

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“TRATAMIENTO MICROBIANO DE UN RESIDUO
INDUSTRIAL ASISTIDO POR AGENTES SURFACTANTES”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO AGRÍCOLA

PRESENTA

AMANDA KIM RICO CHÁVEZ

DIRIGIDA POR

Dra. NORMA GABRIELA ROJAS AVELIZAPA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2013.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“TRATAMIENTO MICROBIANO DE UN RESIDUO
INDUSTRIAL ASISTIDO POR AGENTES SURFACTANTES”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO AGRÍCOLA

PRESENTA

AMANDA KIM RICO CHÁVEZ

DIRIGIDA POR

Dra. NORMA GABRIELA ROJAS AVELIZAPA

SINODALES

Dra. NORMA GABRIELA ROJAS AVELIZAPA
DIRECTORA

Dr. JUAN RAMIRO PACHECO AGUILAR
SINODAL

Dra. ROSARIO MEJÍA RODRÍGUEZ
SINODAL

M. en C. VÍCTOR MANUEL MONDRAGÓN OLGUÍN
SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Problemática de los residuos industriales	1
1.2 La industria petrolera y la generación de residuos en México	2
1.3 El proceso de desulfuración	3
1.4 Oxidación biológica del azufre	4
1.5 El género <i>Acidithiobacillus</i>	6
1.6 Generalidades de los surfactantes	8
2. HIPÓTESIS	15
3. OBJETIVOS	16
3.1 General	16
3.2 Específicos	16
4. METODOLOGÍA	17
4.1 Materiales	17
4.2 Métodos	18
4.3 Diseño Experimental	21
5. RESULTADOS	26

5.1 Comparación del efecto de tres agentes surfactantes sobre la remoción microbiana de azufre de un residuo industrial	26
5.2 Evaluación de la actividad sulfooxidante del cultivo AZ6 en presencia y ausencia del residuo industrial	33
5.3 Evaluación del efecto de la concentración de agente surfactante sobre la remoción de azufre por el cultivo AZ6	37
5.4 Cuantificación del porcentaje de remoción de azufre del residuo industrial por acción del tratamiento biológico en presencia y ausencia de agentes surfactantes	40
6. DISCUSIÓN	43
7. CONCLUSIONES	46
8. BIBLIOGRAFÍA	47

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Composición del medio de cultivo Starkey	17
2	Experimento factorial con diseño completamente al azar	21
3	Descripción de los tratamientos en el ensayo con distintos agentes surfactantes	22
4	Descripción de los factores de variación en tratamientos del ensayo con distintas concentraciones de surfactante	24
5	Resultados de la determinación de azufre por ICP-OES en muestras de residuo industrial bajo distintos tratamientos	30
6	Análisis de varianza del experimento factorial de comparación del efecto de distintos surfactantes sobre la remoción de azufre de un residuo industrial por el cultivo AZ5	31
7	Análisis de varianza del experimento factorial de comparación del efecto de distintos surfactantes sobre la remoción de azufre de un residuo industrial por el cultivo AZ6	32
8	Prueba de medias y asignación de niveles para cada tratamiento en los experimentos con los cultivos AZ5 y AZ6 por el método de la diferencia mínima significativa (DMS) al 95% de confianza	36

9	Análisis de producción de ión sulfato por actividad sulfooxidante del cultivo AZ6 con azufre elemental y residuo industrial como fuentes de azufre	39
10	Análisis de varianza para experimento factorial con distintas concentraciones de surfactante	39
11	Prueba de medias con distribución t por el método de la diferencia mínima significativa (DMS)	40
12	Prueba de medias de t de dos muestras para las medias de los tratamientos con y sin surfactante	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	El ciclo del azufre (Adaptado de Bos y Kuenen 1983)	5
2	Estructura química de una molécula surfactante (lauril sulfonato de sodio)	8
3	Fenómenos producidos por agentes surfactantes (Salager y Fernández, 2004)	9
4	Estructura química del nonilfenol	14
5	Variación de pH por actividad sulfooxidante del cultivo AZ5 y cultivo AZ6 en presencia de agentes surfactantes	27
6	Concentración de ión sulfato ($\text{SO}_4^{=}$) producido a partir del azufre presente en el residuo en el experimento con el cultivo AZ5 y AZ6	29
7	Gráfica de producción de ión sulfato y disminución del pH por actividad sulfooxidante del cultivo AZ6 con azufre elemental como fuente de azufre	34
8	Gráfica de producción de ión sulfato y disminución del pH por actividad sulfooxidante del cultivo AZ6 con residuo industrial como fuente de azufre	35
9	Efecto de la concentración de surfactante sobre el pH en el tratamiento biológico del residuo	37

10	Determinación de ión sulfato ($\text{SO}_4^{=}$) en el tratamiento biológico del residuo con distintas concentraciones de surfactante	38
----	---	----

RESUMEN

El crecimiento acelerado de las poblaciones humanas trae como consecuencia el aumento en la generación de residuos industriales; en éstos se pueden encontrar contaminantes como los compuestos inorgánicos de azufre, algunos de los cuales pueden dispersarse en la atmósfera repercutiendo negativamente en el medio ambiente. Es por esto que resulta de suma importancia estudiar los procesos de degradación o transformación de los compuestos de azufre en el ambiente que en algunos casos tienen lugar como parte de un ciclo natural, debido a la acción de ciertos microorganismos que se encuentran en prácticamente todos los suelos y cuerpos de agua. Con base en este principio, el presente trabajo hace uso de dos cultivos bacterianos denominados AZ5 y AZ6 aislados de una muestra ambiental, en el tratamiento biotecnológico de un residuo contaminado con compuestos de azufre, el cual proviene de un proceso empleado por la industria petrolera mexicana. Se evaluó la actividad sulfooxidante de los cultivos mediante dos métodos indirectos: determinación de pH por conductimetría y cuantificación de ión sulfato ($\text{SO}_4^{=}$) por espectroscopia (UV-VIS), y uno directo: determinación de azufre por espectroscopia de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES). Además se probó el efecto del uso de tres surfactantes, obteniéndose resultados positivos con nonilfenol que en consecuencia se evaluó en tres concentraciones distintas: 0,003 %, 0,03 % y 0,3 %. Los resultados permitieron comprobar que el tratamiento bacteriano permite disminuir la concentración de azufre presente en el residuo industrial, obteniéndose un porcentaje de remoción de hasta 47,08 % cuando el tratamiento se lleva a cabo en presencia del agente surfactante nonilfenol al 0,3 %.

1. ANTECEDENTES

1.1 Problemática de los residuos industriales.

El crecimiento acelerado de las poblaciones humanas está asociado a la urbanización de los espacios y al desarrollo de distintas actividades económicas como la agricultura, el comercio y la industria que tienen como consecuencia la generación de residuos orgánicos e inorgánicos.

Los residuos antropogénicos por definición son aquellos materiales producto de la actividad humana, que no se consideran materia prima y que el generador no encuentra útiles en sus propósitos de producción, consumo o transformación y que desecha, pretende o requiere desechar (ONU, 2008). Estos residuos pueden clasificarse con base en su procedencia como domiciliarios, comerciales, agrícolas o industriales y su desmedida producción provoca un incremento en la contaminación del ambiente con serias repercusiones sobre la salud humana y la homeostasis de los ecosistemas.

Como su nombre lo indica, los residuos industriales son aquellos provenientes de las actividades de la industria, la cual se define como el conjunto de operaciones materiales ejecutadas para la obtención, transformación o transporte de los recursos naturales (RAE, 2001). Esta definición da una buena idea de la diversidad de residuos industriales que se producen actualmente. Dentro del grupo que se denomina residuos industriales se encuentran los residuos inertes y los residuos peligrosos, cuya producción tiene tal magnitud que se estima que en México durante el año 2006 fueron producidas ocho millones de toneladas de residuos peligrosos (Basel Convention, 2011).

El impacto ambiental que provocan los residuos industriales puede reducirse aplicando estrategias que incluyen, pero no se limitan a la disminución de su generación, su reutilización, reciclaje y correcta disposición; sin embargo, la

mayor parte de las veces, llevar a cabo alguna de estas acciones resulta costoso y hacerlo no es económicamente redituable. En México la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) se encarga de legislar a favor de la protección del ambiente y la promoción del desarrollo sustentable, ejerciendo dicha legislación a través de órganos como la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA) con la finalidad de promover en la mayor parte de los sectores industriales el desarrollo y aplicación de tecnologías limpias que representen un ahorro económico para los generadores de residuos.

1.2 La industria petrolera y la generación de residuos en México.

La industria petrolera es una de las más activas y relevantes de nuestro país debido a su gran influencia en la economía nacional, tanto por su importancia como suministro de energía como por el alto porcentaje de ingresos e inversión que representa (Pérez-Téllez, 2010), en consecuencia, es también una generadora importante de residuos industriales. En éstos pueden encontrarse numerosos tipos de contaminantes: metales pesados, compuestos orgánicos y compuestos inorgánicos que pueden contener nitrógeno (N) y azufre (S) siendo este último, el elemento principal en gases altamente tóxicos como el sulfuro de hidrógeno (H_2S) y aquellos óxidos de azufre de composición SO_x , que pueden formarse y dispersarse en la atmósfera a partir de los residuos contaminados provocando entre otros fenómenos, la lluvia ácida, el efecto invernadero y el envenenamiento de agua y suelo, además de generar efectos negativos en la salud humana provocando afecciones de las vías respiratorias y el sistema cardiovascular (Folinsbee, 1992).

La desulfuración del gas natural es uno de los múltiples procesos que lleva a cabo la industria petrolera para la disminución de emisiones peligrosas. En varias plantas recuperadoras de azufre de Petróleos Mexicanos (PEMEX) esta desulfuración se hace usando un proceso conocido como “superclaus” que permite remover más del 98,5 % del azufre en el gas amargo (PEMEX, 2012);

sin embargo, en las etapas de reacción catalítica del proceso se producen residuos que contienen parte del azufre recuperado del gas, este contenido de azufre hace que al residuo se le considere peligroso y requiere de una correcta disposición.

1.3 El proceso de desulfuración.

La desulfuración es el proceso mediante el cual se remueven sulfuros de un medio sólido, líquido o gaseoso. Puede llevarse a cabo física, química o biológicamente.

Para la remoción de azufre suelen emplearse distintos métodos que ofrecen soluciones por la vía de la desulfuración y se basan fundamentalmente en mecanismos de adsorción, absorción y biofiltración. En la actualidad, los métodos de absorción son muy utilizados debido a la extrema reactividad del sulfuro con la mayoría de los metales. Los más comunes enlistan la adición de cloruro de hierro (III), utilización de pellets de hierro u otros metales, utilización de residuos de la extracción de níquel, lavado con agua, lavado con solución de hidróxido de sodio, y otros. Por su parte, los métodos de adsorción operan a temperatura y presión menores, requieren menos energía y reducen costos de operación e inversión, entre ellos se encuentra la utilización de carbón activado, adsorción empleando gel de sílice y tamices moleculares, entre otros (Monticello, 2000). Sin embargo en ambos casos (absorción y adsorción) se produce una considerable cantidad de residuos y contaminantes secundarios que deberán ser tratados antes de disponerse al ambiente.

El sistema biológico también llamado biofiltración, ha sido efectivo para el tratamiento de efluentes o emisiones gaseosas y emplea microorganismos que degradan sustancias contaminantes, normalmente mediante procesos oxidativos. Presenta como beneficio adicional sobre otras tecnologías de oxidación la producción mínima de residuos y la carencia de contaminantes

secundarios, costos de operación generalmente bajos, altas eficiencias de degradación, biomasa inmovilizada de vida larga y seguridad intrínseca del sistema (Pérez y Villa, 2005).

1.4 Oxidación biológica del azufre.

Existe una gran diversidad de microorganismos procariontes capaces de oxidar compuestos reducidos de azufre y por consiguiente se puede encontrar enorme variedad en sus características morfológicas, fisiológicas y ecológicas (Kelly y Wood, 2006). En la Figura 1 se muestra el ciclo biogeoquímico del azufre del cual, con base en su importancia en la presente investigación, se destacan las bacterias sulfooxidantes.

Las bacterias sulfooxidantes pueden clasificarse en dos grandes grupos: coloreadas e incoloras. El primer grupo engloba aquellos microorganismos pigmentados y fotosintéticos que pueden oxidar los compuestos reducidos del azufre de manera anaeróbica mientras que el segundo grupo hace referencia a los microorganismos que son capaces de oxidar los compuestos reducidos del azufre aeróbicamente utilizando oxígeno o anaeróbicamente utilizando el nitrato como aceptor terminal de electrones (Gotschal y Kuenen, 1981). En la actualidad se usa el término quimiolitótrofo para describir el metabolismo energético de las bacterias que, en ausencia de luz, efectúan la oxidación de sustancias inorgánicas como fuente de energía para la biosíntesis y el mantenimiento celular (Robertson y Kuenen, 2006a; Rittenberg, 1969).

En la naturaleza, las principales reservas de azufre son yacimientos de minerales sulfurosos y azufre elemental que se encuentran principalmente en los sedimentos y el agua de los ambientes marinos.

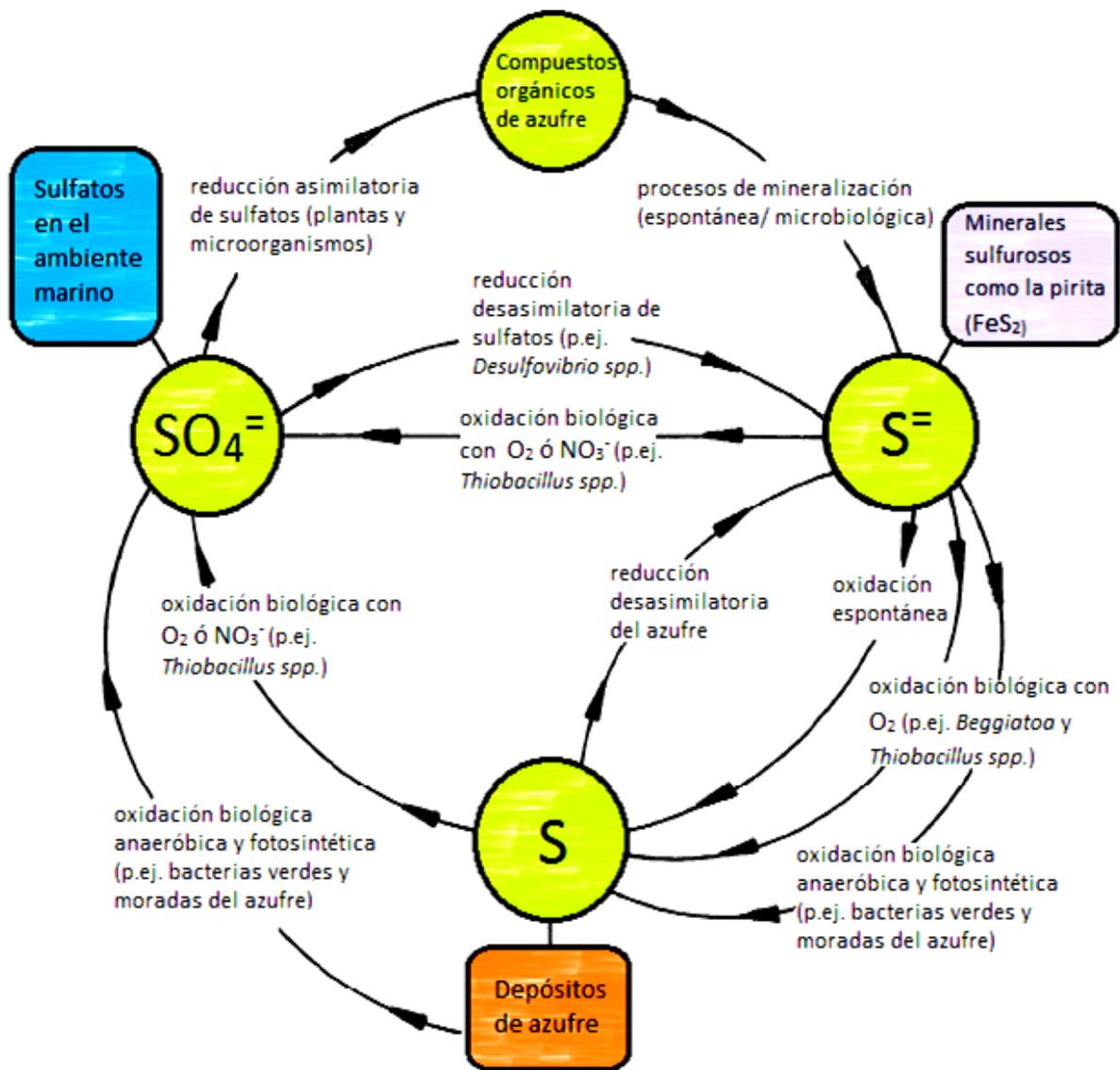


Figura 1. El ciclo del azufre (Adaptado de Bos y Kuenen 1983).

Tanto en el suelo como en ambientes acuáticos se produce sulfuro de hidrógeno por la degradación de materiales biológicos que contienen azufre o por la acción de bacterias sulfato-reductoras, este sulfuro de hidrógeno puede precipitarse como compuestos metálicos de azufre o pasar al aire, agua o suelo donde se oxidará de manera espontánea (química) o biológicamente.

En ambientes anaerobios la oxidación de compuestos inorgánicos azufrados es predominantemente biológica y está restringida a aquellos medios ricos en nitratos o donde se encuentre luz disponible (Kuenen, 1975).

En contraste, en los ambientes aeróbicos la oxidación de los compuestos inorgánicos del azufre puede ocurrir de manera espontánea y así competir con la oxidación biológica; sin embargo, se ha demostrado que en concentraciones bajas (10^{-5} M) de sulfuro de hidrógeno con cultivos de *Acidithiobacillus*, la oxidación biológica ocurre sin interferencia de la oxidación espontánea hasta llegar a una oxidación completa a ácido sulfúrico sin la formación de intermediarios (Beudeker y col, 1982; Jørgensen, 1982).

Las bacterias sulfooxidantes incoloras entonces, juegan un papel fundamental en la transformación del azufre, en especial en la interfase en que los compuestos inorgánicos reducidos del azufre se encuentran con el oxígeno, por esta razón son ubicuas en la naturaleza y se pueden encontrar prácticamente en cualquier ecosistema.

1.5 El género *Acidithiobacillus*.

Desde la primera descripción del género *Thiobacillus* en 1904, la capacidad de crecer utilizando un compuesto reducido de azufre como fuente de energía ha sido considerada taxonómicamente determinante y utilizada para clasificar a todos los bacilos no fototróficos, sulfooxidantes y Gram negativos en este género. Sin embargo, gracias a los métodos de taxonomía moderna se ha encontrado evidencia de que algunas especies se encuentran relacionadas entre sí sólo de manera superficial, lo cual ha tenido como consecuencia la reorganización del género.

El efecto de esta reorganización ha sido dramático, de 17 especies que se enlistaban en el género *Thiobacillus* ahora sólo se tienen 3, habiéndose

reasignado las demás en 3 nuevos géneros llamados: *Acidithiobacillus*, *Halothiobacillus* y *Thermithiobacillus* (Robertson y Kuenen, 2006b).

El género *Acidithiobacillus* incluye a un grupo de miembros de la subclase γ de las proteobacterias y entre las características más importantes de las especies de este género se encuentra que son acidófilos obligados (pH óptimo <4), Gram negativos, móviles por la presencia de uno o más flagelos, utilizan a las formas reducidas del azufre para soportar su crecimiento autotrófico, algunas especies oxidan el hierro o usan sulfuros naturales o sintéticos para obtener energía y algunas otras oxidan hidrógeno, su temperatura óptima de crecimiento varía entre 30 y 35 °C para las especies mesófilas y hasta 45 °C en aquellas especies moderadamente termófilas. El contenido G+C (guanina y citosina) de su ADN se encuentra entre 52-64 %. La especie tipo es *Acidithiobacillus thiooxidans* antes denominada *Thiobacillus thiooxidans* y erróneamente considerada diferente de *Thiobacillus concretivorans* (Kelly y Wood, 2000).

Cuando se observa el consumo de partículas de azufre por *Acidithiobacillus thiooxidans*, se encuentra que al principio el azufre finamente dividido flota en el medio de cultivo inorgánico preparado para el crecimiento de la bacteria. A pesar de que el azufre elemental que es la fuente de energía de *A. thiooxidans*, tiene una densidad relativa de 2,1 se mantiene en la superficie del medio de cultivo aún después de la esterilización por flujo de vapor debido a que su naturaleza hidrófoba lo hace resistente a la humectación es decir, es insoluble en medio acuoso. Conforme el crecimiento bacteriano progresa, el azufre comienza a asentarse en el fondo del matraz de cultivo y, después de dos semanas de desarrollo del cultivo prácticamente todo el azufre se ha humedecido y asentado. Es cierto que durante el crecimiento de la bacteria el medio se acidifica debido a la oxidación de azufre a ácido sulfúrico, pero se tienen pruebas que indican que la humectación del azufre es resultado de la producción de sustancias surfactantes como aminoácidos y polipéptidos, y no de la producción de ácido sulfúrico (Jones y Starkey, 1961). Estudios posteriores demostraron que el

surfactante producido por *A. Thiooxidans* es un fosfolípido (Schaeffer y Umbreit, 1963), el fosfatidilglicerol, que ha mostrado ser un coadyuvante en la humectación del azufre y provee de actividad surfactante esencial para el ataque bacteriano a las superficies de azufre (Jones y Benson, 1965).

1.6 Generalidades de los surfactantes.

Un surfactante es una molécula anfífila es decir, con doble afinidad lo cual se describe desde el punto de vista fisicoquímico como una doble característica polar y apolar a la vez. En la Figura 2 se pueden observar las dos partes en las que se divide típicamente un anfífilo: una parte polar que contiene heteroátomos tales como O, S, N, P, los cuales aparecen en grupos funcionales como alcohol, tiol, éter, éster, ácido, sulfato, sulfonato, fosfato, amina, amida, etc., y la otra parte que consiste en un grupo apolar, compuesto en general por un hidrocarburo parafínico, cicloparafínico o aromático, el cual puede eventualmente contener halógenos (Salager y Fernández, 2004).

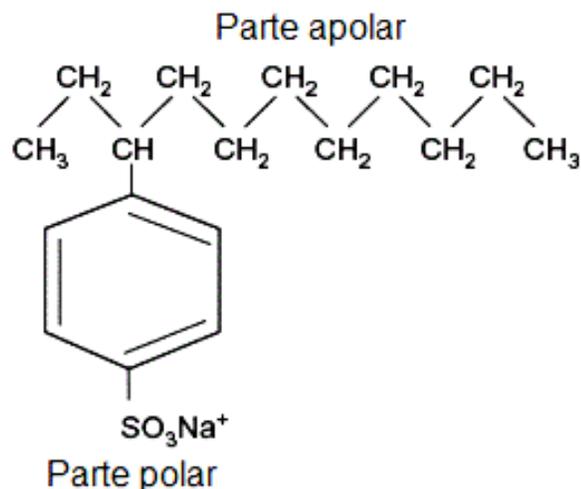


Figura 2. Estructura química de una molécula surfactante (lauril sulfonato de sodio).

La palabra surfactante es una composición que proviene del término anglosajón “surface active substance” y, como su nombre lo indica, estas sustancias tienden a interactuar con las interfases. Una interfase es el límite entre dos fases en un sistema heterogéneo. En los sistemas interfaciales los compuestos orgánicos de las fases no sólidas se adsorben, inmovilizándose en la interfase con la fase sólida, en donde eventualmente forman una delgada capa conocida como capa de acondicionamiento, lo que cambia las propiedades de la superficie sólida original, así como su humectabilidad y carga (Neu, 1996), produciendo efectos ampliamente utilizados en procesos industriales como la hidrofiliación y la hidrofobación, la flotación, la dispersión, la detergencia y la humectación, entre otros como los que pueden observarse en la Figura 3.

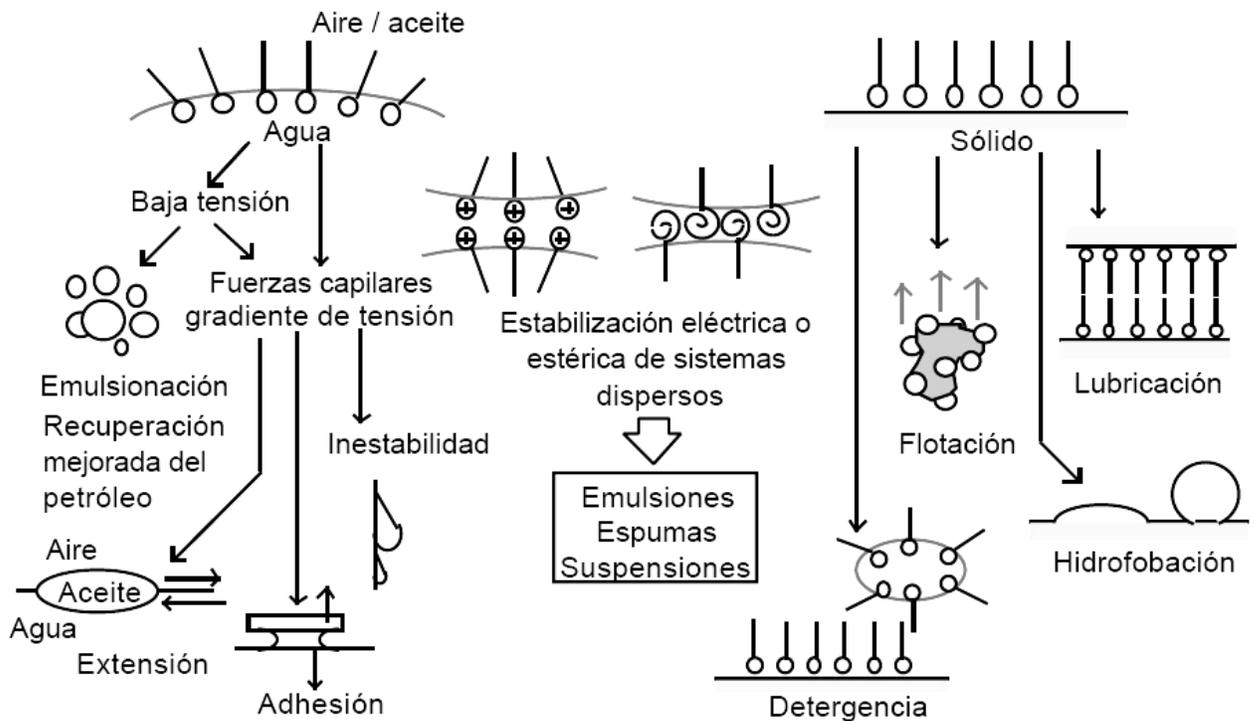


Figura 3. Fenómenos producidos por agentes surfactantes (Salager y Fernández, 2004).

Los surfactantes pueden ser entonces de naturaleza muy diversa; así en este grupo se encuentran muchas sustancias no contaminantes y que pueden ser producidas selectivamente y a gran escala, lo cual ha permitido que actualmente la investigación en surfactantes se enfoque en su uso para aplicaciones en las ciencias de la salud (Rodrigues y col, 2006) y en biotecnología ambiental (Pacwa-Płociniczak, 2011). Dentro de este ámbito se ha investigado su capacidad de emulsificar aceites (Pekdemir, 1999), de favorecer la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (Barkay 1999; Volkering, 1995), de favorecer la actuación de los microorganismos sobre moléculas contaminantes (Stelmack, 1999) e inclusive de lo contrario: inhibir el crecimiento de microorganismos que transforman ciertos compuestos en contaminantes (Dugan, 1983).

1.6.1 Clasificación de los surfactantes.

Desde el punto de vista comercial, los surfactantes se identifican según sus propiedades particulares, ya sean detergentes, bactericidas, humectantes, espumantes, tensoactivos, dispersantes, etc. Sin embargo, puesto que la mayoría de los surfactantes tienen más de una de estas propiedades a la vez, una clasificación con base en ellas sería muy confusa, es por esto que la clasificación más citada es la que tiene base en el tipo de disociación de las moléculas en solución acuosa, de esta manera se tienen:

1.6.1.1 Surfactantes aniónicos.

Son aquellos que se disocian en un anión anfífilo y un catión que generalmente es un metal alcalino o amonio cuaternario.

1.6.1.2 Surfactantes catiónicos,

Son aquellos que al disociarse generan un catión anfífilo y un anión generalmente halogenado.

1.6.1.3 Surfactantes no iónicos.

No forman iones en solución acuosa pues su parte hidrofílica está formada por grupos polares no ionizados como alcohol, tiol, éter o éster. Una gran parte de estos surfactantes son alcoholes o fenoles etoxilados.

1.6.1.4 Surfactantes anfóteros.

Los surfactantes anfóteros tienen dos grupos funcionales: uno aniónico y otro catiónico. Según el pH una de las dos disociaciones domina (aniónico en pH mayor y catiónico en pH menor al del punto isoeléctrico). En el punto isoeléctrico, son realmente anfóteros y presentan una mínima actividad superficial.

1.6.2 Actividad bactericida de los surfactantes.

Existen muchas propiedades particulares de los agentes surfactantes, sin embargo, se puede encontrar una que con frecuencia se ha utilizado para caracterizar a estas sustancias: su actividad bactericida.

De entre todas las sustancias químicas que tienen acción antiséptica los surfactantes son una clase bien definida y distinta de los colorantes, agentes oxidantes, y los compuestos de metales pesados. Muchos de ellos tienen muy poco en común en su estructura química, excepto en la existencia de una parte hidrofóbica y otra hidrofílica y por lo tanto de actividad superficial que es la responsable de su actividad bactericida (Hotchkiss, 1946).

Algunos agentes surfactantes catiónicos en concentraciones muy bajas son capaces de inhibir el crecimiento de una gran variedad de especies bacterianas, mientras que algunos surfactantes aniónicos presentan actividad contra bacterias Gram positivas y los surfactantes no iónicos suelen no tener actividad bactericida. Los surfactantes catiónicos tienen mayores efectos bactericidas en ambientes alcalinos y los aniónicos en ambientes ácidos.

En particular, se ha encontrado dificultad en definir por qué del vasto número de agentes surfactantes que existen, algunos son altamente bactericidas y otros prácticamente inocuos. No se han reconocido grupos químicos activos únicos, de hecho dos sustancias altamente activas pueden poseer grupos distintos y otras sustancias que contienen alguno de estos grupos pueden ser inactivas (Glassman, 1948). Es por esto que el uso de agentes surfactantes en tratamientos microbianos debe evaluarse cuidadosamente, a fin de evitar la afectación de los cultivos que se utilizan.

1.6.3 Generalidades de los surfactantes utilizados en esta investigación.

Siendo este trabajo parte de un proyecto en colaboración con el Instituto Mexicano del Petróleo, las pruebas aquí realizadas se llevaron a cabo con agentes surfactantes estudiados en la dispersión fisicoquímica de azufre del residuo sólido contaminado objeto de estudio (Montiel-Rivas, 2012), y cuyos efectos en el tratamiento microbiano, por lo tanto, interesan: Glucocon 425/Plantarem 2000, Glucocon 625 y nonilfenol.

1.6.3.1 Glucocon 425 / Plantarem 2000

El Glucocon425 / Plantarem 2000 es un alquilpoliglucósido comercial cuyo fabricante (Cognis, Care Chemicals) asegura que provee excelente actividad detergente y que exhibe capacidades excelentes de humectabilidad, dispersión y reducción de la tensión superficial. Su aspecto es el de un líquido viscoso y

transparente de color amarillo claro. A diferencia de otros surfactantes no iónicos es altamente soluble en soluciones concentradas de electrolitos y favorece la solubilidad de otros componentes de la solución. Está formulado a partir de materiales renovables, glucosa de maíz, y alcoholes grasos provenientes de aceite de coco y palma, lo que lo hace muy suave y fácilmente biodegradable.

1.6.3.2 GlucoPON 625.

Se trata de una mezcla de alquilglucósidos que contiene moléculas con estructuras C10-C16. Surfactante que funciona como uno no iónico convencional, excepto por su característica de no convertirse en gel al disolverse, lo que lo hace excelente en formulaciones. Es excepcionalmente inofensivo para la piel lo que lo hace una gran opción en jabones y cosméticos. Su pH es neutro. Está aprobado por la SSCN (Swedish Society for Nature Conservation) como una “opción amigable con el medio ambiente”.

1.6.3.3 Nonilfenol.

Sustancia pura cuya estructura química puede observarse en la Figura 4. Es un líquido amarillo pálido, viscoso y con ligero olor a fenol. Su punto de ebullición se encuentra entre 293 y 297 °C. Es ligeramente corrosivo y no se recomienda su contacto con la piel ni la inhalación de sus vapores, a diferencia de sus productos etoxilados los cuales suelen ser inocuos y se han utilizado en jabones de uso cosmético y doméstico. Suele usarse como emulsionante en la fabricación de pesticidas y otros productos agroindustriales, su pH es de 7,1.

Los alquilfenoles son agentes surfactantes que se han utilizado ampliamente como parte de la formulación de diversos productos y en procesos industriales, sin embargo en la última década estos surfactantes han sido objeto de numerosas investigaciones para conocer sus efectos sobre el medio ambiente, algunos resultados indican que tienen una alta biodegradabilidad mientras otros

indican que es baja (Swisher, 1997) sin embargo, se ha demostrado que tienen efectos nocivos sobre los ecosistemas acuáticos provocando desórdenes endócrinos en algunas especies animales (Naylor, 1995). En México aún no existe regulación de la producción y uso de estos surfactantes ni datos de su presencia en el medio ambiente (Mendoza-Cantú, 2004).

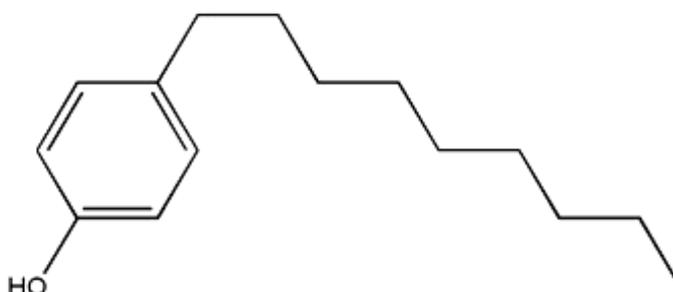


Figura 4. Estructura química del nonilfenol.

Con base en la información presentada, el presente trabajo estudió el uso de dos cultivos de microorganismos con actividad sulfooxidante conocida, pertenecientes al género *Acidithiobacillus* y que fueron aislados de un ecosistema natural, en una aplicación biotecnológica que permitiera disminuir el impacto ambiental provocado por un residuo sólido proveniente de la industria petrolera, el cual se encuentra contaminado con azufre. Adicionalmente se evaluó el empleo de agentes surfactantes para la mejora del tratamiento biológico de este residuo.

2. HIPÓTESIS

La adición de agentes surfactantes mejora la actividad sulfooxidante microbiana responsable de la disminución del contenido de azufre de un residuo industrial.

3. OBJETIVOS

3.1 General.

- Evaluar el efecto de la adición de agentes surfactantes en un proceso de remoción microbiana de azufre de un residuo industrial.

3.2 Específicos.

- Comparar el efecto de tres agentes surfactantes sobre la remoción de azufre de un residuo industrial por dos cultivos de microorganismos sulfooxidantes.
- Evaluar la actividad sulfooxidante del cultivo microbiano que presentó mejores resultados en el primer ensayo, en presencia y ausencia de un residuo contaminado con azufre.
- Cuantificar el porcentaje de remoción de azufre de un residuo industrial por el cultivo elegido de microorganismos sulfooxidantes en presencia y ausencia de agente surfactante, mediante espectroscopia de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES).
- Evaluar el efecto del agente surfactante en tres concentraciones distintas sobre la remoción de azufre por el cultivo elegido de microorganismos sulfooxidantes.

4. METODOLOGÍA

4.1 Materiales.

4.1.1 Microorganismos sulfooxidantes. Dos cultivos bacterianos denominados AZ5 y AZ6 aislados de una muestra ambiental. El análisis de 16S rRNA manifestó en ambos casos que pertenecen al género *Acidithiobacillus*.

4.1.2 Residuo industrial contaminado con azufre. Material sólido de óxidos metálicos procedente de la industria petrolera, que originalmente se encuentra en forma de “pellets” y que para esta investigación fue molido, tamizado a través de una malla no. 7 e impregnado con azufre hasta alcanzar una concentración de 1,8 % en peso, igualando las condiciones de contaminación en que comúnmente se le encuentra. Todos los experimentos se realizaron con residuo de un lote de 2kg preparado y analizado para este fin.

4.1.3 Medio de Cultivo. Se preparó un medio mineral líquido con formulación de Starkey (1923) cuyos componentes se enlistan en la Cuadro 1.

El pH del medio de cultivo se ajusta a 3 con ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado.

Cuadro 1. Composición del medio de cultivo Starkey.

Especie	Concentración (g/L)
KH_2PO_4	3
$(NH_4)_2SO_4$	0,2
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,3
$FeSO_4$	0,01
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	75 $\mu g/L$

4.1.4 Agentes Surfactantes. Se utilizaron tres, proporcionados para la investigación por el Dr. Jorge Aburto Anell del Instituto Mexicano del Petróleo, los cuales son referidos de ahora en adelante por las siglas indicadas en cada caso:

G4P: surfactante comercial Glucocon 425 / Plantarem 2000.

G6: surfactante comercial Glucocon 625.

NF: nonilfenol, surfactante sintetizado en los laboratorios del Instituto Mexicano del Petróleo (IMP).

4.1.5 Manejo estadístico de datos. Fue realizado con el programa Minitab ® excepto las pruebas de medias con distribución t las cuales fueron realizadas de acuerdo al método de diferencia mínima significativa y efectuadas con cálculos manuales.

4.2 Métodos.

4.2.1 Preparación del inóculo bacteriano.

Los cultivos bacterianos se prepararon de la siguiente manera: en un matraz Erlenmeyer de 250 mL se colocaron 50 mL de medio de cultivo Starkey y 0,5 g de azufre elemental (1 %). Se protegió la boca del matraz con una torunda de algodón y papel de estraza para después esterilizarlo en una autoclave, sometiéndolo durante 30 minutos a 10 psi y 100 °C. Una vez estéril y haciendo uso de una campana de flujo laminar, se agregaron al matraz 5 mL de preinóculo de cinco días de edad y se incubó durante cuatro días a 30 °C y 140 rpm de agitación orbital en una incubadora (marca IKA modelo 4000I). El preinóculo se prepara sembrando en medio Starkey con azufre al 1 % un 10 % de volumen de un cultivo anterior respecto al volumen del medio de cultivo en las mismas condiciones de incubación. Posteriormente, el cultivo se transfirió a cuatro tubos Falcon de 50 mL y se centrifugaron a 8000 rpm y 4 °C por seis minutos en una centrífuga (marca Eppendorf modelo 5810R). El sobrenadante se desechó y la

pastilla celular se lavó tres veces con medio de cultivo Starkey original para finalmente resuspenderla en el mismo medio. La centrifugación y los lavados se realizaron dos veces. Para los tratamientos se utilizó un volumen de inóculo del 10 % v/v con respecto al medio de cultivo.

4.2.2 Tratamiento del residuo.

Los distintos tratamientos se llevaron a cabo a microescala, colocando 1,6500 g (peso exacto) del residuo y 10 mL del medio de cultivo Starkey (conteniendo o no surfactantes según el tratamiento) en un matraz Erlenmeyer de 125 mL, se taparon las bocas con torundas de algodón y papel de estraza antes de la esterilización. Todas las unidades experimentales fueron esterilizadas en una autoclave a 10 psi y 100 °C durante 30 minutos para evitar la aglomeración del azufre. Posteriormente a los tratamientos que así lo requirieron se les agregó inóculo bacteriano al 10 % v/v bajo condiciones de flujo laminar. Los lotes experimentales fueron después colocados al azar en una incubadora a 30 °C y agitación orbital a 140 rpm, durante el tiempo requerido para cada tratamiento.

4.2.3 Determinación de pH. Se realizó de acuerdo a la NMX-AA-008-SCFI-2000.

Para realizar esta determinación se utilizó un potenciómetro (marca Thermo Scientific, modelo 310). Las soluciones amortiguadoras de pH utilizadas fueron de preparación comercial (marca J.T Baker).

4.2.4 Determinación de ión sulfato. Se realizó de acuerdo a la NMX-K-436-1977.

Esta norma describe una determinación turbidimétrica que se basa en una reacción química del ión sulfato en la solución con cloruro de bario (BaCl_2) en la que se forma como producto sulfato de bario (BaSO_4). Para esta determinación

se utilizó un espectrofotómetro UV-VIS (marca Thermo Scientific, modelo Genesys 10S). La preparación de los reactivos, características necesarias del material y los aparatos, los cálculos y la calibración del instrumento se llevaron a cabo como lo indica la norma. La determinación se llevó a cabo a microescala con la modificación desarrollada por la Sociedad Americana de Pruebas y Materiales (ASTM, 1995).

4.2.5 Determinación de azufre por espectroscopia de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES).

Se llevo a cabo con base en el proyecto de norma mexicana PROY-NMX-AA-131/2-SCFI-2008; sin embargo debido a la extensión de la misma y con fines prácticos se describe a continuación el procedimiento utilizado.

Preparación de las muestras. Se pesaron 0,0200 g (peso exacto) de muestra del residuo pulverizada y homogeneizada en un frasco de teflón de boca ancha de 120 mL. Se agregó 1 mL de ácido clorhídrico (HCl) y 0,5 mL de ácido nítrico (HNO₃) concentrado dentro de los frascos y se cerraron perfectamente. Se realizó una digestión ácida en una autoclave eléctrica (marca All American, modelo 75X) sometiendo las muestras a 15 psi y 120 °C durante 1 h. Una vez a temperatura ambiente, se abren los frascos (este paso debe realizarse protegiendo las vías respiratorias con una mascarilla para vapores inorgánicos y los ojos con lentes de seguridad), y usando una jeringa desechable con agua destilada, se transfiere la muestra digerida a través de una membrana de filtración de acetato de celulosa (VWR international) de 0,25 µm a un matraz aforado de vidrio de 100 mL, una vez en el matraz la muestra se afora con agua destilada. Las muestras diluidas se almacenan en frascos de polipropileno y a 4 °C hasta el momento de su lectura en el espectrómetro de emisión atómica.

Calibración del instrumento. Se utilizó un espectrómetro de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente de marca Varian y modelo 710-ES. Fue

calibrado mediante el método de estándar externo con soluciones de sulfato de sodio (Na_2SO_4) de concentraciones: 0; 0,1; 0,2; 0,5; 0,75; 1; 2; 4; 8; 12; 16; 20; 25; 30 y 35 ppm de azufre, analizándose su línea de emisión de $\lambda = 180,669 \text{ nm}$.

4.3 Diseño Experimental.

La investigación se llevó a cabo en cuatro etapas, cuyo diseño experimental se describe a continuación.

4.3.1 Comparación del efecto de tres agentes surfactantes sobre la remoción microbiana de azufre de un residuo industrial.

En esta primera parte se determinó la actividad sulfooxidante de las dos cepas bacterianas disponibles AZ5 y AZ6 en presencia de los tres distintos agentes surfactantes G4P, G6 y NF en una concentración de 0,3% en peso (Montiel-Rivas, 2011); para esto se realizaron dos experimentos factoriales (uno por cada cultivo bacteriano), con diseño experimental completamente al azar y tres repeticiones. En la Cuadro 2 se describe el diseño con los factores y niveles utilizados.

Cuadro 2. Experimento factorial con diseño completamente al azar.

Factores	Niveles	Descripción
Surfactantes	4	Sin surfactante, G4, G6 y NF.
Microorganismo	2	Con microorganismo y sin microorganismo.
Tiempo	2	T0 y Tf (7 días).

El residuo industrial se agregó al 16,5 % en peso (equivalente a 0,003 % de azufre), con respecto al medio de cultivo, a las unidades experimentales que así lo requirieron según el diseño.

Ambos cultivos bacterianos AZ5 y AZ6 se evaluaron por separado, llevándose todos los tratamientos a incubación a 30 °C y 140 rpm de agitación orbital durante siete días.

Se realizó un muestreo al azar sin reemplazo a dos tiempos: 0 y 7 días, y se evaluó la actividad sulfooxidante de los cultivos AZ5 y AZ6 en presencia de cada uno de los surfactantes, mediante la determinación del pH y del ión sulfato en el medio de cultivo líquido remanente, en los resultados la concentración de ión sulfato es reportada con respecto a la cantidad de azufre presente en cada muestra.

Cuadro 3. Descripción de los tratamientos en el ensayo con tres agentes surfactantes.

Tratamiento	Microorganismo	Residuo (0,003 % de azufre)	Surfactante (0,3%)
Blanco	No	No	No
Testigo R	No	Sí	No
Testigo RG4	No	Sí	Glucopon 425
Testigo RG6	No	Sí	Glucopon 625
Testigo RNF	No	Sí	Nonilfenol
AZ5	AZ5	No	No
AZ5 R	AZ5	Sí	No
AZ5 RG4	AZ5	Sí	Glucopon 425
AZ5 RG6	AZ5	Sí	Glucopon 625
AZ5 RNF	AZ5	Sí	Nonilfenol
AZ6	AZ6	No	No
AZ6 R	AZ6	Sí	No
AZ6 RG4	AZ6	Sí	Glucopon 425
AZ6 RG6	AZ6	Sí	Glucopon 625
AZG RNF	AZ6	Sí	Nonilfenol

Con la finalidad de facilitar la lectura de los resultados obtenidos, en la Cuadro 3 se describen los tratamientos realizados en ambos experimentos con sus respectivos códigos asignados. El blanco consiste en una muestra del medio de cultivo (que se mantiene constante en todos los casos), mientras que los testigos son aquellos tratamientos sin cultivo bacteriano y los tratamientos AZ5 y AZ6 consisten en el medio de cultivo con la presencia del cultivo bacteriano que se indica, sin residuo o fuentes de azufre adicionales.

4.3.2 Evaluación de la actividad sulfooxidante del microorganismo en presencia y ausencia del residuo industrial.

Se seleccionó al cultivo AZ6 por presentar mayor actividad sulfooxidante en presencia de agentes surfactantes y se creció en dos condiciones distintas generando dos ensayos simultáneos:

- Medio de cultivo Starkey (1923) con azufre elemental al 1 %.
- Medio de cultivo Starkey (1923) con residuo industrial al 16,5 % (equivalente al 0,003% de contenido de azufre).

(Los porcentajes están indicados en peso con respecto al medio de cultivo). Manteniendo a los tratamientos en condiciones de incubación a 30 °C y 140 rpm de agitación orbital, se llevó a cabo el seguimiento de la producción de ión sulfato y la disminución de pH del medio de cultivo, parámetros que reflejan el consumo de azufre. La experimentación se realizó durante 21 días con la finalidad de comparar la actividad del microorganismo en un medio de cultivo en que la fuente de azufre es directamente el azufre elemental respecto a la actividad observada en un medio en que la fuente de azufre proviene únicamente del residuo.

El diseño experimental para ambos ensayos fue completamente al azar, evaluándose 16 tiempos: 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 264, 288, 312, 336 y 504 h con tres repeticiones y sus respectivos blancos, que para el

primer ensayo consistieron en el medio de cultivo con azufre elemental y para el segundo ensayo el medio de cultivo con residuo; ambos sin la presencia del microorganismo. Se realizó un muestreo sin reemplazo para realizar las mediciones.

4.3.3 Evaluación del efecto del agente surfactante en tres concentraciones distintas sobre la remoción de azufre por el cultivo de *Acidithiobacillus* AZ6.

Siendo el nonilfenol (NF) el agente surfactante probado que favoreció la actividad sulfooxidante del cultivo AZ6 (y el único que no afectó negativamente la actividad sulfooxidante del cultivo AZ5) en los experimentos anteriores; se le sometió a evaluación para conocer en qué concentración es más efectivo. Para ello, se preparó un ensayo factorial (con la concentración de surfactante y el tiempo como factores) en que se evaluó el crecimiento bacteriano en presencia del residuo industrial y de tres niveles distintos de concentración del surfactante. Se manejó un blanco para cada uno de los mismos niveles de concentración de surfactante, y tiempo, con presencia del residuo pero en ausencia del cultivo sulfooxidante AZ6. Los tratamientos realizados se describen en la Cuadro 4.

Cuadro 4. Descripción de los factores de variación en tratamientos del ensayo con distintas concentraciones de surfactante.

Tratamientos	Concentraciones de surfactante (NF)	Concentración total de Azufre (del residuo al 16,5%)
Blanco	0,003%	
AZ6	0,03%	0,003%
	0,3%	

(Los porcentajes son indicados en peso con respecto al medio de cultivo). El diseño experimental utilizado fue completamente al azar. Todas las unidades experimentales se sometieron a las mismas condiciones de incubación las

cuales fueron 30 °C y 140 rpm de agitación orbital y, utilizando un muestreo al azar sin reemplazo se evaluaron los parámetros de la actividad sulfooxidante: el pH y la concentración de ión sulfato a los ocho niveles del factor tiempo: 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 h.

4.3.4 Cuantificación del porcentaje de remoción de azufre del residuo industrial por acción del tratamiento biológico en presencia y ausencia de agentes surfactantes.

Se cuantificó el azufre total mediante espectroscopia de emisión atómica con ICP-OES en las siguientes muestras:

- Residuo industrial sin tratamiento microbiano o incubación.
- Residuo industrial sin tratamiento microbiano, incubado en presencia de medio de cultivo Starkey a 0, 168 y 504 h (Testigo).
- Residuo industrial tratado con microorganismos sulfooxidantes en presencia de medio de cultivo Starkey e incubado durante 0, 168 y 504 h.
- Residuo industrial tratado con microorganismos sulfooxidantes y agente surfactante en presencia de medio de cultivo Starkey e incubado durante 0, 72, 120 y 168 h.

Los resultados permitieron comparar la cantidad de azufre presente en el residuo antes del tratamiento y la cantidad remanente en el residuo después del tratamiento con microorganismos sin agente surfactante y con agente surfactante obteniendo así el porcentaje de remoción de azufre obtenido por los distintos tratamientos.

5. RESULTADOS

En esta sección se presentan los gráficos y el análisis estadístico de los resultados más relevantes, las barras de error en cada gráfico representan la desviación estándar de las repeticiones de cada tratamiento.

5.1 Comparación del efecto de tres agentes surfactantes sobre la remoción microbiana de azufre de un residuo industrial.

El pH fue uno de los parámetros utilizados para dar seguimiento al proceso de oxidación de azufre elemental por acción de los cultivos bacterianos utilizados en este ensayo. Estos cultivos forman ácido sulfúrico (H_2SO_4) como producto de la oxidación del azufre elemental, y conforme aumenta la producción de ácido sulfúrico existe una disminución de pH del medio de cultivo. La determinación de pH permite conocer la acidez o alcalinidad de una solución, y así por medio de este parámetro puede evaluarse la actividad de los cultivos sulfooxidantes.

La descripción de los tratamientos, así como de los códigos utilizados se encuentra en la Cuadro 3.

Los resultados se presentan en la Figura 5 para los cultivos AZ5 y AZ6. Como se puede observar, con el cultivo AZ6 (Figura 5 b), en los tratamientos en que fueron adicionados los tres surfactantes el pH disminuye, aunque estos valores parecen cercanos a los valores obtenidos en ausencia de surfactantes. Es notoria la excepción del sistema que emplea al surfactante nonilfenol (NF), donde la disminución del pH es considerablemente mayor, indicando actividad sulfooxidante. Sin embargo esto no ocurrió para el cultivo AZ5, en este caso no se observó actividad sulfooxidante en ningún sistema adicionado con surfactante, e inclusive en los sistemas adicionados con los surfactantes G4 y G6, el valor de pH se mantuvo igual al determinado en el tiempo inicial, indicando una posible toxicidad de los surfactantes para este cultivo.

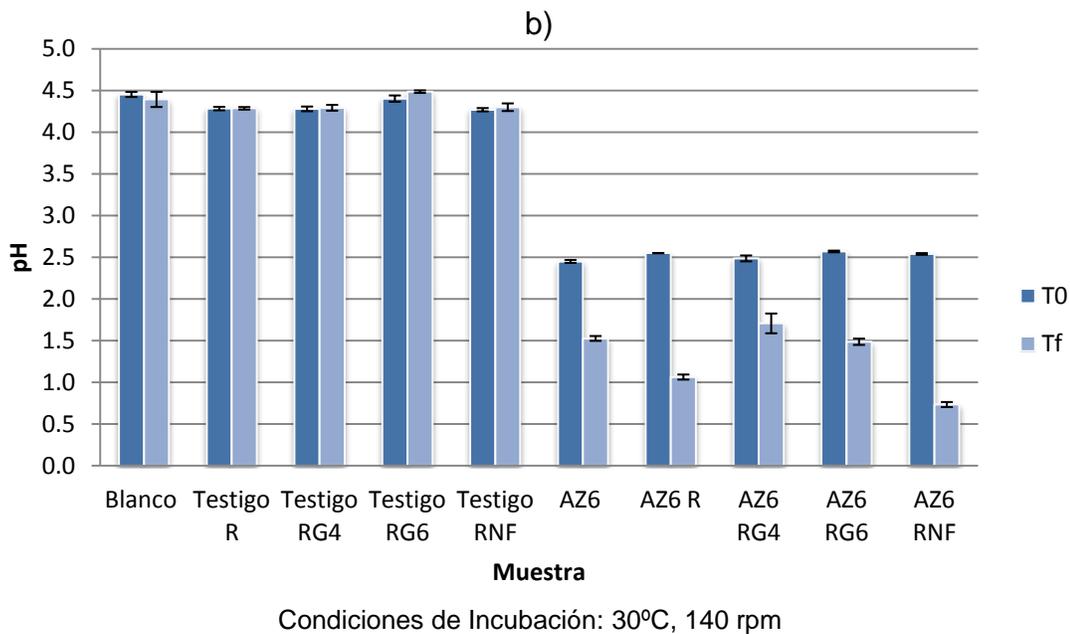
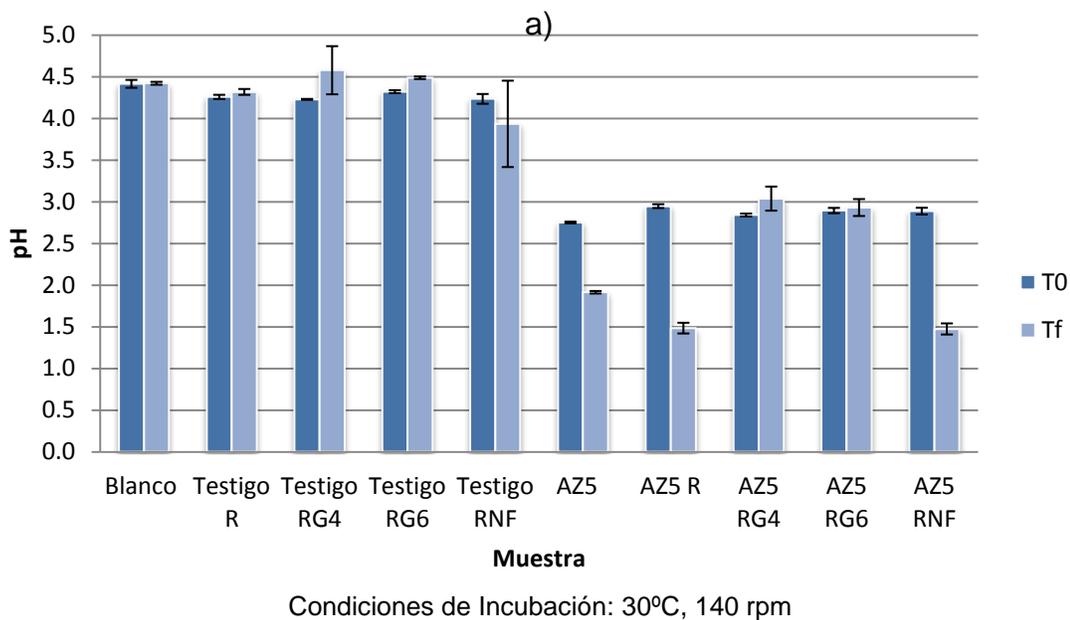


Figura 5. Variación de pH por actividad sulfooxidante del a) cultivo AZ5 y b) cultivo AZ6 en presencia de agentes surfactantes.

Para el sistema adicionado con nonilfenol, la disminución de pH no parece significativa, y aunque se observa una disminución del valor de pH, éste resultó

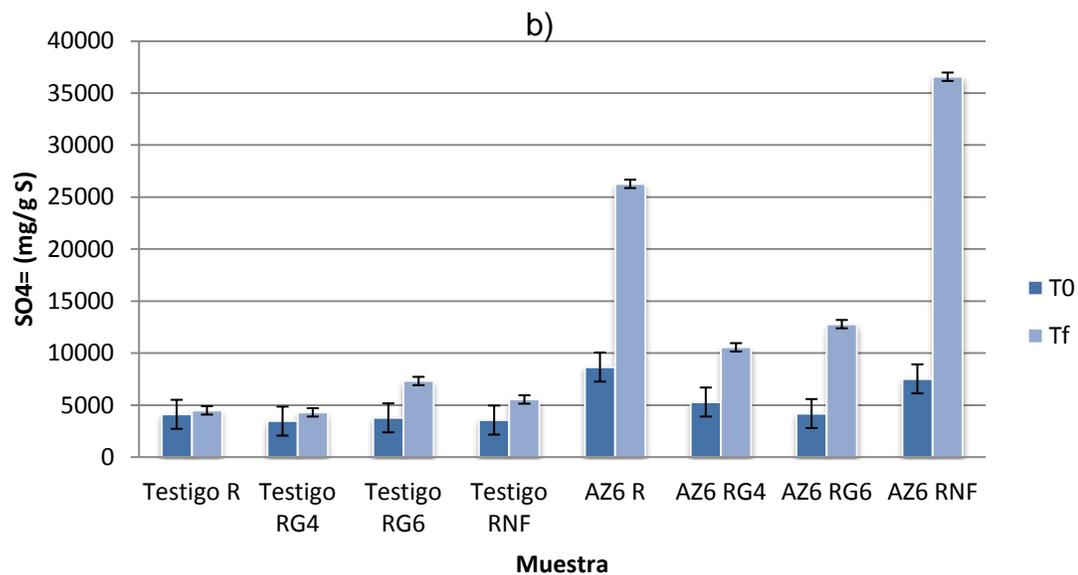
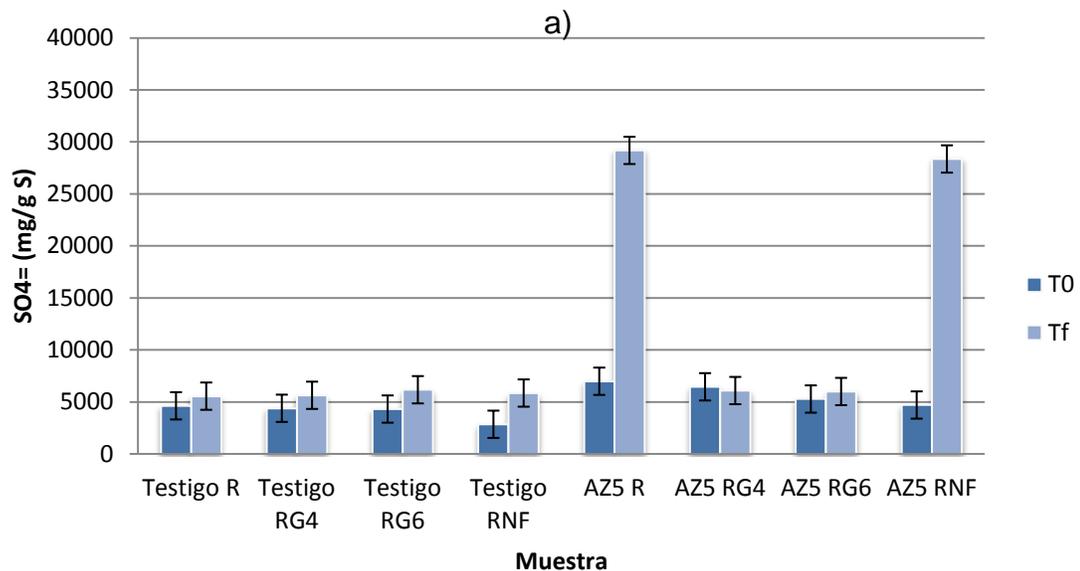
similar dentro del rango de desviación estándar al pH obtenido por la sola presencia del cultivo. En lo que se refiere al tratamiento control y los testigos, éstos no presentan una diferencia importante entre los valores de pH al inicio y al final del periodo de incubación, lo que sugiere que no existe actividad sulfooxidante en estos sistemas.

Además de la determinación de pH, en esta etapa se evaluó la concentración de ión sulfato en el medio de cultivo como otro indicador de la oxidación del azufre elemental contenido en el residuo. A mayor oxidación de azufre se observa una mayor concentración de sulfato en el medio de cultivo.

Los resultados se presentan en la Figura 6, a) para el experimento con el cultivo AZ5 y b) para el experimento con el cultivo AZ6. Como puede observarse para ambos cultivos la concentración de ión sulfato (SO_4^-) se incrementó de manera considerable en los sistemas que no fueron adicionados con ningún surfactante y en el sistema con nonilfenol (NF), a diferencia de los sistemas con los surfactantes G4 y G6.

A pesar de que el pH es un buen indicativo de la actividad sulfooxidante, el método espectrofotométrico de determinación de ión sulfato (SO_4^-) presenta una mayor sensibilidad y facilita el cálculo de obtención del azufre oxidado por actividad bacteriana, por esta razón para realizar el análisis estadístico de los experimentos realizados en esta primera etapa se utilizaron los resultados de la cuantificación de ión sulfato como variable de respuesta.

Para conocer la significancia estadística de estos resultados, se preparó el análisis de varianza de dos sentidos para cada uno de los experimentos, considerando en cada caso un experimento factorial con diseño completamente al azar con tres repeticiones, cuyos factores y niveles se encuentran indicados en la Cuadro 2. Los resultados de este análisis pueden observarse en la Cuadro 6 y la Cuadro 7.



Condiciones de Incubación: 30°C, 140 rpm

Figura 6. Concentración de ión sulfato (SO_4^-) producido a partir del azufre presente en el residuo en el experimento con el cultivo a) AZ5 y b) AZ6.

Posterior al análisis de varianza se utilizó una prueba F al 95 % de confianza para conocer si los factores presentan efectos estadísticamente significativos sobre los resultados. Los valores de F que representan resultados significativos se indican con asteriscos en la Cuadro.

Cuadro 5. Análisis de varianza del experimento factorial de comparación del efecto de tres agentes surfactantes sobre la remoción de azufre de un residuo industrial por el cultivo AZ5.

Fuente de Variación	G.L	SC	SC _{Aj}	CM _{Aj}	F _{calc}	F _{tab} ($\alpha=0,05$)
Surfactantes	3	1290,73	1350,32	450,11	37,14**	2,92
Microorganismo	1	4697,89	4577,10	4577,10	377,65**	4,17
Tiempo	1	2623,57	2423,40	2423,40	199,95**	4,17
Surfactantes*Microorganismo	3	1398,87	1459,70	486,57	40,15**	2,92
Surfactantes*Tiempo	3	799,94	812,82	270,94	22,35**	2,92
Microorganismo*Tiempo	1	1460,03	1395,76	1395,76	115,16**	4,17
Surfactantes*Microorganismo*Tiempo	3	851,42	851,42	283,81	23,42**	2,92
Error	31	375,72	375,72	12,12		
Total	46	13498,17				

G.L Grados de libertad	SC Suma de Cuadrados	SC _{Aj} Suma de Cuadrados Ajustada
CM Cuadrado Medio	F _{calc} Valor de F calculado	F _{tab} Valor de F tabulado

Se puede observar en el análisis de varianza del experimento con el cultivo AZ5 (Cuadro 5) tanto como en el experimento con el cultivo AZ6 (Cuadro 6), que los efectos de todos los factores probados y sus interacciones resultaron estadísticamente significativos, lo cual indica que la remoción total de azufre del sistema dependerá directamente del nivel que se establezca de cada uno de estos factores, es decir la adición de agentes surfactantes, la presencia de microorganismo y el tiempo de tratamiento.

Cuadro 6. Análisis de varianza del experimento factorial de comparación del efecto de tres agentes surfactantes sobre la remoción de azufre de un residuo industrial por el cultivo AZ6.

Fuente de Variación	G.L	SC	SC _{Aj}	CM _{Aj}	F _{calc}	F _{tab} ($\alpha=0,05$)
Surfactantes	3	2044,72	2044,72	681,57	50,07**	2,92
Microorganismo	1	3065,60	3065,60	3065,60	225,20***	4,17
Tiempo	1	1825,33	1825,33	1825,33	134,09***	4,17
Surfactantes*Microorganismo	3	2231,27	2231,27	743,76	54,64**	2,92
Surfactantes*Tiempo	3	1551,74	1551,74	517,25	38,00**	2,92
Microorganismo*Tiempo	1	1396,44	1396,44	1396,44	102,58***	4,17
Surfactantes*Microorganismo*Tiempo	3	1500,22	1500,22	500,07	36,73**	2,92
Error	31	435,62	435,62	13,61		
Total	46	14050,95				

G.L Grados de libertad SC Suma de Cuadrados SC_{Aj} Suma de Cuadrados Ajustada
 CM Cuadrado Medio F_{calc} Valor de F calculado F_{tab} Valor de F tabulado

Asimismo en ambos casos se puede observar que el factor que presenta la mayor diferencia significativa respecto al valor tabulado de F es el microorganismo, lo que prueba que el factor más determinante de la producción de ión sulfato en el sistema (SO_4^-) es la presencia o ausencia de microorganismo en el tratamiento del residuo.

Para poder afirmar cuál de los tratamientos es mejor, se compararon los resultados mediante una prueba de medias, utilizando la distribución de t de Student para muestras pequeñas, por el método de la diferencia mínima significativa. Los resultados de esta prueba se presentan en la Cuadro 7.

La primera observación importante es que para los experimentos con ambos cultivos las diferencias entre los tratamientos testigo no fueron significativas, demostrando una vez más que la presencia de microorganismo tiene el efecto más importante en el aumento de la concentración de ión sulfato y que este aumento no es provocado por factores fisicoquímicos.

Cuadro 7. Prueba de medias y asignación de niveles para cada tratamiento en los experimentos con los cultivos AZ5 y AZ6 por el método de la diferencia mínima significativa (DMS) al 95 % de confianza.

Prueba de medias por DMS con distribución t ($\alpha=0,05$)					
Muestra	SO ₄ ⁼ (mg/g S)	DMS	Muestra	SO ₄ ⁼ (mg/g S)	DMS
AZ5 R Tf	36979,68	a	AZ6 RNF Tf	38736,96	a
AZ5 RNF Tf	30203,19	b	AZ6 R Tf	28434,93	b
AZ5 R T0	9621,09	c	AZ6 RG6 Tf	14953,32	c
AZ5 RNF T0	7660,63	cd	AZ6 R T0	12729,27	cd
AZ5 RG4 T0	7210,32	cd	AZ6 RG4 Tf	12015,38	cd
AZ5 RG4 Tf	7193,85	cd	AZ6 RG4 T0	10878,64	de
AZ5 RG6 Tf	6913,78	cd	AZ6 RG6 T0	8709,50	de
AZ5 RG6 T0	6007,69	cd	AZ6 RNF T0	8654,59	de
Testigo RG4 Tf	5881,38	d	Testigo RG4 T0	7545,30	e
Testigo R Tf	5738,61	d	Testigo RNF T0	6935,75	e
Testigo RG6 Tf	5711,15	d	Testigo RG6 T0	5892,37	e
Testigo R T0	5365,18	d	Testigo R T0	5700,16	e
Testigo RG4 T0	5162,00	d	Testigo RG4 Tf	5282,81	e
Testigo RNF Tf	5156,51	d	Testigo R Tf	4942,34	e
Testigo RG6 T0	5068,64	d	Testigo RNF Tf	4728,17	e
Testigo RNF T0	3492,59	d	Testigo RG6 Tf	4629,32	e

DMS Diferencia mínima significativa.

Con el análisis estadístico de datos para el experimento con el cultivo AZ5 se demuestra que la adición de agentes surfactantes no aumentó la actividad sulfooxidante de este cultivo. Sin embargo cabe destacar que en presencia de nonilfenol (NF) si existe actividad sulfooxidante, a diferencia de los tratamientos adicionados con los agentes G4 y G6 en los no hay diferencia significativa entre los resultados de tiempo cero y tiempo final, comportamiento que prueba la ausencia de actividad sulfooxidante del cultivo AZ5 en estos casos.

Por otra parte, para el experimento con el cultivo AZ6 se observa una diferencia mayor a la mínima significativa entre el tratamiento adicionado con el surfactante

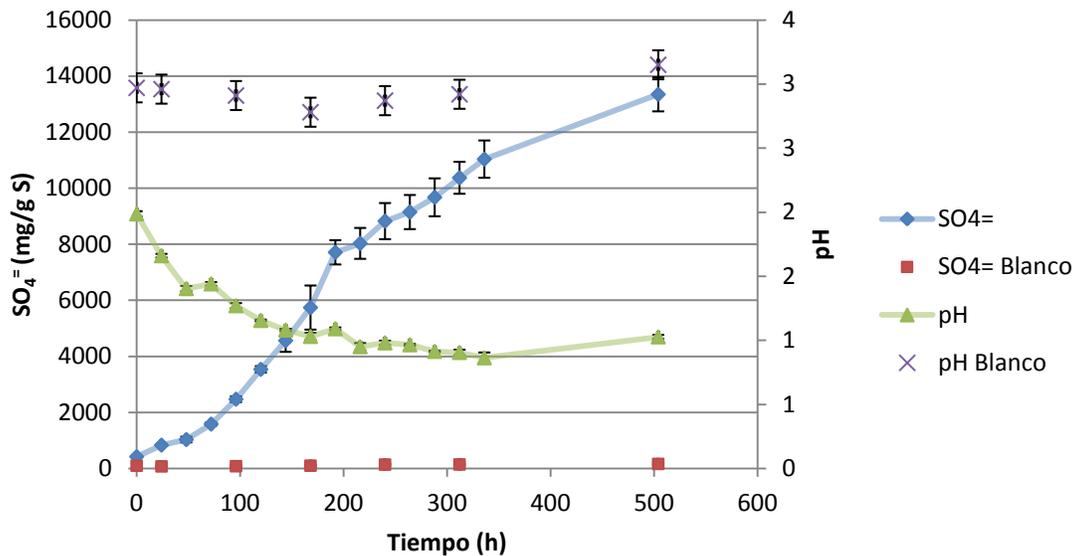
nonilfenol y el tratamiento sin surfactante, así como entre este último y el tratamiento con el agente G6. En el caso del G4 no se hallan diferencias entre los tratamientos del tiempo cero y tiempo final indicando ausencia de actividad sulfooxidante significativa, lo mismo que se observa para los tratamientos testigo.

Con base en lo anterior se puede afirmar que para este cultivo la adición del surfactante nonilfenol tiene un efecto positivo sobre la producción del ión sulfato (SO_4^-), por lo que los experimentos posteriores de la investigación se llevaron a cabo usando al cultivo AZ6 y al surfactante nonilfenol (NF).

5.2 Evaluación de la actividad sulfooxidante del cultivo AZ6 en presencia y ausencia del residuo industrial.

Los resultados del seguimiento de la actividad sulfooxidante del cultivo AZ6 con respecto al tiempo por determinación de la concentración de ión sulfato (SO_4^-) y variación de pH del medio de cultivo, se encuentran en la Figura 7 en un medio de cultivo con azufre elemental, y en la Figura 8 se presentan los resultados del mismo cultivo en presencia del residuo industrial como único suministro de azufre.

Para ambas fuentes de azufre se puede observar un descenso del pH con un mínimo a las 336 h, en este punto fue necesaria la adición de 10 mL más de medio de cultivo estéril idéntico al de las condiciones iniciales pero sin fuente de azufre para evitar la desecación de las células. Esta adición resultó en una alcalinización del medio de cultivo que puede observarse como un aumento en el valor de pH a las 504 h, sin embargo permitió proseguir con el tratamiento y cuantificar la cantidad de ión sulfato en el medio de cultivo en ese tiempo.



Condiciones de Incubación: 30°C, 140 rpm

Figura 7. Gráfica de producción de ión sulfato y disminución del pH por actividad sulfooxidante del cultivo AZ6 con azufre elemental como fuente de azufre.

En la Figura 7 para el cultivo AZ6 en presencia de azufre elemental, se observa un cambio de pendiente a las 192 h que muestra la disminución de la rapidez de oxidación de azufre a ión sulfato (SO_4^-), sin embargo la actividad sulfooxidante permanece después de las 336 h.

En la Figura 8, se observa el caso en que el cultivo tiene como fuente de azufre el contenido en el residuo industrial, se observan varios puntos en que cambia la pendiente de la curva de producción de ión sulfato (SO_4^-), lo cual pudo haber sucedido debido a una diferencia de disponibilidad de azufre, se sugiere que en este caso el azufre fue liberado en el medio de cultivo debido al ataque de las células bacterianas a la superficie del residuo, lo que provocó que esta liberación resultara heterogénea igual que el consumo de azufre a lo largo del periodo de tratamiento, sin presentarse actividad más allá de las 336 h.

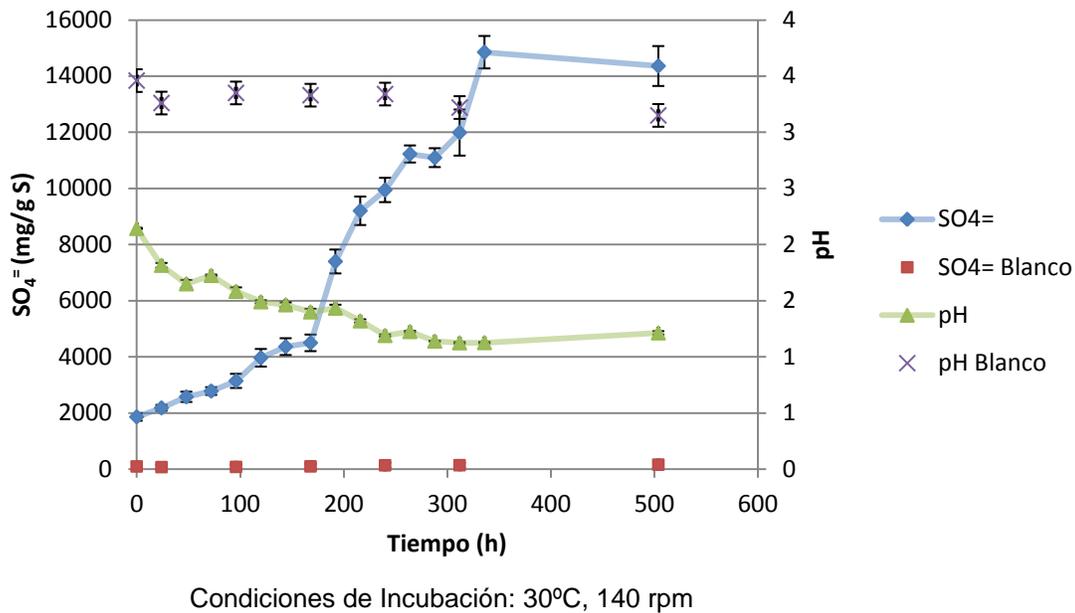


Figura 8. Gráfica de producción de ión sulfato y disminución del pH por actividad sulfooxidante del cultivo AZ6 con residuo industrial como fuente de azufre.

Cabe destacar que con base en las gráficas, el cultivo AZ6 oxida una cantidad similar de azufre en menos tiempo cuando lo toma del residuo industrial (336 h) en comparación de cuando lo toma de azufre elemental (504 h) comportamiento que puede ser provocado por una diferencia en la disponibilidad de azufre debida a las características físicas del medio, las cuales resultan alteradas por la presencia del residuo que se encuentra sólido, proporcionando mayor superficie para el establecimiento de células, o de las características químicas que resultan alteradas por la composición del residuo, la cual no será discutida en este trabajo por cuestiones de confidencialidad.

Los datos obtenidos de ambos experimentos fueron analizados estadísticamente para conocer si provienen de grupos de datos semejantes, lo que permitiría comprobar que el comportamiento del cultivo es igual cuando crece sobre el medio de cultivo con azufre elemental y cuando crece sobre el medio de cultivo con el residuo industrial que contiene azufre. Se hizo una prueba de t de dos muestras y

un análisis de correlación de Pearson obteniéndose los datos que se muestran en la Cuadro 8.

Cuadro 8. Análisis de producción de ión sulfato por actividad sulfooxidante del cultivo AZ6 con azufre elemental y residuo industrial como fuentes de azufre.

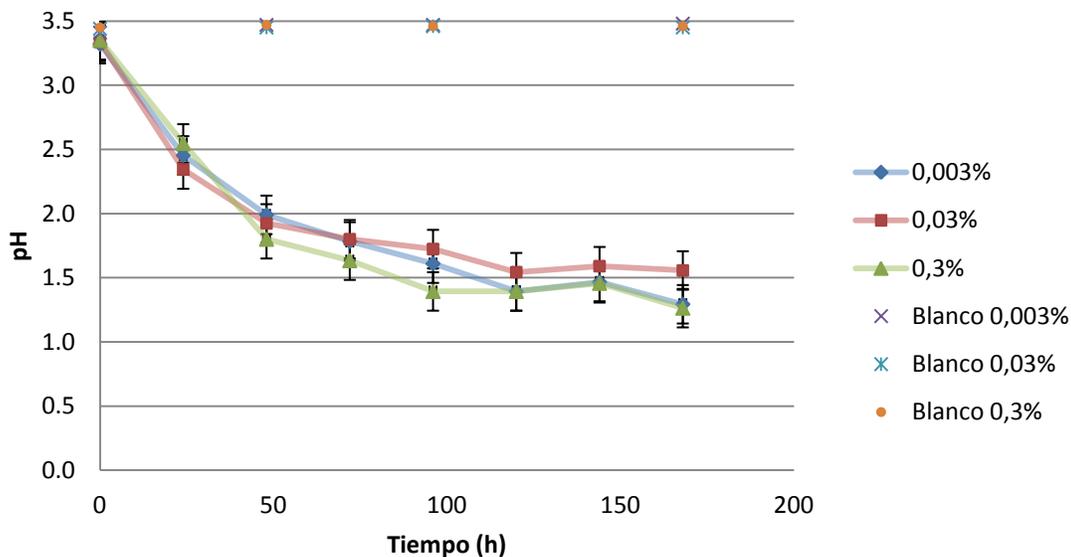
Variable	N	Media	Desviación Estándar	Error Estándar	Diferencia estimada
Tratamiento con Azufre	16	6144	4157	1039	-1070.64
Tratamiento con Residuo	16	7214	4564	1141	
Prueba de t para la diferencia					
Valor de P	0,493	Intervalo de confianza para la diferencia al 95 %: (de -4227,11 a 2085,84)			
$T_{\text{calc}} - T_{\text{tab}}$ ($\alpha=0,05$)	-0,69	Coefficiente de correlación de Pearson: 0,971			

La diferencia estimada entre ambas curvas se encuentra dentro del intervalo de confianza y éste sí incluye al valor cero lo cual indica que la diferencia entre tratamientos no es estadísticamente significativa, argumento también sugerido por el alto valor de P que se obtuvo.

El coeficiente de correlación de Pearson obtenido (0,971) prueba que ambas curvas tienen un alto grado de relación entre ellas, demostrándose así que el microorganismo tiene la misma capacidad de consumir el azufre del residuo industrial que de una fuente ideal como lo es el azufre elemental; este comportamiento resulta muy conveniente ya que la finalidad del tratamiento biológico que se propone es encontrar un cultivo que pueda consumir el azufre contenido en el residuo industrial y metabolizarlo.

5.3 Evaluación del efecto de la concentración de agente surfactante sobre la remoción de azufre por el cultivo AZ6.

La Figura 9 muestra la variación de pH con respecto al tiempo, que se observó en los sistemas con distinta concentración de surfactante en el medio de cultivo, conforme mayor sea la oxidación de azufre se presenta un menor valor de pH.



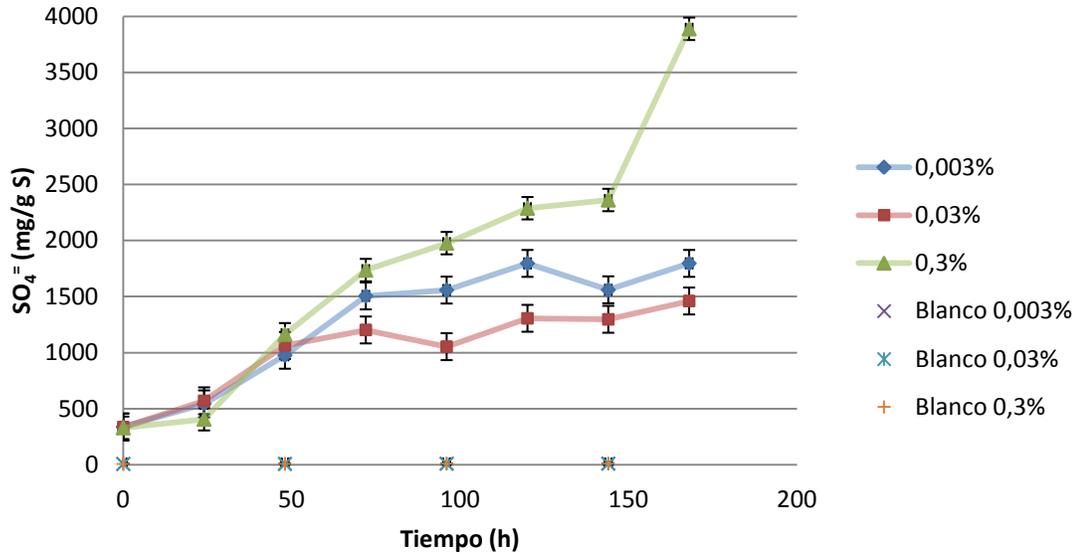
Condiciones de Incubación: 30°C, 140 rpm

Figura 9. Efecto de la concentración de surfactante sobre el pH en el tratamiento biológico del residuo.

En la gráfica puede observarse que los valores de pH para los distintos tratamientos resultaron con una variación menor a la de la desviación estándar de las observaciones, lo que sugiere que al menos para este parámetro no existe una diferencia significativa entre tratamientos.

En la Figura 10 se presentan los resultados de la determinación de ión sulfato (SO_4^-) y se puede observar el comportamiento del cultivo en los distintos sistemas, en función de la concentración de surfactante añadido al medio de cultivo. Estos resultados por presentar diferencias mayores a la desviación estándar de los datos serán utilizados para el análisis estadístico. En la Figura 10 se puede observar una

concentración de ión sulfato mayor en todas las observaciones a partir de las 48h del tratamiento con surfactante al 0,3 % con respecto a los otros dos tratamientos 0,003 % y 0,03 % lo que sugiere que el surfactante a esta concentración tiene un efecto positivo sobre la oxidación de azufre a ión sulfato por acción del cultivo AZ6.



Condiciones de Incubación: 30°C, 140 rpm

Figura 10. Determinación de ión sulfato (SO_4^{2-}) en el tratamiento biológico del residuo con distintas concentraciones de surfactante.

Los sistemas sometidos al tratamiento blanco no presentaron un aumento en la cantidad de ión sulfato (SO_4^{2-}) lo que demuestra que la oxidación del azufre es llevada a cabo por los microorganismos y no es, como puede llegar a sospecharse debida a un proceso fisicoquímico espontáneo.

Para el análisis estadístico del experimento factorial con distintas concentraciones de surfactante se realizó un análisis de varianza cuyos resultados se muestran en la Cuadro 9.

Cuadro 9. Análisis de varianza para experimento factorial con distintas concentraciones de surfactante.

Fuente de Variación	G.L	SC	CM	F _{calc}	F _{tab} ($\alpha=0,05$)
Tiempo	7	12338,0	1762,57	64,60**	2,20
Concentración de Surfactante	2	2134,7	1067,35	39,12**	3,18
Interacción	14	2513,8	179,56	6,58*	1,90
Error	48	1309,7	27,29		
Total	71	18296,3			

G.L Grados de libertad
F_{calc} Valor de F calculado

SC Suma de Cuadrados
F_{tab} Valor de F tabulado

CM Cuadrado Medio

Como parte del análisis de varianza se realizó una prueba F que demostró que el efecto de todos los factores estudiados es estadísticamente significativo. Para determinar si alguna de las concentraciones de surfactante en el tiempo final (168 h) tenía un mayor efecto sobre la actividad sulfooxidante del cultivo AZ6 se realizó una prueba de medias con la distribución t de student y el método de la diferencia mínima significativa, los resultados de dicha prueba pueden observarse en la Cuadro 10, de la cual se puede destacar que el tratamiento con agente surfactante al 0,3 % presentó una producción de ión sulfato significativamente mayor que las otras concentraciones evaluadas (0,003 % y 0,03 %).

Cuadro 10. Prueba de medias con distribución t por el método de la diferencia mínima significativa (DMS).

Tiempo (h)	Concentración de surfactante (%)	SO ₄ ⁼ (mg/g)	DMS
168	0,3	70,79	a
168	0,003	52,25	b
168	0,03	26,59	c

5.4 Cuantificación del porcentaje de remoción de azufre del residuo industrial por acción del tratamiento biológico en presencia y ausencia de agentes surfactantes.

Se realizó la determinación de azufre por espectroscopia de emisión con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) del residuo después de ser sometido a tratamiento, obteniéndose los resultados que se muestran en la Cuadro 11.

Cuadro 11. Resultados de la determinación de azufre por ICP-OES en muestras de residuo industrial bajo distintos tratamientos.

Determinación de azufre por ICP-OES		
Residuo industrial sin tratamiento		
Muestra	S (mg/g)	Desv. Est.
R	18,212	0,067
Tratamiento con cultivo AZ6		
Muestra	S (mg/g)	Desv. Est.
BT0	19,163	0,417
BT336	14,913	2,186
BT504	16,225	0,789
AZ6T0	21,415	0,249
AZ6T336	10,889	0,503
AZ6T504	11,037	0,587
Tratamiento con cultivo AZ6 y agente surfactante al 0,3 %		
Muestra	S (mg/g)	Desv. Est.
BT0	20,537	0,494
BT48	19,659	0,517
BT96	20,431	0,427
BT144	20,574	1,121
AZ6T0	25,632	0,508
AZ6T72	17,590	0,987
AZ6T120	17,890	1,092
AZ6T168	11,521	0,732

En la Cuadro cada muestra se define con un código que indica el tratamiento (B blanco ó AZ6 para indicar tratamiento con el cultivo sulfooxidante AZ6) y el tiempo en horas al cual fue sometido a dicho tratamiento el residuo industrial.

En el caso de la primera muestra “R” se refiere al residuo sin ningún tipo de tratamiento, es decir sin contacto con el medio de cultivo y sin incubación. La segunda columna indica la cantidad de azufre encontrada en la muestra en mg/g y la tercera columna presenta la desviación estándar encontrada entre las tres repeticiones de cada muestra analizada.

Los tiempos a los cuales fueron muestreados ambos experimentos difieren, debido a que las muestras del experimento sin surfactante provienen de un ensayo que se llevó hasta las 504 h con la finalidad de conocer el comportamiento sulfooxidante del microorganismo en el tiempo y el experimento con surfactante se llevó sólo hasta las 168 h con la finalidad de buscar un tratamiento competitivo en cantidad de azufre oxidado y tiempo de tratamiento.

De acuerdo a la cantidad de azufre encontrada en el residuo antes y después de cada tratamiento se encuentra que con el tratamiento bacteriano del residuo sin presencia de agente surfactante (AZ6T336) a las 336 h se obtiene una remoción total del 42,79 % del azufre presente inicialmente, mientras que con el tratamiento bacteriano del residuo en presencia del agente surfactante nonilfenol (AZ6T168) se obtiene una remoción total del 43,90 % del azufre desde las 168 h.

La observación y análisis de los resultados obtenidos por ICP-OES de las muestras analizadas permitieron confirmar que con esta técnica se obtienen valores correspondientes con los resultados de la determinación de ión sulfato, lo cual sugiere que ambas técnicas de análisis resultan efectivas para determinar la cantidad de azufre del residuo que se oxida debido a la actividad metabólica de los microorganismos sulfooxidantes.

Cuadro 12. Prueba de medias de t de dos muestras para las medias de los tratamientos con y sin surfactante.

Variable	N	Media	Desviación Estándar	Error Estándar	Diferencia estimada
AZ6T336	3	42,79	2,040	1,20	-1,11
AZ6NFT168	3	43,90	0,597	0,34	
Prueba de t para la diferencia					
Valor de P	0,462		Intervalo de confianza para la diferencia al 95 %:		
$T_{\text{calc}} - T_{\text{tab}}$ ($\alpha=0,05$)	-0,90		(de -6,397 a 4,177)		

Además permitieron obtener un resultado del porcentaje de azufre removido (o transformado) por los tratamientos. Para conocer si alguno de ellos resulta estadísticamente mejor que otro se realizó una prueba de t de dos muestras obteniéndose los resultados que se listan en la Cuadro 12, encontrándose que ambos tratamientos no pueden considerarse significativamente distintos ($P=0,462$ e intervalo de confianza al 95 % que incluye al valor cero), y por lo tanto que la adición del agente surfactante no afecta positiva o negativamente a la oxidación del azufre por el cultivo AZ6 sin embargo, cabe destacar que este nivel de oxidación de azufre, aunque es igual para ambos tratamientos, fue logrado para el caso en el que no se añadió agente surfactante en 14 días y para el tratamiento con agente surfactante en sólo 7 días, lo cual es un beneficio considerable.

6. DISCUSIÓN

En la sección 5.2 de resultados (evaluación de la actividad sulfooxidante del cultivo AZ6 en presencia y ausencia del residuo industrial) se demostró que el cultivo AZ6 tiene la misma capacidad de consumir el azufre del residuo industrial que de una fuente ideal como lo es el azufre elemental. Este comportamiento tan conveniente habla de una gran adaptabilidad del microorganismo a distintas fuentes de azufre lo cual puede atribuirse a su género, pero también a su origen (Madigan, 2000) ya que al haber sido aislado de una muestra ambiental con una rica composición química (Birkle y Merkel, 1999) el microorganismo puede poseer características genéticas que le permiten desarrollarse en medios variados así como tolerar una gran diversidad de metales y otras especies químicas que se encuentran presentes en el residuo industrial o que inclusive podrían ser útiles para su metabolismo.

Existen otros estudios en los que se ha analizado la transformación de azufre elemental a sulfato por acción de microorganismos, y en los que se manifiesta la correlación que existe entre el crecimiento de bacterias sulfooxidantes y la concentración de ión sulfato (SO_4^-) en el medio de cultivo (Qiu Guan y col, 2007). Las concentraciones de ión sulfato (SO_4^-) producido por estos microorganismos van desde 16 g/L en 86 h (Qiu Guan y col, 2007) hasta 29 g/L en 168 h (Fu Bo y col, 2008) y en ambos casos son menores a las concentraciones de ión sulfato (SO_4^-) alcanzadas por la cepa AZ6 que se utilizó en este trabajo, las cuales fueron de 16 g/L en 72 h y 57 g/L en 168 h. Estos resultados demuestran la gran eficiencia de la cepa AZ6 en la oxidación del azufre elemental y su alto potencial en el tratamiento del residuo aquí discutido.

Como se mostró en las Figuras 5 y 6 la actividad sulfooxidante de los cultivos AZ5 y AZ6 se vio negativamente afectada por la presencia de los agentes surfactantes G4 y G6. Puesto que se tuvo controlado el pH y las condiciones de incubación, esto fue así debido a un efecto microbicida de la formulación de los surfactantes G4 y G6 (Huang y col 2007) actuando a nivel superficial (Hotchkiss, 1946) como se menciona

en los antecedentes de este trabajo. En el caso del tratamiento con NF si se observó actividad sulfooxidante de ambos cultivos, sin embargo se demostró que el cultivo AZ5 presentó una mejor actividad en el medio de cultivo sin surfactante que con NF al 3 %, y en contraste el cultivo AZ6 presentó una actividad mayor en presencia de NF al 0,3 % que en su ausencia. Este comportamiento sugiere que el cultivo AZ5 es poco tolerante a la presencia de surfactantes, no así el cultivo AZ6 que como se planteó en los antecedentes de este trabajo, se beneficia de la presencia de surfactantes y en este caso de la adición de NF. Este hallazgo sin embargo, no es aislado puesto que existen otros estudios en los que se ha demostrado la efectividad de la adición de NF (Van Hamme, 1999) y otros agentes surfactantes (Behera, 2012; Maudgalya y col, 2004) como asistentes en distintos procesos de degradación biológica.

El beneficio de la adición de NF depende de la concentración del surfactante en el medio de cultivo. Se comprobó mediante los experimentos realizados que el tratamiento adicionado con NF es significativamente más efectivo cuando éste se encuentra a una concentración de 0,3 % en el medio de cultivo, esta concentración es superior a su concentración micelar crítica (CMC), la CMC del NF utilizado en este trabajo es de 0,01 % (Montiel, 2011). Debajo de su CMC un surfactante existe en forma de monómeros, en concentraciones mayores a ésta los surfactantes se arreglan en micelas. La formación de micelas es fundamental para que el surfactante tenga el efecto de humectación esperado sobre la superficie de los sustratos (Figura 3) haciéndolos más accesibles a los microorganismos y favoreciendo su biodegradación (Morán y col, 2000). Concentraciones menores a la micelar crítica entonces, impedirían que el surfactante humectara la superficie de los sustratos.

El efecto de la adición de NF en el tratamiento fisicoquímico del residuo utilizado en esta investigación ha sido estudiado (Montiel, 2011) obteniéndose que con su uso se logra una dispersión de hasta el 18.03 % del azufre contenido en el residuo. La dispersión sin embargo no modifica la forma química del azufre manteniéndose

como azufre elemental contaminante. La información obtenida en ese estudio permite afirmar que la adición de NF favorece al sistema, provocando además de la humectación del azufre elemental su dispersión, lo que aumenta su disponibilidad y facilita la adhesión de las células bacterianas a su superficie.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el presente estudio permite recomendar el uso del tratamiento que consiste en añadirle al residuo industrial medio de cultivo en una proporción 1:10 con agente surfactante NF a una concentración de 0,3 % para transformar hasta el 43,90 % del azufre presente en el residuo a ión sulfato (SO_4^-). Los residuos generados de este tratamiento consisten en dos fases separables, una líquida formada por el restante medio de cultivo, con una alta concentración de ión sulfato y NF y una sólida, formada por el residuo industrial que ha disminuido su cantidad de azufre elemental. La investigación para la correcta disposición o reuso de éste último sigue desarrollándose sin embargo, para la fase líquida se puede proponer un tratamiento de sulfato reducción para transformar al sulfato (SO_4^-) en azufre elemental insoluble (S^0) permitiendo su posterior utilización como materia prima para la industria de agroquímicos (Martínez y col, 2009).

El NF puede removerse del medio por diferentes métodos que van desde tratamientos por membranas de nanofiltración (Castanheira, 2010), luz UV (Pinto, 2010), y procesos fisicoquímicos acoplados (Robles y col, 2008).

7. CONCLUSIONES

La adición de los agentes surfactantes G4 y G6 al tratamiento biológico del residuo industrial inhibe la actividad sulfooxidante del cultivo AZ5 y disminuye la del cultivo AZ6. Este fenómeno sin embargo, no es observado para el agente nonilfenol, que demostró no tener efecto positivo o perjudicial en la actividad sulfooxidante del cultivo AZ5 y que, en contraste, sí tuvo un efecto significativo positivo en la actividad sulfooxidante del cultivo AZ6.

El cultivo bacteriano sulfooxidante AZ6 demostró además tener la misma capacidad para consumir el azufre contenido en azufre elemental grado reactivo y en el residuo industrial utilizado en esta investigación, sin la presencia de agente surfactante alguno, lo cual es una prueba del gran potencial de este cultivo bacteriano para ser utilizado en el tratamiento biológico del residuo.

Finalmente puede afirmarse que el tratamiento biológico con el cultivo AZ6 adicionado con el agente surfactante nonilfenol en las condiciones experimentales evaluadas, logra una remoción de hasta el 43,90 % del azufre total contenido en el residuo en un periodo de siete días es decir, la mitad del tiempo que sin agente surfactante.

El análisis de las pruebas de remoción de azufre realizadas con agente surfactante y sin microorganismo demostró que el efecto fisicoquímico no es significativo, lo que indica que la remoción fue obtenida gracias a un aumento de la actividad sulfooxidante del cultivo y prueba la hipótesis establecida al inicio de la investigación.

8. BIBLIOGRAFÍA

ASTM. D516-02 standard test methods for sulfate ion in water. ASTM annual book **1995**; [consultado 2012 septiembre 22] Disponible en: <http://www.astm.org/DATABASE.CART/HISTORICAL/D516-02.htm>

Barkay T, Navon-Venezia S, Ron E Z, Rosenberg E. Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by emulsifier Alasan. Appl Environ Microbiol **1999**; 65:2697-2702.

Basel Convention. Country fact sheet, Mexico. Actualizado en octubre de **2011** [consultado 2011 noviembre 17]. Disponible en: <http://www.basel.int/Countries/Countryfactsheets/tabid/1293/Default.aspx>

Behera S K, Sukla L B. Microbial extraction of nickel from chromite overburdens in the presence of surfactant. Transactions of Nonferrous Metals Society of China **2012**; 22:2840–2845.

Beudeker R F, Gottschal J C, Kuenen J G. Reactivity versus flexibility in thiobacilli. Antonie van Leeuwenhoek **1982**; 48:39-51.

Birkle P, Merkel B. Environmental impact by spill of geothermal fluids at the geothermal field of Los Azufres, Michoacán, México. Water air soil poll **1999**;124:371-410.

Bos P, Kuenen, J G. Microbiology of sulphur oxidizing bacteria. Microbial corrosion. The Metals Society, London **1983**; 4:18-27.

Castanheira A A, Aplicación de membrana de nanofiltración para eliminar disruptores endócrinos en la potabilización del agua. Barcelona. **2010**. Universitat

Politécnica de Catalunya. Tesis para obtener el título de Doctor en Ingeniería Ambiental. 0-194.

Dugan P R, Apel W A. Bacteria and acidic drainage from coal refuse: inhibition by sodium lauryl sulfate and sodium benzoate. *Appl Environ Microbiol* **1983**; 46:279-282.

Folinsbee L J. Human health effects of air pollution. *Environ Health Perspect* **1992**; 100:45-56.

Fu B, Zhou H B, Zhang Q, Qiu G Z. Isolation and Characterization of three strains of *Acidithiobacillus thiooxidans* and its bioleaching of chalcopyrite. *J Microbiology* **2008**; 8:12-19.

Glassman H N. Surface active agents and their application in bacteriology. *Bacteriol Rev* **1948**; 12:105-148.

Gottschal J C, Kuenen J G. Microbial growth on C1 compounds; Proceedings of the Third International Symposium. Sheffield, Inglaterra. **1981**; 8:92-104.

Hotchkiss D R. The nature of the bactericidal action of surface active agents. *Ann NY Acad Sci* **1946**; 46:479-493.

Huang L, Shu-Ping Y, Yahiaoui A, Spencer A S. Antimicrobial composition. United States Patent Application Publication **2007**; 0048345: 1-11

Jones G E, **Benson A A**. Phosphatidyl Glycerol in *Thiobacillus thiooxidans*. *J Bacteriol* **1965**; 89:260-261.

Jones G E, **Starkey R L**. Surface-active substances produced by *Thiobacillus thiooxidans*. *J Bacteriol* **1961**; 82:788-789.

Jørgensen B B. Ecology of the bacteria of the sulphur cycle with special reference to anoxic-oxic interface environments. *Philosoph Trans Roy Soc London Ser B Biol Sci* **1982**; 298:543-561.

Kelly D P, Wood A P. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *Int J Sys Evol Microbiol* **2000**; 50:511–516.

Kelly D P, Wood A P. The chemolithotrophic prokaryotes. *The Prokaryotes* **2006**; 2:441-456.

Kuenen J G. Colourless sulphur bacteria and their role in the sulphur cycle. *Plant Soil* **1975**; 43:49-76.

Madigan M T, Martinko J M, Parker J. Brock. *Biología de los microorganismos*. 8 Edición. Madrid: Prentice Hall, **2000**:14.

Maudgalya S, McInerney M J, Knapp R M, Nagle D P, Folmsbee M J. Development of Bio-surfactant based Microbial Enhanced Oil Recovery Procedure. Symposium on Improved Oil Recovery. Society of Petroleum Engineers **2004**; [consultado 2013 abril 13] Disponible en: <http://www.onepetro.org/mslib/servlet/onepetroid=00089473>

Martínez G, González J, Moreno G, Buitrón G. Memorias del XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. **2009**; [consultado 2013 abril 3] Disponible en: <http://www.smbb.com.mx/archivos.html>

Mendoza-Cantú A. Las sustancias tóxicas persistentes en México. Etoxil-alquilfenoles y alquilfenoles. *INE-SEMARNAT* **2004**; 1:134-142.

Monticello D J. Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates. *Curr Opin Biotech* **2000**; 11:540-546.

Montiel-Rivas J L. Evaluación de biodispersantes en la reducción de azufre de catalizadores gastados de óxido de titanio. Cuautitlán Izcalli, Estado de México. **2011**. Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis para obtener el título de Ingeniero Químico. 0-73.

Morán A C, Olivera N, Commendatore M, Esteves J L, Siñeriz F. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9. Biodegrad **2000**; 11:65-71.

Naylor C G. Environmental fate and safety of nonylphenol ethoxylates. Huntsman Corp **1995**; 27:29-35.

Neu T R. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. Microbiol Rev **1996**; 60:151-166.

Organización de las Naciones Unidas (ONU). México country sheet [consultado 2011 julio 5] Disponible en: <http://www.un.org/esa/earthsummit/mex1-cp.htm>

Pacwa-Płociniczak M, Grażyna A P, Piotrowska-Seget Z, Cameotra S S. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. Int J Mol Sci **2011**; 12:633-654.

Pekdemir T, Ishigami Y, Uchiyama H. Characterization of Aescin as a biosurfactant for environmental remediation. J Surfactants Deterg **1999**; 2:337-341.

PEMEX. Planta recuperadora de azufre con proceso superclaus. Actualizado al 13/07/**2012**. [consultado 2012 julio 25] Disponible en: <http://www.gas.pemex.com/PGPB/Responsabilidad+social/Protecci%C3%B3n+ambiental/Emisiones/PlantaAzufre.htm>

Pérez H, Villa P. Desulfuración biológica: una alternativa para el tratamiento de emisiones de gases a la atmósfera. *Agua Latinoamérica* **2005**; 5:17-20.

Pérez-Téllez G A. Potencialidad de la investigación y el desarrollo tecnológico de la industria petrolera en México “alcances y perspectivas”. México, D.F. **2010**. Instituto Politécnico Nacional. Tesis para obtener el título de Maestro en Geociencias y Administración de los Recursos Naturales. 24-40.

Pinto P T. Estudio de la degradación de sustancias peligrosas presentes en aguas de salida de Edar mediante tratamientos basados en luz UV. Zaragoza. **2010**. Centro Politécnico Superior, Universidad de Zaragoza. Tesis para obtener el título de Ingeniero Químico. 0-39.

Qiu G Z, Fu B, Zhou H B, Liu X G, Liu F, Chen X H. Isolation of a strain of *Acidithiobacillus caldus* and its role in bioleaching of chalcopyrite. *World J Microbiol Biotechnol* **2007**; 23:1217–1225.

Real Academia Española (RAE). Diccionario de la lengua española. 22^a Edición. [consultado 2011 diciembre 2]. Disponible en: http://buscon.rae.es/draeI/SrvltConsulta?TIPO_BUS=3&LEMA=Industria.

Rittenberg S C. The roles of exogenous organic matter in the physiology of chemolithotrophic bacteria. *Adv Microbial Phys* **1969**; 3:159–196.

Robertson L A, Kuenen J G. The colorless sulphur bacteria. *The Prokaryotes* **2006**; 2:985-1011 (a).

Robertson L A, Kuenen J G. The genus *Thiobacillus*. *The Prokaryotes* **2006**; 5:812-827 (b).

Robles D L, Valdés M J, Ortíz A F, Martínez G L. Alternativa de remoción de los nonilfenol etoxilados de aguas residuales industriales mediante un proceso acoplado: fisicoquímico, oxidación avanzada y adsorción. Memorias del VII Congreso internacional de Ciencias Ambientales. **2008**; [consultado 2013 abril 30]. Disponible en: <http://antiguo.itson.mx/congresoambiental/descargas.asp>

Rodrigues L, Banat I M, Teixeira J, Oliveira R. Biosurfactants: potential applications in medicine. *J Antimicrob Chemother* **2006**; 57:609-618.

Salager J L, Fernández A. Surfactantes, Cuaderno FIRP S301-PP. Mérida-Venezuela: Universidad de los Andes, **2004**; Vol. I: 3-6.

Schaeffer W I, Umbreit W W. Phosphatidylinositol as a wetting agent in sulfur oxidation by *Thiobacillus thiooxidans*. *J Bacteriol* **1963**; 85:492-493.

Starkey R L, Waskman S A. On the growth and respiration of sulfur-oxidizing bacteria. *The J Gen Phys* **1923**; 5:285-310.

Stelmack P L, Gray M R, Pickard M A. Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants. *Appl Environ Microbiol* **1999**; 65:163-168.

Swisher R D. Surfactant biodegradation. *Surf Sci Series* **1997**; 18:8-25.

Van Hamme J D, Ward O P. Influence of chemical surfactants on the biodegradation of crude oil by a mixed bacterial culture. *Can J Microbiol* **1999**; 45:130-137.

Volkering F, Breure A M, Van-Andel J H, Rulkens W H. Influence of nonionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol* **1995**; 61:1699-1705.

Organización de las Naciones Unidas. United Nations Statistics Division, 13^o Meeting of the London Group, **2008** [consultado 2011 diciembre 5]. Disponible en: <http://unstats.un.org/unsd/envaccounting/londongroup/meeting13.asp> Presentación: LG/13/4.