*, 2001) y el subcluster lh del grupo *Desulfotomaculum* lineage I (Qiu *et al.*, 2004). El complemento metanogénico sintrópico incluye a la especie *Methanosaeta concilli* y miembros de los géneros *Methanospirillum* y *Methanobacteriaceae*; entonces,

la degradación del tereftalato es un proceso de dos pasos que finaliza con la metanogénesis (Chen *et al.*, 2004).

Shigematsu *et al.* (2003) aislaron una bacteria nueva (T7^T) de lodos activados de una planta de tratamiento de aguas residuales domésticas; para obtener energía en condiciones aeróbicas esta cepa utiliza tereftalato y los siguientes compuestos: acetamida, β -alanina, citrato, D-fructuosa, glicerol, isobutirato, isoptalato, D(-)-manitol, maleato, malonato, fenilacetato, propionato, protocatechuate, tereftalato, D-triptofano y L-triptofano. Mediante análisis filogenéticos y la secuencia genética del ARN_r 16S, la cepa fue ubicada dentro del género *Delftia*. Dado que no se habían identificado especies que pueden degradar tereftalato, se propuso el nombre *Delftia tsuruhatensis* sp. nov. para esta nueva bacteria (cepa T7^T) (Shigematsu *et al.*, 2003).

Degradación de ácido tereftalico en fase mesofílica

Concentraciones altas de ácido acético inhiben la degradación de ácido benzoico y *p*-tolúico. La transformación de ATF a metano se ve afectada negativamente por la presencia de hidrógeno, ácido acético y benzoico. Aunque se ha reportado que a cierta concentración del ácido benzoico (7 g L⁻¹) y ácido ftalico (4 g L⁻¹) no presenta toxicidad para los microorganismos metanogénicos acetoclásticos. Sin embargo concentraciones de 0.5 a 5 g L⁻¹ de ATF presentan efectos tóxicos en las bacterias. Fajardo *et al.* (1997) encontraron en lodos provenientes de aguas residuales, que la tasa de degradación de tereftalato disodio y benzoato de sodio fue de 17 y 87 mg g⁻¹ VSS d⁻¹, y que la degradación

de ATF fue inhibida parcialmente con la presencia de benzoato y totalmente con la inclusión de glucosa. Los mismos autores reportan que en presencia de ácido benzóico, la degradación de ATF ocurre una vez terminada la degradación del primero; mientras que en presencia de glucosa, la degradación de ATF no se reestablece una vez metabolizado el ácido benzóico, estos resultados indican que la degradación de ATF involucra un proceso bioquímico muy sensible a las condiciones del medio ambiente. Los ácidos benzóico, acético y fórmico encontrados en aguas residuales provenientes de la fabricación de fibras de poliéster, son metabolizados hasta metano sin problema durante el tratamiento anaeróbico debido a que la metanogénesis no es inhibida por la presencia de los ácidos 4-carboxilbenzaldehído, ATF, y *p*-tolúico. Por lo anterior, considerando que ha sido difícil obtener la degradación de ATF en presencia de glucosa, acetato y *p*-tolúato, se recomienda el uso de un reactor de dos fases: en la primera fase, se eliminan los compuestos que inhiben la degradación del ATF y *p*-tolúico (benzoato, acetato, glucosa), en la segunda fase se inicia la degradación de los compuestos aromáticos (tereftalato y *p*-tolúato).

Kleerebezem *et al.* (1999a) encontraron que la degradación de tereftalato se realiza en un rango de pH de 6.1 a 7.1; con un pH inicial de 5.6, existe una acumulación de acetato y no se observa crecimiento microbiano, mientras que con valores de pH mayores a 5.6 no hay acumulación de acetato, lo cual indica una fuerte dependencia del pH en el proceso de remoción rápida de acetato, obteniéndose un mejor resultado a pH de 7.1. Para lograr una tasa de degradación alta ($>40 \text{ mmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) de tereftalato por la biomasa microbiana en

los biorreactores se debe de: tener un tiempo de retención de sólidos alto, temperatura cercana al valor óptimo de 37 °C, valores de pH entre 6.1 y 7.1, con preferencia por un pH de 7, y una concentración baja de acetato y benzoato (1 a 3 mM).

Kleerebezem *et al.* (1999a) estudiaron el papel del benzoato y acetato en la degradación de tereftalato usando un cultivo mixto de bacterias proveniente de la fase granular de un reactor utilizado para degradar tereftalato, el cultivo degradó benzoato sin presentar fase lag; cuando el cultivo bacteriano fue incubado con una mezcla de tereftalato y benzoato, se observó una conversión secuencial de ambos sustratos, siendo preferido el benzoato sobre el tereftalato. Los microorganismos que realizan la degradación de benzoato y tereftalato presentan un crecimiento de tipo diauxico. En el cual, al principio la capacidad para degradar tereftalato es mínima y el cultivo microbiano prefiere como sustrato al benzoato, la nula o mínima degradación de tereftalato es más pronunciada cuando hay concentraciones mayores de benzoato al inicio del proceso y menor concentración de biomasa bacteriana. Una vez terminado el benzoato inicia la degradación del tereftalato, aunque la tasa de conversión del benzoato, es significativamente más bajas que las obtenidas cuando se usa sólo tereftalato como fuente de carbono y energía. Un efecto similar se observó cultivos bacterianos incubados con una mezcla de acetato y tereftalato. La pérdida de la capacidad de degradación es característica solo para tereftalato, ya que esta inhibición no fue observada cuando el cultivo fue incubado con una mezcla de benzoato y acetato. La degradación de tereftalato es energéticamente

más favorable que la degradación de benzoato ($\Delta G_0' \approx -20 \text{ kJ mol}^{-1}$), por lo que no existe una explicación al hecho que los microorganismos prefieran al benzoato como sustrato.

Una explicación es que los pasos para la degradación de benzoato y tereftalato comienzan con la transformación a benzoil coenzima A (benzoil-CoA), un intermediario central en la degradación de compuestos aromáticos. Las diferencias cinéticas entre el número de pasos requeridos para la formación de benzoil-CoA, determina la preferencia por la degradación de benzoato sobre tereftalato (Kleerebezem *et al.*, 1999b).

Otra posible explicación es que la tasa de absorción de sustrato a través de la membrana microbiana puede limitar la tasa de de formación de benzoil-CoA. Puesto que el valor para pK_a del tereftalato ($pK_a=3.5$) es más bajo que para benzoato ($pK_a=4.2$), el flujo de tereftalato a través de la membrana citoplasmática será menor comparado con benzoato. En presencia de ambos (benzoato y tereftalato) resulta en concentraciones mayores de benzoil-CoA a partir de benzoato comparado con tereftalato y, consecuentemente la conversión de benzoato procederá más rápido (Kleerebezem *et al.*, 1999b).

Las investigaciones más recientes están dirigidas al tratamiento de los isómeros de ftalato (*ortho*-, *meta*-, y *para*-benceno ácido dicarboxílico) mediante procesos anaeróbicos. Los isómeros de ftalato son compuestos antropogénicos producidos en cantidades grandes durante el proceso de fabricación de resinas de poliéster, envases de plástico, fibras de poliéster y otros productos derivados del petróleo, los cuales son vertidos aguas residuales por la industria. Los

principales problemas que se tienen para la remoción de los isómeros de ftalato presente en aguas residuales está el requerimiento de periodos largos de arranque (fase lag) y que el proceso a veces se interrumpe antes de que termine el tratamiento. La fase lag va de uno a tres meses en reactores operados por lotes, hasta más de un año en reactores de escala completa. Este fenómeno ha sido atribuido al tiempo que requieren las poblaciones microbianas para estabilizarse e iniciar la degradación de los isómeros del ftalato en presencia de bacterias metanogénicas, por tanto, las investigaciones se han enfocado hacia estudios que permitan disminuir la fase lag de las poblaciones microbianas que degradan isómeros de ftalato (Qiu *et al.*, 2004).

En condiciones metanogénicas, la degradación de ftalato es llevada a cabo por una asociación sintrópica formada por al menos tres grupos de microorganismos anaerobios: (i) degradadores de ftalato productores de hidrógeno, dióxido de carbono y formato, (ii) metanogénicos hidrogenotróficos, los cuales capturan hidrógeno, y (iii) metanogénicos acetoclásticos, que consumen acetato. La reacción llevada a cabo por las bacterias degradadoras de ftalato es desfavorable energéticamente en condiciones normales; la presencia de los últimos dos grupos microbianos son considerados esenciales para que la totalidad de la reacción sea energéticamente posible. Debido a estas características el aislamiento de bacterias sintrópicas degradadoras de ftalato es difícil y solamente algunas especies de estos grupos microbianos se han aislado e identificado exitosamente. Se han reportado pocos cultivos que degradan isómeros de ftalato, en condiciones metanogénicas (Qiu *et al.*, 2004). Así,

Kleerebezem *et al.* (1999a) reportaron tres consorcios metanogénicos que degradan *ortho*-ftalato, isoftalato, o tereftalato. Los cultivos mixtos de bacterias fueron aislados en un periodo de un año y presentaron capacidad para degradar *ortho*-ftalato, isoftalato y tereftalato. Para la obtención de los cultivos mixtos con degradación alta de sustrato, se adicionaron 6 a 12 mM de isómeros de tereftalato y se realizaron transferencias a un medio fresco cuando se alcanzó una degradación de 1 mM d⁻¹. A los tres cultivos mixtos se les adicionó isómeros de tereftalato; sin embargo, los microorganismos que crecieron en los medios selectivos no fueron capaces de degradar isómeros de ftalato diferentes al que se usó para aislarlos. Por tanto es probable que exista un grupo específico de bacterias capaz de degradar solo un tipo de isómero. Los tres cultivos mixtos degradaron benzoato sin fase lag a tasas comparables con las de la degradación de los isómeros de tereftalato. Se produjeron cantidades pequeñas de acetato e hidrógeno (1 a 4 mM) durante la fase de crecimiento exponencial, lo cual indicó una relación estrecha entre las bacterias fermentativas y metanogénicas. Cuando se utilizó *ortho*-ftalato como sustrato hubo poca acumulación intermedia de benzoato (1 a 3 μM), lo que no ocurrió al utilizar los otros isómeros. Mediante observación microscópica fueron identificadas bacterias del género *Methanosaeta* en los tres cultivos mixtos, mientras que en el cultivo mixto con el isómero *ortho*-ftalato fueron identificados otros microorganismos diferentes a este género; a las cuales fue atribuida la capacidad de degradar este isómero. Por lo anterior, los microorganismos que transforman los isómeros de tereftalato a acetato e hidrógeno dependen

estrictamente de la presencia de bacterias metanogénicas para mantener concentraciones lo suficientemente bajas de acetato e hidrógeno en el medio. De la misma forma los microorganismos metanogénicos dependen de las bacterias fermentadoras de los isómeros de tereftalato para cubrir sus requerimientos (CO₂, acetato e hidrógeno). Debido a esta dependencia mutua, los cultivos mixtos pueden ser designados como cultivos sintrópicos. La ruta de degradación es la que en el primer paso ocurre una descarboxilación de los isómeros a benzoato, por el hecho de que los tres cultivos mixtos fueron capaces de degradar benzoato sin presentar fase lag y que hubo una acumulación de cantidades pequeñas de benzoato cuando fue aplicado un inhibidor de la metanogénesis en los cultivos mixtos.

Qui *et al.* (2004) identificaron y aislaron poblaciones bacterianas responsables de la mineralización de los isómeros de ftalato en condiciones metanogénicas. Las bacterias predominantes fueron *Desulfotomaculum* línea I. Los intentos realizados para aislar estos microorganismos condujeron al aislamiento de una bacteria degradadora de tereftalato denominada como JT, que al estar en cocultivo con *Metanospirillum hungatei* convirtió tereftalato a acetato y metano después de tres meses de incubación, mientras que la cepa JT, no pudo degradar tereftalato en cultivo puro. Durante la degradación de tereftalato hubo acumulación temporal de benzoato como compuesto intermediario, indicativo de la descarboxilación de tereftalato a benzoato como paso inicial de la degradación de este compuesto.

Degradación de ácido tereftálico en fase termofílica

La degradación del ácido tereftálico se lleva a cabo mediante procesos mesofílicos (35 a 37 °C) anaeróbicos; no obstante, el tratamiento termofílico anaerobio puede ser una buena alternativa, ya que las aguas residuales contaminadas con tereftalato se generan a una temperatura de 54 a 60 °C, la cual es óptima para el desarrollo de un consorcio metanogénico – termofílico; se ha reportado que tal consorcio tiene tasas de remoción orgánica mucho más altas que el consorcio mesofílico. Así, el volumen del reactor anaerobio requerido para tratar cierto tipo de aguas residuales, puede ser significativamente de menor tamaño comparado con otro operando a una temperatura mesofílica (Chen *et al.*, 2004).

A diferencia del proceso metanogénico - mesofílico, se conoce poco acerca del proceso termofílico para el tratamiento anaeróbico de ATF en aguas residuales. Las principales poblaciones microbianas relacionadas con la degradación inicial de tereftalato en condiciones termofílicas, fueron bacterias del género *Desulfotomaculum*, y la especie metanogénica *Methanotherix thermophilla* (Chen *et al.*, 2004).

Si en el reactor se presenta un shock térmico o falla en el sistema de bombeo, hay un cambio en las poblaciones microbianas. Después de que el funcionamiento normal se recupera hay la proliferación de otras poblaciones bacterianas, de los géneros *Cytophaga*, *Flexibacter*, *Bacteroides*, y en menor concentración los géneros β -*Proteobacteria*, *Planctomycetes* y *Nitrospira*. Estas poblaciones son capaces de degradar tereftalato en el reactor, pero en menor

grado que las poblaciones establecidas antes de las perturbaciones en el funcionamiento normal del reactor (Chen *et al.*, 2004).

Las aguas residuales producto de la fabricación de polietilentereftalato, tienen un pH de 4.5, una temperatura de 56 °C, una concentración alta de ATF (1-4 g L⁻¹), poco soluble en agua (19 mg L⁻¹ a 25 °C, 400 mg L⁻¹ a 100 °C) y de alta densidad (1.5 g mL⁻¹ a 25 °C). Estas características evitan que el ATF no se degrade significativamente en reactores operados a una tasa de digestión alta y un tiempo de retención hidráulica corto. Tomando en cuenta sus propiedades físicas este problema puede solucionarse de dos formas: el primer procedimiento consiste en retirar el ATF del agua residual sin tratamiento y depositarlo en la unidad anaeróbica, y el segundo paso es la transformación por una simple neutralización (se requiere un pH mínimo de 5.5 para evitar la precipitación) a una sal de sodio mucho más soluble (140 g L⁻¹ a 25 °C) para después tratarlo en la fase biológica. En el primer procedimiento la neutralización completa con un compuesto alcalino externo no es necesaria, ya que se genera alcalinidad durante el proceso anaeróbico a través de la circulación del efluente y por la disminución del contenido de CO₂ (Macarie, 2000).

La degradación de ATF en agua residual colectada de un reactor tipo USAB, se observó que el sistema con alta carga y poco tiempo de retención hidráulica había poca eficiencia en la degradación de ATF, debido al lavado del lodo y a un proceso incompleto de la metanogénesis a partir de ácido acético; sin embargo, al disminuir la carga y aumentar el tiempo de retención hidráulica aumentó la tasa de biodegradación para el ácido acético y benzóico; mientras

que con la tasa de biodegradación para el ATF fue lenta, y nula para el ácido *p*-tolúico. Cuando se aumentó el tiempo de retención hidráulica (60 d), hubo un aumento en el diámetro promedio de la granulación (46 μm a 0.8 mm) mientras que el polímero extracelular aumentó de 12.6 mg g^{-1} VSS (sólidos solubles volátiles) a 55 mg g^{-1} VSS con estructura microbiana filamentosa. Después del periodo de crecimiento bacteriano y degradación del ácido acético, la presencia de sustratos aromáticos contribuyó al crecimiento de una población bacteriana con forma de bastones; la mayor diversidad de microorganismos sintrópicos produjo una mejor granulación del lodo y mejor degradación de los compuestos aromáticos (Sheng *et al.*, 1997).

Kimura e Ito (2001), desarrollaron un tratamiento microbiológico para el tratamiento de aguas residuales que contenían ácido tereftálico (ATF), proveniente de procesos industriales. Los microorganismos fueron aislados de lodos activados obtenidos de aguas residuales de la industria y de plantas de tratamiento. Se utilizaron dos medios de cultivo (6 g de ATF L^{-1} agua y pH de 6.5) y (8 g de ATF L^{-1} agua purificada y pH de 7.5). Los resultados mostraron que la cepa K1 mineralizó ATF completamente, esto hace suponer que la mineralización se llevó a cabo mediante un sistema enzimático para degradar ATF, mientras que la cepa K3 provee un factor de crecimiento para la cepa K1. Los estudios anteriores sugieren que se requiere de cultivos mixtos que contengan microorganismos que degradan el ATF y de otros que proporcionen factores de crecimiento para el tratamiento de aguas residuales que contienen ATF. Mediante la inoculación de un cultivo mixto que incluían la presencia de las

cepas K1 y K3, en aguas residuales que contenían 8 mg mL^{-1} de ATF se obtuvo una eliminación de más de 99 % de ATF a una temperatura de $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y pH menor de 8.5.

Reciclado de desechos de fibras de polietilentereftalato

Métodos físicos

Los métodos mecánicos se aplican a todo tipo de desechos, incluyendo fibras naturales como lana y algodón, así como también, a desechos de polímeros sintéticos y regenerados, tales como desechos de poliéster y nylon. Los desechos son cortados, mezclados y expandidos. El producto obtenido, en forma de red, se procesa en una planta de hilado para obtener hilaza gruesa. Los métodos mecánicos son los más simples, los costos también son bajos y por tanto el valor del producto también es bajo (Pisano *et al.*, 2000).

Métodos químicos

Los métodos químicos se usan por lo general para reciclar desechos de fibras de PET en plantas con alta capacidad de producción y reciclado de envases de PET. Los métodos más comunes son glicólisis y metanólisis. La hidrólisis y extruido al vapor también puede usarse pero todavía no es muy común. El procesamiento con métodos químicos es complicado, los costos son altos y el producto obtenido es de altamente costoso (ECOCE, 2006).

Métodos termomecánicos

Los métodos termomecánicos pueden utilizarse para procesar desechos de fibra de PET, polipropileno y poliamida. Se basan en el refundido de desechos termoplásticos para obtener una regranulación; el regranulado puede utilizarse como producto principal en la producción de fibra o la industria del plástico. Debido a la degradación y viscosidad, el regranulado es utilizado generalmente en la producción de fibra.

Los métodos termomecánicos son más simples que los métodos químicos y el valor de los productos generalmente es mayor que el de aquéllos obtenidos con los métodos mecánicos. El método termomecánico es el método más común empleado para reciclar desechos de envases fabricados con PET.

Este método es básicamente un proceso de re-extrusión que incluyen: cortado, compactado, secado y expulsión. El principal inconveniente de este método, es que durante el proceso las fibras de poliéster pueden ser degradadas, lo que afecta negativamente sus características de plasticidad y resistencia. Los tipos de degradación que ocurren durante la re-extrusión de los desechos de fibra de PET son: (i) degradación térmica, (ii) degradación termo oxidativa, (iii) hidrólisis, y (iv) degradación mecánica (Altun y Ulcay, 2004).

Degradación microbiana de compuestos aromáticos naturales (lignina) en ecosistemas anaerobios.

Existen varios reportes científicos sobre solubilización y degradación anaerobia de la lignina en aguas residuales y zanjas anaerobias para el tratamiento de desperdicios orgánicos (Karlsson *et al.*, 2000; Warikoo *et al.*, 1996). Dicha solubilización y degradación comprende los siguientes pasos: i) todas las rutas conocidas inician con la transformación de fenoles a benzoato (vía 4-hidroxi-benzoato, 4-hidroxibenzoil-CoA, y benzoil CoA), seguido de ii) reducción del anillo benzoico en lugar de una ruptura oxidativa del anillo, iii) ruptura del anillo, dando origen a un ácido graso de cadena lineal o un ácido dicarboxílico, y iv) transformación de los ácidos intermediarios en Acetil CoA.

La descomposición anaerobia de compuestos aromáticos por cultivos puros o mixtos de bacterias se caracteriza por un acoplamiento entre reacciones fosforilación no oxidativa y las reacciones catabólicas de deshidrogenación con la hidrogenación de un aceptor externo de electrones (NO_3^- y CO_2), dando como resultado un producto reducido (NH_3 y CH_4).

Entre las especies bacterianas lignolíticas identificadas están: *Clostridium hydroxybenzoicum*, *Desulfobacterium phenolicum*, y *Thauera aromatica* (Zeikus, 1980). Se ha demostrado que la capacidad para degradar lignina en acetato, metano y CO_2 , es estimulada con la presencia de bacterias metanogénicas. Es importante señalar que la transformación anaerobia de fenoles es lenta, requiriéndose al menos 10 días para su transformación a benzoato y hasta 60 días para su total transformación a acetato y metano (Karlsson *et al.*, 2000).

Degradación de fenoles en rumen

Aunque no se ha reportado la formación de benzoato en el rumen, existen indicios que permiten suponer que en el rumen hay bacterias degradadoras de compuestos aromáticos (lignina), por ejemplo: i) tanto bacterias como hongos ruminales, son capaces de solubilizar lignina, lo que también se ha reportado como un proceso inicial para la degradación de fenoles en otros hábitats anaerobios (Kleerebezem *et al.*, 1999a); ii) se ha comprobado la hidrogenación de fenoles libres por bacterias ruminales celulolíticas (Dehority, 1998). Al respecto, Karlsson *et al.* (2000) menciona que la degradación de fenoles por bacterias anaerobias de rellenos sanitarios inicia con su hidrogenación; iii) en el rumen está ampliamente documentada la interacción positiva entre microorganismos celulolíticos (bacterias y hongos) con bacterias metanogénicas (Dehority, 1998); lo cual se ha determinado como un requisito para la degradación de fenoles en otros ambientes anaerobios, iv) se ha comprobado la degradación ruminal de dehydrodivanilina y su transformación en ácidos grasos volátiles (Chen *et al.*, 1985); aunque la dehydrodivanilina es una molécula sintética formada por la unión de dos ácidos vinílicos, se demuestra la capacidad de bacterias ruminales para degradar fenoles.

También se ha reportado la desmetoxilación de ácido monobenzoide en borregos que recibieron infusión ruminal de vanilato. Los benzoides metoxilados se encuentran normalmente en la dieta de los rumiantes como derivados de los ácidos cinámico y benzoico unidos por enlaces éster a carbohidratos. Las bacterias presentes en el rumen modifican los benzoides mediante una

deshidroxilación, descarboxilación de derivados de ácido benzoico y desmetoxilación de derivados metil eter (Chesson *et al.*, 1982; Martin, 1982). Los productos de la degradación del benzoato son acetato, CO₂, H₂ los cuales son el sustrato para la formación de metano (Shelton y Teidje, 1984).

Fibra y sustitutos de fibra en dietas para rumiantes

En los sistemas de producción intensivo tanto de ovinos y bovinos, las dietas son elaborados con 60 a 80 % de concentrados y el resto con fuentes fibrosas como el rastrojo de maíz, paja de de avena y paja de cebada (El-Sabban *et al.*, 1972). Estos dos componentes de la dieta son importantes ya que con los primeros se cubren los requerimientos de energía, proteína, vitaminas y minerales para mantenimiento y producción, mientras que los ingredientes fibrosos favorecen el buen funcionamiento del rumen, cuando no se incluye fibra en cantidades adecuadas se pueden producir problemas metabólicos (Owens *et al.*, 1998).

Se han realizado diferentes investigaciones con el objetivo de incluir fuentes alternas de fibra en dietas altas en grano para rumiantes dentro de las que destacan el periódico (Daniels *et al.*, 1970); vainas de arroz (White y Reynolds, 1969), polietileno (Oltjen *et al.*, 1962; González-Aranda *et al.*, 1972), conchas de ostra (Perry *et al.*, 1968), aserrín de encino (El-Sabban *et al.*, 1972) y pino (Guerra, 2004). El último autor, concluye que la adición de 30% de aserrín en la dieta de ovinos en crecimiento no afecta negativamente la eficiencia productiva y puede ser un buen sustituto del rastrojo de maíz. Con relación al

PET, cabe mencionar que no se encontraron reportes a nivel nacional o internacional en donde se haya evaluado el PET como un sustituto de fibra en rumiantes.

EXPERIMENTO 1

Polietilentereftalato como fuente de fibra en dietas para borregos en engorda

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar el potencial del polietilentereftalato (PET) como una fuente de fibra en dietas para rumiantes, se adicionó 10 y 20 % de PET (en base a materia seca) en dietas para borregos en engorda. Se usaron 15 borregos machos criollos con un peso vivo promedio inicial de 23 kg. El experimento tuvo una duración de 60 d y se dividió en periodos de 15 d. Los tratamientos (T) consistieron en la inclusión de tres niveles de PET en la dieta; T1= 0 %, T2 = 10% y T3 = 20% de PET. Todas las dietas fueron formulada para cubrir lo requerimientos nutritivos de ovinos con una ganancia de peso vivo superior a 200 g por día. Las variables estimadas fueron ganancia diaria de peso (GDP), consumo de materia seca (CMS), eficiencia alimenticia (EE), pH ruminal, concentración de ácidos grasos volátiles (AGV), amoniaco, bacterias totales y bacterias celulolíticas. Para el análisis de los datos se utilizó un diseño completamente al azar con tres tratamientos y cinco repeticiones. No hubo diferencias significativas ($P>0.05$) en GDP, CMS ni en la concentración de bacterias totales y celulolíticas. El pH ruminal fue mayor en los T2 y T3 en el tercer periodo ($P\leq 0.05$) comparado con el que se determinó en el tratamiento testigo. Tampoco se determinó una diferencia significativa en la concentración de AGV y amoniaco entre tratamientos. Se concluye que es posible alimentar ovinos en crecimiento con dietas que contienen 20 % de PET como fuente de fibra en sustitución de rastrojo de maíz, sin que se afecte negativamente la eficiencia productiva de los animales o variables microbiológicas y fermentativas del rumen.

Palabras clave: PET, polietilentereftalato, alimentación ovinos, fermentación de PET.

SUMMARY

With the objective to find up the potential of polyethylene-terephthalate (PET) as a fiber source for ruminants, it was added 10 and 20 % PET (dry matter basis) in diets for growing lambs. Fifteen crossbreeding male lambs with an initial average body weight of 23 kg were used. The experiment took place for 60 d and it was divided in 15 d periods. Treatments (T) consist of diets with addition three levels of PET. T1 = 0 %, T2 = 10% and T3 = 20 % PET (dry matter bases). All diets were formulated to meet nutritive requirements for growing lambs with an expected daily weight gain exceeding 200 g. The variables measured were daily weight gain (DWG), dry matter intake (DMI), feed efficiency (FE), ruminal pH, and concentration of volatile fatty acids (VFA), ammonia, and total and cellulolytic bacteria. Data from the animal performance experiment were statistically analyzed in a completely randomized design with three treatments and five replications. No significant differences ($P>0.05$) were observed in DWG and DMI, neither on total and cellulolytic bacteria concentration. Ruminal pH was only higher ($P<0.05$) in third period for T2 and T3 with respect to the control treatment. The VFA and ammonia concentration was similar among treatments. It is concluded that it is possible to feed growing lambs with diets containing 20 % of PET as a fiber source in replacement of corn stover, without a negative effect on animal performance or fermentative and microbiological rumen variables.

Key words: PET, polyethylenterephthalate, lambs feeding, PET-fermentation

INTRODUCCIÓN

En México se producen alrededor de 90 millones de envases de polietilentereftalato (PET) que se utilizan para envasar refrescos y otros líquidos. Se calcula que para el 2006 se acopiarán y reciclarán 2,610 millones de botellas, lo cual será muy difícil dado que sólo hay cinco plantas recicladoras en el país (ECOCE, 2006). Las vías de reutilización de los plásticos abarcan desde su incineración, con posible recuperación energética, hasta su transformación química, pero estos métodos tienen un costo elevado y se deben buscar alternativas para disminuir este problema. Se ha estudiado fuentes de fibra no convencionales en dietas altas en grano para rumiantes, como papel (Hansen *et al.*, 1969), papel periódico (Daniels *et al.*, 1970), polietileno (Oltjen *et al.*, 1962; González-Aranda *et al.*, 1972). Otra posible fuente de fibra es el PET dada su similitud con la lignina, compuesto fenólico ampliamente distribuido en los forrajes consumidos por rumiantes; además en la degradación anaerobia del ácido tereftálico (AT) intervienen bacterias metanogénicas que transforman el ATF en acetato, CH₄, CO₂ y H₂O (Wu *et al.*, 2001; Nozawa *et al.*, 1988; Kleerebezem *et al.*, 1999c).

En la literatura revisada no se encontraron trabajos relacionados con la utilización de PET (de botellas de plástico) como fuente de fibra u otro uso en rumiantes. Por tanto, la presente investigación tuvo como objetivo utilizar PET en dietas para ovinos en engorda como fuente alterna de fibra en sustitución de rastrojo de maíz.

Objetivos

Evaluar el efecto de adicionar 10 y 20 % de PET como fuente de fibra a una dieta para borregos en engorda, en las variables productivas, fermentativas y microbiológicas.

Hipótesis

La sustitución de 10 y 20 % de PET por rastrojo de maíz en una dieta para borregos en engorda, no afecta negativamente las variables productivas, fermentativas y microbiológicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en los laboratorios de Microbiología Ruminal y Nutrición Animal y en las jaulas individuales para ovinos pertenecientes al Programa de Ganadería del Colegio de Postgraduados, ubicados en Montecillo, Texcoco, Edo. de México.

Análisis químico de la dietas

En muestras de las dietas experimentales se determinó materia seca, cenizas, nitrógeno proteínico por el método de microkjeldahl (AOAC, 1990), fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) (Van Soest *et al.*, 1991).

Animales

Se usaron 15 borregos machos enteros criollos con un peso promedio de 23.4 ± 0.5 kg. Antes de iniciar el experimento los borregos se desparasitaron interna y externamente con 0.5 mL de Ivermectina vía subcutánea; además, se aplicó vitamina ADE (1 mL animal⁻¹). Los borregos se identificaron y alojaron en jaulas individuales (1 x 1.96 m) con comederos y bebederos. Antes de iniciar el experimento los borregos tuvieron un periodo de adaptación de 10 d a las dietas experimentales (Cuadro 1).

Dietas

Las dietas se formularon con el programa computacional Used Feed Formulation Done Again, UFFDA (Pesti y Miller, 1993), de acuerdo con los

requerimientos nutritivos establecidos en las tablas del NRC (1985), para borregos machos enteros con un peso promedio inicial de 20 a 25 kg y una ganancia diaria de peso (GDP) de 200 g.

Molido de las botellas PET

Las botellas de polietilentereftalato (PET) fueron recolectadas por el Departamento de Agroecología de la Universidad Autónoma Chapingo, se lavaron manualmente y se molieron en un molino para rígidis con una criba de 8 mm.

Tratamientos experimentales

Los tratamientos (T) fueron los siguientes: T1, dieta testigo; T2, dieta testigo + 10% de PET; T3, dieta testigo + 20% de PET.

Alimentación

Los borregos fueron alimentados a las 08:00 y 16:00 h con dietas isoproteínicas e isoenergéticas incluyendo polietilentereftalato (PET) para el tratamiento dos y tres (Cuadro 1). La fase experimental duró 60 d considerando cinco períodos: 0, 15, 30, 45 y 60 d.

Cuadro 1. Composición de las dietas experimentales (% BS⁺) para cada tratamiento (T)

Ingrediente	% de la dieta		
	T 1 [¶]	T 2 ^{¶¶}	T 3 ^{¶¶¶}
Maíz molido	38.0	30.0	28.0
Pasta de soya	16.5	16.5	16.5
Rastrojo de maíz	30.0	20.0	10.0
PET ⁺	0.0	10.0	20.0
Mezcla mineral (Rumisal)*	1.5	1.5	1.5
Heno de alfalfa	10.0	18.0	20.0
Urea	1.0	1.0	1.0
Melaza	3.0	3.0	3.0
Total	100.0	100.0	100.0

⁺Dietas formuladas con el programa Used Feed Formulation Done Again, UFFDA (Pesti y Miller. 1993).

[¶] 20.15 % de proteína cruda; ^{¶¶} 21.91 de proteína cruda; ^{¶¶¶}19.45 de proteína cruda.

*Calcio, 130 g; fósforo, 50 g; sodio, 109.0 g; cloro, 200 g; hierro, 4.30 g; magnesio, 3.3 g; manganeso, 200 mg; cobre, 80.0 mg; cobalto, 66.6 mg; yodo, 4.0 mg; zinc, 8.0 mg kg⁻¹.

⁺PET: polietilentereftalato

Muestreo de líquido ruminal

Las muestras se recolectaron usando una sonda esofágica en los cinco borregos de cada tratamiento (100 mL de líquido por animal) a los 0, 15, 30, 45 y 60 d después de iniciar el experimento, a las 3 horas después de la alimentación de las 08:00 h. En total se recolectaron 15 muestras.

Variables evaluadas

Consumo y rechazo de alimento

Se midió dos veces por semana durante todo el experimento, registrando la cantidad ofrecida y la rechazada; el consumo voluntario se obtuvo por la diferencia entre ambos valores.

Cambios de peso vivo

Los borregos fueron pesados al inicio del experimento y posteriormente cada 15 d, antes de ofrecer el alimento de las 08:00 h. La GDP se calculó por diferencia entre el peso final menos el peso inicial dividido entre los días del periodo.

Conversión alimenticia

Se calculó como el producto de la GDP en kg dividida entre la consumo de alimento.

pH ruminal

Se hizo inmediatamente después de recolectar el líquido ruminal con un potenciómetro marca Orion modelo 710A, calibrado a pH 4.0 y 7.0 (ORION, 1996).

Concentración de nitrógeno amoniacal

Se utilizó la técnica de McCullough (1967). El líquido ruminal recolectado (4 mL) se acidificó con 1 mL de ácido metafosfórico (solución al 25 % en agua), la muestra se centrifugó a 14 000 rpm por 5 min y del sobrenadante se recolectaron 3.0 mL en viales de plástico. Para determinar la concentración de N-NH₃ se tomaron 20 µL de muestra y se depositaron en tubos de 18 x 130 mm en los cuales se adicionó 1.0 mL de fenol y 1.0 mL de hipoclorito de sodio basificado con hidróxido de sodio. Los tubos se incubaron a 39 °C durante 30 min y se agregaron 5.0 mL de agua destilada para diluir la muestra. La concentración de nitrógeno amoniacal se midió por absorbancia a 630 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV-VIS modelo Lambda 40. Se utilizó un blanco como referencia, el cual contenía 1.0 mL de fenol, 1.0 mL de hipoclorito de sodio y 5.0 mL de agua destilada. Para conocer la concentración final de nitrógeno amoniacal, se comparó con una curva estándar previamente calibrada con cinco concentraciones molares de N-NH₃.

Concentración de ácidos grasos volátiles (AGV)

Se determinó una vez acidificado el líquido ruminal con ácido metafosfórico con una proporción 4:1 de muestra:ácido metafosfórico. La muestra se centrifugó a 14 000 rpm por 15 min y se recolectó el sobrenadante (1.5 mL). La concentración de AGV de las muestras se determinó por cromatografía de gases, en un cromatógrafo Perkin Elmer,

Modelo Claurus 500 con columna capilar Elite FFAP. El gas acarreador utilizado fue hidrógeno con flujo de 15 mL min⁻¹. Se inyectó 1 µL de muestra, con temperatura de inyector de 200 °C, detector de 250 °C y una temperatura de horno de 140 °C. El tiempo total por corrida fue 5 min.

Concentración de bacterias celulolíticas

Se utilizó un medio de cultivo líquido anaerobio (Cuadro 2), preparado en tubos de cultivo (13 x 100 mm) a razón de 4.5 mL de medio por tubo, y permanecieron 72 h en incubación a 38 °C para observar posible desarrollo de bacterias que puedan contaminar los medios. Una vez comprobado la esterilidad de los medios se inocularon con 0.5 mL de líquido ruminal para cada tratamiento; las diluciones fueron de 10⁻¹ a 10⁻¹⁰; después de la inoculación los tubos se incubaron a 38 °C por 10 d. Luego se hicieron las lecturas y los tubos positivos fueron los que tuvieron una marcada degradación de papel Watman No 541. Para determinar las concentraciones de bacterias se utilizó la técnica del número más probable (NMP; Harrigan y McCance, 1979). La concentración de bacterias se determinó a los 0, 15, 30, 45 y 60 d de iniciado el experimento.

Cuadro 2. Composición del medio de cultivo para conteo de bacterias celulolíticas

Compuesto	Cantidad por 100 mL
Agua destilada (mL)	52.6
Líquido ruminal clarificado (mL) ⁽¹⁾	30.0
Solución mineral I (mL) ⁽²⁾	5.0
Solución mineral II (mL) ⁽³⁾	5.0
Rezarsurina 0.1 % (mL) ⁽⁴⁾	0.1
Peptona de soya (g)	0.2
Extracto de levadura (g)	0.1
Carbonato de sodio, sol. 8 % (mL) ⁽⁵⁾	5.0
Sol. cisteína sulfito de sodio (mL) ⁽⁶⁾	2.0
Glucosa (g)	0.0
Celobiosa (g)	0.0
Almidón (g)	0.0
Tira de papel Watman 541	Una tira por tubo

⁽¹⁾ Líquido ruminal clarificado previamente filtrado en una gasa triple y centrifugado a 12,000 rpm, por 15 min tres veces y esterilizado por 15 min a 15 psi, 121 °C.

⁽²⁾ Contiene 6 g de K₂HPO₄ por 1000 mL de H₂O.

⁽³⁾ Contiene 6 g de KH₂PO₄; 6 g (NH₄)₂SO₄; 12 g NaCl; 2.45 g MgSO₄ y 1.6 g de CaCl₂ *H₂O por 1000 mL de H₂O (Bryant y Robinson, 1962).

⁽⁴⁾ Agregar 0.1 mL solución al 1 % en agua y aforar a 100 mL de agua destilada.

⁽⁵⁾ 8 g de carbonato de sodio en 100 mL de agua destilada.

⁽⁶⁾ 2.5 g de L- cisteína (disuelta en 15 mL de 2N NaOH); 2.5 g de Na₂S-9H₂O y 0.1 mL de resarzurina en un volumen final de 100 mL.

Concentración de bacterias totales

Se calcularon utilizando la técnica del recuento directo en microscopio a través de la cámara de Petroff-Hausser (Partnership® modelo SQMM

Horsham PA 19044). El conteo se realizó en 10 cuadros (0.05 x 0.05 mm) elegidos al azar usando un microscopio de contraste marca Olympus® modelo BX51, lente objetivo 100 x, contraste Ph3 y filtro de luz azul. El procedimiento se realizó de acuerdo a lo descrito en el manual de operación SIGMA (1990). La concentración de bacterias totales por mililitro de fluido ruminal se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\text{Bacterias totales mL}^{-1} = (\text{Promedio}) (\text{Factor de dilución}) (2 \times 10^7)$$

Concentración de protozoarios

Se utilizó una cámara de Neubauer y un microscopio Zeiss a una magnificación de 40x. Para conservar la integridad de los protozoarios se fijaron 5 mL de líquido ruminal en 5 mL de una solución para conteo (5 mL de solución mineral I + 5 mL de solución mineral II + 3 mL de formaldehído al 3% aforadas a 87 mL con agua destilada) (Dehority, 1998). Se contaron diez repeticiones para sacar el promedio de cada muestra. La concentración de protozoarios por mililitro de fluido ruminal se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de protozoarios (mL)} = (\text{Promedio}) (\text{Factor de dilución}) (10^4)$$

Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar con cinco repeticiones por tratamiento; las variables fueron GDP, CMS, conversión alimenticia, pH ruminal,

proporción de AGV, y concentración de nitrógeno amoniacal. Para evaluar el efecto del tiempo se utilizó el procedimiento MIXED (SAS, 1999) de acuerdo con lo propuesto por Littell *et al.* (1998) y Wang y Goonwardese (2004). Para el análisis se tomó en cuenta la opción AR (1) correspondiente a la estructura de la covarianza.

El modelo estadístico utilizado fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \delta_i + d_{ij} + t_k + (\delta t)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde,

Y_{ijk} = variable de respuesta

μ = media general

δ_i = efecto fijo del i-ésimo tratamiento

d_{ij} = efecto aleatorio asociado con el j-ésimo borrego en el i-ésimo tratamiento

t_k = efecto fijo del k-ésimo periodo

$(\delta t)_{ik}$ = efecto fijo de la interacción del i-ésimo tratamiento con el k-ésimo periodo

ε_{ij} = error aleatorio asociado con el j-ésimo borrego en el i-ésimo tratamiento al k-ésimo muestreo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis químico de las dietas

Los valores del contenido de materia seca, proteína cruda y cenizas de las dietas fueron similares (Cuadro 3), lo cual corresponde con lo planteado en la formulación de las dietas. El contenido de PC está dentro del valor óptimo para una GDP superior a 200 g, de acuerdo con las tablas de requerimientos para ovinos (NRC, 1985).

Las dietas con polietilentereftalato tuvieron 3.56% (T2) y 10.53% (T3) más FDN, así como 5.48% (T1) y 13.4% (T2) más FDA con respecto a la dieta testigo. Como se puede observar los valores de FDN y FDA se incrementan conforme aumentó la inclusión de PET, lo cual se debe a que el este compuesto no se digiere al ser sometido a una digestión ácida y alcalina; por tanto, los valores para FDN y FDA son de 100%. Sin embargo; los valores observados de FDN de las dietas están dentro de los valores adecuados para mantener las funciones del rumen. Mertens (1997) menciona que valores inferiores a 25 % de FDN causan problemas de acidosis, laminitis y desplazamiento abomasal.

Cuadro 3. Análisis bromatológico de las dietas experimentales y el polietilentereftalato (PET) (% MS)

Compuesto	T1	T2	T3	PET*
Materia seca	93.24	93.45	93.88	99.71
Proteína cruda	20.15	21.91	19.45	-
FDN	36.37	39.93	46.40	100 [¶]
FDA	20.13	25.61	33.53	100 [¶]
Cenizas	6.39	6.32	5.26	0

*Polietilentereftalato molido. [¶] Dado que el PET no sufre alteración durante la digestión ácida y alcalina de la técnica, se considero que el 100 % es FDN y FDA.

Ganancia diaria de peso

Durante los 10 d de la fase de adaptación no se presentaron diarreas ni trastornos digestivos comunes en la primera semana de iniciada la alimentación con dietas altas en concentrado (Owens *et al.*, 1998). Por tanto, se considera que los borregos y la población microbiana ruminal se adaptaron durante esta fase inicial. Aunque las dietas se formularon para una GDP de 200 g, en el primer periodo experimental (0-15 d) todos los borregos tuvieron una GDP inferior a 200 g; sin embargo, a partir del segundo periodo experimental (15-30 d) la GDP fue superior a 200 g (Cuadro 4). Durante todo el experimento no se observaron diferencias significativas en la GDP, aunque se esperaba que los borregos que consumieron PET tuvieran una respuesta negativa debido principalmente a la naturaleza inerte del PET. Al evaluar otro subproducto inerte,

aserrín de pino como fuente alternativa de fibra, en dietas para rumiantes, se afecta negativamente las variables productivas con niveles mayores al 15% de aserrín (Slyter y Kamstra, 1974). Lo anterior no ocurrió en el presente estudio, ni siquiera con el tratamiento (T3) donde se incluyó 20% de PET. Los resultados de GDP también son similares a los reportados por Guerra (2004) quien encontró que la GDP promedio fue 246.07 y 203.21 g para borregos alimentados con 30% de aserrín de pino y 30% de rastrojo de maíz.

Cuadro 4. Ganancia de peso ($\text{g animal}^{-1}\text{d}^{-1}$) de borregos en engorda, con diferentes niveles de PET

Periodos+	Tratamientos			
	1	2	3	EEM
1	198.66	194.41	180.36	29.66
2	214.66	200.26	212.00	29.66
3	221.46	223.60	212.00	29.66
4	230.26	212.93	223.34	29.66
Promedio	216.26	207.78	206.92	30.83

No hubo diferencias significativas ($p>0.05$). EEM = error estándar de la media.
+Periodos de 15 d.

Consumo de materia seca

El consumo de materia seca (CMS) fue similar entre tratamientos ($p>0.05$) en los periodos evaluados (Cuadro 6); por tanto, la inclusión de 20% de PET, el nivel más alto en la dieta para borregos en T3, no afectó negativamente el CMS. La GDP inferior a los 200 g observada en el periodo uno (0-15 d) para los tres tratamientos se explica con el menor consumo de MS observado en ese mismo

periodo. El CMS difiere con los valores reportados por Guerra (2004) de 1.642 kg y 1.683 kg para borregos alimentados con 30 % de aserrín de pino y 30 % de rastrojo de maíz: Por tanto, es posible que el PET estimula en mayor medida la rumia lo que aumentaría la fragmentación y fermentación de los otros nutrientes de la dieta.

Cuadro 5. Consumo de materia seca ($\text{kg animal}^{-1} \text{d}^{-1}$) de borregos en engorda, con diferentes niveles de PET

Periodos+	Tratamientos			EEM
	1	2	3	
1	0.956	0.942	0.948	0.36
2	1.036	1.048	1.055	0.36
3	1.056	1.058	1.082	0.36
4	1.059	1.072	1.072	0.37
Promedio	0.984	0.986	0.966	0.32

No hubo diferencias significativas ($p>0.05$). EEM = error estándar de la media.

+ Periodos de 15 d.

Conversión alimenticia

La relación GDP/ CMS indica la eficiencia de utilización del alimento (Cuadro 6); en este estudio no hubo diferencias significativas entre tratamientos. Se esperaba una mejor eficiencia para los borregos de la dieta testigo (rastrojo de maíz como fuente de fibra) porque tenía menor contenido de FDN, ya que la eficiencia disminuye en dietas altas FDN debido a una menor digestibilidad de la dieta que se traduce en una menor cantidad de energía disponible para mantenimiento y GDP (Gill y Oldham, 1993). Dado que no hubo diferencias en

eficiencia alimenticia, se considera que el mayor contenido de FDN de las dietas con PET no afecta negativamente las variables productivas de los borregos.

Cuadro 6. Conversión alimenticia (GDP/CMS) de borregos en engorda con diferentes niveles de PET

Periodos+	Tratamientos			
	1	2	3	EEM
1	0.207	0.206	0.196	0.032
2	0.206	0.190	0.200	0.032
3	0.209	0.210	0.196	0.032
4	0.217	0.198	0.219	0.033
Promedio	0.209	0.201	0.202	0.032

No hubo diferencias significativas ($p > 0.05$). EEM = error estándar de la media.

+ Periodos de 15 d.

pH ruminal

Los valores de pH del líquido ruminal en el segundo periodo experimental (15-30 d) para los borregos que recibieron 10 y 20 % de PET fueron diferentes significativamente ($p \leq 0.05$) comparados con los borregos del tratamiento testigo, mismo comportamiento se observó en el pH promedio de toda la fase experimental (Cuadro 7). El pH de los borregos que recibieron PET como fuente de fibra estuvo alrededor de 7.2, lo cual indica que se pueden utilizar dietas con un nivel más elevado de concentrado sin tener efectos negativos sobre esta variable. El pH ruminal difiere con los valores reportados por Sánchez (2000) los cuales fueron de 5.95 y 6.05 para borregos alimentados con 51 % de concentrado, 22 % de rastrojo de maíz y 26 % de alfalfa. Por tanto, es posible

que el PET de alguna manera esté favoreciendo la rumia lo que aumentaría el flujo de saliva hacia el rumen. Diversas investigaciones mencionan que la saliva contiene bicarbonato de sodio y fosfatos que ayudan a mantener un pH casi neutro en el rumen (Jouany, 1994; Hobson, 1988), y que es un factor determinante en la actividad y crecimiento de las poblaciones bacterianas del rumen, las cuales requieren de un pH que oscile entre 6.2 y 7.0 (Yokohama y Johnson, 1988).

Cuadro 7. pH del líquido ruminal obtenido 3 h después de la alimentación a borregos en engorda, con diferentes niveles de PET

Periodos+	Tratamientos			
	1	2	3	EEM
pHi	7.16	7.05	7.07	0.19
1	7.13	7.15	7.30	0.19
2	6.54 ^a	7.22 ^b	7.19 ^b	0.19
3	7.26	7.48	7.57	0.19
4	7.23	7.38	7.38	0.19
Promedio	7.06 ^a	7.25 ^{ab}	7.30 ^b	0.091

^{a,b} = medias con literales diferentes en una hilera difieren estadísticamente ($p < 0.05$).

EEM = error estándar de la media. +Periodos de 15 d. pHi = pH inicial.

Proporción molar de ácidos grasos volátiles (AGV)

La producción de ácidos grasos volátiles está dada principalmente por el crecimiento microbiano y la disponibilidad de sustrato; en este sentido cuando se dispone de un sustrato de fácil degradación la producción de AGV es rápida y su salida del rumen es limitada, lo que permite una acumulación de AGV e inhiben ciertas reacciones de la fermentación ruminal (Church, 1993; Williams, 1998). Las proporciones molares (acetato:propionato:butirato) varían de 65:25:10 con dietas altas en forraje a 50:40:10 con dietas altas en concentrados (Church, 1993).

La concentración molar de ácido acético y propiónico fue similar ($p>0.05$) entre tratamientos en los periodos evaluados (Cuadro 8). La concentración promedio del ácido butírico del tratamiento tres fue menor significativamente ($p\leq 0.05$) con respecto al tratamiento testigo, pero similar ($p>0.05$) al tratamiento dos. El acetato y propionato son transportados al hígado, mientras que el butirato es convertido en la pared ruminal en β -hidroxibutirato, el cual es una de las principales fuentes de energía para la mayoría de los tejidos (Orskov, *et al.*, 1991; Church, 1993; Owens y Goetsch, 1993).

Cuadro 8. Concentración (mM) de ácidos grasos volátiles en líquido ruminal de borregos en engorda, con diferentes niveles de PET

Variable	Tratamientos				
	Periodo+	1	2	3	EEM
Acetato	Ci	20.01	22.95	26.99	5.90
	1	27.84	28.62	23.07	5.90
	2	34.20	33.65	30.04	5.90
	3	16.42	15.02	11.66	5.90
	4	16.34	13.20	11.87	6.14
	Promedio	22.96	22.69	20.73	3.29
Propionato	Ci	2.94	3.57	3.13	0.95
	1	4.59	4.89	3.11	0.95
	2	6.28	5.33	4.59	0.95
	3	3.01	2.29	1.80	0.95
	4	2.63	2.81	2.03	0.99
	Promedio	3.89	3.78	2.93	0.43
Butirato	Ci	2.34	2.75	1.32	0.82
	1	3.87	3.83	2.95	0.82
	2	3.58	3.50	2.89	0.82
	3	2.13 ^{ab}	1.59 ^a	3.18 ^b	0.82
	4	2.11	1.38	0.77	0.85
	Promedio	2.81 ^a	2.61 ^{ab}	1.58 ^b	0.33

^{a,b} = medias con literales diferentes en una hilera, difieren estadísticamente ($p < 0.05$).

EEM = error estándar de la media. Ci = Concentración inicial. +Periodos de 15 d.

Concentración de nitrógeno amoniacal

El amoniaco es una fuente importante de nitrógeno que utilizan los microorganismos ruminales para su crecimiento, del 60 a 90 % del consumo diario de nitrógeno por los rumiantes es convertido a amoniaco y de 50 a 70 %

del nitrógeno bacteriano puede ser derivado a partir de amoníaco (Mackie y White, 1990).

La concentración de nitrógeno amoniacal ruminal (Cuadro 9) presentó diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en el primer periodo experimental (0 a 15 d), donde el tratamiento dos tuvo una mayor concentración de amoníaco con respecto al tratamiento testigo y tratamiento tres, respectivamente; sin embargo, a partir del segundo periodo experimental (0-15 d) la concentración de nitrógeno amoniacal fue similar entre tratamientos ($p > 0.05$), lo cual fue congruente, ya que, la cantidad de proteína en la dieta de los tres tratamientos fue similar. Las concentraciones de amoníaco requerida para una máxima síntesis de proteína microbiana por unidad de sustrato fermentado son de 5 a 6 mg dL⁻¹ de líquido ruminal (Mehrez y Orskov, 1977); y las concentraciones de nitrógeno amoniacal en líquido ruminal pueden variar de 8.8 a 56.1 mg dL⁻¹, aumentando con el porcentaje de digestibilidad del alimento (Rogers *et al.*, 1996). Dado que los valores de nitrógeno amoniacal en el presente estudio se encuentran dentro de los intervalos normales reportados, se considera que el PET no afecta negativamente esta variable.

Cuadro 9. Concentración de nitrógeno amoniacal (mM) en líquido ruminal de borregos en engorda con diferentes valores de PET

Periodos+	Tratamientos			
	1	2	3	EEM
Ci	16.63	17.31	15.70	2.49
1	13.44 ^a	22.20 ^b	13.92 ^a	2.49
2	20.74	19.38	16.94	2.49
3	9.72	10.65	10.17	2.49
4	10.36	9.34	10.57	2.59
Promedio	14.18	15.77	13.46	1.05

^{a,b} = medias con literales diferentes en una hilera difieren estadísticamente ($p < 0.05$). EEM = error estándar de la media. Ci = Concentración inicial. +Periodos de 15 d.

Concentración de bacterias totales

La concentración de bacterias totales fue similar significativamente entre tratamientos, registrándose un promedio de 1.42×10^{10} (T1), 1.44×10^{10} (T2) y 1.53×10^{10} (T3) bacterial mL^{-1} de fluido ruminal, las cuales se encuentran dentro de los intervalos óptimos que marca la literatura (Orpin y Joblin 1997; Wallace 1994; Jouany 1994). La concentración de bacterias estimada en este estudio coincide con lo reportado por Guerra (2004), quién encontró una concentración de bacterias de 2.5 a 9.5×10^{10} bacterias mL^{-1} de fluido ruminal en borregos alimentados con 30 % de aserrín de pino como fuente de fibra. Por tanto, la inclusión de un 20 % de PET en dietas para borregos no afecta negativamente la concentración de bacterias totales.

Cuadro 10. Concentración de bacterias totales (10^9 mL^{-1}) en líquido ruminal de borregos en engorda, con diferentes niveles de PET

Periodos+	Tratamientos			
	1	2	3	EEM
Ci	7.64	6.70	6.30	2.13
1	9.24	11.88	10.80	2.13
2	9.60	12.40	14.64	2.13
3	21.36	17.28	19.18	2.13
4	23.20	24.16	26.02	2.21
Promedio	14.20	14.48	15.38	1.21

No hubo diferencias significativas ($p > 0.05$). EEM = error estándar de la media.

+Periodos de 15 d. Ci = Concentración inicial.

Concentración de bacterias celulolíticas

La concentración de bacterias celulolíticas (Cuadro 11) fue similar estadísticamente entre los tres tratamientos evaluados, y se encuentran dentro de las concentraciones reportadas por la literatura (10^4 a 10^6 ; Yokohama y Johnson, 1998). Cuando la cantidad de carbohidratos de fácil degradación en la dieta es alta, la concentración de bacterias amilolíticas aumenta, al mismo tiempo que disminuye la cantidad de bacterias celulolíticas como resultado de una disminución en el pH ruminal (Goad *et al.*, 1998). Sin embargo, en este estudio se observó que en los borregos que recibieron PET como fuente de fibra, el pH se mantuvo cercano a la neutralidad.

Cuadro 11. Concentración de bacterias celulolíticas (10^6 mL⁻¹) en líquido ruminal de borregos en engorda alimentados con diferentes niveles de PET

Periodos+	Tratamientos			
	1	2	3	EEM
Ci	1.68	3.15	2.04	1.67
1	1.28	1.50	1.07	1.67
2	1.06	1.16	2.08	1.67
3	4.38	3.22	3.56	1.67
4	3.80	5.00	5.46	1.74
Promedio	2.44	2.80	2.88	1.18

No hubo diferencias significativas ($p > 0.05$). EEM = error estándar de la media.

+Periodos de 15 d. Ci = Concentración inicial.

Concentración de protozoarios

La concentración de protozoarios no fue afectada significativamente en los primeros dos periodos en los tratamientos evaluados. Sin embargo, en el periodo tres (30-45 d) y cuatro (45-60 d) la concentración de protozoarios fue menor significativamente ($p \leq 0.05$) para los tratamientos dos y tres. En el presente estudio las concentraciones promedio de los tres tratamientos evaluados se encuentran dentro del intervalo considerado como normal para animales sanos, que es de $10^4 - 10^6$ protozoarios por mL de fluido ruminal (Nolan, 1993).

Cuadro 12. Concentración de protozoarios (10^5 mL^{-1}) en líquido ruminal de borregos en engorda con diferentes niveles de PET

Periodos+	Tratamientos			EEM
	1	2	3	
Ci	2.99	4.56	1.83	2.92
1	5.44	4.96	10.00	2.92
2	4.40	5.20	6.24	2.92
3	10.72 ^a	5.20 ^{ab}	2.48 ^b	2.92
4	13.12 ^a	4.37 ^b	3.309 ^b	3.04
Promedio	7.33	4.85	4.77	1.09

^{a,b} = medias con literales diferentes en una hilera, son diferentes ($p < 0.05$). EEM = error estándar de la media. ⁺Periodos de 15 d. Ci = Concentración inicial.

CONCLUSIONES

La ganancia diaria de peso, el consumo de materia seca y la eficiencia alimenticia no presentaron diferencias significativas ($p>0.05$) en los borregos que consumieron 10 y 20 % de PET. Entonces, la sustitución de hasta 20% de rastrojo de maíz por PET como fuente de fibra no afecta negativamente las variables productivas.

Las concentraciones promedio de AGV y nitrógeno amoniacal no fueron diferentes entre tratamientos, pero el pH cambió ($p\leq 0.05$) en los borregos que recibieron 10% y 20% de PET, en los cuales el pH tendió a la neutralidad en lugar de acidificarse como sucede al usar dietas altas en concentrado. Debido a una mejor pH, no hubo efectos negativos en la concentración de bacterias totales, celulolíticas y protozoarios.

EXPERIMENTO 2

Desaparición *in vitro* de la materia seca del PET y de las dietas del primer experimento

RESUMEN

El principal objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad para degradar la MS de dietas que contienen 0, 10 y 20% de polietilentereftalato (PET), entre un cultivo mixto de bacterias ruminales aisladas (BA) contra las presentes en líquido ruminal fresco (LRF). El estudio se realizó *in vitro* mediante técnicas anaerobias. El inóculo de BA se aisló a partir de líquido ruminal de cinco borregos con un peso vivo (PV) de 38 kg, alimentados durante 60 d con una dieta que contenía 20% de PET; mientras que, el inóculo de LRF se obtuvo de ovinos alimentados con una dieta comercial libre de PET. Los tratamientos evaluados fueron (T): T1 = dieta con 0% de PET + BA; T2 = dieta con 0 % PET + LRF; T3 = dieta con 10 % PET + BA; T4 = dieta con 10 % PET + LRF; T5 = dieta con 20 % PET + BA; T6 = dieta con 20 % PET + LRF. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente en un diseño completamente al azar con mediciones repetidas. A las 24 h de incubación el inóculo BA presentó una mayor ($P < 0.05$) degradación de la MS que las bacterias del LRF, en la dieta que contenía 10 % de PET (26.38 vs 8.72 %, respectivamente), y 20 % de PET (29.69 vs 18.79 %, respectivamente). A las 48h de incubación, se mantuvo una mayor degradación de MS por parte de las BA con respecto a las bacterias del LRF, en las dietas que contenían 10 % de PET (57.11 vs 51.99 %, respectivamente), pero en la dieta que contenía 20 % de PET la degradación de MS fue mayor cuando se utilizó LRF como inóculo (58.3 vs 48.77; LRF vs BA, respectivamente). A las 72 h de incubación, solamente se determinaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la dieta con 10 % de PET, en donde las BA mostraron una mayor degradación de la MS que las bacterias del LRF (67.55 vs 55.34 %). También se evaluó la capacidad de BA y LRF para degradar PET, sin embargo, los resultados obtenidos no mostraron diferencias entre tipo de inóculo (BA o LRF) y la degradación de PET fue muy baja (2.17 y 2.07 %, BA y LRF) después de 72 h de incubación, respectivamente. Se concluye que las bacterias aisladas de animales alimentados con 20 % de PET en la dieta, tienen una mayor capacidad para degradar dietas que contienen 10 % de PET.

Palabras clave: PET, polietilentereftalato, bacterias ruminales, degradación de PET

SUMMARY

The main objective of this research was to compare the capacity of DM degradation of diets containing 0, 10 and 20 % polyethyleneterephthalate (PET) between a mix culture of rumen bacteria isolated (AB) and bacteria present in fresh rumen liquid (FRL). The study was performed *in vitro* by means of anaerobic techniques. The (AB) inoculum was isolated from the rumen liquid of five lambs with an average body weight of 38 kg, feeding a diet containing 20 % PET for 60 d; while, the FRL inoculum was obtained from lambs feeding a PET-free diet. Treatments (T) evaluated were: T1 = 0 % PET diet + AB, T2 = 0 % PET diet + FRL, T3 = 10 % PET diet + AB, T4 = 10 % PET diet + FRL, T5 = 20 % PET diet + AB, T6 = 20 % PET diet + FRL. Data were statistically analyzed in a completely randomized design with repeat measurement in time. At 24 h of incubation, the AB showed an higher ($P<0.05$) DM degradation than bacteria on FRL on the diet containing 10 % PET (26.38 vs 8.72 %, respectively), and 20 % PET (26.69 vs 18.79 %, respectively). After 48 h of incubation the higher DM degradation was maintained by AB with respect to bacteria present FRL in diet containing 10 % PET (57.11 vs 51.99 %, respectively), but in the diet containing 20 % PET, DM degradation was higher with the FRL than with AB inoculum (58.3 vs 48.77 %, respectively). At 72 h of incubation a significant differences ($P<0.05$) was only observed with the diet containing 10 % PET, where the AB inoculum showed better DM degradation than FRL inoculum (67.55 vs 55.34 %). Also, PET degradation by AB an FRL was measured; however, results obtained showed no differences between inoculum (AB and FRL), and the PET degradation after 72 h of incubation was too low (2.17 and 2.07 %, AB and FRL). It is concluded that the aisolated bacteria from lambs fed a diet containing 20 % PET, have a better capacity to degrade the DM content of diets containing 10 % PET.

Key words: PET, polyethyleneterephthalate, rumen bacteria, PET degradation

INTRODUCCIÓN

Un material con mucha demanda en México es el polietilentereftalato (PET) debido a sus características de durabilidad, impermeabilidad y no toxicidad. En México la fabricación principalmente de envases, empaques y productos elaborados con plástico se ha incrementado considerablemente en años recientes; en el 2000 se produjeron 3 mil t de material plástico, de las cuales 413 t se destinaron a la fabricación de PET (APREPET, 2006).

Organizaciones como el programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente han iniciado campañas para alertar a la población acerca del riesgo de la acumulación de residuos sólidos no degradables, en particular de plásticos desechables, debido a su efecto sobre el equilibrio ecológico del planeta; se calcula que una botella de PET puede tardar en degradarse aproximadamente mil años (APREPET, 2006). En México se distribuyen 9 mil millones de botellas de PET al año, de las cuales al menos 90 millones se dispersan en el medio ambiente, ocasionando un grave problema de contaminación ambiental.

Considerando la similitud entre la solubilización anaerobia ruminal de compuestos aromáticos naturales como la lignina, con la reportada en aguas residuales con alta concentración de ácido tereftálico, se realizó un primer experimento donde la inclusión de 10 y 20 % de PET en la dieta para borregos en engorda, permite un consumo de alimento y GDP similar a la de los ovinos alimentados con una dieta convencional; además, la concentración de bacterias ruminales no sufre cambios. Entonces, después de 60 d de alimentar borregos con dietas que contienen PET, es necesario investigar si la flora microbiana

desarrollada en el rumen de los borregos alimentados con PET tiene una mayor capacidad para degradar PET (o dietas que contengan este polímero sintético), con relación a la población bacteriana de ovinos alimentados con una dieta convencional. Por tanto, el objetivo de la presente investigación fue aislar y caracterizar un cultivo bacteriano con capacidad para degradar PET.

Objetivos

Aislar y caracterizar un cultivo bacteriano con capacidad para degradar polietilentreftalato.

Determinar la desaparición *in vitro* de la MS de tres dietas utilizando el cultivo bacteriano aislado.

Hipótesis

La utilización de medios de cultivo anaerobios selectivos permiten aislar un cultivo mixto de bacterias con capacidad para degradar polietilentreftalato.

El cultivo mixto de bacterias aisladas a partir de ovinos alimentados con PET tienen una mayor capacidad para degradar polietilentreftalato.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento del cultivo mixto bacteriano

Obtención del cultivo mixto bacteriano

La fuente de inóculo fueron cinco borregos con un PV promedio de 38 kg después de alimentarlos durante 60 d (Experimento 1) con una dieta que contenía 20 % de polietilentereftalato. Una vez terminado el primer experimento (60 d), se obtuvieron 250 mL de líquido ruminal de la parte media ventral del rumen mediante sonda esofágica. Se depositaron 50 mL de líquido ruminal fresco en viales de 100 mL, se taparon con tapón de hule negro y arillo de aluminio y se congelaron a 1 °C por 48 h para después ser liofilizados por 48 h en una liofilizadora LABCONCO, modelo Freezone-6, durante 3 d.

Crecimiento del cultivo bacteriano en medio líquido

Se elaboró un medio de cultivo selectivo a base de ácido tereftálico-fluido ruminal (AT-FR; Cuadro 13). El medio anaerobio AT-FR se preparó usando la metodología descrita por Cobos y Yokoyama (1995). Se depositaron 9 mL de medio AT-FR en tubos de cultivo (18 x 150 mm) estériles y con flujo de CO₂ constante, se incubaron a 38 °C por 48 h para comprobar esterilidad de los medios. Para inocular los medios líquidos se depositaron 0.05 g de material liofilizado bajo flujo de CO₂ y en condiciones de esterilidad, para lo cual se utilizó una campana de flujo laminar vertical Labconco, modelo Purifier Class II. Con la

cantidad de material liofilizado (0.05 g) se aseguró obtener una concentración mínima de 10^7 bacterias mL^{-1} . Los tubos se incubaron a 38 °C por 48 h.

Aislamiento del cultivo bacteriano en medio sólido

En tubos de cultivo (18 x 150 mm; Cuadro 13) se prepararon medios sólidos anaerobios selectivos. En cada tubo se depositaron 9 mL de medio y mediante la técnica del tubo rodado se dispersó el medio en las paredes del tubo (Hungate, 1969), se incubaron a 38 °C por 48 h para verificar esterilidad de los mismos. Del cultivo líquido se hicieron diluciones (10^{-1} a 10^{-8}) y luego los medios sólidos fueron inoculados con el medio líquido a razón de 1 mL por tubo (por triplicado) con las diluciones descritas; luego se incubaron a 38 °C por 48 h. Después se hizo una caracterización bacteriana en cuanto a tamaño y tinción de Gram usando la metodología descrita por Harrigan y McCance (1979).

Cuadro 13. Composición del medio de cultivo líquido para el aislamiento del cultivo mixto de bacterias degradadoras de PET

Componente	Medio
Cantidad por 100 mL	
Agua destilada (mL)	52.6
Líquido ruminal clarificado (mL) ⁽¹⁾	30.0
Sol. mineral I (mL) ⁽²⁾	5.0
Sol. mineral II (mL) ⁽³⁾	5.0
Resarzurina 0.1 % (mL) ⁽⁴⁾	0.1
Tristona de soya (g)	0.2
Extracto de levadura (g)	0.1
Carbonato de sodio al 8 % (mL) ⁽⁵⁾	5.0
Sol. de cisteína sulfido (mL) ⁽⁶⁾	2.0
Ácido tereftálico (g)	0.05
Agar bacteriológico (g)*	2.0

*Utilizado sólo para medios sólidos

⁽¹⁾ Líquido ruminal clarificado, previamente filtrado con una gasa triple y centrifugado a 12,000 rpm, por 15 min tres veces y esterilizado por 15 min a 15 psi, 121 °C.

⁽²⁾ Contiene 6 g de K₂HPO₄ por 1000 mL de H₂O.

⁽³⁾ Contiene 6 g de KH₂PO₄; 6 g (NH₄)₂SO₄; 12 g NaCl; 2.45 g MgSO₄ y 1.6 g de CaCl²·H₂O por 1000 mL de H₂O (Bryant y Robinson, 1962).

⁽⁴⁾ Agregar 0.1 mL solución al 1 % en agua y aforar a 100 mL de agua destilada.

⁽⁵⁾ 8 g de carbonato de sodio en 100 mL de agua destilada.

⁽⁶⁾ 2.5 g de L- cisteína (disuelta en 15 mL de 2N NaOH); 2.5 g de Na₂S·9H₂O y 0.1 mL de resarzurina en un volumen final de 100 mL.

Prueba de degradación *in vitro* de la MS de las dietas experimentales

Se evaluaron seis tratamientos, con dos fuentes de inóculo: bacterias aisladas en medio con PET (BAPET) y líquido ruminal fresco (LRF). Los tratamientos fueron los siguientes:

T1 = dieta testigo + BAPET; T2 = dieta testigo + LRF; T3 = dieta con 10% PET + BAPET; T4 = dieta con 10% PET + LRF; T5 = dieta con 20% PET + BAPET; T6 = dieta con 20% PET + LRF.

Se utilizó la técnica descrita por López *et al.* (1999) y Cobos y Yokoyama (1995). Se depositaron por triplicado 9 mL de medio de cultivo (Cuadro 14) y 0.1 g de las muestras en tubos estériles de 18 x 150 mm con flujo de CO₂ y se incubaron a 38 °C por 48 h para comprobar esterilidad. Para la inoculación se depositó 1 mL del medio de las bacterias aisladas (10⁷ bacterias mL⁻¹ de medio), las cuales habían crecido en medio líquido por 48 h. Para el inóculo proveniente del líquido ruminal fresco se hicieron diluciones hasta obtener una concentración aproximada de 10⁷ bacterias mL⁻¹ (similar concentración a la de las bacterias aisladas). Después de la inoculación los tubos fueron incubados a 38 °C por 24, 48 y 72 h. Para determinar la cantidad de muestra degradada se recuperó el residuo por filtración a través de un papel Whatman No. 540 usando una bomba de vacío. El material recuperado se secó a 60 °C por 24 h y se pesó para calcular el porcentaje de material degradado. Para calcular la fase lag y tasa de degradación se realizó un análisis de regresión lineal simple: $Y = a + bx$; la tasa de degradación es la pendiente entre el tiempo, y la fase lag = $((\ln 100) - (a))/\text{tasa de degradación}$.

Cuadro 14. Composición del medio de cultivo para la degradación *in vitro* de la MS del PET y de las dietas experimentales

Compuesto	Cantidad por 100 mL
Agua destilada (mL)	52.6
Líquido ruminal clarificado (mL) ⁽¹⁾	30.0
Solución mineral I (mL) ⁽²⁾	5.0
Solución mineral II (mL) ⁽³⁾	5.0
Rezarsurina 0.1 % (mL) ⁽⁴⁾	0.1
Peptona de soya (g)	0.2
Extracto de levadura (g)	0.1
Carbonato de sodio, sol. 8 % (mL) ⁽⁵⁾	5.0
Sol. Cisteína sulfito de sodio (mL) ⁽⁶⁾	2.0
Dieta (g)	0.1
PET (g)	0.1

⁽¹⁾ Líquido ruminal clarificado filtrado en una gasa triple y centrifugado a 12,000 rpm, por 15 min tres veces y esterilizado por 15 min a 15 psi, 121 °C.

⁽²⁾ Contiene 6 g de K_2HPO_4 por 1000 mL de H_2O .

⁽³⁾ Contiene 6 g de KH_2PO_4 ; 6 g $(NH_4)_2SO_4$; 12 g NaCl; 2.45 g $MgSO_4$ y 1.6 g de CaCl² \cdot H_2O por 1000 mL de H_2O (Bryant y Robinson, 1962).

⁽⁴⁾ Agregar 0.1 mL solución al 1 % en agua y aforar a 100 mL de agua destilada.

⁽⁵⁾ 8 g de carbonato de sodio en 100 mL de agua destilada.

⁽⁶⁾ 2.5 g de L- cisteína (disuelta en 15 mL de 2N NaOH); 2.5 g de $Na_2S \cdot 9H_2O$ y 0.1 mL de resarzurina en un volumen final de 100 mL.

Prueba de degradación *in vitro* de la MS del PET

La prueba de degradación del PET se hizo a las 24, 48 y 72 h siguiendo la metodología descrita anteriormente. Los tratamientos fueron: T1 = cultivo mixto de bacterias aisladas; T2 = líquido ruminal fresco

pH

El pH se determinó directamente de los medios de cultivo inoculados para la degradación *in vitro* a las 24, 48 y 72 h de incubación usando un potenciómetro marca ORION modelo 250A calibrado a pH 4 y 7, de acuerdo con el procedimiento descrito en el manual de ORION (1996).

Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar con medidas repetidas a través del tiempo (REPEATED MEASURES); hubo ocho tratamientos, con tres repeticiones por cada tratamiento que se distribuyeron en forma aleatoria en las unidades experimentales (tubos de cultivo). Se utilizó el procedimiento MIXED (Littell *et al*, 1998; SAS, 1999; Wang y Goonwardese, 2004).

El modelo estadístico fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \delta_i + t_j + (\delta t)_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = variable respuesta

μ = media general

$\bar{\delta}_i$ = efecto fijo del i-ésimo tratamiento

t_j = efecto fijo del j-ésimo factor (periodo, tiempo)

$(\bar{\delta t})_{ij}$ = efecto fijo de la interacción del i-ésimo tratamiento con el j-ésimo periodo

ε_{ij} = error experimental.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento del cultivo mixto bacteriano

Mediante la utilización de los medios de cultivos anaerobios selectivos sólidos y líquidos en los cuales se adicionó ácido tereftálico como sustrato nutritivo, se aisló un cultivo mixto compuesto por dos especies de bacterias. Una corresponde a un coco sólo o en pares, Gram positivo de 3 -5 μm de diámetro; esta bacteria fue una de las más predominantes en el cultivo (70 %). El otro tipo de bacteria corresponde a un bacilo motil Gram positivo de aproximadamente 12 μm de longitud representando el resto de la población bacteriana (30 %).

Prueba de degradación *in vitro* de la MS de las dietas experimentales

Los resultados de la degradación *in vitro* de las dietas por los diferentes inóculos se muestran en el Cuadro 15. En la hora 24 los tratamientos que recibieron como fuente de inóculo el cultivo mixto de bacterias aisladas fueron diferentes significativamente ($p \leq 0.05$), sobre todo comparado con los tratamientos cuatro y seis donde las dietas contenían PET y el inóculo fue líquido ruminal fresco. Este comportamiento es lógico debido principalmente a que dichos tratamientos fueron inoculados con bacterias aisladas de borregos que previamente habían recibido PET en la dieta, lo que permitió una más rápida adaptación de los microorganismos ruminales a este tipo de sustrato. Una respuesta similar se observó 48 h después de incubación, donde los tratamientos tres y cuatro presentaron una degradación mayor (57.11 vs 58.30%), comparado con los tratamientos donde el inóculo fue líquido ruminal

fresco. En la hora 72 no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) en degradación debido principalmente a que las bacterias ruminales en ese tiempo ya se adaptaron al sustrato.

Cuadro 15. Degradación *in vitro* (%) de la MS de las dietas experimentales con dos fuentes de inóculo

Tratamientos (T)	Hora de incubación		
	24	48	72
T1	29.32 ^a	45.38 ^a	62.56
T2	27.80 ^{ac}	49.81	62.30
T3	26.38 ^{ad}	57.11 ^b	67.55 ^a
T4	8.72 ^b	51.99	55.34 ^b
T5	29.69 ^a	48.77	61.24
T6	18.87 ^{cd}	58.30 ^c	61.10
Error estándar	4.48	4.48	4.48

^{a,b,c,d} = medias con literales diferentes en una columna, difieren estadísticamente ($p \leq 0.05$).

T1 = dieta 1 + bacterias aisladas (BA); T2 = dieta 1 + líquido ruminal fresco (LRF); T3 = dieta 2 + BA; T4 = dieta 2 + LRF; T5 = dieta 3 + BA; T6 = dieta 3 + LRF.

En cuanto a la cinética de degradación, no se observó fase lag ($b > \ln 100$) en todos los tratamientos, mientras que la tasa de degradación (Kd) fue 16.62, 17.23, 20.58, 23.31, 15.77, y 21.11 h para los tratamientos uno, dos, tres, cuatro, cinco y seis. Los resultados de este experimento a las 72 h son similares

a los obtenidos por Mora (2001) y Guerra (2004) quienes alimentaron borregos con 30% de rastrojo de maíz como fuente de fibra. En consecuencia, la utilización de hasta 30% PET en la dieta no afecta la degradación *in vitro* de la MS; dicho resultado se vio reflejado en las GDP del primer experimento donde no hubo diferencias significativas.

Prueba de degradación *in vitro* del PET

Los resultados de la degradación *in vitro* del PET se muestra en el Cuadro 16; no hubo diferencias significativas y la degradación de este sustrato (1.04 a 2.07%) fue muy baja en las 72 de incubación. Esto indica que para las bacterias ruminales es difícil adaptarse rápidamente y degradar este tipo de sustrato; por tanto, sería conveniente realizar observaciones en un periodo más prolongado de tiempo. De igual manera no se observó fase lag para los tratamientos y la tasa de degradación de la MS fue muy similar para el T2 (0.51 h) y el T1 (0.46). En la degradación de tereftalato disódico (presente en agua residuales), la bacteria *Dietzia* sp. cepa GS-1 mostró una fase lag de 50 h antes de iniciar el crecimiento, mientras que la fase exponencial tuvo una duración de 72 h con una fase de estabilización a las 168 h (Sugimori *et al.*, 2000). Estos resultados indican la dificultad de las bacterias ruminales o de otros ambientes para degradar compuestos fenólicos. En consecuencia para estudiar la degradación del PET por bacterias ruminales aisladas es necesario aplicar metodologías propuestas en otros estudios, donde se ha requerido 1 a 3 meses de fase lag o de arranque para la degradación de compuestos fenólicos (Qiu *et al.*, 2004).

Cuadro 16. Degradación *in vitro* (%) de PET durante 72 h

Tratamientos (T)	Hora de incubación		
	24	48	72
T1	1.24	1.70	2.17
T2	1.04	1.63	2.07
Error estándar	0.15	0.15	0.15

No existieron diferencias significativas ($p > 0.05$)

T1 = bacterias aisladas (BA); T2 = líquido ruminal fresco (LRF).

pH

El pH de los medios de los tratamientos evaluados a diferentes horas de incubación se muestra en el Cuadro 18. En la hora cero no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, este resultado era el esperado ya que antes de las inoculaciones los medios de cultivos fueron ajustados a un pH aproximado de 6.8. Sin embargo, a 24 h los tratamientos uno y dos fueron inferiores significativamente ($p \leq 0.05$) comparado con el tratamiento tres. Por tanto, en la dieta testigo la adaptación de las bacterias en las primeras 24 h fue más rápida debido a la presencia de una alta cantidad de carbohidratos de fácil fermentación, por lo que el pH tendió a disminuir. A las 48 h de incubación el pH del tratamiento dos fue menor significativamente ($p \leq 0.05$) al tratamiento tres y cinco, respectivamente; registrando este tratamiento (T2) el pH más bajo (6.31). En la hora 72 el pH de los tratamientos uno y dos fueron diferentes significativamente ($p \leq 0.05$). Por tanto, las dietas que contenían PET como fuente

de fibra, el pH fue más alto. El mismo comportamiento se presentó en el pH del líquido ruminal de los animales de los tratamientos dos y tres en el primer experimento

Cuadro 17. Efecto de dos fuentes de inóculos en el pH de los medios a diferentes horas de incubación

Tratamientos (T)	Hora de incubación			
	0	24	48	72
T1	6.76	6.20 ^a	6.44	6.15 ^a
T2	6.80	6.30 ^a	6.31 ^a	6.20 ^a
T3	6.81	6.73 ^b	6.59 ^b	6.40 ^b
T4	6.79	6.71 ^b	6.47	6.50 ^{bd}
T5	6.82	6.71 ^b	6.51 ^c	6.61 ^{cde}
T6	6.82	6.66 ^b	6.40	6.53 ^{be}
Error estándar	0.095	0.095	0.095	0.095

^{a,b,c,d,e} = medias con literales diferentes en una columna, difieren estadísticamente ($p \leq 0.05$).

T1 = dieta 1 + bacterias aisladas (BA); T2 = dieta 1 + líquido ruminal fresco (LRF); T3 = dieta 2 + BA; T4 = dieta 2 + LRF; T5 = dieta 3 + BA; T6 = dieta 3 + LRF.

CONCLUSIONES

El cultivo mixto de bacterias ruminales aislado estuvo constituido por dos especies de bacterias, una correspondió a un coco sólo o en pares, Gram positivo de 3 a 5 μm de diámetro; esta bacteria fue una de las más predominantes el cultivo (70 %). La otra bacteria correspondió a un bacilo mótil Gram positivo de aproximadamente 12 μm de longitud representando el resto de la población bacteriana restante (30 %). La degradación *in vitro* de la MS de las diferentes dietas del experimento con el cultivo mixto de bacterias se adaptó mejor en las primeras 24 h de incubación en las dietas que tenían PET, comparado con las bacterias de líquido ruminal fresco. El pH de los medios de cultivo fue mayor significativamente a partir de la hora 24 en los tratamientos donde se inoculó con bacterias aisladas.

La degradación *in vitro* del PET fue mínima en toda la fase experimental (72 h) lo que indica que este tipo de substrato es muy difícil de degradar en ese periodo de tiempo, por lo que es necesario realizar incubaciones por un tiempo más prolongado ya que estudios con bacterias en otros ambientes anaerobios, se ha demostrado que se requieren de periodos de incubación de 200 h para que se haga evidente la degradación de tereftalato.

LITERATURA CITADA

- Altun, S. and Y. Ulcay. 2004. Improvement of waste recycling in PET fiber production. *J. Prod. Environm.* 12(4):231-237.
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Vol. 1, 15th Ed. Assoc. Offic. Anal. Chem. Washington, D. C. pp. 69-88.
- APREPET.2006. [www. aprepet.org.mx](http://www.aprepet.org.mx). Fecha de consulta 11 de febrero del 2006.
- Bryant, M. P. and I. M. Robinson. 1962. Some nutritional characteristics of predominant culturable ruminal. *J. Bacteriology.* 64: 605-613.
- Chen, W., K. Ohmiya, S. Shimizu and H. Kawakami. 1985. Degradation of dehydrovanillin by anaerobic bacteria from cow rumen fluid. *Appl. Environm. Microbiol.* 49:211-216.
- Chen, C. L., H. Macarie, I. Ramírez, A. Olmos, S. L. Ong, O. Monroy, and W. T. Liu. 2004. Microbial community structure in a thermophillic anaerobic hybrid degrading terphthalate. *Microbiology.* 150:3429-3440.
- Chesson, A., C. S. Stemart, and R. J. Wallace. 1982. Influence of plant phenolic acids on growth and cellulolytic activity of rumen bacteria. *Appl. Environm. Microbiol.* 44: 597-603.
- Church, D. C. 1993. *El Rumiante. Fisiología Digestiva y Nutrición.* Ed. Acriba España. pp. 137-142.

- Cobos, M. A. and M. T. Yokoyama. 1995. *Clostridium paraputrificum* var. *Ruminantium*: colonization *in vitro* observed by scanning electron microscopy. *In*: Rumen Ecology Research Planning. Wallace, R. J. and Lahlou- Kassi (eds.). Proceeding of a Workshop held at ILRI, Addis Ababa, Ethiopia. pp. 151-162.
- Daniels, L. B., J. R. Campbell, F. R. Martz and H. B. Hedrick. 1970. An evaluation of newspaper as feed for ruminants. *J. Anim. Sci.* 30: 593-597.
- Dehority B. A. 1998. Microbial Interactions in the rumen. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 15: 69-86.
- ECOSE. 2006. <http://www.ecoce.org.mx>. Fecha de consulta 12 de febrero del 2006.
- El-Sabban, F. F., T. A. Long, and B. R. Baumgart. 1972. Utilization of oak sawdust as a roughage substitute in beef cattle finishing rations. *J. Anim. Sci.* 32: 749-755.
- Espí, E., A. Salmerón., A. Fontecha., Y. García., and A. I. Real. 2006. Plastic films for agricultural application. *J. Plastic Films Sheeting*. 22: 85-102.
- Fahey, G. C., McLaren G. A. and Williams J. E. 1979. Lignin digestibility by lambs fed both low quality and high quality roughages. *J. Anim. Sci.* 48:941-953.
- Fajardo, C., J. P. Guyot, H. Macarie, and O. Monroy. 1997. Inhibition of anaerobic digestion by terephthalic acid and its aromatics by products. *Water. Sci. Technol.* 36(67):83-90.

- Franck, H. G. and J. W. Stadelhofer. 1988. p-Xylene and its derivatives: terephthalic acid. *In*: Industrial aromatic chemistry: raw materials, processes, products. Franck, H. G. (ed.). Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp. 283-290.
- Gill, M., and J. D. Oldham. 1993. Growth. *In*: Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism, Forbes, J. M., and J. France (eds.). CAB Internatoinal. Oxon, UK. pp. 383-401.
- Goad, D. W., D. L. Goad and T. G. Nagaraja. 1998. Ruminant microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. *J. Anim. Sci.* 76:234-241.
- Gonzalez-Aranda, A., L. J. Bush, J. L. Cunningham and B. J. Steevens. 1972. Polyethylene as roughage substitute in rations for dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 32: 1239-1244.
- Guerra, M. C. E. 2004. Uso de aserrín de pino (*Pinus patula*) en la engorda de ovinos y aislamiento de un cultivo bacteriano. Tesis de Doctorado. Programa en Ganadería, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo de México. 106 p.
- Hansen, K. R., R. D. Furr and L. B. Sherrod. 1969. A comparison of roughage sources in feedlot rations. *J. Anim. Sci.* 28: 136-138.
- Harrigan, W. F. and M. E. McCance. 1979. Métodos de Laboratorio en Microbiología de Alimentos y Productos Lácteos. Ed. Academia, Leon, España. pp: 361-366.

- Hobson, P. M. 1988. The rumen microbial ecosystem. Elsevier Science Publisher. UK. pp: 21-76.
- Hungate, R. E. 1969. A roll tube method for cultivation strict anaerobes. *In*: Methods in Microbiology. Norris, J. R., and D. E. Robins (eds.). Academic Press Inc. New York, USA. pp. 117-132.
- Jouany, J. P. 1994. Methods of manipulating the microbial metabolism in the rumen. *Ann. Zootech.* 43: 42-69.
- Karegoudar, T. B., and B. J. Pujar. 1985. Degradation of terephthalic acid by a *Bacillus* species. *FEMS Microbiol. Letters* 30: 217-220.
- Karlsson, A. J., Ejlertsson, and Svensson. 2000. CO₂-dependent fermentation of phenol to acetate, butyrate and benzoate by an anerobic, pasteurized culture. *Arch. Microbiol.* 173:398-402.
- Kimura, T., and Y. Ito. 2001. Two bacterial mixed culture systems suitable for degrading terephthalate in wastewater. *J. Biosci. Bioeng.* 91(4):416-418.
- Kleerebezem, R., L. W. H. Pol, and G. Lettinga. 1999a. Anaerobic degradation of phthalate isomers by methanogenic consortia. *Appl. Environm. Microbiol.* 65(3):1152-1160.
- Kleerebezem, R., L. W. H. Pol, and G. Lettinga. 1999b. The role of benzoate in anaerobic degradation of terephthalate. *Appl. Environm. Microbiol.* 65(3):1161-1167.
- Kleerebezem, R., M. Ivalo., L. W. H. Pol, and G. Lettinga. 1999c. High-rate treatment of terephthalate in anaerobic hybrid reactors. *Biotechnol. Prog.* 15:347-357.

- Lettinga, G. 1995. Anaerobic digestion and wastewater treatment systems. *Antonie Leeuwenhoek*. 67:3-28.
- Littell, R. C., P. C. Henry, and C. B. Ammerman. 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Anim. Sci.* 76: 1216-1231.
- Lopéz, S., M. D. Carro, J. S. González and F. J. Ovejero. 1999. Comparison of different in vitro and in situ methods to estimate the extent and rate of degradation of hays in the rumen. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 73: 99-113.
- Lstrok S., AbuZek y Radecka I. 2001. Biosynthesis of PHB tercopolymer by *Bacillus cereus* UVM., *J. Appl. Microbiol.* 90(13): 353.
- Macarie, H. 2000. Overview of the application of anaerobic treatment to chemical and petrochemical wastewaters. *Water. Sci. Technol.* 42(5-6):201-214.
- Mackie, I. R. and B. A. White. 1990. Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism: Potential impact on nutrient output. *In: Symposium, Rumen microbial ecology and nutrition.* *J. Anim. Sci.* 73:2871-2995.
- Martin, A. K. 1982. The origin of urinary aromatic compounds to simple phenols. *Br. J. Nutr.* 48: 497-507.
- McCullough, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by direct colorimetric method. *Clin. Chem.* 17:297-304.
- Mehrez, A. Z. and E. R. Orskov. 1977. A study of artificial bag technical for determiniting the digestibility of feed in the rumen. *J. Agric. Sci. Camb.* 88:645-650.

- Mertens, D. R. 1997. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80: 1463-1481.
- Mora, J. G. 2001. Respuesta productiva y fermentación ruminal en borregos alimentados con grano de sorgo tratado con amilasa. Tesis de Maestría. Especialidad de Ganadería. Colegio de Postgraduados. México. 43 p.
- Nolan, J. V. 1993. Nitrogen kinetics. *In: Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism.* Forbes, J. M. and J. France (eds.). CAB International. Australia. pp. 123-143.
- Nozawa, T., and Y. Maruyama. 1988. Anaerobic metabolism of phthalate and others aromatic compounds by a denitrifying bacterium. *J. Bacteriol.* 170:5778-5784.
- NRC. 1985. Nutrient Requirements of Sheep. 6th revised edition. National Academy Press. Washington, D. C. 104 p.
- Oltjen, R. R., R. J. Sirny and A. D. Tillman. 1962. Purified diets studies with sheep. *J. Anim. Sci.* 21: 277-280.
- Orion. 1996. Benchon pH/ISE Meters Models 250A, 420A, 520A, 525A, 710A, 920A. Instruction Manual USA. pp: 5-8, 33-36.
- Orpin, C. G. and K. N. Joblin. 1997. The rumen anaerobic fungi. *In: The rumen Microbial Ecosystem.* Hobson, P. N., and C. S. Stewart (eds.). Blackie Academic and Professional, Publishers, London. pp: 140-195.

- Orskov, E. R., E. R., N. A. MacLeod, and Y. Nakashima. 1991. Effect of different volatile fatty acids mixtures on energy metabolism in cattle. *J. Agric. Sci. Camb.* 69: 3389-3397.
- Owens, F. N., and A. L. Goetsch. 1993. Fermentación ruminal. *In: El rumiante. Fisiología Digestiva y Nutrición.* Church, D. C. (ed). Acriba, S. A. Zaragoza, España. pp. 159-190.
- Owens, F, N., D. S., Secrist, W. J. Hill and D. R. Gill. 1998. Acidosis in cattle. A review. *J. Anim. Sci.* 76: 275-286.
- Peláez F. 2001. Los plásticos / www.ingenieriaambiental, fecha de consulta 15 de octubre de 2005.
- Perry, T. W., H. F. Troutt, R. C. Peterson and W. M. Beeson. 1968. Oyster shell a roughage replacer in fattening beef cattle rations. *J. Anim. Sci.* 27: 185-189.
- Pesti, G. M., and B. R. Miller. 1993. *Animal Feed Formulation, Economics and Computer Applications.* An. AVI Book, Van Nonstrand Reinhold. Georgia. USA. 320 p.
- Pisano, C. A., U. Cardamone y P. D. Conde. 2000. *Reciclado del PET.* Centro Tecnológico de Plásticos y Elastómeros. Madrid, España 12 p.
- Qiu, Y. L., Y. Sekiguchi, H. Imachi, Y. Kamagata, I. C. Tseng, S. S. Cheng, A. Ohashi, and H. Harada. 2004. Identification and isolation of anaerobic, syntrophic phthalate isomers-degrading microbes from methanogenic

- sludges treating wastewater from terephthalate manufacturing. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(3):1617-1626.
- Rogers, J. A., H. R. Conrad, B. A. Dehority, and J. A. Grup. 1996. Microbial numbers, rumen fermentation and nitrogen utilization of steers fed wet and dried brewers grains. *J. Dairy Sci.* 59:745-753.
- Sánchez, P. I. 2000. Efecto de la fuente nitrogenada y un ionóforo en el consumo, digestibilidad y variables ruminales en borregos. Tesis de Maestría. Programa en Ganadería, Colegio de Postgraduados. 51 p.
- SAS. Institute Inc. 1999. SAS User's Guide Statistics. Version 8.0. Cary North Carolina, USA. 956 p.
- Schläfli, H. R., M. A. Weiss, T. Leisinger, and A. M. Cook. 1994. Terephthalate 1,2-dioxygenase system from *Comamonas testosteroni* T-2: purification and some properties of the oxygenase component. *J. Bacteriol.* 176(21):6644-6652.
- Shelton, D. R. and J. M. Teidje. 1984. Isolation and partial characterization of bacteria in anaerobic consortium that mineralizes 3-chlorobenzoic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 840-848.
- Sheng, S. C., C. Y. Ho, and J. H. Wu. 1997. Pilot study of USAB process treating PTA manufacturing wastewater. *Water Sci. Technol.* 36(6-7):73-82.
- Shigematsu, T., K. Yumihara, Y. Ueda, M. Numaguchi, S. Morimura, and K. Kida. 2003. *Delftia tsuruhatensis* sp. Nov., a terephthalate-assimilating bacterium isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:1479-1483.

- Sigma. 1990. Commonly Used Tissue Culture Terms. Technical Information. Catalogue Sigma Cell Culture Reagents. pp. 180-190.
- Slyter, A. L. and L. D. Kamstra. 1974. Utilization of pine sawdust as a roughage substitute in beef finishing rations. *J. Anim. Sci.* 38: 693-696.
- Sudesh, K., H.Abe, and Y.Doia 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biol. Polyesters. *Progress Polymer Sci.* 25(10): 1503-1507.
- Sugimori, D., T. Dake, and S. Nakamura. 2000. Microbial degradation of disodium terephthalate by alkaliphilic *Dietzia* sp. Strain GS-1. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* 64(12):2709-2711.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 74: 3583-3597.
- Wallace, R. J. 1994. Ruminal microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition: progress and problems. *J. Anim. Sci.* 72:2992-3003.
- Wang, Z., and L. A. Goonwardene. 2004. The use of mixed models in the analysis of animal experiments with repeated measures data. *Can. J. Anim. Sci.* 84: 1-11.
- Warikoo, V., M. J. McInerney., J. A. Robinson and J. M. Suflita. 1996. Interspecies acetate transfer influences the extent of anaerobic benzoate degradation by syntrophic consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:26-32.

- White, T. W. and W. L. Reynolds. 1969. Various sources and levels of roughage in steers rations. *J. Anim. Sci.* 29: 1001-1005.
- Williams, A. G., and G. S. Coleman. 1998. The rumen protozoa. *In: The rumen Microbial Ecosystem.* Hobson, P. N., and C. S. Stewart (eds). Blackie Academic and Professional Publishers, London. pp. 73-139.
- Wu, H. J., Liu T. W., Tseng I. and Cheng S. S. 2001. Characterization of microbial consortia in a terephthalate-degrading anaerobic granular sludge system. *Microbiology* 147: 373-382.
- Yokoyama, M. T. and K. A. Johnson. 1998. Microbiología del rumen e intestino delgado. *In: El rumiante, Fisiología Digestiva y Nutrición.* D. C. Church (ed.). Acriba, Zaragoza, España. pp. 137-157.
- Zeikus, J. G. 1980. Fate of lignin and related aromatic substrates in anaerobic environments. *In: Lignin Biodegradation Microbiology, Chemistry, and Potential Applications.* Kirk, T. K. (ed.). CRS Press, Inc. Boca Raton, Florida. pp. 115-124.