



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**



**UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA**

TESIS

Presentada para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS**

Por

José Roberto González Reyes

Ingeniero Biotecnólogo

**APLICACIÓN DEL RAMNOLÍPIDO PRODUCIDO POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, EN EL LAVADO Y BIODEGRADACIÓN DE COMPUESTOS PRESENTES EN SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO**

Dirigida por

Dr. Luis Gilberto Torres Bustillos

Dr. Luis C. Fernandez Linares

México, D.F. 06 de Diciembre de 2011



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México D.F. siendo las 16:00 horas del día 06 del mes de Diciembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de La UPIBI para examinar la tesis titulada:

"Aplicación del ramnolípido producido por Pseudomonas aeruginosa en el lavado y biodegradación de compuestos presentes en suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo"

Presentada por el alumno:

<u>González</u>	<u>Reyes</u>	<u>José Roberto</u>							
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)							
		Con registro:	A	1	0	0	0	6	9

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Bioprocesos

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

### LA COMISIÓN REVISORA

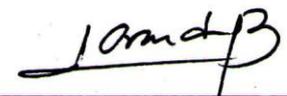
Directores de tesis

  
Dr. Luis Gilberto Torres Bustillos

  
Dr. Luis Carlos Fernández Linares

  
Dr. Jorge Noel Gracida Rodríguez

  
Dr. Jorge Muñoz Fernández

  
Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas



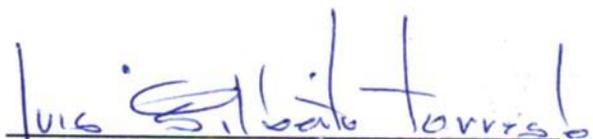
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES  
INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

  
COMISIÓN DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO E INVESTIGACION

Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas

## Declaración de originalidad

"Yo J. Roberto González Reyes declaro que los resultados reportados en esta tesis, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo declaro que hasta donde yo sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto donde se reconoce como tal a través de citas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mi director de tesis y mi comité tutorial en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita."



Luis Gilberto Torres

Vo. Bo. del director o directores de tesis



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de México D.F. el día 06 del mes de Diciembre del año 2011, el (la) que suscribe José Roberto González Reyes alumno (a) del Programa de maestría en Ciencias en Bioprocesos con número de registro A100069, adscrito a Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Luis Gilberto Torres Bustillos y cede los derechos del trabajo intitulado Aplicación del ramnolípido producido por *Pseudomonas aeruginosa* en el lavado y biodegradación de compuestos presentes en suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección zerj\_000@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

  
González Reyes José Roberto

Nombre y firma

Dedicatoria:

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo moral de mi familia y amigos quienes con recomendaciones hicieron posible en todo momento que este escrito y todo lo que lo involucra llegara a su fin, a todos ellos mis más sinceros agradecimientos y a ellos les he dedicado este esfuerzo.

**Este trabajo fue llevado a cado con el apoyo de la beca número 287867/238139  
proporcionada por CONACyT a quien el autor agradece**

**Vo. Bo. Dr. Luis Gilberto Torres Bustillos**



## Contenido

III Índice de Tablas	IX
IV Índice de Figuras	X
V Índice de Gráficas	XI
I Resumen	1
II Abstract	2
1. Antecedentes	4
1.1. La contaminación en suelos es un riesgo para la salud	4
1.2. Tecnologías de remediación de suelos contaminados	6
1.2.1. Tratamientos biológicos (biorremediación)	7
1.2.2. Tratamientos fisicoquímicos	10
1.2.3. Comparación de las tecnologías de remediación	11
1.3. Transformación y biodegradación de hidrocarburos en el suelo	14
1.3.1. Interacción de microorganismos con hidrocarburos en el suelo para su biodegradación	15
1.4. Tensoactivos	16
1.4.1. Características de los tensoactivos	17
1.4.2. Clasificación de los tensoactivos	18
1.5. Biotensoactivos	21
1.5.1. Gomas naturales	22
1.5.2. Ramnolípidos	23
2. Definición del problema	28
3. Objetivo general	29
3.1. Objetivos particulares	29
4. Hipótesis	30
5. Materiales y métodos	31
5.1. Preparación del inóculo	31
5.2. Producción de ramnolípidos en medio mineral	31
5.3. Determinación de biomasa, concentración de ramnolípidos y tensión superficial	32
5.4. Preparación de producto no purificado y determinación de su contenido en ramnolípidos	32
5.5. Determinación de la CMC para ramnolípidos del PSA en distintos sistemas acuosos	33
5.6. Lavado de suelo contaminado con HTP empleando ramnolípidos.	34
5.7. Lavado de suelo contaminado con metales pesados empleando ramnolípidos	35

5.8. Cinéticas de biodegradación de HTP por bioestimulación acoplada con tensoactivos _____	36
5.9. Estudio de la biodegradación de HTP en suelo por bioestimulación acoplada con ramnolípidos. _____	37
6. <i>Resultados y discusión</i> _____	39
6.1. Producción de ramnolípidos _____	39
6.2. Preparación del producto no purificado y determinación de su contenido en ramnolípidos _____	45
6.3. Determinación de la CMC de ramnolípidos del PSA en distintos sistemas acuosos _____	47
6.4. Características del suelo contaminado con HTP _____	54
6.5. Lavado de un suelo contaminado con HTP empleando ramnolípidos _____	58
6.6. Características del suelo contaminado con metales pesados _____	66
6.7. Lavado de un suelo contaminado con metales pesados empleando ramnolípidos _____	70
6.8. Cinéticas de biodegradación de HTP por bioestimulación acoplada con tensoactivos _____	77
6.9. Estudio de la biodegradación de HTP en suelo por bioestimulación acoplada con ramnolípidos _____	83
7. <i>Conclusiones</i> _____	90
8. <i>Recomendaciones</i> _____	92
9. <i>Referencias</i> _____	93
10. <i>Anexos</i> _____	101
Anexo 1. Curva estándar de L-ramnosa _____	101
Anexo 2. Método de Du Nouy para determinar tensión superficial y método gráfico para determinar CMC. _____	101
Anexo 3. Extracción de hidrocarburos con equipo soxhlet y determinación de humedad _____	105
Anexo 5. Cálculo de constantes de estabilidad entre ramnolípidos y metales _____	106
Anexo 5. Propiedades químicas de los metales pesados _____	107
Anexo 6 Perfiles de degradación de HTP por bioestimulación en presencia de tensoactivos _____	108
Anexo A _____	109

### III Índice de Tablas

Tabla 1-1. Clasificación de los principales tipos de contaminación y efectos tóxicos para la salud en humanos, tomado de Eweis <i>et al.</i> , (1999). .....	5
Tabla 1-2. Pros y contras en la remediación <i>ex situ</i> o <i>in situ</i> (Volke & Velasco, 2002)..	7
Tabla 1-3. Una evaluación comparativa de las tecnologías de remediación de suelo tomada de Khan-Faisal <i>et al.</i> , (2004). .....	12
Tabla 5-1. Características del suelo contaminado con metales pesados. Tomada de Zacarías (2009). .....	35
Tabla 5-2 Experimentos propuestos para la evaluación de las cinéticas de biodegradación de HTP.....	36
Tabla 5-3. Condiciones experimentales para los microcosmos del diseño experimental Box Benhken.....	37
Tabla 6-1. Producción de ramnolípidos con diversas fuentes de carbono, algunos datos publicados entre 1984 y 2011. ....	43
Tabla 6-2. Capacidad tensoactiva específica de ramnolípidos producidos por diferentes cepas del género de <i>Pseudomonas</i> . .....	44
Tabla 6-3. Valores de CMC de soluciones con un tipo de ramnolípidos o mezclas de ramnolípidos.....	50
Tabla 6-4. Valor de la CMC para ramnolípidos del PSA en distintos sistemas acuosos. ....	53
Tabla 6-5. Contenido de hidrocarburos fracción media y HPAs, en muestra de suelo grava-arenoso, de acuerdo a métodos estandarizados del laboratorio ABC. ....	55
Tabla 6-6. Límites máximos permisibles para HPAs de acuerdo a la EPA y SEMARNAT. ....	56
Tabla 6-7. Características de galactomananas utilizadas en la propuesta de lavado de suelo grava-arenoso contaminado con HTP.....	59
Tabla 6-8. Niveles de limpieza de suelo grava-arenoso obtenidas con 6 concentraciones distintas de ramnolípidos. ....	65
Tabla 6-9. Contenido inicial de metales en el suelo industrial en mg/Kg. ....	67

Tabla 6-10. Comparación de concentraciones de metales pesados con normas oficiales mexicanas, canadienses y norteamericanas.....	67
Tabla 6-11. Porcentaje de remoción de metales en función de la concentración de ramnolípidos en mg/L. ....	71
Tabla 6-12. Correlación entre las remociones de metales, propiedades de los metales y concentración de ramnolípidos como el número de veces la CMC del PSA.....	74
Tabla 6-13. Contenido final de metales (mg/Kg) en suelo arcilloso en función de la concentración de ramnolípidos utilizada en el lavado. ....	76
Tabla 0-14. Constantes de la cinética de biodegradación de hidrocarburos, obtenidas mediante modelo de exponencial inversa para diferentes tratamientos .....	78
Tabla 0-15. Variación del contenido bacteriano en el proceso de biodegradación. Tomado y modificado de Torres <i>et al.</i> , (2004)--.....	81

#### IV Índice de Figuras

Figura 1-1. Estructura química del dodecil sulfato de sodio.....	19
Figura 1-2. Estructura química del mono-éster, tensoactivo de naturaleza no iónica... ..	20
Figura 1-3. Estructura química de tween 80. ....	21
Figura 1-4. Estructura química de galactomananas. A) Las unidades básicas de las gomas naturales. B) Ejemplo de una galactomanana aislada de la semilla <i>Mellilotus indica</i> . Tomada de Srivastava & Kapoor, (2007).....	22
Figura 1-5. A) Estructura química desarrollada del primer ramnolíoideo comparada con B) una estructura del diramnolípido con ramnosas representadas en forma de silla. ..	23
Figura 1-6. Estructura química de los 4 congéneres básicos de ramnolípidos. Las principales variaciones están en el número de unidades de ramnosa y la longitud de las cadenas de ácido grado.....	24
Figura 1-7. Ruta metabólica para la producción de ramnolípidos. Tomada y modificada de Soberón-Chávez <i>et al.</i> , (2005).....	26
Figura 6-1. Producto no purificado (en tubo falcón).....	45
Figura 6-2. Efecto del tipo de tensoactivo en el ángulo de contacto para compuestos hidrófobos en partículas del suelo. A) Los tensoactivos aniónicos se adsorben por la disponibilidad de sitios cargados positivamente asociados con las partículas arcillosas, dejando la parte hidrofóbica orientada hacia el poro de agua. Por lo que el ángulo de	

contacto es menor. B) Los tensoactivos no iónicos se unen al suelo mediante la fracción hidrofóbica, dejando su porción hidrofilia orientada hacia el líquido del poro, aumentando el ángulo de contacto (Abu-Zreig *et al.*, 2003). ..... 64

Figura 6-3. Suelo arcilloso, con partículas de Cu en color azul. Presentada con la autorización de Zacarias, (2009). ..... 68

Figura 10-1. Se ilustran las principales partes del tensiómetro de Du Nouy. .... 102

Figura 10-2. Compartimento interior del tensiómetro. .... 103

## V Índice de Gráficas

Grafica 6-1. Producción de ramnolípidos empleando aceite de olivo en medio mineral. Las barras de error representan la desviación estándar de muestras por triplicado. .... 41

Gráfica 6-2. Capacidad tensoactiva específica versus concentración de ramnolípidos de algunos datos reportados en literatura y los encontrados en el presente estudio. .. 44

Gráfica 6-3. Efecto del nivel de pureza de ramnolípidos en el perfil de tensión superficial. Las barras de error representan la desviación estándar de tres repeticiones. .... 48

Gráfica 6-4. Efecto del nivel de pureza de ramnolípidos en el perfil de tensión superficial, en escala logarítmica. .... 49

Gráfica 6-5. Efecto del pH en el perfil de tensión superficial de ramnolípidos del PSA disuelto en agua. .... 51

Gráfica 6-6. Efecto del calcio (A) y fierro (B) en la tensión superficial de soluciones de ramnolípidos del PSA en agua. .... 52

Gráfica 6-7. Predicción de formas micelares en sistemas acuosos con diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Fe}^{3+}$ , en función de la CMC. Tomada de modificada de Helvaci *et al.*, (2004). .... 53

Gráfica 6-8. Porcentajes de remoción de hidrocarburos obtenidos con ramnolípidos (RLs), tween 80 y gomas naturales a concentraciones de 0.125 %. .... 61

Gráfica 6-9. Efecto en de la concentración de ramnolípidos en la remoción de HTP del suelo grava-arenoso. Las barras de error representan el la variación de muestras por duplicado. .... 63

Gráfica 6-10. Degradación de hidrocarburos del suelo grava-arenoso mediante bioestimulación en ausencia de tensoactivos. Los puntos representan la media de mediciones por duplicado. .... 77

Gráfica 6-11. Perfil de evolución de microorganismos autóctonos en experimentos de biodegradación de HTP en función del tiempo. Los puntos representan la media de muestras por duplicado. .... 81

## I Resumen

El lavado de suelos o su bioestimulación suplementados con ramnolípidos han sido alternativas recientes para remediar suelos contaminados debido a que los ramnolípidos son biodegradables, no tóxicos y estables a temperatura, pH y salinidad extremos, no obstante sus costos de separación y purificación son elevados por lo que se ha propuesto usar ramnolípidos no purificados en la remediación. En el presente trabajo se produjeron 100 mg/L de ramnolípidos con *P. aeruginosa* en aceite de olivo como fuente de carbono y mediante secado del caldo de cultivo a 75 °C durante 96 h se generó un polvo que contenía 0.19% (p/p) de ramnolípidos, además se midió el efecto en su CMC en agua a dos niveles de pureza (filtrado con membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  y directo), en presencia de 0.5 a 2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Fe}^{3+}$  y pH de 4 a 10, encontrando que las CMCs fueron semejantes a las reportadas en literatura para ramnolípidos puros. Se usaron ramnolípidos para lavar un suelo contaminado con 6500 mg/Kg de HTP y otro con As, Cu y Zn con 130, 41458 y 151 mg/Kg respectivamente. Con menos de 176 mg/L de ramnolípidos se removió 80% de HTP comparada con la remoción de SDS (75.3%) y tween 80 (69.4%) a una concentración de 1250 mg/L, mostrando mayor eficiencia a bajas concentraciones y la remoción de HTP evaluada de 0.074 a 7.9 veces la CMC de ramnolípidos sugirió que los hidrocarburos son removidos por movilización. Por otro lado, los ramnolípidos evaluados de 17.6 a 1760 mg/L removieron As, Cu y Zn en bajas concentraciones debido al pH ácido del suelo que afectó la complejación, en cambio la remoción estuvo correlacionada con las propiedades de los metales de la siguiente manera: el radio atómico < número atómico < peso atómico < radio iónico < radio covalente << densidad << constante de afinidad < potencial primero de ionización; las correlaciones se obtuvieron con Excel de Office. Se estudiaron las cinéticas de biodegradación de HTP, se observó que las constantes de la velocidad de biodegradación aumentaron de 0.72 a 1.64 semanas<sup>-1</sup> en presencia de 0.155 mg/L de ramnolípidos, aunque disminuyó a 1.21 semanas<sup>-1</sup> con 0.775 mg/L además este valor fue semejante al obtenido con tween 80 a la misma concentración (1.42 semanas<sup>-1</sup>). Paralelamente, se aplicaron 3 tipos de ramnolípidos (distinto valor de CMC) en la biodegradación de HTP por bioestimulación, en función de 3 dosis y 3 temperaturas distintas, encontrando que la remoción está afectada de acuerdo a la siguiente ecuación: remoción (%) = 76.75 + 0.223 (CMC) - 6.16 (dosis) - 0.39 (temperatura).

Palabras clave: producto no purificado, lavado de suelos, bioestimulación, ramnolípidos

## II Abstract

The soil washing or supplemented with rhamnolipids biostimulation have been recent alternative to remediate contaminated soils because rhamnolipids are biodegradable, nontoxic and stable temperature, pH and salinity extremes, despite their separation and purification costs are high so has been proposed that non-purified rhamnolipids remediation. In the present study were produced 100 mg/L of rhamnolipids by *P. aeruginosa* in olive oil as carbon source and by drying the culture broth at 75 °C for 96 h generated a powder containing 0.19% (w / w), rhamnolipid also measured the effect on its CMC in water two levels of purity (filtered with 0.45 µm membrane and direct) in the presence of 0.5 to 2 mM Ca<sup>2+</sup> or Fe<sup>3+</sup> and pH 4 to 10, finding that the CMCs were similar to those reported in literature for pure rhamnolipids. Then, rhamnolipids were used for washing soil contaminated with 6500 mg/kg of TPH and another with As, Cu and Zn with 130, 41458 and 151 mg/kg, respectively. With less than 176 mg/L of rhamnolipids was removed HTP 80% compared with the removal of SDS (75.3%) and tween 80 (69.4%) at a concentration of 1250 mg/L, showing greater efficiency at low concentrations and removal evaluated TPH 0.074 to 7.9 times the CMC of rhamnolipid, suggested that hydrocarbons are removed by mobilization. On the other hand, the rhamnolipids evaluated from 17.6 to 1760 mg/L removed As, Cu and Zn at low concentrations due to acid soil pH affected the complexation, whereas the removal was correlated with the properties of metals as follows: atomic radius<atomic number<atomic weight<radius ionic< covalent radius<< density<<affinity constant first <ionization potential, the correlations were obtained with Excel in Office. It has been studied the kinetics of biodegradation of TPH, it was observed that the constants of the biodegradation rate increased from 0.72 to 1.64 week<sup>-1</sup> in the presence of 0.155 mg/L of rhamnolipids, but decreased to 1.21 week<sup>-1</sup> with 0.775 mg/L, also this value was similar to that obtained with tween 80 at the same concentration (1.42 week<sup>-1</sup>). In parallel, we applied three types of rhamnolipids (different value of CMC) in the biodegradation of TPH by biostimulation, based on 3-dose and 3 different temperatures, finding that removal is affected according to the following equation: removal (%) = 76.75 + 0.223 (CMC) - 6.16 (Servings) - 0.39 (temperature).

Keywords: product non purified, soil washing, biostimulation, rhamnolipid



## 1. Antecedentes

### 1.1. La contaminación en suelos es un riesgo para la salud

Los contaminantes se definen como químicos de origen sintético o natural liberados por las actividades del hombre o por fenómenos naturales, dentro del ambiente, donde tienen un efecto no deseable en los sistemas biológicos (Riser-Roberts, 1992). Los contaminantes entran al ambiente directamente como resultado de accidentes, por ejemplo; los derrames durante el transporte de compuestos químicos, fugas de sitios de almacenamiento de sustancias tóxicas, mala disposición de residuos, instalaciones defectuosas en las industrias (Khan Faisal *et al.*, 2004), etc. Se ha reportado que el origen de importantes problemas de contaminación de suelos y aguas subterráneas está relacionado con los vertidos incorrectos de compuestos tóxicos de hogares y empresas. Por su parte, el aceite residual y los disolventes de limpieza provenientes de cocheras, productos químicos, agrícolas residuales de granjas y pistas de aterrizaje utilizadas por avionetas de fumigación, pinturas y los suministros de limpieza, con frecuencia han sido vertidos en suelos o enterrados en terrenos privados (Eweis *et al.*, 1999) provocando contaminación en suelo.

En México y de acuerdo al diario de la PROFEPA publicado en 2009 con relación al seguimiento de emergencias ambientales asociadas al manejo de sustancias químicas, en colaboración con el Centro de Orientación para la Atención de Emergencias Ambientales (COATEA) 50% de las emergencias reportadas ocurrieron en los estados de Veracruz, Tamaulipas, Guanajuato, Puebla, Nuevo León y Oaxaca. Así mismo en 58% de las emergencias se involucran 10 tipos de sustancias, 8 de estas de la familia de los hidrocarburos, además de amoníaco y pólvora. Por su frecuencia destacan gasolina, diesel, combustóleo y petróleo crudo (PROFEPA, 2009). Además, dentro de los contaminantes que se consideran prioritarios en México debido a su alta toxicidad y persistencia en el ambiente se encuentran a la dioxinas, furanos,

hexaclorobenceno, bifenilos policlorados (PCBs, por sus siglas en inglés), plaguicidas organoclorados y metales pesados como Hg, Pb, Cr, Cd, V, compuestos tóxicos atmosféricos, hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) y otros derivados del petróleo (Volke & Velasco, 2002). Como ejemplo de un suelo contaminado en México está el de la estación de almacenamiento y distribución de petróleo (ODSS, por sus siglas en inglés) ubicada en Morelia Michoacán, la cual estuvo activa durante 36 años, quedando fuera de servicio en 1999, el sitio contaminado fue caracterizado por el grupo de saneamiento de suelos y acuíferos de la UNAM en 2003 y se encontró que sus alrededores estaban contaminados con hidrocarburos totales del petróleo (HTP), benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX), metil tert-butil éter (MTBE), Pb, Fe, Cr y Zn (Iturbe *et al.*, 2003). La presencia de contaminantes en suelos o aguas subterránea está relacionada con efectos tóxicos para sistemas biológicos, aunque de particular interés se presentan en la Tabla 1-1 algunos contaminantes comunes en sitios dañados.

Tabla 1-1. Clasificación de los principales tipos de contaminación y efectos tóxicos para la salud en humanos, tomado de Eweis *et al.*, (1999).

Tipo de compuestos	Procedencia habitual	Efectos tóxicos
Compuestos químicos de la agricultura	Industrias manufactureras distribuidores de compuestos químicos, granjas, aeropuertos destinados a vuelos de fumigación	Enfermedades del sistema nervioso central, cáncer
Gasolina y diesel	Estaciones de servicio, bases militares, refinерías	Los compuestos cancerígenos se incluyen dentro de la gran variedad de compuestos del petróleo
Pinturas	Vertederos municipales	Envenenamiento por metales pesados, daños al sistema nervioso central, cáncer
Disolventes	Industrias de la electrónica, talleres de automoción, bases militares	Se incluyen los compuestos cancerígenos, daños a nervios, toxicidad
HPAs	Fabricación de gas de hulla	Cierto número de HPA son conocidos, o se sospecha que son cancerígenos
PCBs	Transformadores eléctricos	Cáncer
Dioxinas	Fabricación de compuestos químicos, gases provenientes de escape de vehículos, combustión de residuos	Formación de tumores, acné debido a la exposición continua a compuestos del cloro

Un estudio de evaluación de riesgo a la salud, puede ser útil para analizar el nivel de riesgo al cual están expuestos los seres vivos encontrados en los alrededores de un sitio contaminado. Los estudios de riesgo a la salud son utilizados también para determinar los límites máximos permitidos de contaminantes en suelo o agua, que no causan riesgo a la salud y que a menudo sirven como criterios de niveles de limpieza en zonas contaminadas (Iturbe *et al.*, 2006).

## 1.2. Tecnologías de remediación de suelos contaminados

Las alternativas para remediar suelos contaminados han sido diseñadas considerando el tipo de contaminante, sus propiedades fisicoquímicas, el tipo de suelo contaminado, entre otros factores. Una descripción detallada de las tecnologías de remediación está compilada en Volke & Velasco (2002), aunque en el presente trabajo se dará una breve presentación de estas tecnologías. Pero antes, un grupo de conceptos importantes serán descritos.

Remediación se define como operación o conjunto de operaciones unitarias que alteran la composición de una sustancia peligrosa o contaminante a través de acciones químicas, físicas o biológicas de manera que reduzcan su toxicidad, movilidad o volumen (Volke & Velasco, 2002).

Tomando en cuenta el lugar donde se realizará el procedimiento de remediación, las tecnologías se clasifican en:

- *Ex situ*: proceso que implica remover el suelo dañado de la pluma de contaminación, antes de su tratamiento. Puede excavar y realizarse en el sitio (*on site*) o fuera de lugar donde está el sitio contaminado (*off site*).
- *In situ*: los contaminantes son removidos sin necesidad de excavar el suelo dañado.

Excavar el suelo para su posterior tratamiento o trabajar en la pluma de contaminación tienen importantes implicaciones que le dan ventajas y desventajas a cada método, (Tabla 1-2).

Tabla 1-2. Pros y contras en la remediación *ex situ* o *in situ* tomada de Volke & Velasco,(2002).

	<i>In situ</i>	<i>Ex situ</i>
Ventajas	Permiten tratar el suelo sin necesidad de excavar ni transportar Potencial disminución en costos	Menor tiempo de tratamiento Más seguro en cuanto a uniformidad: es posible homogenizar y muestrear periódicamente
Desventajas	Mayores tiempos de tratamiento Pueden ser inseguros en cuanto a uniformidad: heterogeneidad en las características del suelo Dificultad para verificar la eficacia del proceso	Necesidad de excavar el suelo Aumentar en costos e ingeniería para equipos Debe considerarse la manipulación del material y la posible exposición al contaminante

Sin embargo las consideraciones anteriores quedan determinadas por los requerimientos involucrados en el problema específico de contaminación.

### 1.2.1. Tratamientos biológicos (biorremediación)

Consisten principalmente en poner en contacto el suelo contaminado con sustancias orgánicas y bacterias autóctonas o especializadas, bajo condiciones que permitan que las enzimas de las bacterias transformen o degraden a los contaminantes. Debe haber un control en la medida de lo posible de las condiciones de crecimiento tales como el pH, nutrientes, oxígeno, humedad, entre otros (Balba *et al.*, 1998). Los principales tratamientos biológicos se comentan a continuación.

#### 1.2.1.1. Bioestimulación

Es una tecnología *in situ* que se basa en el suministro de soluciones acuosas de nutrientes al suelo contaminado, para estimular la actividad de los microorganismos autóctonos y por lo tanto inducir al consumo de contaminantes del suelo (Van-Deuren *et al.*, 1997). Se ha reportado que en la bioestimulación se aumenta la eficiencia de biodegradación cuando se usan tensoactivos (Iturbe *et al.*, 2004).

#### **1.2.1.2. Bioventeo**

Proceso en el cual se estimula la biodegradación natural *in situ* de sustancias orgánicas en el suelo, proporcionando oxígeno. Usa bajas velocidades de flujo de aire para proporcionar solo el suficiente oxígeno que sustenta la actividad microbiana. El oxígeno se suministra a través de la inyección directa del aire dentro del suelo contaminado (Marks *et al.*, 1994).

#### **1.2.1.3. Bioaumentación**

Consiste en la adición de microorganismos vivos, que tengan la capacidad de degradar o transformar el contaminante en cuestión. Esta tecnología se utiliza cuando se requiere el tratamiento inmediato de un sitio contaminado o cuando la microbiota autóctona es insuficiente en número o capacidad degradadora (Volke & Velasco, 2002).

#### **1.2.1.4. Biolabranza**

En este proceso el suelo contaminado se mezcla con agentes de volumen y nutrientes, posteriormente es removido periódicamente por medio de arado para favorecer su aireación (Marks *et al.*, 1994). El suelo mezclado incrementa el contacto entre compuestos orgánicos y microorganismos, conduciendo al aumento en la degradación aeróbica (Khan-Faisal *et al.*, 2004).

#### **1.2.1.5. Biopilas**

Este proceso incluye el apilamiento del suelo contaminado en pilas y la simulación de la actividad microbiana por medio de la aireación y la adición de minerales, nutrientes y agua. El calor y pH pueden ser controlados para incrementar la biodegradación. El área de tratamiento a menudo es cubierta con un impermeabilizante para reducir la cantidad de lixiviados que pueden entrar al suelo no contaminado (Khan-Faisal *et al.*, 2004).

#### **1.2.1.6. Atenuación natural**

Es un proceso en el cual se permite que los fenómenos naturales reduzcan o eliminen contaminantes. Esos procesos incluyen la adsorción de contaminantes a partículas de suelo, biodegradación de contaminantes, dilución y dispersión en aguas subterráneas, entre otros. Esta tecnología requiere de un monitoreo para verificar que los contaminantes disminuyan (Prizzia, 2001).

#### **1.2.1.7. Fitorremediación**

Es un proceso que utiliza plantas para remover, transferir, estabilizar, concentrar y/o destruir contaminantes (orgánicos e inorgánicos) del suelo, lodos y sedimentos, tiene la ventaja de poder aplicarse tanto *in situ* como *ex situ* (Volke & Velasco, 2002).

#### **1.2.1.8. Composteo**

Consiste en poner en contacto el suelo con materiales de relleno como paja, aserrín, corteza o astillas de madera, o algunos otros materiales orgánicos para que los microorganismos presentes degraden compuestos peligrosos convirtiéndolos en compuestos inocuos o bioproductos estables. La temperatura se eleva entre 65 y 70 °C debido al calor producido por los microorganismos durante la descomposición de los desechos orgánicos (Marks *et al.*, 1994).

#### **1.2.1.9. Biorremediación en fase de lodos (biorreactores)**

Consiste en la excavación del suelo para introducirlo en un sistema de variables controlables. Se utilizan biorreactores para tratar suelos heterogéneos y poco permeables, o cuando es necesario disminuir el tiempo de tratamiento, debido a que es posible combinar controlada y eficientemente procesos químicos, físicos y biológicos, que mejoren y aceleren la biodegradación (Volke & Velasco, 2002).

## **1.2.2. Tratamientos fisicoquímicos**

Estos tratamientos aprovechan las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes o del medio contaminado para separar o contener la contaminación (Volke & Velasco, 2002).

### **1.2.2.1. Lavado de suelos**

Esta tecnología separa contaminantes (orgánicos e inorgánicos) por medio de un líquido de extracción que puede aumentar la solubilidad del contaminante o puede influir en su desorción del suelo, aunque el fluido líquido requiere de un tratamiento posterior para remover o destruir los contaminantes. Los líquidos usados para el lavado usualmente son agua, solventes (Volke & Velasco, 2002) o soluciones con tensoactivos (Torres & Bandala, 2009). El grupo de contaminantes objetivo de este proceso incluye compuestos orgánicos semi-volátiles (S-VOCs, por sus siglas en inglés), hidrocarburos del petróleo, residuos de combustible, metales pesados, PCBs, HPAs y pesticidas. Esta tecnología permite la recuperación de los metales y puede ser usada para limpiar sitios con una amplia variedad de contaminantes orgánicos o inorgánicos (Khan-Faisal *et al.*, 2004). El lavado de suelos es semejante al enjuague de suelos con la variante de que éste último se aplica preferentemente *in situ*.

### **1.2.2.2. Electrorremediación**

Consiste en la generación de un campo eléctrico a partir de imponer corriente directa al suelo. Requiere del empleo de electrodos (ánodo y cátodo), los cuales son colocados en pozos excavados en el suelo, usualmente estos se humectan con un electrólito para mejorar las condiciones de conducción del campo eléctrico. La acción del electrólito permite transportar el contaminante hacia los pozos en donde será extraído (Khan-Faisal *et al.*, 2004).

### **1.2.2.3. Extracción de vapores (EV)**

Es una tecnología en la que se aplica un vacío al suelo para inducir un flujo controlado y continuo de aire, para remover contaminantes como volátiles o semi-volátiles del suelo (Volke & Velasco, 2002).

### **1.2.2.4. Solidificación y estabilización (S/E)**

Se refiere a las técnicas que encapsulan (atrapan físicamente) al contaminante formando un material sólido y no necesariamente involucra una interacción química entre el contaminante y los aditivos solidificantes (Volke & Velasco, 2002).

Existe una amplia gama de técnicas de remediación, no obstante aunque debe quedar claro que el tipo de contaminante, el tipo de suelo, las condiciones de contaminación entre otros factores, delimitan su uso para cada problema de contaminación específico.

## **1.2.3. Comparación de las tecnologías de remediación**

Como se vio anteriormente, el espectro de posibilidades disponibles para remediación de suelos es amplio. Entonces, para un problema específico hay más de una opción que brinde soluciones factibles. La cuestión entonces podría ser ¿Cuáles son los aspectos que deben ser tomados en cuenta al momento de decidir entre las opciones disponibles, para un caso particular de remediación de suelo contaminado?, no hay un parámetro preciso que indique cuál es la mejor opción, pero si una serie de consideraciones que pueden servir de guía en la decisión. Entre las más relevantes están; 1) el tipo de contaminante a tratar, 2) el tipo de suelo, 3) los costos asociados a su desarrollo e implementación, 4) la eficiencia de remoción y 5) el tiempo requerido para alcanzar el nivel de contaminantes adecuado según las normas ambientales. En

la Tabla 1-3 se muestra la comparación entre las tecnologías en función de los aspectos antes mencionados.

Tabla 1-3. Una evaluación comparativa de las tecnologías de remediación de suelo tomada de Khan-Faisal *et al.*, (2004).

Técnicas de remediación		Costo		Eficiencia		Duración	
Tipo de contaminante	Rango	Intervalo de USD/ton de suelo tratado	Rango	Intervalo	Rango	Intervalo	Rango
VOCs	A	Más de 150	A	Más de 90%	A	1-6 meses	A
SVOCs	B	75-150	B	75%-90%	B	6-12 meses	B
Hidrocarburos medios y pesados	C	50-75	C	50%-75%	C	1-2 años	C
Insecticidas	D	25-50	D	Menos de 50%	D	2-5 años	D
Inorgánico	E	10-25	E			Más de 5 años	E
Metales pesados	F	Menos de 10	F				
Técnica	Contaminante	Costo		Eficiencia		Duración	
Lavado de suelos	B-F	A-B		A		A	
Biolabranza	B-C	C-D		B		B-C	
Enjuague de suelos	A-F	C-F		B-C		A-B	
Solidificación/estabilización	C, E-F	A-B		A		B	
Biopilas	A-D	E-F		A-B		A-B	
Bioventeo	B-D	C-E		A		A-B	
Fitorremediación	A-F	D-E		C-D		D-E	
Biorremediación en fase de lodos	A-D	A-C		A		A	
Extracción de vapores	A-B	C		A		B-C	

Las letras del cuadro superior están referidas a tipos de compuestos, costo, eficiencia y duración presentadas de la parte inferior. Como ejemplo, en el lavado de suelos los contaminantes para los cuales puede ser usada la técnica están entre B y F, es decir, entre SVOCs y metales pesados, su costo entre más de 150 hasta 75 y 150 USD/ton (A-B), la eficiencia es de más de 90% (A) y de duración de 1 a 6 meses (A). USD/ton: dólares por tonelada.

El tipo de contaminante en gran medida va a reducir el número de opciones posibles para un problema de contaminación particular, esto porque no todas las tecnologías sirven para todos los contaminantes a excepción del enjuague de suelos y la fitorremediación, aunque por otro lado ninguna de las tecnologías sirve solo para un tipo de contaminante. La eficiencia, viene dada por el porcentaje de remoción con respecto al contenido inicial del contaminante, existen tecnologías tan eficientes como para remover más del 90%, algunos ejemplos de éstas son: el lavado de suelos, la

solidificación/estabilización, el bioventeo, la biorremediación en fase de lodos y la extracción con vapores. Los niveles de remediación estarán definidos por las normas ambientales o por estudios de análisis de riesgo a la salud, es por eso que los porcentajes de remoción menores del 50% pueden ser adecuados para ciertos casos de contaminación. El tiempo de remediación es importante por dos aspectos: a) costos de mantenimiento y b) posible riesgo a la salud. Un suceso de contaminación puede darse en niveles bajos o elevados, en ciertos casos conviene remediar a largo plazo porque quizás el riesgo a la salud de la pluma de contaminación sea menor, o diametralmente opuesto es posible que se requiera remediar a corto plazo por su elevado riesgo a la salud. Con respecto a la duración del tratamiento, las tecnologías consideradas como rápidas tienen un intervalo de tiempo de remediación de 1 a 6 meses, por ejemplo para el lavado de suelos y la biorremediación en fase de lodos (Tabla 1-3). Otras como el enjuague de suelos, las biopilas y el bioventeo pueden durar de 1 hasta 12 meses, la solidificación/estabilización de 3 a 12 meses, en estos últimos casos el tiempo está en término medio. En general, la extracción de vapores y la fitorremediación son las que más tiempo usan para el tratamiento de los contaminantes en el suelo. El último pero no menos importante aspecto, es el costo del proceso de remediación, se puede decir que la solidificación/estabilización así como el lavado de suelos son los más costosos con costos de 75 a más de 150 USD/ton, en contraste con las biopilas que han demostrado ser más baratas, sus costos van de menos de 10 o hasta 25 USD/ton.

Por lo tanto, se recomienda priorizar los aspectos anteriores en función de las necesidades de remediación. La respuesta a la pregunta planteada al inicio del acápite es que no existe una tecnología ideal, solo procesos combinados que aumentan la eficacia de la remediación, por lo que para cada problema de contaminación debe haber una solución muy específica (Khan-Faisal *et al.*, 2004). Las pruebas

preliminares en laboratorio ayudar a elegir las condiciones óptimas o los procesos más adecuados para resolver problemas de contaminación en suelos.

### **1.3. Transformación y biodegradación de hidrocarburos en el suelo**

La importancia de las tecnologías biológicas está en los fenómenos involucrados en la interacción de contaminantes y componentes del suelo con los microorganismos autóctonos del sitio contaminado, además las características del contaminante juegan un rol importante en la eficiencia de la biorremediación. Hay grandes variaciones en la composición de diferentes crudos y aceites refinados, algunos aceites contienen hidrocarburos tóxicos los cuales pueden evitar o retrasar el ataque microbiano; otros aceites refinados contienen Pb que puede inhibir la degradación microbiana de los hidrocarburos. Tanto la velocidad como el grado de degradación dependen de la composición relativa de las clases de hidrocarburos (Riser-Roberts, 1992). Dependiendo del tipo y concentración de compuestos del petróleo se puede inhibir el crecimiento de los microorganismos. Por ejemplo, concentraciones de hidrocarburos entre 1 y 100  $\mu\text{g/g}$  (base seca) son consideradas como no tóxicas para microorganismos heterótrofos (bacterias y hongos), aunque a concentraciones mayores un tiempo de adaptación puede ser esperado. Otros factores que afectan la velocidad de biodegradación son la temperatura y la salinidad del suelo (Riser-Roberts, 1992). Sin embargo, cuando un producto petroquímico entra al suelo está sujeto a un número de factores físicos, químicos y biológicos que contribuyen en la pérdida o alteración de algunos de sus componentes. Los compuestos volátiles, por ejemplo, se pueden perder por evaporación; las reacciones fotoquímicas pueden contribuir al cambio; los aceites pueden absorberse en los detritos; el viento, el movimiento u otras acciones de mezclado pueden contribuir en la formación de emulsiones en agua; los microorganismos pueden metabolizar o co-metabolizar la mayoría de los hidrocarburos bajo las condiciones ambientales apropiadas (Riser-

Roberts, 1992), entre otros fenómenos. Por lo tanto, la eliminación de los contaminantes en el suelo está dada por la suma de diversos factores ambientales, físicos y químicos que facilitan su biodisponibilidad para los microorganismos y así mismo su biodegradación.

### **1.3.1. Interacción de microorganismos con hidrocarburos en el suelo para su biodegradación**

No todos los microorganismos son capaces de degradar hidrocarburos, en cambio los que lo consiguen es porque se han adaptado a las condiciones de estrés. En 1946, ZoBell reportó que cerca de 100 especies de bacterias, hongos y mohos, representando 30 especies del género microbiano, fueron descubiertas por tener propiedades de oxidación de hidrocarburos. Las bacterias son clasificadas como heterótrofas, si derivan su energía y carbono para sobrevivir y crecer, de la descomposición de materiales orgánicos, o como autótrofos, si toman el carbono, para crecer, del dióxido de carbono y obtienen (usualmente) su energía de la luz (fotosintéticos) o la oxidación de compuestos inorgánicos (quimiosintéticos o litotróficos). Los organismos litotróficos pueden transformar materiales inorgánicos (especialmente nitrógeno) en nutrientes disponibles para los heterótrofos. Las bacterias heterótrofas son los organismos más importantes en la transformación de compuestos orgánicos peligrosos y el esquema de tratamiento de suelos puede realizarse directamente hacia el aumento de su actividad. Los hidrocarburos están sujetos a la degradación aeróbica y anaeróbica. Las bacterias comúnmente encontradas en áreas de contaminación por hidrocarburos son del género *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium* y *Nocardia*. El género de *Pseudomonas* parece ser el más ubicuo y el más adaptable a los diferentes contaminantes. Por otro lado, los hongos que fácilmente se adaptan a las condiciones ácidas, contribuyen en la mayoría de los procesos de descomposición. Sus enzimas

extracelulares pueden ayudar a proporcionar sustratos para las bacterias. Algunos hongos (*Penicillium* y *Cunninghamella*) presentan mayor capacidad de biodegradación que algunas bacterias (*Flavobacterium*, *Brevibacterium* y *Arthobacter*). Sin embargo, el metabolismo de los hongos frecuentemente resulta en incompleta degradación para lo cual necesitan bacterias para complementar la degradación. La superficie del suelo usualmente soporta poblaciones de algas eucarióticas y cianobacterias. Esos organismos son potencialmente importantes en las situaciones que implican bajas concentraciones de nutrientes, porque son capaces de obtener su energía de la luz del sol y el carbono de la fijación de dióxido de carbono. En general, los fototrófos no promueven la degradación pero si la transformación de compuestos. El apropiado balance entre bacterias, hongos y algas puede resultar en la extensiva biodegradación de compuestos antropogénicos (Riser-Roberts, 1992).

Un factor que a menudo limita a la biodegradación es la baja disponibilidad de sustratos para los microorganismos, causada por la fuerte sorción de los contaminantes al suelo o la formación de fases líquidas no acuosas (NAPLs, por sus siglas en inglés). Para resolver éste inconveniente a menudo se utilizan tensoactivos, los cuales pueden aumentar la solubilidad y movilidad de los compuestos atrapados en los poros del suelo.

#### **1.4. Tensoactivos**

Los tensoactivos son moléculas orgánicas anfifílicas, es decir que están constituidas por una porción hidrofóbica y otra hidrofílica (Volkering *et al.*, 1998) lo cual les confiere propiedades de superficie. Las cadenas de hidrocarburo (hidrofóbicas) interactúan débilmente con moléculas de agua en un ambiente acuoso, mientras que los grupos funcionales iónicos o polares (hidrofílicos) interactúan fuertemente con moléculas de agua por interacciones dipolo o de tipo ión-dipolo. Es esta última fuerza de interacción

la que provoca que los tensoactivos sean solubles en agua (Tharwat, 2005). La presencia de los tensoactivos en la interface aire-agua promueve la reducción de la tensión superficial de la solución. Muchos tensoactivos pueden reducir hasta 30 mN/m la tensión superficial del agua (72 mN/m) dependiendo del tipo y la concentración del tensoactivo (Volkering *et al.*, 1998).

#### **1.4.1. Características de los tensoactivos**

Algunas características importantes de los tensoactivos se describen brevemente a continuación. El balance Hidrofílico-lipofílico (HLB, por sus siglas en inglés), es la medida del comportamiento dual de cada tensoactivo: una porción de la molécula es soluble en agua mientras que el resto es no polar. Los productos con valores de HLB bajos promueven la formación de emulsiones agua en aceite, mientras que un HLB alto promueve la formación de emulsiones aceite en agua. La segunda característica importante tiene que ver con la capacidad de los tensoactivos para formar micelas; pequeños agregados de moléculas (Torres & Bandala, 2009). A bajas concentraciones en solución acuosa, están presentes como moléculas simples de tensoactivos y después de cierta concentración, llamada concentración micelar crítica (CMC), las moléculas de tensoactivo se juntan formando agregados de entre 20-200 moléculas. La CMC es dependiente de la temperatura y diferente para cada tensoactivo. A temperatura del suelo las CMCs típicas van de 0.1 a 10 mM. Las micelas pueden ser vistas como gotas (2-4 nm) con un núcleo hidrofóbico y un exterior hidrofílico. La presencia de micelas guía al aumento de la solubilidad de hidrocarburos (Volkering *et al.*, 1998).

En la presencia de NAPLs los tensoactivos se concentran en la interface líquido-líquido, reduciendo la tensión interfacial, esto puede causar la dispersión de gotas de NAPLs y la estabilización de emulsiones. Las moléculas de tensoactivo en superficies sólidas guían a la reducción de la tensión interfacial, mejorando el contacto entre las fases sólida y acuosa. A altas concentraciones la absorción de tensoactivos en

superficies sólidas induce la formación de capas simples (hemimicelas) o dobles (admicelas) que contribuyen en la liberación de los contaminantes del suelo (Volkering *et al.*, 1998).

Las propiedades típicamente deseables de los tensoactivos en el área de la remediación de suelos incluyen el aumento de la solubilidad en agua de compuestos hidrofóbicos, la reducción de la tensión superficial y valores de CMC bajas. La efectividad de los tensoactivos en la remediación de suelos contaminados está determinada por su capacidad para reducir la tensión superficial de distintas soluciones (Mulligan, 2005).

#### **1.4.2. Clasificación de los tensoactivos**

De acuerdo al tipo de síntesis los tensoactivos pueden distinguirse entre; 1) químicos y 2) biológicos (biotensoactivos). En función de la naturaleza del grupo hidrofílico cuatro tipos de tensoactivos pueden ser distinguidos: aniónico, catiónico, zwitterionico y no iónico (Mulligan, 2005). A continuación se abordaran algunos de los aspectos más importantes en los tensoactivos de acuerdo a Tharwat (2005).

##### **1.4.2.1. Tensoactivos químicos aniónicos**

Son ampliamente usados por su bajo costo de manufacturación, los más comúnmente usados son, por su grupo hidrofílico; carboxilatos, sulfatos, sulfonatados y fosfatos. El jabón hecho a base de tensoactivos carboxilatos es especialmente atractivo porque es simple y de bajo costo, además de que tienen una relativa baja biodegradabilidad y toxicidad. Su principal desventaja es que pueden precipitar en agua que contiene iones divalentes tales como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ .

Los tensoactivos sulfatados, son producidos por reacción de un alcohol con ácido sulfúrico. La sal de los tensoactivos sulfatados es muy soluble en agua pero puede ser afectada por la presencia de electrólitos. El más común de su clase es el dodecil

sulfato de sodio (SDS, por sus siglas en inglés) (Figura 1-1), el cual es ampliamente usado tanto en estudios fundamentales así como en muchas aplicaciones industriales.

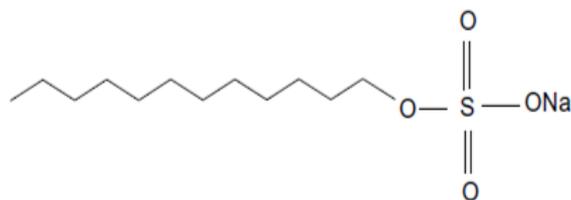


Figura 1-1. Estructura química del dodecil sulfato de sodio.

#### 1.4.2.2. Tensoactivos químicos catiónicos

Los más comunes son los compuestos de amonio cuaternario, por ejemplo el alquil-trimetil-cloruro de amonio y dialquil-dimetil-cloruro de amonio, éste último es más soluble en agua comparado con el compuesto mono-alkil cuaternario, son comúnmente usados en fábricas de suavizantes de ropa como detergentes. Los tensoactivos catiónicos son generalmente solubles en agua y cuando tienen un solo grupo alquilo largo, son estables a los cambios de pH tanto ácidos como básicos. Son incompatibles con los tensoactivos aniónicos pero compatibles con tensoactivos no iónicos en mezclas. Son insolubles en petróleo. El primer uso de los tensoactivos catiónicos se debió a su tendencia a adsorberse en superficies cargadas negativamente, por ejemplo como agentes anticorrosivos, dispersantes de pigmentos inorgánicos, agentes antiestáticos para plásticos, acondicionadores para el cabello, entre otros.

#### 1.4.2.3. Tensoactivos químicos zwitterionicos

Son tensoactivos que contienen grupos de tipo catiónico y aniónico. Los más comunes de su clase con los N-alkil betaínas, que son derivados de trimetil-glicina, un ejemplo es; laurilaminopropildimetilbetaína. La principal característica de estos tensoactivos es su dependencia al pH. En soluciones ácidas, las moléculas adquieren carga positiva (tensoactivo catiónico) mientras que en soluciones alcalinas tienen carga negativa

(tensoactivos aniónicos). A un pH específico puede definir que ambos grupos iónicos muestren una ionización igual (el punto isoeléctrico de la molécula). Esta clase de tensoactivos tienen excelentes propiedades dermatológicas, exhiben baja irritación en los ojos y son frecuentemente usados en jabón para cabello y otros productos del cuidado personal.

#### 1.4.2.4. Tensoactivos químicos no iónicos

Los más comunes son aquellos basados en óxido de etileno, referidos como tensoactivos etoxilados. Diferentes clases pueden ser distinguidas: alcoholes etoxilados, alquil fenol etoxilados, ácidos grasos etoxilados, sorbitan éster etoxilados, grasas de amina etoxiladas y copolímeros de óxido de etileno-óxido de propileno (comúnmente referidos como tensoactivos poliméricos). Los ácidos grasos-ésteres del sorbitan (referidos como span) y sus derivados etoxilados (referidos como tweens) son tal vez una de las clases de tensoactivos no iónicos más usados. Los ésteres de sorbitan son producidos por el reactivo de sorbitol con ácidos grasos a altas temperaturas (> a 200 °C). Sí 1 mol de ácido graso reacciona con 1 mol de sorbitol, se obtiene un mono-éster (Figura 1-2).

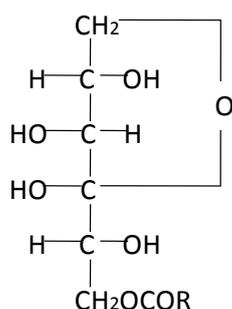


Figura 1-2. Estructura química del mono-éster, tensoactivo de naturaleza no iónica.

Los grupos OH libres en la molécula puede ser esterificados, produciendo di- y tri-ésteres. Algunos ejemplos de estos son: sorbitan monolaureato (span 20), sorbitan monopalmitato (span 40), sorbitan mono-oleato (span 80), sorbitan trioleato (span 85), entre otros. Los derivados etoxilados del span (tween) son producidos por una

reacción de óxido de etileno en cualquier grupo hidróxido que queda libre en el grupo éster del sorbitan, algunos ejemplos de estos son: polioxietileno (20) monolaureato de sorbitan (tween 20) y polioxietileno (20) mono-oleato de sorbitan (tween 80) (Figura 1-3), entre otros. Los ésteres de sorbitan son insolubles en agua pero solubles en la mayoría de los solventes orgánicos (bajo valor de HLB). El producto etoxilado es generalmente soluble en agua y tiene un valor de HLB relativamente elevado.

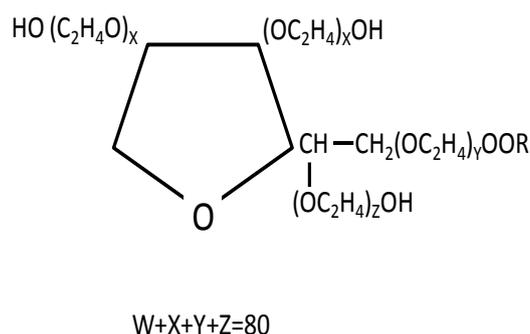


Figura 1-3. Estructura química de tween 80.

Una de las principales ventajas de los ésteres de sorbitan y sus derivados etoxilados es su aprobación como aditivos en alimentos.

### 1.5. Biotensoactivos

Son producidos por levaduras o bacterias, empleando sustratos tanto miscibles como inmiscibles en agua, cuando se producen se pueden adherir a la superficie de la célula o secretarse al medio. Los tensoactivos microbianos tienen diversa naturaleza química, es así que pueden clasificarse como: glicolípidos, lipopéptidos, lipoproteínas, ácidos grasos, lípidos neutros, fosfolípidos, poliméricos y particulados (Mukherjee *et al.*, 2006), dependiendo del pH pueden estar presentes como tensoactivos aniónicos o no-iónica. Se ha reportado que la parte hidrofóbica de las moléculas de biotensoactivos está basada en ácidos grasos de cadena pequeña, hidroxiácidos grasos o  $\alpha$ -alquil- $\beta$ -hidroxiácidos grasos, entre otros. La porción hidrofílica puede ser un carbohidrato, amino ácido, péptido cíclico, fosfato, ácido carboxílico o alcohol. El rango de las CMCs de los biotensoactivos es generalmente de 1 a 200 mg/L y su masa molecular es de 500 a 1500 Da (Mulligan, 2004).

### 1.5.1. Gomas naturales

Las gomas naturales son tejido de reserva de algunas plantas, están constituidas por galactomananas que consisten en polisacáridos heterogéneos, generalmente sus cadenas centrales las conforman unidades de D-manosa (Man) unidas por enlaces  $\beta(1\rightarrow4)$  a la cual se unen residuos de D-galactosa (Gal) en distinta proporción (Figura 1-4). Las gomas difieren una de otra por los diferentes ratios entre Man/Gal los cuales están en el rango de 1.1 a 5.0 (Srivastava & Kapoor, 2007). Garti, (1994) reportado en Torres *et al.*, (2004) encontró que goma guar reduce la tensión superficial del agua hasta 55mmol/(L.m) mostrando que este tipo de compuestos tienen propiedades de superficie.

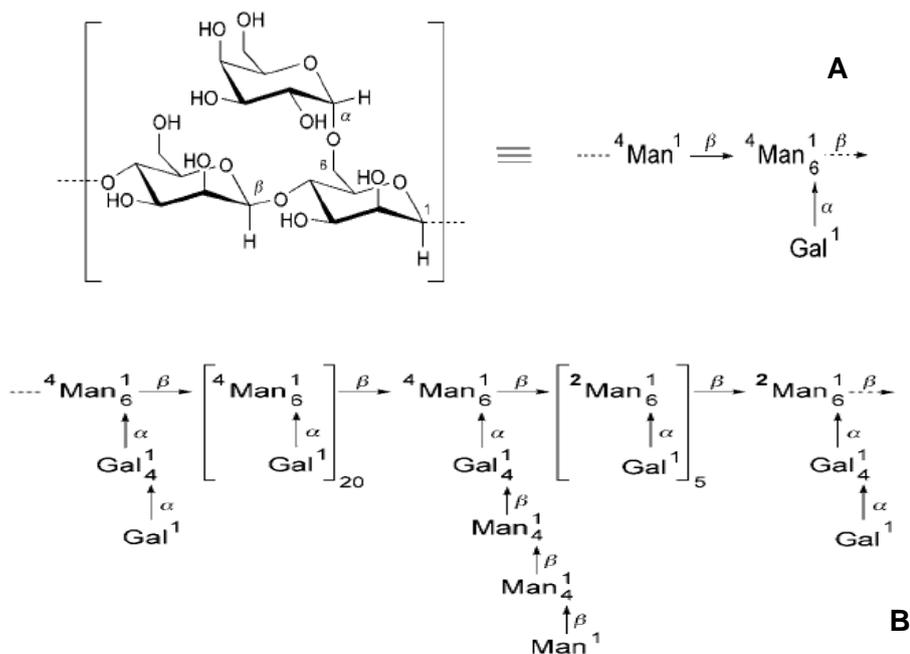


Figura 1-4. Estructura química de galactomananas. A) Las unidades básicas de las gomas naturales. B) Ejemplo de una galactomanana aislada de la semilla *Mellilotus indica*. Tomada de Srivastava & Kapoor, (2007).

### 1.5.2. Ramnolípidos

Son una clase de biotensoactivos de tipo glucolípidos, producidos mayoritariamente por las cepas del género *Pseudomonas*. Los primeros estudios acerca de los ramnolípidos dilucidaron la estructura de un ramnolípidos, mostrando que estaba compuesto por dos ácidos- $\beta$ -hidroxidecanoicos unidos a través de un puente éster, acoplados por un enlace glicosídico a dos porciones de ramnosa enlazadas entre sí por la unión  $\alpha$ -1,2-glicosídico (Jarvis & Johnson, 1949). La estructura completa recibió el nombre de 2-O- $\alpha$ -1,2-L-ramnopiranosil- $\alpha$ -L-ramnopiranosil- $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxidecanoato (Figura 1-5).

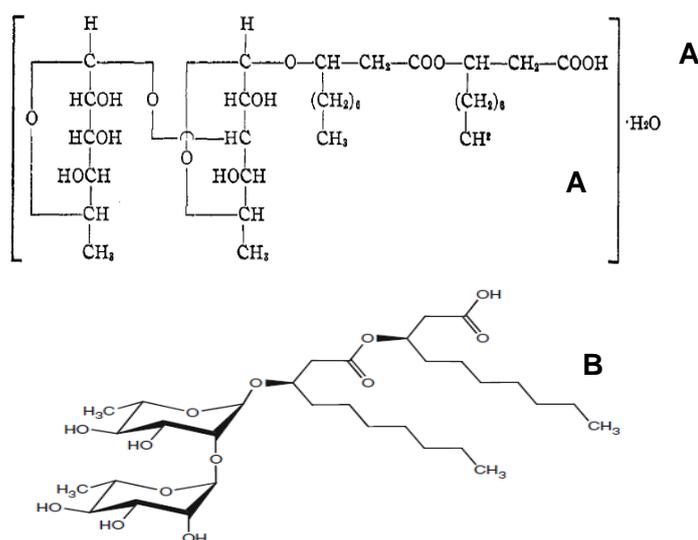


Figura 1-5. A) Estructura química desarrollada del primer ramnolípido (Jarvis & Johnson, 1949) comparada con B) una estructura del di-ramnolípido con ramnosas representadas en forma de silla (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010).

Estudios posteriores mostraron que las mezclas de ramnolípidos estaban compuestas por mono-ramnolípidos y di-ramnolípidos, años más tarde se identificaron 4 congéneres de ramnolípidos diferentes (Figura 1-6) aunque en la actualidad se sabe que hay 28 congéneres distintos (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010), una característica común de los congéneres es que han sido identificados como metabolitos secundarios de *P. aeruginosa* sin embargo, hay otros homólogos de ramnolípidos producidos por

bacterias diferentes a *Pseudomonas sp.* Por ejemplo *Nocardia ortidiscaviarum* (Vyas & Dave, 2011).

La producción de ramnolípidos es posible a partir de diversas fuentes de carbono que soportan el crecimiento bacteriano, en particular los aceites de origen vegetal, tales como el de soya, maíz u olivo que proporcionan un mayor rendimiento (Maier & Soberón-Chavez, 2000).

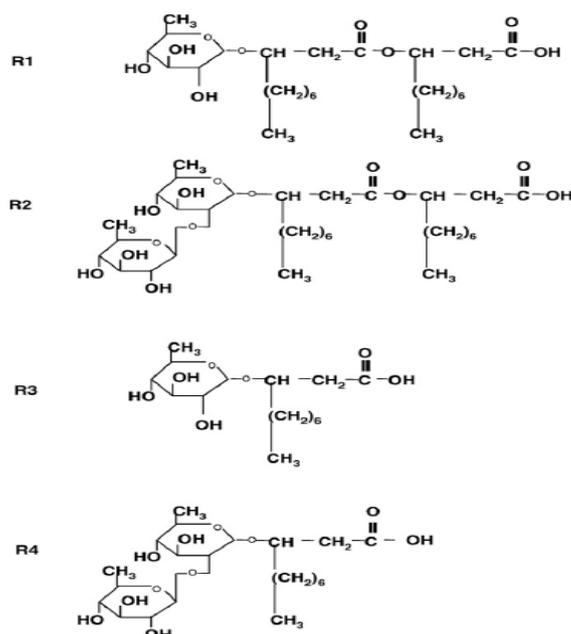


Figura 1-6. Estructura química de los 4 congéneres básicos de ramnolípidos. Las principales variaciones están en el número de unidades de ramnosa y la longitud de las cadenas de ácido grado, tomada de Mulligan, (2004).

Se han realizado muchos trabajos acerca de la optimización en la producción de ramnolípidos en sistemas por lote y en reactores continuos, con resultados prometedores. Además, el uso de diseños experimentales para la optimización de los nutrientes del medio y las condiciones del cultivo (Al-Araji *et al.*, 2007; De Lima *et al.*, 2007) es una práctica cada vez más común lo cual ha conducido a que la producción de ramnolípidos sea cada vez más factible. La factibilidad económica en la producción de metabolitos microbianos para uso comercial está dada por tres factores básicos: 1) los costos de insumos; 2) la optimización en la producción y procesos de recuperación;

3) un buen rendimiento. Se han sugerido tres estrategias para que la producción de biotensoactivos sea un proceso competitivo en su costo: 1) el uso de sustratos baratos y de desecho; 2) el desarrollo de bioprocesos eficientes, incluyendo la optimización de las condiciones de cultivo y los procesos de separación con buenas relaciones en costo-efectivo; y 3) el desarrollo y uso de cepas mutantes o recombinantes sobre-productoras (Mukherjee *et al.*, 2006).

Mucho se ha trabajado con respecto a la producción de ramnolípidos y se ha enfatizado que el conocimiento bioquímico y genético es base fundamental para que su biosíntesis se induzca hasta niveles de sobre-producción. Los estudios encaminados en esta línea de investigación han generado información suficiente para proponer rutas metabólicas en la producción de ramnolípidos. La cepa de *P. aeruginosa* produce este tipo de glucolípidos por 3 reacciones en secuencia las que a continuación se describen brevemente: la enzima Rh1A está involucrada en la síntesis del dímero de ácidos grasos de los ramnolípidos y de los ácidos-2-(3-hidroxicanoiloxi) alcanoico (HAAs) libres. Parecer ser que Rh1A está unida a la membrana interna. La siguiente reacción es catalizada por la ramnosiltransferasa Rh1B unida a la membrana y usa desoxitimidina di-fosfato de ramnosa (dTDP-L-ramnosa) y HAAs como precursores para la producción de mono-ramnolípidos. Esos compuestos son en turno, sustratos junto con dTDP-L-ramnosa, de la enzima Rh1C para producir di-ramnolípidos (Soberón-Chávez *et al.*, 2005). La ruta bio-sintética que resume los pasos de la síntesis de ramnolípidos se ilustra en la Figura 1-7.

Los biotensoactivos han ganado importancia en el campo de la recuperación de petróleo, la biorremediación (Jiménez-Islas *et al.*, 2010), el procesamiento de alimentos y fármacos, debido a sus propiedades únicas: alta biodegradabilidad, baja toxicidad y efectivos en ambientes extremos de temperatura, pH y salinidad. Los ramnolípidos y los ramnolípidos modificados químicamente son investigados como una

alternativa de alto valor agregado. Por ejemplo, los ramnolípidos son usados para estéreo-especificidad de L-ramnosa la cual se emplea comercialmente en la producción de saborizantes de alta calidad y como materia prima para la síntesis de compuestos orgánicos. En el área de los cosméticos los ramnolípidos han demostrado tener baja irritación o efectos anti-irritación y compatibilidad con la piel (Maier & Soberón-Chavez, 2000).

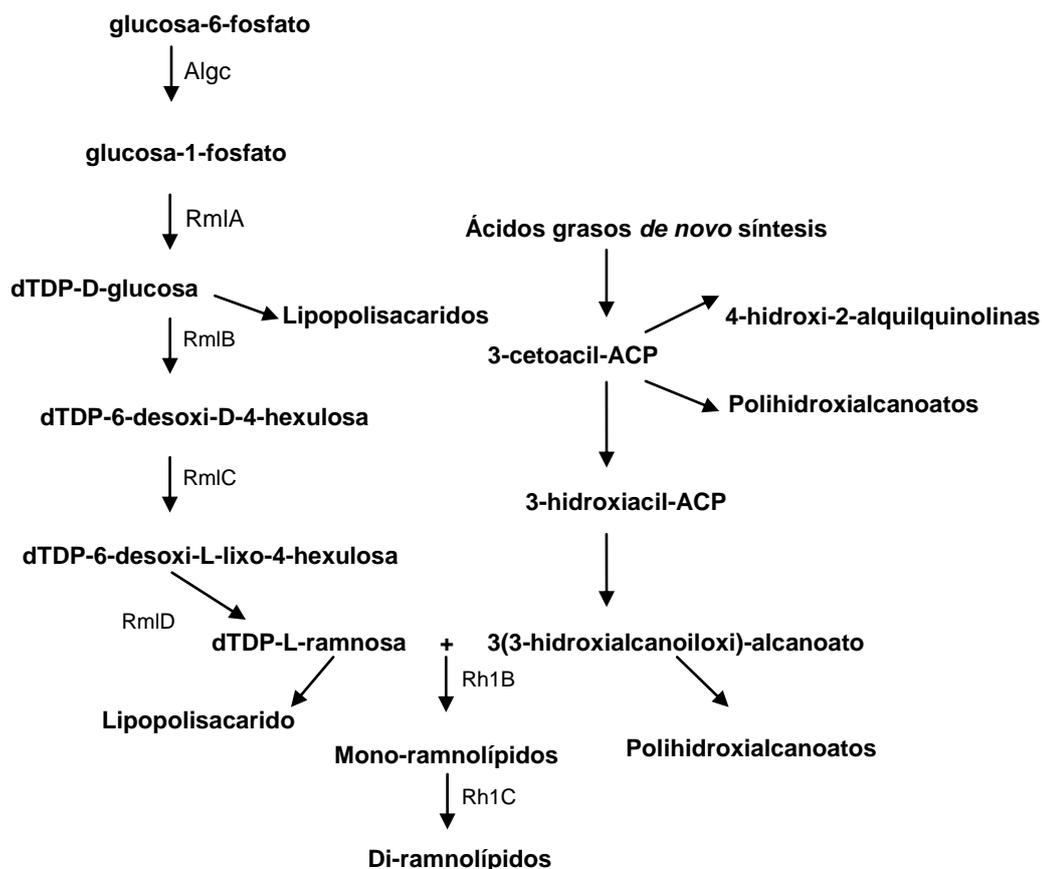


Figura 1-7. Ruta metabólica para la producción de ramnolípidos. Tomada y modificada de Soberón-Chávez *et al.*, (2005).

En la actualidad la empresa Jeneil Biosurfactant produce y comercializa ramnolípidos para distintas aplicaciones, por ejemplo los ramnolípidos que denomina dicha empresa como tipo I y tipo II son adecuados para el lavado de suelos y remoción de metales pesados, mientras los tipo III son para el procesamiento de metales, procesamiento de cuero, lubricantes, procesamiento de pulpa y papel y finalmente los tipo IV pueden ser usados en textiles, limpiadores, alimentos, tintas, pinturas, adhesivos, productos de

cuidado personal, adjuvante de agricultura y para el tratamiento de agua contaminada

(Mulligan & Wang, 2004).

## 2. Definición del problema

Debido al gran número de sitios contaminados por hidrocarburos o metales en México, es necesario realizar su remediación, aunque en la actualidad no basta con remover o eliminar los contaminantes, también es necesario en la medida de lo posible disminuir los posibles efectos nocivos en las técnicas de remediación. Una alternativa es acoplar los productos biológicos a los procesos de remediación existentes.

El lavado de suelos es una técnica eficiente, utiliza periodos cortos de tiempo y es relativamente barata, por su parte la bioestimulación es útil para todos los compuestos orgánicos además de ser una técnica de bajo costo, en común para las dos técnicas se ha reportado que su eficiencia aumenta cuando se acoplan con el empleo de biotensoactivos. La aplicación de biotensoactivos es preferida en lugar de los tensoactivos químicos, porque no son tóxicos, biodegradables y son estables en condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad. Los ramnolípidos son una clase de biotensoactivos que tienen valores de CMC bajos y han sido probados en la remoción de diversos compuestos tóxicos presentes en el suelo. Sin embargo, sus costos de producción son elevados en la parte que involucra su separación y purificación, por tal razón se propone una alternativa económicamente viable de aplicación de ramnolípidos en la remediación de suelos contaminados con compuestos tóxicos.

### 3. Objetivo general

Evaluar la efectividad del ramnolípido producido a nivel laboratorio en el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos o metales pesados, por las técnicas de lavado de suelos y bioestimulación.

#### 3.1. Objetivos particulares

- Producir ramnolípidos a nivel de matraces con *P. aeruginosa* ATCC 9027 usando como fuente de carbono aceite de olivo. Deshidratar el medio de cultivo; el polvo generado será el producto no purificado y se cuantificara su contenido de ramnolípidos.
- Evaluar el efecto de la pureza, la fuerza iónica y el pH en la CMC de los ramnolípidos del producto no purificado en agua.
- Valorar el efecto de la concentración de ramnolípidos en el lavado de un suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo y comparar su remoción con la de SDS, tween 80 y galactomananas.
- Valorar el efecto de la concentración de ramnolípidos en el lavado de un suelo contaminado con metales pesados.
- Evaluar el efecto de la concentración de ramnolípidos y tween 80 en la velocidad de biodegradación de HTP presentes en suelo contaminado por bioestimulación.
- Evaluar el efecto de la concentración de ramnolípidos, la temperatura y el tipo de ramnolípidos, en la biodegradación de HTP del suelo mediante bioestimulación.

#### 4. Hipótesis

Si se emplean ramnolípidos no purificados producidos por *P. aeruginosa* ATCC 9027 a nivel laboratorio, en el lavado o la bioestimulación de suelos contaminados con metales pesados o hidrocarburos del petróleo se puede aumentar o mejorar su remoción en comparación con la obtenida con tensoactivos de origen químico.

## 5. Materiales y métodos

### 5.1. Preparación del inóculo

La cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 fue utilizada para la producción de biotensoactivos en agar nutritivo, caldo nutritivo y medio mineral.

La cepa se cultivó en cajas pétri con agar nutritivo (BD bioxon) durante 48 h a una temperatura de 30°C. Posteriormente, la cepa se transfirió a matraces Erlenmeyer de 150 mL que contenían 60 mL de caldo nutritivo (BD bioxon), los matraces fueron agitados a 150 rpm durante 24 h en una incubadora orbital (SEV, INO-650 M) a 30°C. Se monitoreó la biomasa por densidad óptica a 565 nm, una vez detectada la fase de crecimiento exponencial se transfirió 1 mL de caldo nutritivo a matraces de 150 mL que contenían 60 mL de medio mineral y aceite de olivo como fuente de carbono.

### 5.2. Producción de ramnolípidos en medio mineral

El contenido de nutrientes del medio mineral fue (g/L): MgSO<sub>4</sub>, 0.53; KCl, 1.34; NaCl, 1.34; CaCl<sub>2</sub>, 0.067; NaNO<sub>3</sub>, 3.37 y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1.151 (mL/L). La concentración de elementos traza (g/L) fue: FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.00067; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.0020; MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.0020; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.0004; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.0002; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.0002 y NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.00013 (Jiménez-Islas *et al.*, 2010). El pH del medio fue ajustado a 7 usando soluciones de NaOH y HCl (ambas a concentraciones de 0.5 N). La fuente de carbono fue aceite de olivo en una relación C/N=16 equivalente a 19.9 g/L. Después de esterilizar los matraces con medio mineral, se les inoculó con *P. aeruginosa*. Esos matraces fueron introducidos a un agitador orbital a una velocidad de 150 rpm y 30 °C durante 5 días. Durante el tiempo de crecimiento se determinó la concentración de ramnolípidos, la tensión superficial y la biomasa.

### **5.3. Determinación de biomasa, concentración de ramnolípidos y tensión superficial**

La biomasa fue medida empleando una prueba gravimétrica descrita en Jiménez-Islas *et al.*, (2010).

El contenido de ramnolípidos fue determinado por el método de hidrólisis-ácida y determinación de azúcares hidrolizados, como se describe brevemente a continuación. El caldo de cultivo fue centrifugado a 6000 rpm por 15 min, para eliminar células. Los ramnolípidos fueron extraídos del sobrenadante con éter (1:1, v/v). La fase orgánica fue evaporada hasta desecación y el extracto se disolvió en 0.25 volúmenes de agua desmineralizada con respecto al volumen de éter usado en la extracción. Posteriormente se adicionó al extracto una solución de orcinol al 0.19% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 53%, en una relación 1:9 (v/v), las muestras se calentaron a 80°C por 30 min. Después de la hidrólisis y a temperatura ambiente, se midió la absorción a 421 nm en un espectrofotómetro (Termo, Scientific. Genesys 10S UV-Vis). La concentración de ramnolípidos fue calculada por comparación con una curva estándar de L-ramnosa de 0 a 50 mg/L (Aldrich) (Anexo 1), expresada como equivalentes de ramnosa (Wang *et al.*, 2007).

La tensión superficial fue medida con un tensiómetro semiautomático (Cole Parmer, tensiomat 21) mediante el método de Du Nouy descrito en Heyd *et al.*, (2008) (Anexo 2).

### **5.4. Preparación de producto no purificado y determinación de su contenido en ramnolípidos**

El medio de cultivo después del crecimiento fue esterilizado a 120 °C durante 15 min a 1 atm de presión, posteriormente se sometió a proceso de secado en un horno (RIOSSA, B-51) a 75 °C durante 96 h, el polvo obtenido se rotuló como producto no purificado de aceite de olivo con las siglas PSA, se determinó su contenido de

ramnolípidos mediante un gramo de PSA que se suspendió en 50 mL de agua desionizada, después por centrifugación 10,000 g durante 15 min se separaron las células, posteriormente los ramnolípidos se precipitaron por acidificación del sobrenadante a pH de 2 con HCl concentrado durante 12 h a 4°C. Los ramnolípidos se recuperaron por centrifugación a 10,000 g durante 1 h, el sedimento se suspendió en 50 mL de agua desionizada y finalmente se agregaron dos volúmenes de cloroformo-etanol (2:1) en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con tapa para agitarlos durante 30 min a 120 rpm en un agitador orbital (Wang *et al.*, 2007). La fase orgánica fue recuperada y evaporada a sequedad, se calculó la masa del residuo por gravimetría.

El grupo de trabajo repitió este mismo proceso para medios de cultivo generados a partir de grasa de borrego (PSB) y suero lácteo (PSC) mismos que se nos proporcionaron.

#### **5.5. Determinación de la CMC para ramnolípidos del PSA en distintos sistemas acuosos**

Se prepararon conjuntos de soluciones de 0.1 a 800 mg/L de ramnolípidos, un conjunto de muestras fueron filtradas con membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ , a cada muestra se le midió la tensión superficial y mediante el perfil de tensión superficial se calculó la CMC mediante un método gráfico (Anexo 2).

Después, se prepararon conjuntos de soluciones de 0.1 a 400 mg/L de ramnolípidos, a conjuntos distintos de los varió el pH de 4 a 10 con NaOH o HCl ambas a 0.5 N. Se calculó la CMC para cada conjunto como se mencionó anteriormente.

Finalmente se prepararon conjuntos de soluciones de 0.1 a 400 mg/L de ramnolípidos, a conjuntos distintos de los varió el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Fe}^{3+}$  en un rango de 0 a 2 mM, Se calculó la CMC para cada conjunto como se mencionó anteriormente.

### 5.6. Lavado de suelo contaminado con HTP empleando ramnolípidos.

Se usó un suelo tipo grava-arenoso proveniente de la ex refinería de Azcapotzalco ubicada en la ciudad de México en cual fue previamente caracterizado por Bofani, 2008 (Tabla 5-1). El procedimiento para lavar el suelo contaminado fue el siguiente: 6 g de suelo fueron cernidos en tamiz del número 10, los cuales fueron agregados a viales de 40 mL con 20 mL de solución de lavado bajo las condiciones mostradas en la Tabla 5-2, los viales se agitaron en un termo-agitador a 70 rpm durante 23 h a temperatura ambiente, después de este periodo, se permitió sedimentación durante 1 h. La fase líquida fue separada y el suelo se secó a temperatura ambiente. Se determinó el contenido de HTP del suelo contaminado, por extracción con hexano en soxhlet de acuerdo a la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 (Anexo 3), además se determinó la humedad de cada muestra de suelo de acuerdo a Fernandez *et al.*, (2006) (Anexo 3) para reportar el contenido de HTP en base seca. Las diferencias en HTP antes y después del lavado fueron expresadas como porcentaje de remoción.

Tabla 5-1. Características del suelo grava-arenoso tomados de Bofani, (2008).

Parámetro	Valor	Metal	Concentración (mg/Kg)	Desviación estándar
HTP (mg/Kg)	31,902	As	0	0
pH	6.3	Cd	4.09	0.272
Humedad (%)	4.5	Cu	310.25	5.2
Partículas <2mm (%)	63	Zn	165.92	10.8
Partículas >2mm (%)	37	Pb	32,206.23	1435.5
COT (%)	0.27	Ni	8,608	798
Fósforo soluble (ppm)	0.84	K	1,376	259.5
Nitrógeno total (%)	0.04	Ca	8,029.6	88
Capacidad de intercambio catiónico (cmol(+)Kg <sup>-1</sup> )	16.54	Mg	4,298.8	163.7
Bacterias UFC/g	2.3x10 <sup>7</sup>			

COT: carbono orgánico total, UFC: unidades formadoras de colonias, cmol(+)Kg<sup>-1</sup>: centimoles de cationes por kilogramo de suelo.

Tabla 5-2. Tipo y concentración de soluciones extractantes para lavar suelo grava-arenoso contaminado con HTP. Se adjuntan algunas características de los extractantes.

Extractante	Concentración empleada (%)	CMC (mg/L)	Naturaleza del química del extractante
Agua	---	---	---
Tween 80	0,125	65,4	No iónico
SDS	0,125	400	Aniónico
Mezquite	0,125	NR	No iónico <sup>1</sup>
Algarrobo	0,125	NR	No iónico <sup>1</sup>
Goma guar	0,125	NR	No iónico <sup>1</sup>
Ramnolípidos del PSA	0.138, 0.130, 0.065, 0.013, 0.006 y 0.001	175.8	No iónico <sup>2</sup>

NR: no reportada, 1: tensoactivo extraído de plantas, 2: tensoactivo microbiano

## 5.7. Lavado de suelo contaminado con metales pesados empleando ramnolípidos

Para evaluar la remoción de metales con ramnolípidos fue usado un suelo tipo arcilloso proveniente de una industria metalúrgica localizada en el área metropolitana de la ciudad de México, las características del suelo fueron reportadas por Zacarías, (2009) y se presentan en la Tabla 5-3. El procedimiento de lavado es el mismo descrito en el apartado 5-6, aunque en este caso se usaron soluciones de ramnolípidos a concentraciones de 0.1, 1.0, 3.0, 5.0 y 10 veces su valor de CMC. El contenido de metales en las muestras de suelo fue analizado por el método espectrofotométrico de absorción atómica de la norma NMX-AA-51-81.

Tabla 5-1. Características del suelo contaminado con metales pesados. Tomada de Zacarías (2009).

Parámetro	Valor	Desviación estándar
Materia Orgánica (%)	2.81	0.12
Humedad (%)	63.4	2.8
Nitrógeno (mg/kg)	180	35
Fósforo (mg/kg)	39	3.92
Potasio (mg/kg)	19.3	5.2
Textura	Arcilloso	NA
pH	5.5	0.25
Densidad aparente (g/cm <sup>3</sup> )	1.15	0.09
Densidad re (g/cm <sup>3</sup> )	3.36	0.25
Espacio poroso (%)	65.87	2.19
Capacidad de intercambio catiónico (cmol(+)/Kg <sup>-1</sup> )	17.33	0.05

NA: no aplica

## 5.8. Cinéticas de biodegradación de HTP por bioestimulación acoplada con tensoactivos

Los ramnolípidos fueron evaluados en la velocidad de biodegradación de HTP mediante la bioestimulación del suelo presentado en la Tabla 5-1. Se prepararon microcosmos en frascos de vidrio (0.1 m de altura x 0.06 m de diámetro) que contenían 30 g de suelo contaminado, sulfato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y fosfato monobásico de sodio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O) suficientes para conseguir una relación C/N/P 100/15/1 (Fahnestock, 1998) además conservando la misma relación de C/N/P se agregaron tensoactivos bajo las condiciones de la Tabla 5-3. Posteriormente, todos los microcosmos se introdujeron en una estufa de cultivo (RIOSSA) a 30 °C durante 8 semanas. Se usó un blanco que fue esterilizado a 120 °C durante 15 min a 1 atm de presión. A cada muestra se le midió el contenido de bacterias heterótrofas el cual fue determinado tomando 1 g de suelo y suspendiéndolo en solución salina isotónica (8.5 g/L de NaCl) para posteriormente preparar diluciones de 1x10<sup>-1</sup> a 1x10<sup>-7</sup>. Posteriormente, una alícuota de 0.1 mL de cada dilución se adicionó a placas con agar nutritivo (BD bioxon) y se incubaron a 30 °C durante 48 h. Solo se consideraron las placas donde hubo entre 20 y 200 UFC (Torres *et al.*, 2004). También a cada muestra se le determinó el contenido de HTP (Anexo 3).

Tabla 5-2 Experimentos propuestos para la evaluación de las cinéticas de biodegradación de HTP

Sin tensoactivos	Ramnolípidos [0.177]	Ramnolípidos [0.755]	Tween 80 [0.775]	Fechas propuestas
0	0	0	0	Semana 0, 14/Enero/11
1	1	1	1	Semana 1, 21 /Enero/11
2	2	2	2	Semana 2, 28/Enero/11
3	3	3	3	Semana 3, 4/Febrero/11
5	5	5	5	Semana 5, 18/Febrero/11
8**	8**	8**	8	Semana 8, 11/Marzo/2011
Muestra estéril				

\*\* Representa una repetición de la muestra

## 5.9. Estudio de la biodegradación de HTP en suelo por bioestimulación acoplada con ramnolípidos.

La biodegradación por bioestimulación suplementada con ramnolípidos fue estudiada con en el suelo presentado en la Tabla 5-1 de acuerdo al diseño experimental de Box Benhken el cual evaluó simultáneamente el tipo de ramnolípidos; definidos como PSA para los obtenidos en el presente proyecto y PSB, PSC que fueron proporcionados por el grupo de trabajo, la dosis según el número de veces la CMC (0.01, 0.05 y 0.1) y la temperatura (28, 38 y 48 °C). Los microcosmos correspondientes se prepararon como se describió en la sección 5.8 bajo las condiciones presentadas en la Tabla 5-3.

Tabla 5-3. Condiciones experimentales para los microcosmos del diseño experimental Box Benhken.

Muestra	Tipo de producto no purificado	No. veces la CMC	Temperatura (°C)
1	PSA	0.01	38
2	PSA	0.05	38
3	PSA	0.05	48
4	PSA	0.1	38
5	PSB	0.01	38
6	PSB	0.05	28
7	PSB	0.05	48
8	PSB	0.1	38
9	PSC	0.01	28
10	PSC	0.01	48
11	PSC	0.05	38
12	PSC	0.05	38
13	PSC	0.05	38
14	PSC	0.1	28
15	PSC	0.1	48
16	ST	NA	38
17	ST	NA	38

ST: Sin tensoactivos, NA: No aplica.

La muestra 16 representa un blanco estándar en el cual no se agregaron biotensoactivos pero si nutrientes y la muestra 17 representa el blanco esterilizado a 120 °C durante 15 min a 1 atm de presión. El tiempo en el que se estudió la biodegradación fue de 8 semanas, después del periodo de incubación a cada microcosmo se le midió el contenido de HTP (Anexo 3) para calcular la remoción con respecto al blanco estéril y se determinó el número de bacterias heterótrofas-

autóctonas como se describió en la sección 5.8. Los resultados fueron analizados utilizando el programa estadístico SPSS, versión 11.

## 6. Resultados y discusión

### 6.1. Producción de ramnolípidos

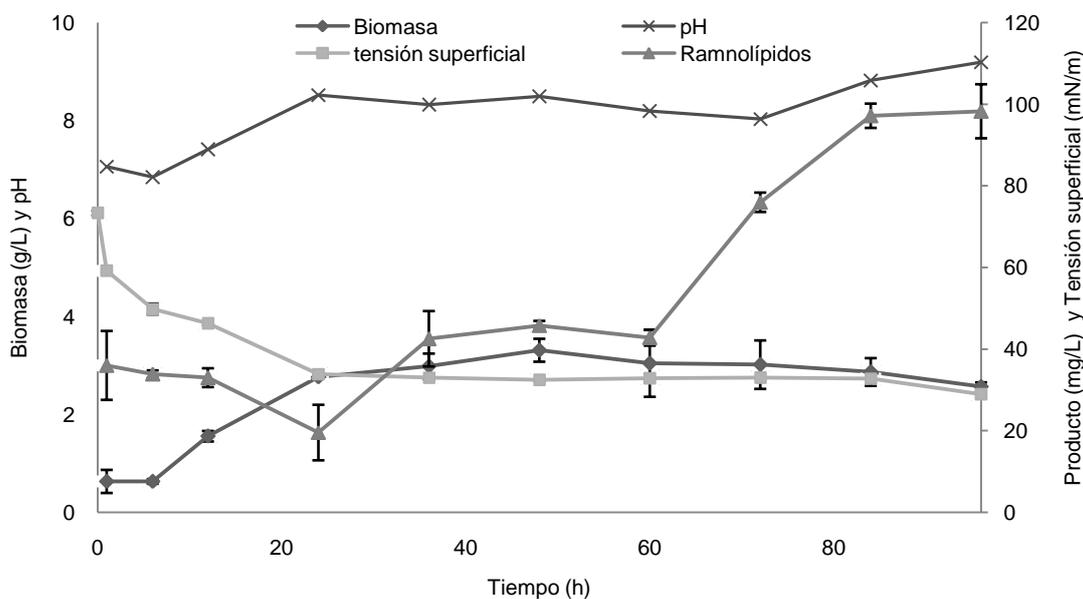
El perfil de generación de biomasa tiene la forma típica de una curva de crecimiento bacteriano con un tiempo lag de 6 h, un crecimiento exponencial que culmina a las 24 h y una fase de mantenimiento que se prolonga hasta las 100 h (Gráfica 6-1). La concentración máxima de biomasa fue de 2.76 g/L, un valor bajo comparado con 7.1 g/L obtenidos en la producción de ramnolípidos con glucosa en medio mineral (Mutsufuji *et al.*, 1997). La limitaciones de nitrógeno (Guerra-Santos *et al.*, 1984) o fósforo (Clarke *et al.*, 2010) en cultivos con *P. aeruginosa* afectan el metabolismo celular reduciendo las reacciones para la generación de biomasa, desviándolo hacia la obtención de energía y otros productos tales como el ácido-7,10-dihidroxi-8-(E)-octadecanoico con propiedades de superficie activa (Kuo *et al.*, 2003), pigmentos de fenanzina, exotóxina A, fosfolípasa C (Santos *et al.*, 2002), ácido-2-(3-hidroxi-1-oxo-2-oxo-3-oxo-4-oxo-5-oxo-6-oxo-7-oxo-8-oxo-9-oxo-10-oxo-11-oxo-12-oxo-13-oxo-14-oxo-15-oxo-16-oxo-17-oxo-18-oxo)-alcanoico (HAAs) como producto libre o precursor de ramnolípidos, polihidroxi- $\alpha$ -alcanoatos (PHAs) (Soberón-Chávez *et al.*, 2005), estructuras intracelulares conocidas como cuerpos-R (Espuny *et al.*, 1991) y ramnolípidos (Guerra-Santos *et al.*, 1984; Maier & Soberón-Chavez, 2000).

La evolución en la generación de ramnolípidos presentada en la Gráfica 6-1 indica que al inicio de la fermentación en el medio de cultivo había cerca de 36 mg/L de ramnolípidos, quizás como consecuencia de no haber lavado el inóculo del medio mineral. Adicionalmente, se ha reportado que el método colorimétrico (orcinol) es fácilmente interferido por impurezas tales como residuos de azúcar del medio de cultivo (Wei *et al.*, 2008), sales inorgánicas, compuestos con carbonilo u oxidantes y proteínas (Heyd *et al.*, 2008) resultando en un sobreestimado del contenido de ramnolípidos. A las 24 h de la producción hubo una disminución de biotensoactivos medida en 19.5 mg/L, atribuible al consumo de ramnolípidos como fuente de carbono. Se ha reportado la posibilidad del consumo preferencial de ramnolípidos en vez de la

f fuente de carbono del medio mineral (Maier & Soberón-Chavez, 2000). Después de las 24 h de fermentación en las muestras se detectó un contenido de biotensoactivos en progresivo aumento, hasta lograr un máximo de 100 mg/L a las 100 h. El nivel de producción de ramnolípidos se incrementó cuando la biomasa pasó a la etapa de crecimiento estacionario, estas observaciones concuerdan con los resultados obtenidos por Benincasa *et al.*, (2004). Los ramnolípidos son considerados como metabolitos secundarios porque su producción coincide tanto con el inicio de la fase estacionaria como con la transcripción del promotor rhLAB que es regulado primeramente, por la densidad celular mediante el sistema *Quorum sensing* (QS, por sus siglas en inglés) (Soberón-Chávez *et al.*, 2005) en la etapa estacionaria.

El perfil de tensión superficial inició con un valor cercano al del agua (72 mN/m) disminuyendo progresivamente hasta 33.9 mN/m a las 24 h, la cual si bien no fue la mínima tensión superficial se mantuvo casi constante hasta el final de la fermentación. Se ha reportado que la presencia de tensoactivos en medios de cultivo está relacionada con la disminución de la tensión superficial (Monteiro *et al.*, 2007) o tensión interfacial (Mulligan, 2004). Se puede decir que la tensión superficial está relacionada con la producción de biotensoactivos hasta antes de la CMC calculada de 15.5 mg/L. Por lo que la determinación de la tensión superficial podría servir para monitorear la producción de ramnolípidos sin necesidad de cuantificarlos (Gráfica 6-1).

Finalmente, el pH inicial del medio de cultivo fue de 7.02 y al final de la fermentación aumentó hasta 9.19 (Gráfica 6-1). Lee *et al.*, (2004) evaluaron las condiciones de crecimiento en un reactor alimentado encontrando que a 25 °C y pH 7.0 se brindan las mejores condiciones para producir biotensoactivos, de esta manera se puede decir que el pH empleado fue el más adecuado en la producción y quizás su aumento sea reflejo de la presencia de biotensoactivos.



Grafica 6-1. Producción de ramnolípidos empleando aceite de olivo en medio mineral. Las barras de error representan la desviación estándar de muestras por triplicado.

Las condiciones de producción utilizadas aquí fueron las mismas empleadas por Medina *et al.*, (2011) a diferencia de que el ácido oleico puro fue sustituido por aceite de olivo como fuente de carbono, para tratar de influir en el costo del insumo. Se ha reportado el empleo de diferentes fuentes de nitrógeno y carbono convencionales para mejorar de productividad de biotensoactivos (Santos *et al.*, 2002) y recientemente se ha preferido usar fuentes de carbono poco convencionales que contienen ácidos carboxílicos de tipo oleico y el linoleico tales como aceites de árbol de neem, de karanja o de la planta de jatropha (Pratap *et al.*, 2011) propias de la India, con la intención de influir en la disminución de los costos de producción.

Una recopilación de concentraciones de biotensoactivos obtenidos en trabajos previos pone de manifiesto el bajo nivel de producción del presente estudio (Tabla 6-1). Las bacterias que secretan ramnolípidos en medios de cultivo, en la mayoría de los reportes, coincide con *P. aeruginosa* con diversas cepas, las cuales son capaces de producir de 71 a 12,470 mg/L. La fuente de carbono empleada para la generación de

biotensoactivos puede ser solubles o insolubles en agua, no obstante una baja productividad puede ser esperada con compuestos solubles en agua (Lee *et al.*, 2004), por ejemplo *P. aeruginosa* PEER02 produce entre 700 y 800 mg/L de ramnolípidos usando glucosa, mientras que se producen entre 1,700 y 1,900 mg/L empleando aceite de soya (Wang *et al.*, 2007). En los trabajos realizados por Guerra-Santos *et al.*, (1984) y Reiling *et al.*, (1986) se han obtenido concentraciones de entre 1250 y 1500 mg/L con la cepa *P. aeruginosa* DSM2659 en glucosa, aunque el elevado contenido de biotensoactivos se debió a que el proceso de producción se realizó en reactores de cultivo continuo y no en sistemas en lote como fue el caso de la mayoría de los procesos incluidos en la Tabla 6-1. Por otro lado, en cultivos con *P. aeruginosa* IFO 3924 y etanol como fuente de carbono, la cantidad de ramnolípidos detectada excede los 3,000 mg/L de biotensoactivos (Mutsufuji *et al.*, 1997), en este caso su elevada detección se debió al proceso de purificación en cromatografía de capa fina, mismo que no se emplea en el método de orcinol. En general cuando se utilizan sustratos no solubles tales como n-alcanos y aceites vegetales, la concentración de ramnolípidos es un orden de magnitud mayor ( Lee *et al.*, 2004; Mukherjee *et al.*, 2006; Medina *et al.*, 2011). Los biotensoactivos disminuyen la tensión superficial en un rango que va desde 37.3 hasta 25.4 mN/m a distintas concentraciones de ramnolípidos, quizás porque su calidad es distinta en cada caso de producción (Tabla 6-1).

El contenido final de biotensoactivos obtenidos en el presente estudio aunque fue bajo, tuvo propiedades de superficie interesantes, porque fueron capaces de disminuir la tensión superficial hasta 33 mN/m.

Tabla 6-1. Producción de ramnolípidos con diversas fuentes de carbono, algunos datos publicados entre 1984 y 2011.

Cepa productora	Concentración de ramnolípidos (mg/L)	Fuente de carbono (FC)	Mínima tensión superficial (mN/m)	Concentración FC (g/L)	Método de cuantificación de ramnolípidos	Referencia
<i>P. aeruginosa</i> DSM2659	1,500	glucosa	35	18.5	orcinol <sup>1</sup>	Guerra-Santos <i>et al.</i> , (1984)
<i>P. aeruginosa</i> DSM2659	2,250	glucosa	30	30	orcinol	Reiling <i>et al.</i> , (1986)
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3924	3,700	etanol	ND	23.7	escáner en cromatografía de capa fina	Mutsufuji <i>et al.</i> , (1997)
<i>P. aeruginosa</i> YPG-80	1,800	glicerol	30.1	20	orcinol	Park <i>et al.</i> , (1998)
<i>P. fluorescens</i>	580*	hexadecano	35	3.08	extracto con solventes	Barathi & Vasudevan (2001)
<i>P. aeruginosa</i> PA1	3,340	glicerol	ND	30	cuantificación de ramnosa	Santos <i>et al.</i> , (2002)
<i>P. aeruginosa</i> B189	71	aceite de soya comercial	ND	40	columna de cromatografía	Thanomsub <i>et al.</i> , (2006)
<i>P. aeruginosa</i> zju.u1	12,470	residuos de aceite de cocina	37.3	40 (mL)	orcinol	Zhu <i>et al.</i> , (2007)
<i>P. aeruginosa</i> DAUPE 614	3,900	glicerol	27.3	30	orcinol	Monteiro <i>et al.</i> , (2007)
<i>P. aeruginosa</i> PEER02	700-800	glucosa	ND	20	orcinol	Wang <i>et al.</i> , (2007)
<i>P. aeruginosa</i> PEER02	1,700-1,900	aceite de soya	ND	20	orcinol	Wang <i>et al.</i> , (2007)
<i>P. aeruginosa</i> EM1	7,500	glucosa	26.5	40	orcinol	Wu <i>et al.</i> , (2008)
<i>P. aeruginosa</i> EM1	4,930	glicerol	26.5	40	orcinol	Wu <i>et al.</i> , (2008)
<i>P. aeruginosa</i> EM1	550	ácido oleico	ND	40	orcinol	Wu <i>et al.</i> , (2008)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	100	ácido oleico-puro	33	6.2	orcinol	Medina <i>et al.</i> , (2011)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	100	aceite de olivo	33	19.9	orcinol	Presente estudio

ND: no determinado, <sup>1</sup>: la técnica de orcinol fue propuesta por Chandrasekaran, E. V., y J. N. Briller en 1980 y es la técnica más usual para a cuantificar ramnolípidos.

Lo anterior queda mayormente fundamentado sí se calcula la capacidad tensoactiva específica (CTE) con la siguiente ecuación empírica propuesta en el presente estudio:

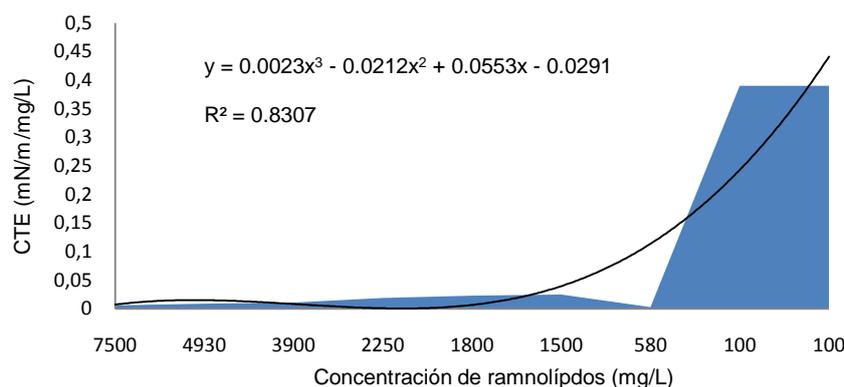
$$CTE = \frac{TS_{agua} - TS_{RLs}}{[RLs]} \dots\dots\dots Ec. (1)$$

Donde TS<sub>agua</sub> es la tensión superficial del agua, TS<sub>RLs</sub> es la tensión superficial del medio de cultivo que contiene los ramnolípidos y [RLs] es la concentración de ramnolípidos en unidades de mg/L al final de la fermentación. Con los datos de la Tabla 6-1 fueron calculados los valores de CTE y se presentan en la Tabla 6-2. La mayoría de los ramnolípidos producidos por cepas de *P. aeruginosa* presentan valores bajos de CTE, en cambio para la cepa utilizada en el presente estudio (ATCC 9027) se obtuvieron los valores más altos, lo cual sugiere una mayor calidad en los biotensoactivos. Adicionalmente, la CTE no presenta una relación lineal con la

concentración de los ramnolípidos, es en cambio una función polinómica (Gráfica 6-2), lo que propone que también la composición de los ramnolípidos influye en su calidad medida como CTE, esto podría estar asociado con la diferencia entre las proporciones de mono y di-ramnolípidos (Haba *et al.*, 2003; Benincasa *et al.*, 2004; Thanomsub *et al.*, 2006; Monteiro *et al.*, 2007).

Tabla 6-2. Capacidad tensoactiva específica de ramnolípidos producidos por diferentes cepas del género de *Pseudomonas*.

Género de <i>P. aeruginosa</i>	CTE (mN/m/mg/L)
DSM2659	0.025
DSM2659	0.019
YPG-80	0.023
zju.u1	0.003
DAUPE 614	0.011
EM1	0.006
EM1	0.009
ATCC 9027	0.390
ATCC 9027	0.390



Gráfica 6-2. Capacidad tensoactiva específica versus concentración de ramnolípidos de algunos datos reportados en literatura y los encontrados en el presente estudio.

Los costos de producción de biotensoactivos han llegado a ser competitivos con los costos de producción de tensoactivos químicos. Por ejemplo, Lang y Wullbrandt (1999) estimaron que la producción de ramnolípidos tiene un costo de 20 USD/Kg (dólares por kg se producto) para fermentadores de 20 m<sup>3</sup> y 5 USD/Kg para fermentadores de 100 m<sup>3</sup>. En contraste con un tensoactivo etoxilado o alquil-poliglicosido sintético los cuales tienen costos de 1-3 USD/kg. La tendencia indica que los costos de producción seguirán a la baja, por lo tanto estudiar ramnolípidos en la solución a problemas

diversos es una idea prometedora. Se puede influir en la disminución de los costos de producción en las distintas etapas del bioproceso tal como en la parte de recuperación, por lo tanto la propuesta del presente estudio fue generar un producto que no requiere de purificar biotensoactivos para su aplicación.

## **6.2. Preparación del producto no purificado y determinación de su contenido en ramnolípidos**

Del medio de cultivo con aceite de olivo para la producción de ramnolípidos se generó un producto no purificado en polvo de color amarillo-pardo, el cual fue rotulado como PSA (Figura 6-1). Los productos referidos como PSB y PSC fueron generados y estudiados paralelamente por el grupo de trabajo.



Figura 6-1. Producto no purificado (en tubo falcón).

El PSA está conformado por biotensoactivos, restos de células, residuos de la fuente de carbono del aceite de olivo, proteínas, sales, y sub-productos que provienen del metabolismo de la bacteria *P. aeruginosa* (Chrazanowski *et al.*, 2011). En trabajos previos, se utilizó directamente el medio de cultivo (González, 2009) en el lavado de un suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo, los resultados indicaron que se puede remover HTP a altas concentraciones, pero no fue posible conservar las soluciones de biotensoactivos libres de contaminación por microorganismos, incluso a baja temperatura (-4 °C). En este sentido, la generación del polvo de PSA reduce el riesgo de contaminación por microorganismos.

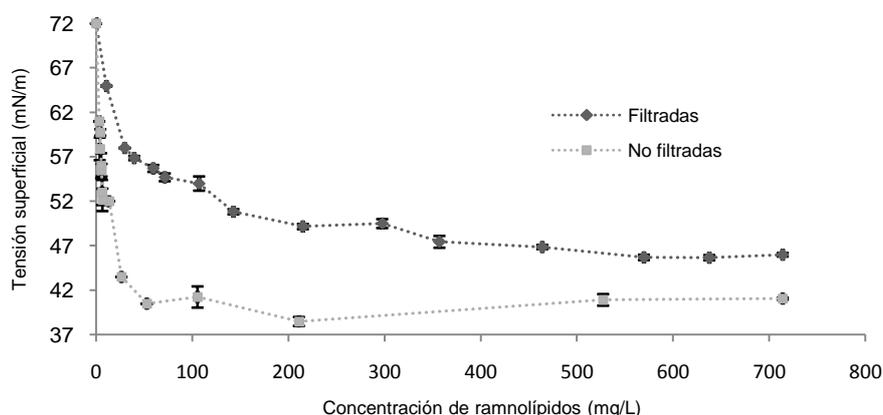
Los resultados respecto a la cuantificación de ramnolípidos del PSA indican que hay 1.19% (p/p), el cual fue un valor bajo pero no muy distinto al contenido de ramnolípidos en un producto que se comercializa actualmente por la empresa Jeneil biosurfactant

que contiene 15% de ramnolípidos (Urum & Pekdemir, 2004). El contenido de ramnolípidos del medio de cultivo reportado en la sección de producción, en comparación con su cuantificación por gravimetría en el PSA, fueron diferentes y menor para el segundo caso. Quizás porque durante el proceso de secado hubo pérdidas, no extrajo el total de biotensoactivos del producto no purificado (datos no mostrados) y porque el método de orcinol detecta ramnosa para calcular el contenido de ramnolípidos sin considerar las diferencias entre mono-ramnolípidos y di-ramnolípidos, ni el tamaño de las cadenas alquílicas (Heyd *et al.*, 2008). Se ha reportado que la especie de *P. aeruginosa* produce mezclas ramnolípidos en función de la fuente de carbono y la cepa (Haba *et al.*, 2003), preferentemente las mezclas que contienen Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> y Rha-Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> (Monteiro *et al.*, 2007). Para *P. aeruginosa* ATCC 9027 se ha reportado que produce una mezcla de 4 mono-ramnolípidos; C<sub>18</sub>, C<sub>20</sub>, C<sub>22</sub> y C<sub>24</sub>, en glucosa y bajo limitaciones de fósforo (Zhang & Miller, 1994). Lo anterior sugiere la necesidad de desarrollar métodos más efectivos para detectar y cuantificar biotensoactivos de distinta naturaleza.

Los costos de separación y purificación tienen 60% del costo de producción (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010). Algunos autores han recomendado usar biotensoactivos-crudos o impuros para aplicaciones ambientales, en la recuperación de petróleo y en industrias de tipo textil o pintura (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010). Park *et al.*, (1998) recomiendan usar preparaciones-crudas siempre y cuando mantengan las propiedades deseadas. En el presente estudio, se intentó influir en la disminución de los costos de producción, usando un producto no purificado que contiene ramnolípidos en la remediación de suelos contaminados. Pero tal como lo han sugerido Park *et al.*, (1998) es crucial el estudio de las características de los biotensoactivos no purificados, como tensoactivo o agente de extracción, que son las características de mayor importancia en el área de remediación de suelos contaminados.

### **6.3. Determinación de la CMC de ramnolípidos del PSA en distintos sistemas acuosos**

Los tensoactivos pueden ser caracterizados con base en sus propiedades, tal como la CMC pues es específica para cada tensoactivo y de las condiciones del sistema acuoso donde estén disueltos (Helvaci *et al.*, 2004). En esta parte del trabajo primero se evaluó el efecto del nivel de pureza de los ramnolípidos en el perfil de tensión superficial y en la CMC. A concentraciones de ramnolípidos alrededor de 10 mg/L la tensión superficial fue cercana a 72 mN/m y al aumentar la concentración de ramnolípidos hasta 100 mg/L disminuyó a 45.7 mN/m para el PSA filtrado y 40.5 mN/m para el PSA no filtrado. Mediante un método gráfico (Anexo 2) se calcularon las CMCs, los valores obtenidos fueron 175.7 y 25.7 mg/L para PSA filtrado y no filtrado, respectivamente (Gráfica 6-3). El bajo valor de la CMC del PSA sin filtrarse podría indicar que ante la presencia de metabolitos diferentes a los ramnolípidos, se requieren menos moléculas para formar micelas. Estos resultados son semejantes a los encontrados por Zhu *et al.*, (2007) quienes reportaron una CMC de 63.3 mg/L para ramnolípidos en medio de cultivo libre de células y 160 mg/L para extracto de ramnolípidos en agua destilada. De lo anterior, se puede decir que la solución de PSA en agua parece tener mayor potencial como agente tensoactivo en comparación con una solución que contiene ramnolípidos con mayor grado pureza. Debido tal vez a la presencia de algunas proteínas, glicolípidos o polisacáridos que podrían facilitar la reducción de la tensión superficial y promover la formación de micelas a bajas concentraciones (Zhu *et al.*, 2007).

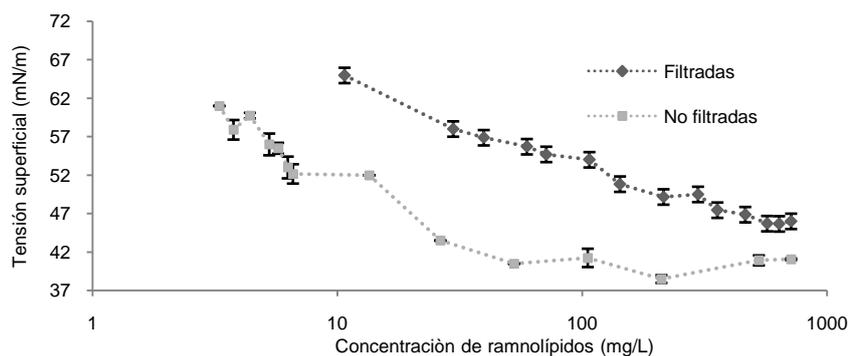


Gráfica 6-3. Efecto del nivel de pureza de ramnolípidos en el perfil de tensión superficial. Las barras de error representan la desviación estándar de tres repeticiones.

Graficando el logaritmo de la concentración de ramnolípidos se observó que a bajas concentraciones las diferencias entre los perfiles de tensión superficial fueron mayores. Por ejemplo, a concentraciones cercanas a las CMCs del PSA filtrado y no filtrado, 215 mg/L y 53 mg/L respectivamente, hubo mayores decrementos en la tensión superficial que en promedio fueron de 17 mN/m (Gráfica 6-4). Lo anterior puede indicar que hay mayor efecto en la tensión superficial con monómeros de tensoactivos que con micelas de tensoactivos. En menor medida, las variaciones en los perfiles de tensión superficial podrían estar asociadas a la presencia de sales de  $\text{NaNO}_3$  tal como lo demostró Wu *et al.*, (2008) al medir la tensión superficial en soluciones de ramnolípidos con y sin  $\text{NaNO}_3$ .

Las mesetas constantes en la tensión superficial, previas a la CMC del sistema, ante el aumento en la concentración de ramnolípidos proponen cambios en la organización de biotensoactivos (Gráfica 6-4). Por ejemplo para PSA no filtrado, entre las concentraciones de 1 y 6 mg/L hay una disminución en la tensión superficial seguida de una meseta constante entre 6.5 y 13.5 mg/L, la que no pertenece a la CMC de la solución (25.7 mg/L). Una posible explicación a estas variaciones se ha reportado en

los estudios de Raza *et al.*, (2010) quienes determinaron el perfil de tensión superficial para soluciones con tensoactivos puros, en sus resultados hallaron decaimientos previos a la CMC de la solución, los cuales fueron atribuidos a la micelización de los diferentes tipos de ramnolípidos, por ejemplo un primer decaimiento en el perfil de tensión superficial en 10 mg/L correspondió a di-ramnolípidos y un segundo decaimiento de 40 mg/L a mezclas de ramnolípidos.



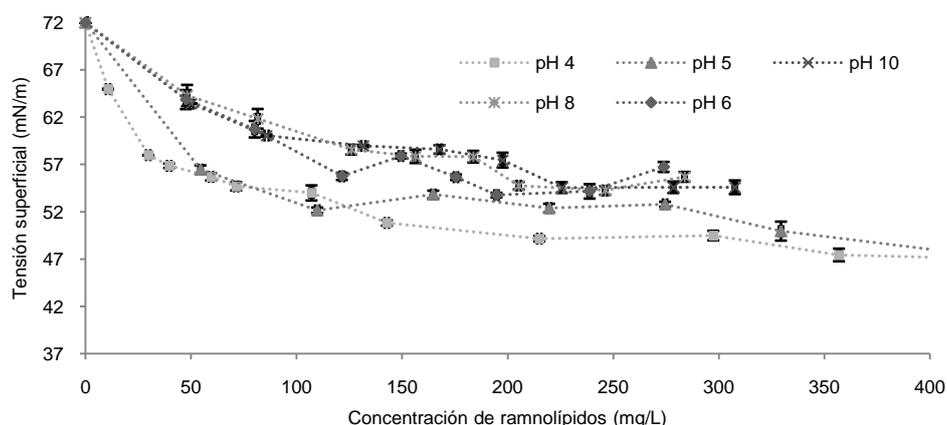
Gráfica 6-4. Efecto del nivel de pureza de ramnolípidos en el perfil de tensión superficial, en escala logarítmica.

En la Tabla 6-3 se compilan los valores de las CMCs reportadas para di-ramnolípidos, mono-ramnolípidos o mezclas. En promedio la CMC para di-ramnolípidos fue de 84.5 mg/L, 50.4 mg/L para mono-ramnolípidos y 43.14 para la mezcla de ramnolípidos aunque con una desviación estándar de 22.4 mg/L, con lo que se podría decir que:  $CMC_{di-ramnolípidos} < CMC_{mono-ramnolípidos} < CMC_{Mezclas-ramnolípidos}$ . Los argumentos anteriores pueden utilizarse para explicar los resultados del presente estudio, así para el perfil de tensión superficial del PSA no filtrado, el decaimiento entre las concentraciones desde 1 hasta 10 mg/L y su valor constante hasta 13.5 mg/L, quizás se deba a la micelización de mono o di-ramnolípidos. Para el perfil de tensión superficial del PSA filtrado, se observa un decaimiento entre 10 y 1000 mg/L el cual corresponde a la CMC del sistema (175.7 mg/L) y tal vez está asociada a la micelización de di-ramnolípidos, previo a este valor las CMCs podrían ser atribuibles a  $CMC_{Mono-ramnolípidos}$  o  $CMC_{Mezclas-ramnolípidos}$ .

Tabla 6-3. Valores de CMC de soluciones con un tipo de ramnolípidos o mezclas de ramnolípidos.

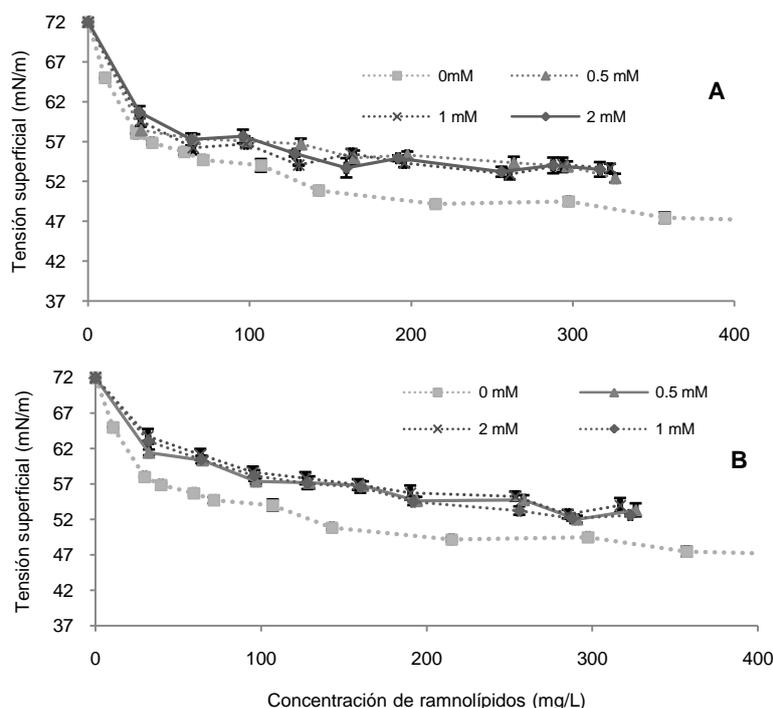
Tipo de ramnolípidos	CMC (mg/L)	Referencia
di-ramnolípidos	71.5	Aranda <i>et al.</i> , 2007
di-ramnolípidos	97.5	Nguyen <i>et al.</i> , 2008
mono-ramnolípidos	50.4	Nguyen <i>et al.</i> , 2008
mono-ramnolípidos	50.4	Ochoa-Loza <i>et al.</i> , 2007
mezcla	13.9	Monteiro <i>et al.</i> , 2007
mezcla	58.8	Ochoa-Loza <i>et al.</i> , 2007
mezcla	30	Mulligan <i>et al.</i> , 2001
mezcla	31	Lai <i>et al.</i> , 2009
mezcla	30	Van-Dyke <i>et al.</i> , 1993
mezcla	75	Wang <i>et al.</i> , 2007
mezcla	63.3	Zhu <i>et al.</i> , 2007

También se estudió el efecto del pH en la CMC de ramnolípidos del PSA en agua. Los perfiles de tensión superficial a pH 4 y 5 fueron semejantes entre sí y lo mismo sucedió con su CMC (40 y 69.5 mg/L, respectivamente) (Gráfica 6-5). Se ha reportado que la CMC para sistemas con pH 4 o 5 es baja porque se inducen a los ramnolípidos a comportarse como tensoactivos no iónicos y provoca que a bajas concentraciones (CMCs bajas) pasen de la interface aire-solución a formar micelas (Raza *et al.*, 2010). Análogamente, hay similitud en los perfiles de tensión superficial a pH 6, 8 y 10 con CMCs de 128, 113 y 102 mg/L, respectivamente (Gráfica 6-5). Los elevados valores de las CMCs indican que para la formación de micelas se requiere de elevadas concentraciones de ramnolípidos. Lovaglio *et al.*, (2011) reportaron un pKa para ramnolípidos de 5.6 y por encima de éste valor, la forma anionica de los tensoactivos prevalece y sus grupos funcionales están protegidos por iones de Na<sup>2+</sup> de la doble capa eléctrica en presencia de NaCl. Los grupos carboxilo de las moléculas de ramnolípidos son sensibles al pH; a pH mayor a 5 se disocian en su base conjugada como aniones carboxílico, mientras que a pH menor o igual a 5 está protonado y exhibe un comportamiento no iónico en solución acuosa (Raza *et al.*, 2010). De acuerdo a Aranda *et al.*, (2007) a pH 7.4, 98.4% de las moléculas di-ramnolípidos soportan una carga negativa, mientras, a pH 4.0, 97.5% son neutros.



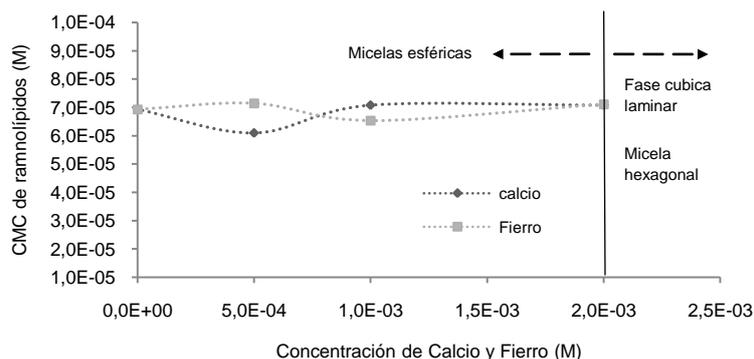
Gráfica 6-5. Efecto del pH en el perfil de tensión superficial de ramnolípidos del PSA disuelto en agua.

En la remediación de suelos contaminados a menudo se usan tensoactivos de naturaleza aniónica, esta clase de tensoactivos pueden ser afectados por la presencia de sales como  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$ , al promover su precipitación como resultado de la formación de complejos con los metales (Ochoa-Loza *et al.*, 2007), disminuyendo su capacidad para remover contaminantes del suelo (Torres *et al.*, 2007b). Los cationes más predominantes en suelos contaminados son  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{2+}$  y  $\text{K}^{+}$ . Además  $\text{Fe}^{3+}$  es uno de los 20 metales de mayor interés para la USEPA por su potencial riesgo a la salud (Ochoa-Loza *et al.*, 2001). Por lo anterior, se evaluó el efecto de la fuerza iónica con  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Fe}^{3+}$  en un rango de 0 a 2 mM, en la CMC de soluciones de ramnolípidos del PSA en agua. Se observó una baja variación de los valores de las CMCs, estos cayeron en el rango de 35.2 a 41.0 mg/L, mostrando que no hubo variación significativa. Por otro lado, en presencia de metales las CMCs fueron 4.5 veces menores que los libres de iones (Gráfica 6-6). En general, se puede decir que la presencia de iones afecta la CMC disminuyéndola, aunque no tiene un efecto importante cuando la concentración de los iones aumenta de 0.5 a 2 mM, bajo las condiciones estudiadas.



Gráfica 6-6. Efecto del calcio (A) y hierro (B) en la tensión superficial de soluciones de ramnolípidos del PSA en agua.

Se ha reportado que los grupos funcionales de los ramnolípidos cargados negativamente pueden ser cubiertos por una capa de cationes metálicos (Ochoa-Loza *et al.*, 2001; Helvacı *et al.*, 2004) promoviendo una reducción de fuerzas repulsivas entre grupos carboxilo, de manera que permite una libre asociación entre monómeros de tensoactivos lo que se traduce en la necesidad de menores cantidades tensoactivos para formar micelas (Raza *et al.*, 2010) y en otras palabras valores de CMC bajas. Además, la presencia de metales define la forma de las micelas de biotensoactivos en sistemas acuosos. Helvacı *et al.*, (2004) reportaron que la forma de las micelas de di-ramnolípidos o mono-ramnolípidos varía de acuerdo al contenido de NaCl desde  $1 \times 10^{-8}$  hasta 1 M en las formas definidas como esféricas, estructuras bi-laminares y hexagonales. Los datos obtenidos en el presente estudio, fueron comparados con los obtenidos por Helvacı *et al.*, (2004) y se encontró que la forma predominante de las micelas en soluciones que contienen  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Fe}^{3+}$  en las concentraciones estudiadas fue de tipo esférica (Gráfica 6-7).



Gráfica 6-7. Predicción de formas micelares en sistemas acuosos con diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Fe}^{3+}$ , en función de la CMC. Tomada de modificada de Helvaci *et al.*, (2004).

Tal forma esférica esférica podría estar también relacionada con la baja repulsión entre ramnolípidos como consecuencia del pH bajo al cual se realizaron los estudios (pH 4). Finalmente en la Tabla 6-4 se resumen los valores de CMC para todos los sistemas acuosos estudiados en esta sección del proyecto.

Tabla 6-4. Valor de la CMC para ramnolípidos del PSA en distintos sistemas acuosos.

Condición evaluada	Nivel de evaluación	CMC (mg/L)
Sin filtración	medio directo	25,7
Filtración con membrana	0.45 $\mu\text{m}$ DP	175,8
pH	4.0	40
pH	5.0	69,5
pH	6.0	128
pH	8.0	113
pH	10.0	102,5
Contenido de $\text{Ca}^{2+}$	0.5 mM	35,2
Contenido de $\text{Ca}^{2+}$	1 mM	40,8
Contenido de $\text{Ca}^{2+}$	2 mM	40,8
Contenido de $\text{Fe}^{3+}$	0.5 mM	41,2
Contenido de $\text{Fe}^{3+}$	1 mM	37,7
Contenido de $\text{Fe}^{3+}$	2 mM	41

Los valores de las CMCs encontrados en el presente estudio coinciden con los reportados en literatura para ramnolípidos puros en el rango que va de 50 a 200 mg/L (Aranda *et al.*, 2007). Las CMCs presentadas en la Tabla 6-4 pueden servir como guía para emplear los ramnolípidos en algún problema específico de contaminación. No debe olvidarse que las propiedades determinadas en esta parte del estudio fueron en

sistemas acuosos y tal vez no sean directamente aplicables en sistemas distintos como en sistemas solido-liquido.

#### **6.4. Características del suelo contaminado con HTP**

El suelo usado en esta parte de trabajo fue previamente caracterizado por Bofani, (2008) quien encontró que estaba contaminado con 31,902 mg HTP/Kg y tenía una humedad de 4.5%. No obstante en el presente trabajo, se realizó nuevamente la determinación de HTP y humedad, los resultados indican que el suelo está actualmente contaminado con 6,503 mg HTP/Kg y tiene 30.9% de humedad. Esta variación se explica considerando que hay cierta heterogeneidad de los HTP en el suelo, además el suelo fue caracterizado 3 años antes del desarrollo del presente proyecto, en tanto a la humedad el método fue el mismo pero no así el cálculo, aquí se usó la ecuación para determinar humedad propuesta en el manual de Fernández *et al.*, (2006).

De acuerdo a Bofani, (2008) el pH del suelo fue de 6.3, es decir ligeramente ácido. Considerando el tamaño de partículas del suelo este fue clasificado como de tipo grava-arenoso. El contenido de nitrógeno y fósforo fueron bajos. La CIC fue de 16.5  $\text{cmol}(+)\text{Kg}^{-1}$ . Porta *et al.*, (2003) se refieren a bajos valores de CIC (10-40  $\text{cmol}(+)\text{Kg}^{-1}$ ) para los componentes del suelo como la illita y la clorita los cuales contienen complejos de superficie de esfera interna y a valores altos de CIC (100-300  $\text{cmol}(+)\text{Kg}^{-1}$ ) a suelos que contienen material orgánico en altas proporciones o son menos arcillosos los cuales albergan complejos de superficie de esfera externa. Regularmente se encuentra que los suelos con elevados CIC contienen altos porcentajes de arcilla. El contenido de materia orgánica del suelo grava-arenoso fue de 0.46%, un valor bajo en comparación con 58% para suelos con microorganismos, residuos vegetales y animales en diferentes etapas de descomposición (Bofani, 2008). Finalmente la cuenta de bacterias autóctonas estuvo alrededor de  $2.3 \times 10^7$  UFC/g, suficiente para promover la degradación de compuestos orgánicos.

Respecto al contenido de metales, se detectó Pb en concentraciones de 32,206 mg/Kg, mientras que Ni, Na, K, Ca, y Mg fueron aproximadamente 1 orden de magnitud más altos que Cu y Zn (310.2 y 165.92 mg/Kg), por su parte Cd está un orden de magnitud por debajo de Cu y Zn (Bofani, 2008).

Para tener mayor detalle sobre el tipo de hidrocarburos del suelo, se determinó el contenido de hidrocarburos fracción media, BTEX y algunos HPAs (laboratorios ABC). En general, no se encontraron dentro de los límites de detección, compuestos de BTEX (datos no mostrados). La fracción media de hidrocarburos fue de 731.9 mg/kg y los compuestos aromáticos estuvieron presentes en concentraciones de 0.15 a 0.42 mg/Kg (Tabla 6-5). Los valores anteriores fueron comparados, con los límites establecidos en las normas oficiales mexicanas u otras, para estimar el grado de contaminación y los niveles de limpieza requeridos.

Tabla 6-5. Contenido de hidrocarburos fracción media y HPAs, en muestra de suelo gravarenoso, de acuerdo a métodos estandarizados del laboratorio ABC.

PARAMETRO	RESULTADO	UNIDADES	MÉTODO ANALÍTICO
HIDROCARBUROS FRACCION MEDIA	731.96	mg/kg B.S	1 y 2
HIDROCARBUROS POLICICLICOS AROMATICOS			
BENZO(B)FLUORANTRENO	0.41	mg/kg B.S	1
BENZO(K)FLUORANTRENO	0.37	mg/kg B.S	1
BENZO(A)PIRENO	0.42	mg/kg B.S	1
DIBENZO(A,H)ANTRACENO	0.15	mg/kg B.S	1
INDENO(1,2,3,C-D)PIRENO	0.27	mg/kg B.S	1
BENZO(A)ANTRACENO	0.34	mg/kg B.S	1

1: método de la norma A.5 NOM-138-SEMARNAT/SS-2003/EPA 8270D, 2: método de la norma EPA 8015B-1996/ANEXO A2

Debido a la escasa información sobre criterios de limpieza o niveles de contaminación máximos, para compuestos del petróleo, Sava (1998) recomienda utilizar la guía publicada por Arpel un comité ambiental que agrupa diversas empresas petroleras de América entre ellas a PEMEX, que propone límites máximos para compuestos del petróleo basados en la sensibilidad de un receptor a la inhalación de vapores de suelos, fundamentados en normatividades canadienses. En dicha guía se proponen un

límite máximo de 2000 mg/Kg de HTP para suelos, con lo que se puede decir que el suelo grava-arenoso está excedido 3.25 veces.

El contenido de hidrocarburos fracción media también fue comparado con límites máximos propuestos por la noma 138 de la SEMARNAT la cual establece un límite permitido de 5000 mg/Kg en suelos tipo industriales, por lo que el suelo se consideró como: sin niveles de hidrocarburos fracción media riesgosos. Probablemente los 6500 mg/Kg estén relacionados con los hidrocarburos fracción pesada, de ser así el suelo tendría un exceso de 500 mg/Kg tomando en cuenta el límite máximo para hidrocarburos fracción pesada de 6000 mg/Kg para suelos industriales según la norma 138 de la SEMARNAT.

Los compuestos del HPAs fueron comparados con límites emitidos por la EPA y la norma 138 de SEMARNAT, se encontró que el contenido de HPAs del suelo grava-arenoso está por debajo de los límites máximos permitidos para suelos de tipo industrial de la EPA y SEMARNAT (Tabla 6-6).

Tabla 6-6. Límites máximos permisibles para HPAs de acuerdo a la EPA y SEMARNAT.

Compuestos	Efecto en la salud	Suelo industrial (mg/Kg) para la EPA	Suelo industrial para nom 138 (mg/Kg)
Benzo(A)antraceno	Cancerígeno	7.8	10
Benzo(B)fluorantreno	Cancerígeno	7.8	10
Benzo(K)fluorantreno	Cancerígeno	78	80
Benzo(A)pireno	Cancerígeno	0.78	10

Por último, se comparó el contenido de metales del suelo grava-arenoso con normas oficiales mexicanas y normas estadounidenses, las últimas se emplearon porque hay algunos metales en el suelo clasificados como compuestos peligrosos, que no consideran las normas mexicanas. Los resultados indican que Pb esta al menos 40 veces por arriba del valor mínimo permitido por la SEMARNAT. De la misma manera Ni y Cu son 172.16 y 3.4 veces, respectivamente, más el valor mínimo permitido por la EPA para la región 9, aunque Ni no sobrepasa los límites de la SEMARNAT y de la

CCMC (Ministro ambiental del condado de Canadá, por sus siglas en inglés). El resto de los metales están por abajo de los límites permisibles para todas las normas consideradas en el presente estudio.

El contenido de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  como metales monovalentes (MM) y  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  como metales divalentes (MD) fue el siguiente: 3,055 mg/Kg de MM y 12,327 mg/Kg de MD. Se calculó la relación MM/MD equivalente a 0.25, evidenciando un exceso de MD. Se ha reportado que la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  afectan la eficiencia de SDS (tensoactivo aniónicos) promoviendo su precipitación (Torres *et al.*, 2007a).

Se considera que los niveles de limpieza adecuados para el suelo contaminado en cuestión, son los que estipula la SEMARNAT, es decir disminuir HTP por debajo de 6000 mg/Kg y 800 mg/Kg para Pb. Las concentraciones de Cu y Ni deben ser menores a 91 y 50 mg/Kg de acuerdo a la EPA. Además se debe tomar en cuenta el elevado contenido de iones divalentes porque se utilizarán los ramnolípidos del PSA los cuales son aniónicos a pH superiores a 5.

### **6.5. Lavado de un suelo contaminado con HTP empleando ramnolípidos**

Se decidió probar la metodología de lavado para remediar el suelo tipo grava-arenoso principalmente contaminado con 6500 mg/Kg de HTP. Las soluciones extractoras que se utilizaron fueron agua desmineralizada, tensoactivos de origen químico, gomas de origen natural y ramnolípidos en forma de PSA, se reportó el porcentaje de remoción (Gráfica 6-8). El agua presentó un elevado porcentaje de remoción (50.13%) en comparación con otros valores reportados en literatura (López *et al.*, 2004; Kuyukina *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2007b; Lai *et al.*, 2009). Con agua es posible extraer fracciones de HTP semi-solubles en agua y además sí la solución contiene sales de metales, la tensión superficial del medio acuoso disminuye promoviendo la solubilización de algunos compuestos del petróleo. Torres *et al.*, (2007a) emplearon agua de mar para lavar suelos contaminados con hidrocarburos de tres crudos del petróleo diferentes, encontrando que con agua de mar se pueden remover alrededor de 20% de HTP, el contenido de sales en el agua de mar disminuyó la tensión superficial hasta 56 mN/m. En los experimentos realizados aquí se usó agua desmineralizada, pero existe la posibilidad de que las sales presentes en el suelo se hayan hidratado y pasado a la fase acuosa disminuyendo la tensión superficial. Los cationes del suelo están sometidos por un lado, a la atracción del campo eléctrico creado por la superficie cargada y por el otro, tienden a difundir desde la superficie hasta la solución al existir un gradiente de concentración (Porta *et al.*, 2003).

El lavado con goma guar no extrajo hidrocarburos del suelo, en tanto mesquite y algarrobo removieron únicamente el 23 y 32%, de HTP respectivamente (Gráfica 6-8), estas diferencias podrían ser explicadas por las variaciones químicas entre las gomas naturales. En la Tabla 6-7 se presentan algunas características sobre las gomas naturales tales como el peso molecular, la relación manosa/galactosa y su fuente de obtención. La baja capacidad para remover hidrocarburos por parte de las gomas naturales está asociada con sus elevados pesos moleculares los cuales van de

$2.5 \times 10^5$  a  $6 \times 10^6$  UMAS. (Tabla 6-7). Breure *et al.*, (1995) reportaron que los tensoactivos de elevado peso molecular podrían difícilmente difundir y adsorberse en poros de partículas pequeñas del suelo, reduciendo la posibilidad de solubilizar compuestos hidrofóbicos. Aunque no se observa una relación directa entre el peso molecular y la remoción de HTP, por ejemplo mientras que mesquite comparado con goma guar tiene un peso molecular 23.9 veces mayor y puede remover 23 veces más hidrocarburos, mesquite comparado con algarrobo es 9.19 veces mayor en su peso molecular y remueve 22% menos que algarrobo. Adicionalmente, la viscosidad de las gomas naturales en agua influye en la remoción de HTP.

Tabla 6-7. Características de galactomananas utilizadas en la propuesta de lavado de suelo grava-arenoso contaminado con HTP.

Tipo de goma	Relación Man/Gal	Peso molecular (UMA)	Fuente de obtención	Referencia
Goma Guar	1:2 (0.5)	$2.5 \times 10^5$	La planta Guar, <i>Cyamopsis tetragonolobus</i> .	Srivastava & Kapoor, (2007)
Algarrobo	1:4 (0.25)	$6.5 \times 10^5$	La planta <i>Cetatonia siliqua</i>	Srivastava & Kapoor, (2007)
Mesquite	1:1 (1)	$6 \times 10^6$	El árbol <i>Prosopis juliflora</i>	López-Franco <i>et al.</i> , (2004)

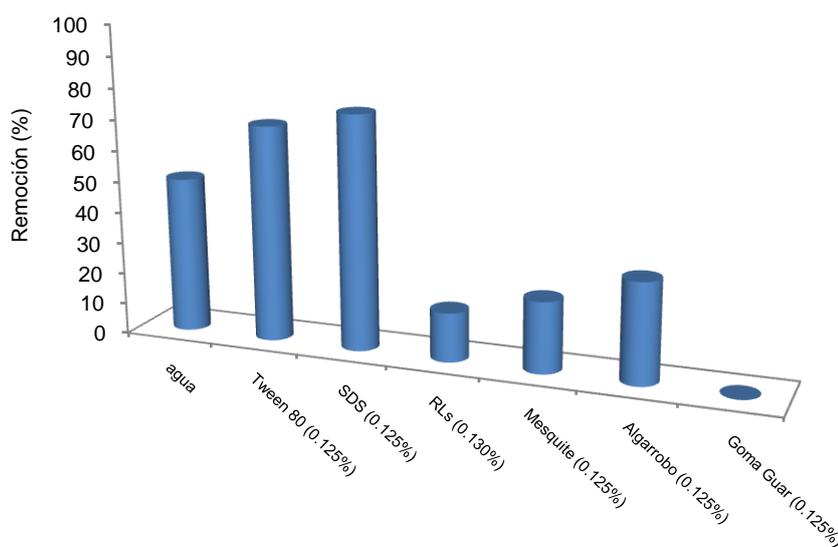
La viscosidad de las galactomananas está determinada por su relación manosa/galactosa. En la revisión de Srivastava & Kapoor, (2007) se mencionan los hallazgos de Hui (1962) quien encontró que algarrobo tiene menor viscosidad que goma guar, en tanto sus pesos moleculares son semejantes entre si. En resumen, el elevado peso molecular y la viscosidad de las gomas naturales, afectan la movilización o solubilización de compuestos hidrofóbicos presentes en el suelo, reflejado en los bajos porcentajes de remoción, por lo tanto las galactomananas no son útiles en la remoción de hidrocarburos del suelo grava-arenoso, bajo las condiciones estudiadas.

Con el lavado usando ramnolípidos al 0.130% se pudo remover 15.8% de HTP, este valor es el segundo más bajo comparado con el del agua (Gráfica 6-8), probablemente se deba a que el pH del suelo (6.3), no menor al pKa de los ramnolípidos (5.6), promueve a que los biotensoactivos estén en su forma anionica y en presencia del

elevado contenido de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  además de un valor bajo de CIC (sección 6.4), los biotensoactivos se precipiten. Billingsley *et al.*, (2002) estudiaron la remoción de PCBs por lavado de un suelo franco arenoso empleando Nansa LSS 38/AS un tensoactivo aniónico al 1%, desafortunadamente no reportan la CIC, pero consideran que el contenido de iones  $\text{Ca}^{2+}$  en concentraciones de 4620 mg/g fue suficiente para el decremento de la capacidad de remoción de PCBs, como consecuencia de la precipitación de los tensoactivos. Mediante cálculos, se sabe que por cada mol de tensoactivos LSS 38/AS hay 935 moles de iones calcio disponibles para asociarse con los tensoactivos, asumiendo que la complejación entre tensoactivo-calcio sea 1:1 (mol-mol) y que la CIC (no reportada) proporcione suficiente potencial para permitir el intercambio de los iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Para nuestro caso estudio, con 0.130% de biotensoactivos se calculó que hay 25.1 moles de calcio disponibles para asociarse con un mol de ramnolípidos, sugiriendo que los biotensoactivos pasan de ser aniónicos a no iónicos porque se asocian con los iones divalente y a su vez se adsorben al suelo. Kuyukina *et al.*, (2005) han reportado que los tensoactivos de naturaleza no iónica pueden absorberse en las partículas del suelo particularmente minerales de arcilla y materia orgánica limitando la aplicación de los tensoactivos en la recuperación del petróleo crudo.

Los mejores agentes de extracción de hidrocarburos fueron tween 80 y SDS ambos al 0.125% con remociones por arriba de la alcanza con agua (Gráfica 6-8). La remoción con SDS (75%) fue elevada aunque semejante a lo reportado en literatura; por ejemplo, López *et al.*, (2004) reportaron que con SDS se pudo remover 56% de HTP y al agrega 1% de NaCl la remoción aumentó hasta 60.36% en pruebas de lavado de suelos. El SDS es ampliamente usado en remediación porque es un tensoactivo barato (Tharwat, 2005). Para tween 80 se ha reportado que es altamente eficiente en la remoción de HTP por lavado de suelos debido a su naturaleza no iónica (López *et al.*, 2004). La diferencia en la naturaleza química de los tensoactivos les confieren

características particulares para remover hidrocarburos del suelo. Posiblemente la diversidad en las longitudes o formas de las cadenas alquílicas provoque un cambio en la remoción de hidrocarburos, por ejemplo SDS, tween 80 y ramnolípidos tienen diferente número de carbonos en su fracción hidrofóbica de  $C_{12}$ ,  $C_{17}$  y  $C_{14}$ , respectivamente. Además, los biotensoactivos tienen una doble cadena de alquílica que podría adsorberse con mayor fuerza al suelo en comparación con tween 80 y SDS que cuentan con una única cadena lineal. Una característica importante en la remoción es la afinidad de tensoactivos para determinados compuestos del petróleo. Urum *et al.*, (2006) reportaron que los ramnolípidos y la saponina son más eficientes para remover naftalenos que SDS, mientras que SDS y ramnolípidos remueven mayoritariamente componentes alifáticos.



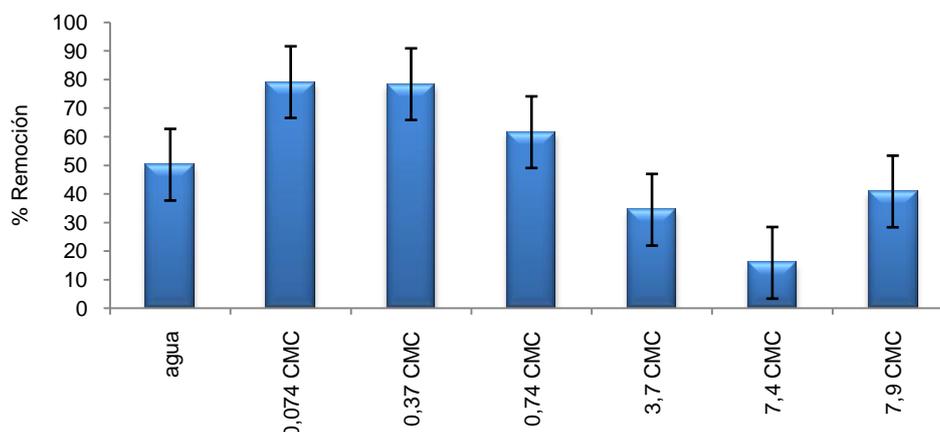
Gráfica 6-8. Porcentajes de remoción de hidrocarburos obtenidos con ramnolípidos (RLs), tween 80 y gomas naturales a concentraciones de 0.125 %.

A pesar de que SDS y tween 80 han sido ampliamente usados en el lavado de suelos (López *et al.*, 2004; Urum *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2007a; Torres *et al.*, 2007b) se ha discutido su toxicidad para organismos del suelo u otros organismos (Edwards *et al.*, 2003) y una baja capacidad de biodegradación (Mulligan, 2005). En tanto que los biotensoactivos han demostrado ser biodegradables y presentan bajos niveles de

toxicidad. Edwards *et al.*, (2003) evaluaron el efecto tóxico grave y agudo de 6 tensoactivos en 2 especies de peces marinos; *Menidia berylina* y *Mysidopsis bahia* ambas recomendadas por la USEPA por su sensibilidad a un amplio rango de contaminantes. Encontraron que PES-61 (tensoactivo químico) y Emulsan (biotensoactivo) fueron los menos tóxicos que Triton X-100 (tensoactivo químico). Además, en la revisión de Rouse *et al.*, (1994) se ha compilado la información que evidencia el efecto tóxico de los tensoactivos iónicos y aunque en menor medida también de los tensoactivos no iónicos de síntesis química.

Adicionalmente, se investigó el efecto de la concentración de ramnolípidos en la remoción de HTP del suelo grava-arenoso. Se observó que a concentraciones menores o iguales a 0.074 veces la CMC hubo elevadas remociones de HTP (79%), aunque un aumento en la concentración de ramnolípidos hasta 7.4 veces la CMC redujo la remoción de HTP (16%) y finalmente un cambio en la tendencia de remoción se observó a 7.9 veces la CMC donde ésta aumentó hasta 40.8% (Gráfica 6-9). Urum & Pekdemir, (2004) han descrito dos mecanismos que explican la remoción de compuestos hidrófobos del suelo cuando se usan tensoactivos; la movilización y la solubilización, estos mecanismos están en función de la concentración y naturaleza de los tensoactivos. Se ha reportado que el mecanismo de movilización, ocurre a concentraciones por debajo de la CMC y está asociado a la reducción de la tensión superficial, la tensión interfacial, la fuerza de capilaridad, la humectabilidad y el ángulo de contacto (Urum & Pekdemir, 2004). Se podría hipotetizar que a concentraciones menores o iguales a 0.37 veces la CMC el mecanismo de movilización es el encargado en promover la remoción de HTP. No obstante, se debe tomar en cuenta que la CMC en solución acuosa no es igual a la CMC resultante después de poner en contacto los tensoactivos con un medio adsorbente. Urum & Pekdemir, (2004) reportaron que la CMC en solución acuosa para ramnolípidos fue de 0.02%, mientras que la CMC para una solución de ramnolípidos en contacto con suelo fue de 0.008%

calculando que su adsorción fue de 75%. El suelo usado por Urum & Pekdemir, (2004) tiene características semejantes a las del suelo grava-arenoso, es decir un pH de 7.43 y una CIC de 10.2. Quizás ante el aumento de la concentración de ramnolípidos, la disminución en la remoción fue debida a la adsorción de biotensoactivos al suelo.



Gráfica 6-9. Efecto en de la concentración de ramnolípidos en la remoción de HTP del suelo grava-arenoso. Las barras de error representan el la variación de muestras por duplicado.

La remoción de HTP fue inversamente proporcional a la concentración de ramnolípidos hasta 7.9 veces la CMC los ramnolípidos del PSA en agua (Gráfica 6-9). Lai *et al.*, (2009) reportaron que la remoción fue directamente proporcional a la concentración de ramnolípidos en el intervalo de 16.12 a 64.51 veces el valor de su CMC (0.0031%), no evaluaron concentraciones por debajo de 1 vez la CMC, tal como se realizó en el presente estudio. Como las concentraciones usadas por Lai *et al.*, (2009) fueron elevadas, el mecanismo que permitió la remoción de hidrocarburos podría estar relacionado con la solubilización de hidrocarburos en micelas. La mayor concentración evaluada en el presente estudio (7.9 veces la CMC) removi6 cerca de 40% de HTP del suelo contaminado con 6000 mg/Kg, en comparación con la menor concentración estudiada por Lai *et al.*, (2009) la cual fue 16.12 veces la CMC que removi6 cerca de 40% HTP de un suelo contaminado con 9000 mg/Kg, aunque el método para determinar los HTP fue distinto, esta comparación sugiere que el

mecanismo de solubilización tuvo lugar en la última concentración evaluada en el presente estudio.

Probablemente los biotensoactivos se estén absorbiendo a las partículas del suelo grava-arenoso por dos vías; 1) por precipitación debido a la presencia de iones metálicos o 2) por la carga negativa del tensoactivo (Kuyukina *et al.*, 2005), esto a su vez tendría un efecto en la capacidad de asociación de los compuestos hidrofóbicos con el suelo, tal como lo observaron Abu-Zreig *et al.*, (2003) quienes encontraron que el uso de tensoactivos no-iónicos reduce el ángulo de contacto de compuestos hidrofóbicos, mientras que un tensoactivo aniónico lo incrementa, probablemente porque la orientación de los tensoactivos adsorbidos al suelo es distinta (Figura 6-2).

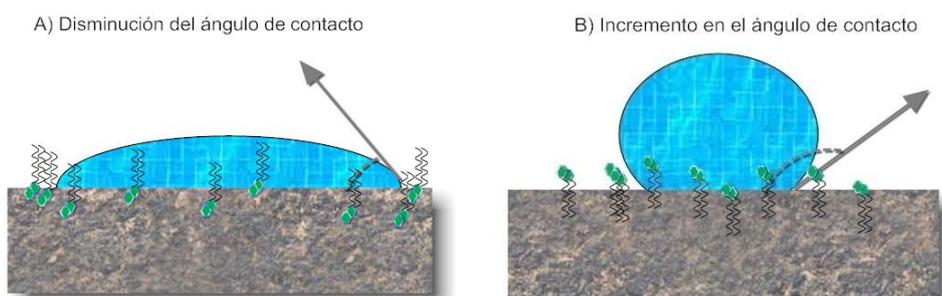


Figura 6-2. Efecto del tipo de tensoactivo en el ángulo de contacto para compuestos hidrofóbicos en partículas del suelo. A) Los tensoactivos aniónicos se adsorben por la disponibilidad de sitios cargados positivamente asociados con las partículas arcillosas, dejando la parte hidrofóbica orientada hacia el poro de agua. Por lo que el ángulo de contacto es menor. B) Los tensoactivos no iónicos se unen al suelo mediante la fracción hidrofóbica, dejando su porción hidrofílica orientada hacia el líquido del poro, aumentando el ángulo de contacto (Abu-Zreig *et al.*, 2003).

En este punto, se puede plantear que los ramnolípidos a bajas concentraciones se comportan como tensoactivos no iónicos ante la presencia de iones metálicos en solución e incrementan el ángulo de contacto (Figura 6-2,B) promoviendo el mecanismo de movilización de los hidrocarburos. Ante el aumento de la concentración de biotensoactivos estos se van adsorbiendo al suelo por atracción entre moléculas de biotensoactivos (interacciones hidrofóbicas) hasta formar agregados tal como las hemimicelas, las cuales evitan que los compuestos del petróleo, fuertemente adsorbidos, abandonen las partículas del suelo. Hay un límite de adsorción de ramnolípidos al suelo que está determinado por su afinidad a las hemimicelas, por la cantidad de sitios

de adsorción del suelo y por la disminución de iones destinados a asociarse por complejación con ramnolípidos, en consecuencia con suficiente cantidad de ramnolípidos en solución acuosa se da punto de partida para que el mecanismo de solubilización sea el que promueva la remoción de HTP del suelo. Estas observaciones son semejantes a las que Torrens *et al.*, (1998) observaron en la remoción de Cd con ramnolípidos.

La remoción de HTP en función de la concentración de ramnolípidos como número de veces la CMC se pudo ajustar a una función matemática. Se determinó una línea de tendencia para los datos experimentales de remoción, los cuales representan una ecuación de tipo exponencial inversa (Ec. 2).

$$\text{Remoción (\%)} = 46.6 (\%) e^{(-0.1529 \cdot X)}, \text{ con 95\% en índice de confianza.....Ec.1}$$

Donde X es el número de veces la CMC. El modelo matemático propuesto sirve para predecir remociones hasta antes de 7.9 veces la CMC. Una estrategia común en la remediación de grandes extensiones de suelo contaminado por la técnica de lavado, consiste en evaluar a nivel laboratorio distintos tensoactivos a distintas concentraciones para obtener un modelo matemático y usarlo como guía en la remediación de grandes volúmenes de suelo contaminado (Iturbe *et al.*, 2004).

Finalmente, respecto a los niveles de remediación logrados con el proceso de lavado, se puede decir que después de un ciclo de lavado para todos experimentos con ramnolípidos fue posible alcanzar los límites permitidos por normas ambientales (Tabla 6-8) evidenciando que a concentraciones menores que 0.37 veces la CMC el nivel de limpieza se garantiza, debido a que bajo esas condiciones se obtuvieron los mayores porcentajes de remoción.

Tabla 6-8. Niveles de limpieza de suelo grava-arenoso obtenidas con 6 concentraciones distintas de ramnolípidos.

Tratamiento	Niveles de HTP después del lavado (mg/Kg)
Agua	2812.55
0.074 CMC	1181.86
0.37 CMC	1222.60
0.74 CMC	2170.26
3.7 CMC	3701.68
7.4 CMC	4749.41
7.9 CMC	3340.64

En general se puede decir, que tomando en cuenta únicamente los porcentajes de remoción, los ramnolípidos del PSA mostraron ser iguales o mayormente eficientes que biotensoactivos con mayores grados de pureza o que tensoactivos químicos, para el tratamiento de un suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo por la técnica de lavado de suelos.

### **6.6. Características del suelo contaminado con metales pesados**

El suelo industrial proveniente de una empresa metalúrgica en el área metropolitana de la ciudad de México empleado en el presente estudio, ha sido usado por Zacarias,

(2009) y Torres *et al.*, (2011) para evaluar fitorremediación y lavado de suelos con tensoactivos químicos, respectivamente, por lo que se tienen bien definidas sus principales características. Se trata de un suelo con pH ácido (5.5) de tipo arcilloso, con un valor de CIC equivalente a 17.33 cmol(+)Kg<sup>-1</sup> y 2.81% de materia orgánica. Adicionalmente, se le realizó una caracterización parcial en función de su contenido en metales, clasificados por la EPA como de elevado riesgo para la salud, tales como As, Cd, Pb, Zn, Cu y Ni. El contenido de Ni y Cu fueron los más altos de 2597 y 41458 mg/Kg, respectivamente (Tabla 6-9).

Tabla 6-9. Contenido inicial de metales en el suelo industrial en mg/Kg.

As	Cd	Pb	Zn	Cu	Ni
130.43	14.46	36.65	151.64	41458.74	2597.45

El contenido de metales del suelo contaminado fue comparado con valores límites permisibles en normas mexicanas, canadienses y norteamericanas, estas dos últimas fueron utilizadas porque algunos de los metales tóxicos en la actualidad no están normados en México (Tabla 6-10). El número de veces el valor límite para cada metal fue calculado y se encontró que sí únicamente se considera la norma oficial mexicana como referencia de comparación, se podía concluir que el suelo no está contaminado, porque hay 0.03 y 0.5 veces el límite, para los metales As, Cd, Pb, y Ni, hecho que no es visualmente evidente en el suelo arcilloso al menos por la presencia de partículas de color azul que muy posiblemente están conformadas por compuestos que contienen Cu (Figura 6-3).

Tabla 6-10. Comparación de concentraciones de metales pesados con normas oficiales mexicanas, canadienses y norteamericanas.

Metal pesado	Número de veces el valor límite permitido			
	Norma Oficial Mexicana	CI	CCME	EPA-R9

As	0.50	3.26	10.87	81.52
Cd	0.03	0.14	NV	NV
Pb	0.05	36.65	NV	NV
Zn	NV	0.10	NV	NV
Cu	NV	NV	455.59	1.01
Ni	0.13	12.99	51.95	0.13

NV: No hay valores en la norma, CI: criterios interinos, CCME: consejo canadiense de ministros del medio ambiente, EPA-R9: región número 9 de la agencia de protección ambiental de USA.

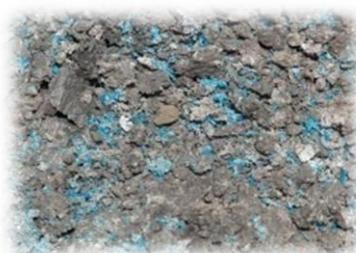


Figura 6-3. Suelo arcilloso, con partículas de Cu en color azul. Presentada con la autorización de Zacarias, (2009).

No obstante, sí los niveles de metales se comparan con los límites encontrados en los criterios interinos de la PROFEPA-SEMARNAP propuestos en el año 2000, para el caso de As, Pb y Ni hay 3.3, 36.7 y 13 veces el valor límite permitido, respectivamente. También fueron empleadas las normas del consejo canadiense de ministros del medio ambiente (CCME, por sus siglas en inglés) encontrando que As y Ni están 10.9 y 52 veces excedidos, respectivamente, además Cu se calculó como 51.95 veces en valor correspondiente a 91 mg/kg de suelo que es el valor límite permitido para la CCME. La agencia de protección ambiental de estados unidos de Norteamérica (USEPA, por sus siglas en inglés) en la norma que aplica en la región 9 de USA, compila datos que sirven para comparar los encontrados en el presente estudio (Tabla 6-10). Se puede observar que las concentraciones de As están excedidas casi 82 veces el límite permitido, el Cu se excede 1.01 veces el valor correspondiente a 41,000 mg/kg de suelo.

En resumen se puede decir que el suelo esta principalmente contaminado por As (de acuerdo a CCME, CI y EPA-R9), Cu (para CCME y EPA-R9) y N (con respecto a CI y

CCME). Por lo tanto es necesario aplicar un tratamiento para reducir el contenido de metales, la propuesta del presente trabajo fue realizar lavados con ramnolípidos del suelo contaminado con metales a nivel laboratorio.

## 6.7. Lavado de un suelo contaminado con metales pesados empleando

### ramnolípidos

Las concentraciones de ramnolípidos probadas en el lavado del suelo arcilloso fueron desde 0.1 hasta 10 veces la CMC de ramnolípidos del PSA. Las remociones de As, Cu, Zn, Cd, Ni y Pb fueron en general muy heterogéneas para las 5 concentraciones evaluadas (Tabla 6-11). El agua utilizada para las pruebas de lavado remueve concentraciones de metales de entre 0 y 85%. Con agua es posible remover cantidades de contaminantes mediante fuerzas de mezclado (Mulligan *et al.*, 1999). La importancia del lavado de suelos con agua es extraer la fracción de metales que está débilmente unida al suelo. Los valores de remoción conseguidos con agua fueron altos con la excepción de Cd, contrario a los resultados reportados por Moutsatsou *et al.*, (2006) al evaluar agua en el lavado de suelos contaminados con metales, encontrando remociones del 1% para todos los metales investigados debido a que 99% de los metales estuvieron presentes como fracciones de menor acceso; ion intercambiable, adsorbidas, precipitadas, unidas a materia orgánica o atrapadas en forma insoluble en la matriz del suelo. En este sentido, la extracción conseguida con agua en los resultados obtenidos aquí, sugiere que a excepción de Cd la mayoría de los metales en el suelo arcilloso son altamente solubles en agua o de fácil acceso.

Se puede observar que a 10 veces la CMC del PSA en todos los lavados se obtuvo una remoción mayor en comparación con el lavado usando agua. Además, a una concentración equivalente a 10 CMC de PSA, As y Pb tuvieron un máximo de remoción de 82.35 y 27.97%, respectivamente. Los metales de Cu y Zn (87.53 y 76.87%, respectivamente) fueron removidos mayormente con ramnolípidos a una concentración de 5 veces el valor de la CMC del PSA. Finalmente Ni y Cd se remueven mucho mejor con soluciones a 3 veces la CMC del PSA, alcanzando porcentajes de remoción de 79.4% para Ni y 11.7% para Cd. Para As la concentración de ramnolípidos fue directamente proporcional a la remoción del metal. Un hallazgo

interesante, fue que la presencia de biotensoactivos en las soluciones de lavado puede contribuir en la extracción de metales que con agua no fue posible remover, tal como sucedió con Cd que se removió en un 11.7% con ramnolípidos a una concentración 3 veces la CMC del PSA (Tabla 6-11).

Tabla 6-11. Porcentaje de remoción de metales en función de la concentración de ramnolípidos en mg/L.

Remoción (%)	Cu	Zn	Ni	As	Pb	Cd
Lavado con agua	85.22	74.06	74.38	78.90	16.19	0.00
0,1 cmc	86.52	72.38	74.82	2.84	2.95	0.00
1 cmc	85.40	76.21	77.47	55.29	18.64	4.36
3 cmc	80.03	70.06	79.39	64.86	10.05	11.70
5 cmc	87.53	76.87	79.04	78.19	0.00	3.00
10 cmc	86.01	75.71	76.10	82.35	27.97	3.24

El aumento en la remoción de metales con ramnolípidos podría estar relacionado con la solubilización, dispersión, desorción de compuestos hidrofóbicos o de metales debido a su naturaleza anfifílica (Mulligan *et al.*, 1999) y con el mecanismo de complejación que consiste en la unión iónica de los grupos carboxílicos cargados negativamente de los ramnolípidos con la carga positiva de los metal. Se ha reportado que para algunos casos las eficiencias de remoción de metales podrían incrementarse linealmente ante el aumento en la concentración de tensoactivos por debajo de la CMC y permanecer relativamente constante por arriba de la CMC, sin embargo altas concentraciones de soluciones de tensoactivos (1-10%) a menudo son requeridas para superar los problemas de adsorción al suelo (Mulligan & Wang, 2004).

Las características del suelo determinan las propiedades químicas de los metales y de los agentes de extracción. Algunos estudios se han enfocado en correlacionar las propiedades del suelo con la remoción de metales, por ejemplo Kashem *et al.*, (2007) evaluaron la remoción de metales en 8 suelos contaminados con diferentes fracciones de Cd, Cu, Pb y Zn, los resultados mostraron que la CIC y el pH del suelo tuvieron correlación negativa con las concentraciones de metales de tipo intercambiables,

móviles y totales, excepto para Cu extractable. La disponibilidad de algunos metales en suelos está afectada por la variación del pH, Cameron (1992) reportado en Dahrazma & Mulligan, (2007) menciona que Zn y Cd son más móviles a pH manores de 7.0. Juwarkar *et al.*, (2007) encontraron que al ajustar el pH a 8.0 se incrementa la solubilidad de Pb y Cd en agua de manera que se proporcionan más sitios de unión para los metales catiónicos con los biotensoactivos. Contrariamente Moutsatsou *et al.*, (2006) encontraron que la elevada remoción de metales con HCl se debe al aumento de la desorción, la disolución de compuestos discretos y la disolución de componentes específicos del suelo. Finalmente, de ha reportado que a manera que el pH de la solución de lavado cambia como consecuencia de la extracción de metales del mismo suelo, otros metales pierden su solubilidad en agua (Dahrazma & Mulligan, 2007). Para el presente estudio, el pH ácido del suelo arcilloso afectó las propiedades de los ramnolípidos del PSA de manera que se promovió la protonación de sus grupos carboxílicos y a su vez su precipitación. Mulligan & Wang, (2004) observaron que ante la disminución del pH por debajo de 6.8 los ramnolípidos se precipitan. Análogamente, la adición de ácido para disminuir el pH hasta 5.5 provocó la inactivación de la surfactina (biotensoactivo de *Bacillus subtilis*) generando a su vez una reducción en la remoción de metales (Mulligan *et al.*, 1999). En los experimentos de lavado del presente estudio, se decidió no cambiar el pH del suelo pues implicaría un aumento en los costos de operación. La baja remoción de metales en todos los experimentos (Tabla 6-11) podría estar atribuida a la falta de sitios de unión en las moléculas de ramnolípidos para permitir su asociación con metales mediante complejación. Las constantes de complejación propuestas por Ochoa-Loza *et al.*, (2001) aplican para ramnolípidos con grupos funcionales ionizados. En resumen se puede decir que el grado de dificultad para remover metales en suelos contaminados es elevado y no hay una tendencia que defina a un metal como altamente soluble a pH ácido o básico porque los metales pueden encontrarse asociados a muy diversas estructuras en el

suelo, mientras que la capacidad de remoción de los ramnolípidos esta determinada por el pH de suelo.

Debido a que los ramnolípidos no forman complejos mediante complejación a las condiciones de lavado estudiadas, se podría hipotetizar que otro tipo de interacciones son las responsables en la asociación de metales con biotensoactivos. De esta manera, algunas propiedades de los metales estudiados (Anexo 6) fueron correlacionadas con la remoción y la concentración de ramnolípidos. Las correlaciones fueron realizadas con ayuda del programa Excel de Windows office 2007 (Tabla 6-12). Las cifras mayores o iguales a 0.700 representan la mejor correlación entre las características y variables comparadas. Además, los valores positivos indican correlaciones directamente proporcionales. La constante de afinidad (K), la electronegatividad, el potencial primero de ionización y la densidad, no tuvieron una buena correlación con los datos presentados. En contraste con el número atómico que se correlaciono a concentraciones de 3 CMC (0.748) y 5 CMC (0.752). El radio iónico con agua, 10 CMC y 5 CMC, tuvieron valores de 0.668, 0.622 y 0.731, respectivamente, correspondientes a la correlación. El peso atómico se correlaciona bien con los ramnolípidos a concentraciones de 3 y 5 CMC (0.735 y 0.737, respectivamente). Finalmente quien presentó mayor correlación de todas las propiedades de los metales fue el radio atómico; 1 CMC (0.723), 3 CMC (0.859) y 5 CMC (0.815), respectivamente. En resumen las correlaciones ordenadas en forma descendente fueron:

Radio atómico < número atómico < peso atómico < radio iónico < radio covalente << densidad << constante de afinidad < potencial primero de ionización.

Este es el primer trabajo donde se intenta asociar las características de los metales con su remoción aunque Dahrazma & Mulligan (2007) reportaron que la desorción y movilización de los metales en suelo está directamente influida por la presencia de

iones OH provenientes de la base NaOH comprobando que la mejora en la remoción de Cu esta relacionada con el radio de hidratación del OH. A menores radios de hidratación de los iones causan una menor CMC de los tensoactivos, la afectividad de los cationes es la siguiente:  $NH^{4+} > K^+ > La^+ > 1/2Ca^{2+}$ : y un valor bajo de CMC significa una mayor efectividad para los tensoactivos (Dahrazma & Mulligan, 2007).

Tabla 6-12. Correlación entre las remociones de metales, propiedades de los metales y concentración de ramnolípidos como el número de veces la CMC del PSA.

Propiedades de los metales	Agua	0.1 CMC	1 CMC	3 CMC	5 CMC	10 CMC
K (constante de afinidad)	0.072	0.089	0.087	0.145	0.117	0.057
Peso atómico (UMA)	0.577	0.420	0.571	0.735	0.737	0.486
Numero atómico	0.595	0.421	0.584	0.748	0.752	0.504
Electronegatividad	0.055	0.499	0.180	0.106	0.080	0.038
Radio covalente (Å)	0.627	0.104	0.449	0.605	0.633	0.622
Radio iónico (Å)	0.668	0.106	0.443	0.628	0.731	0.618
Radio atómico (Å)	0.683	0.578	0.723	0.859	0.815	0.602
Potencial primero de ionización (eV)	0.021	0.106	0.002	0.008	0.038	0.013
Densidad (g/mL)	0.296	0.002	0.137	0.271	0.366	0.255

Å: angstroms, eV: electrón-voltio.

Se estima que 37% de los sitios contaminados con orgánicos están también contaminados con metales, lo cual puede causar la inhibición y biodegradación de compuestos orgánicos (Maier & Soberón-Chavez, 2000). La presencia de metales tóxicos en suelos causa un riesgo a la salud y al medio ambiente (Chang *et al.*, 2005) Cd, Cu, Pb, Hg, Ni y Zn son considerados como peligrosos y están incluidos en la lista de la EPA como contaminantes de prioridad (Mulligan *et al.*, 2001). La exposición de los metales pesados a través de la ingestión o toma en agua ingerida (particularmente donde el agua es reutilizada) y alimentos puede guiar a la acumulación tanto en animales, plantas y humanos. Los metales en suelos no pueden ser degradados, en vez de ello se debe realizar una inmovilización o remoción. La complejidad en el tratamiento de metales en suelos, surge porque el comportamiento de los metales depende de una serie de factores entre los que se pueden incluir las reacciones de especiación, complejación y de sorción. Esas reacciones están definidas por la

composición mineral y las propiedades químicas del suelo, así como variables de condición ambiental tal como pH, salinidad y potencial redox (Ochoa-Loza *et al.*, 2001). Un método eficiente para remover metales del suelo es mediante lavado con soluciones extractantes, por ejemplo compuestos quelantes, no obstante, algunos de los agentes extractantes pueden presentar propiedades tóxicas y de baja biodegradabilidad (Chang *et al.*, 2005). Un agente de complejación ideal para movilizar metales es aquel que sea soluble en agua, químicamente estable bajo distintas condiciones ambientales, que no se asocie fuertemente a las partículas del suelo y que tenga una fuerte afinidad para la complejación con metales (Juwarkar *et al.*, 2007). Los ramnolípidos del PSA empleados en esta sección del trabajo mostraron importantes ventajas en la remoción pues fueron capaces de extraer metales aun cuando las condiciones no fueron favorables. Además se ha reportado que los ramnolípidos son más biodegradables que el EDTA pero más estable que ácido cítrico, misma capacidad que le permite permanecer por un tiempo adecuado para aumentar la movilización de contaminantes (Wen *et al.*, 2009). Y son de baja toxicidad, al respecto Juwarkar *et al.*, (2007) reportaron que 0.1% de di-ramnolípidos usados en lavados de suelos con metales, no afectaron la cuenta bacteriana, hongos, actinomicetos y fijadores de nitrógeno indicando que a esta concentración los ramnolípidos no perturban la integridad de la microflora del suelo.

Finalmente, se presenta el contenido de metales en el suelo arcilloso después de cada proceso de lavado con ramnolípidos solo para Cu, Ni y As porque fueron los metales que estaban excedidos (Tabla 6-13). El lavado con 0.178% de ramnolípidos fue el más adecuado para reducir las concentraciones de As hasta niveles permitidos por algunas normas ambientales. Para Ni el lavado con 0.053% removió el mayor contenido del metal del suelo arcilloso. Finalmente para Cu lavado con soluciones al 0.089% logró disminuir al máximo la concentración del metal del suelo. El exceso de metales que aun sobrepase los límites permitidos por normas ambientales podría ser removido con

lavados secuenciales o aumentando la concentración de ramnolípidos. Las soluciones de biotensoactivos al 0.089 y 0.178% son equivalentes a 1.5 y 3.0 mM, respectivamente. Se ha reportado que hasta 10 mM es una molaridad adecuada desde el punto de vista costo-eficiencia (Neilson *et al.*, 2003) para el lavado de suelos que contienen metales altamente tóxicos como el del presente estudio.

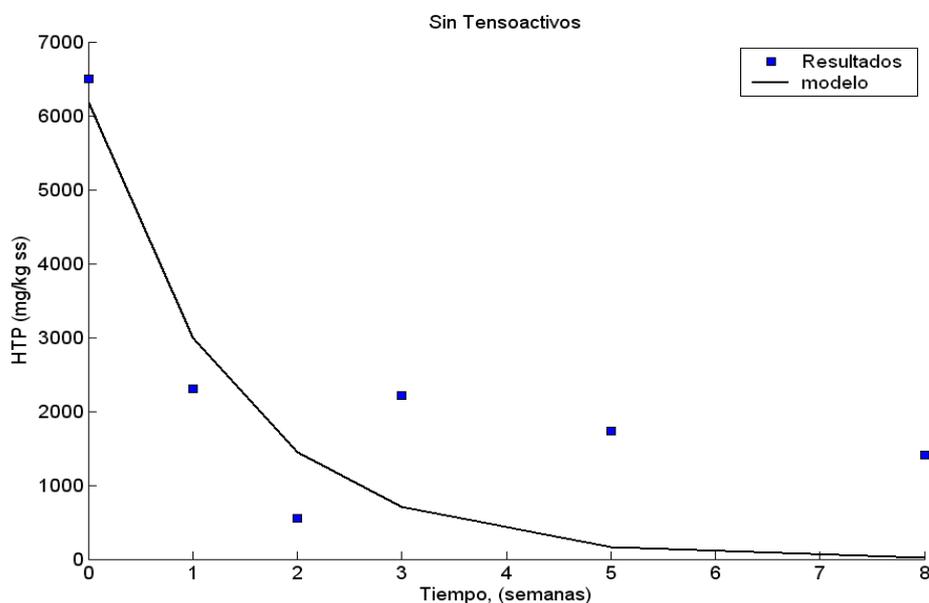
Tabla 6-13. Contenido final de metales (mg/Kg) en suelo arcilloso en función de la concentración de ramnolípidos utilizada en el lavado.

Concentración porcentual	Cu	Ni	As
0.0017	753.4	164.7	123.1
0.017	883.8	131.8	26.0
0.053	1653.5	110.2	16.1
0.089	644.9	114.1	6.2
0.178	811.9	148.3	4.0

En trabajos recientes, se ha reportado que los estudios de especiación de metales en suelo ayudan a elegir el mejor método de remediación. Se cree que las fracciones intercambiables, carbonatos y óxido reducibles podrían ser sensibles a las técnicas de lavado de suelos (Mulligan *et al.*, 1999; Mulligan *et al.*, 2001). Algunos trabajos con biotensoactivos muestran que éstos se asocian preferentemente con algunas fracciones de metales en suelo, por ejemplo la surfactina fue capaz de remover Cu debido a que este estaba principalmente como fracción orgánica en muestras de suelo y sedimentos (Mulligan *et al.*, 1999). Los múltiples lavados del suelo pueden ser efectivos para remover primero las fracciones intercambiables, después los óxidos y al final los carbonatos. Las fracciones residuales son las más difíciles de extraer (Mulligan *et al.*, 2001), los metales asociados a óxidos y fracciones residuales se consideran como los menos extractables (Neilson *et al.*, 2003).

## 6.8. Cinéticas de biodegradación de HTP por bioestimulación acoplada con tensoactivos

La degradación de compuestos orgánicos por bioestimulación del suelo contaminado con HTP, se estudió mediante cinéticas biodegradación acoplada con la adición de ramnolípidos del PSA, tween 80 y en ausencia de tensoactivos. El contenido de HTP en las muestras de suelo bioestimulado en ausencia de tensoactivos disminuyó desde 6500 mg/Kg hasta 2200 mg/Kg en la primer semana, a la segunda semana se cuantificaron alrededor de 1000 mg/Kg se HTP y a la tercer semana aumentó a 2200 mg/Kg de HTP esto quizás sea debida a la heterogeneidad de las muestras, no obstante el decremento de los HTP fue evidente hasta la octava semana de la experimentación, en este sentido se puede observar que el mayor cambio en el contenido de HTP se dio en la primer semana. Entonces, se decidió utilizar una línea exponencial inversa para representar la tendencia de los datos experimentales (Gráfica 6-10).



Gráfica 6-10. Degradación de hidrocarburos del suelo grava-arenoso mediante bioestimulación en ausencia de tensoactivos. Los puntos representan la media de mediciones por duplicado.

La ecuación de la línea de tendencia que se ajusta a los datos experimentales de la Gráfica 6-10 fue la siguiente:

$$\text{TPH residual} = 6174 \text{ mg/Kg} * e^{(-0.724*t)}$$

Donde TPH residual esta expresado en mg/Kg, t en semanas y 6174 mg/Kg representa la concentración inicial que adopta el modelo matemático.

Iturbe *et al.*, (2007) reportaron experiencias en el tratamiento 23 m<sup>3</sup> de suelo contaminado con hidrocarburos fracción diesel mediante la tecnología biopilas, de sus resultados se desarrollaron ecuaciones exponenciales semejantes a la obtenida en el presente estudio, este tipo de ecuaciones son relevantes porque debido a que se puede calcular el tiempo que tomaría alcanzar niveles de HTP adecuados según las normas ambientales. Las ecuaciones también pueden ser útiles sí se desea verificar que los microorganismos presentes en el suelo tienen capacidades de biodegradación antes de la construcción de las biopilas.

Adicionalmente se realizaron los perfiles de biodegradación para los experimentos con ramnolípidos a las concentraciones de 0.155 y 0.775 mg/L y para tween 80 a 0.775 mg/L. En todos los casos la disminución de hidrocarburos disminuyó hasta 2000 mg/Kg al final de las 8 semanas evaluadas, los datos experimentales también fueron ajustados a un modelo matemático representado por una ecuación exponencial inversa (Anexo 6). La constante de biodegradación (-K) y el valor inicial de TPH<sub>0</sub> representan en términos cuantitativos la degradación de HTP para cada experimento realizado (Tabla 6-14). Sin la adición de tensoactivos los valores de TPH<sub>0</sub> y -K fueron de 6174 y 0.724 respectivamente, para los experimentos con ramnolípidos evaluados desde 0.155 hasta 0.775 mg/L la TPH<sub>0</sub> y el valor de -K fueron de 6472, 6449 y 1.648, 1.221, respectivamente. Finalmente para el tratamiento con tensoactivos tween 80 el valor de TPH<sub>0</sub> fue de 6478 y el de la constante de biodegradación fue de 1.425.

Entonces, la mayor velocidad de biodegradación con respecto a su constante de velocidad fue con el tratamiento con 0.155 mg/L de ramnolípidos y el menos valor fue para en tratamiento sin tensoactivos. Los resultados anteriores sugieren que la presencia de tensoactivos induce al aumento de la velocidad de biodegradación, en comparación con los tratamientos sin tensoactivos.

Tabla 6-14. Constantes de la cinética de biodegradación de hidrocarburos, obtenidas mediante modelo de exponencial inversa para diferentes tratamientos.

Tensoactivo	Concentración de tensoactivos (mg/L)	TPH <sub>0</sub> (mg/L)	-K
Sin tensoactivo	0	6174	0.724
Ramnolípidos	0.155	6472	1.648
Ramnolípidos	0.775	6449	1.211
Tween 80	0.775	6478	1.425

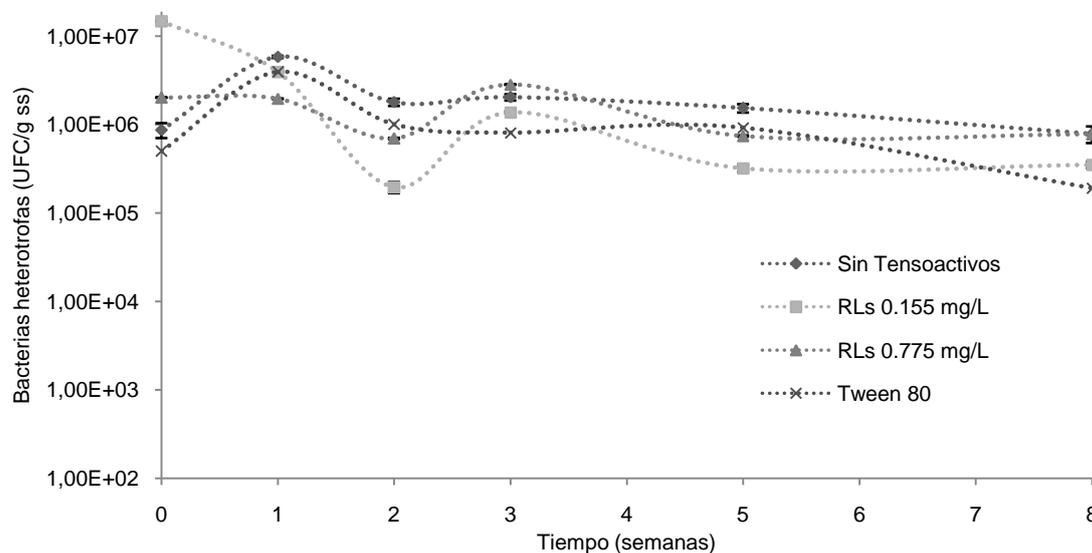
La velocidad de biodegradación para ramnolípidos a 0.775 mg/L fue muy semejante a la obtenida para 0.775 mg/L de tween 80, sugiriendo que los ramnolípidos pueden ser igual de efectivos que los tensoactivos químicos aplicados a la misma dosis. A bajas concentraciones de ramnolípidos se observó una mayor velocidad de biodegradación con respecto al tratamiento sin tensoactivos y con tween 80, contrario a lo reportado por Zhang & Miller, (1994) quienes encontraron que a bajas concentraciones de ramnolípidos (0.6 mM) se afectó la degradación de octadecano por 4 cepas de *Pseudomonas* en sistemas acuosos, ocasionado porque los ramnolípidos evitan que las células bacterianas y los hidrocarburos se adhieran, debido a la disminución de la hidrofobicidad en las membranas de bacterias, no obstante en el presente estudio utilizó un sistema suelo-solución que no es propiamente como el sistema acuoso estudiado por Zhang & Miller, (1994). La velocidad de biodegradación probablemente aumentó porque a bajas concentraciones de ramnolípidos se promueve el mecanismo de movilización de contaminantes (sección 6.5) además de que existió el suficiente

contenido de bacterias ( $8.7 \times 10^5$  UFC/g) para sustentar el crecimiento microbiano usando HTP como fuente de carbono (Iturbe *et al.*, 2007).

Finalmente si se comparan las velocidades de degradación entre tensoactivos químicos y biológicos, queda claro que son muy parecidas. En los experimentos realizados por Torres *et al.*, (2004) se reportó que los tensoactivos de la familia de los tween son más eficientes que los de la familia de los span, en la biodegradación de hidrocarburos en suelo, ellos atribuyeron esta ventaja a la diferencia en sus valores de HLB (15.0 para tween 80 y 4.3 para span 80) como consecuencia de una estructura química diferente.

En tanto a la población microbiana de los autóctonos del suelo grava-arenoso, no se observó un crecimiento exponencial como se ha reportado en literatura. En cambio el contenido de bacterias no fue mayor de dos órdenes de magnitud, es decir las variaciones estuvieron entre  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^5$  UFC/ g. En los experimentos en ausencia de tensoactivos, solo en la primera semana hay un incremento que va desde  $8.7 \times 10^5$  hasta  $5.8 \times 10^6$  y al final del proceso hubo  $7.7 \times 10^5$  UFC/ g (Gráfica 6-10). Es decir, al inicio de la biodegradación entre la primera y segunda semana, cuando se observaron las mayores velocidades de biodegradación (Gráfica 6-11), el número de bacterias autóctonas aumentó, por lo que se podría decir que la adición de nutrientes como sulfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) y fosfato monobásico de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) para ajustar la relación C/N/P a 100/10/1, proporcionan condiciones favorables para el consumo de los hidrocarburos del petróleo por las células bacterianas presentes en el suelo. Aunque el número de bacterias en el suelo no aumenta en paralelo con la biodegradación en todos los experimentos realizados, se observó que el número de bacterias fluctúa con mayor variabilidad entre las primeros dos semanas, así como la mayores velocidades de degradación fueron mayores en las primeras semanas. Este evento tal vez esté relacionado con la selección de microorganismos debido a la

presencia de tensoactivos y la mayor cantidad de nutrientes adicionados disponibles para las bacterias autóctonas.



Gráfica 6-11. Perfil de evolución de microorganismos autóctonos en experimentos de biodegradación de HTP en función del tiempo. Los puntos representan la media de muestras por duplicado.

Por ejemplo, Torres *et al.*, (2004) reportaron que el proceso de biodegradación selecciona microorganismos con las capacidades requeridas para degradar HTP o con capacidad de resistir a las condiciones tóxicas del suelo contaminado (Tabla 6-15). Parece ser que *Pseudomonas* y *Corynebacterium* sp. son responsables de la biodegradación de TPH-diesel en presencia de tensoactivos span-tween 20 (Torres *et al.*, 2004). En otros reportes se ha comprobado como la presencia de ramnolípidos promueve la inhibición de microorganismos. Por ejemplo, los RL<sub>AT10</sub> fueron efectivos en concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) contra especies de hongos como *Aspergillus niger* (16 µg/mL); *Gliocadium virens* (16 µg/mL); *Penicillium chrysogenum* (32 µg/mL); *Botrytis cinerea* (18 µg/mL); y *Rhizoctonia solani* (18 µg/mL), mientras RL<sub>47T2</sub> fue más efectiva contra bacterias (MIC) *Enterobacter aerogenes* (4 µg/mL); *Serratia marcescens* (8 µg/mL); *Bacillus subtilis* (16 µg/mL); y *Staphylococcus aureus* (32 µg/mL) (Haba *et al.*, 2003). Aunque en los estudios del presente proyecto

en efecto de inhibición microbiana no fue medido, tal vez el uso de ramnolípidos contenidos en el PSA tenga ventajas, porque quizás los biotensoactivos no estén en contacto directo las bacterias degradadoras como resultado de la presencia de sustancias distintas a los ramnolípidos contenidas en el producto no purificado.

Tabla 6-15. Variación del contenido bacteriano en el proceso de biodegradación. Tomado y modificado de Torres *et al.*, (2004).

Muestra de suelo	Gram positivas	Gram negativas
Inicial	<i>Corynebacterium sp.</i> <i>Clavibacter sp.</i> <i>Streptococcus sp.</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas putida</i>
Experimento con mayor remoción	<i>Corynebacterium sp.</i>	<i>Yersinia pestis</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas sp.</i>
Blanco sin tensoactivos con bioestimulación	NB	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Stenotrophomonas sp.</i> <i>Yersinia pestis</i>

NB: no se encontraron bacterias

Así en los resultados reportados Thanomsub *et al.*, (2006) el efecto de inhibición no se observó cuando se usó extracto crudo de ramnolípidos, atribuido a la baja concentración de RL-a (0.1%) y RL-b (0.09%) de un total de biotensoactivo en el extracto crudo.

## 6.9. Estudio de la biodegradación de HTP en suelo por bioestimulación acoplada con ramnolípidos

Se evaluó el efecto del tipo de producto no purificado, la concentración de ramnolípidos y la temperatura, en la biodegradación de HTP. Se calculó la remoción de HTP, el contenido de bacterias heterótrofas y la velocidad de biodegradación solo al final de las 8 semanas de la experimentación. Las máximas remociones de hidrocarburos por biodegradación fueron de alrededor de 70% conseguidas con la adición de ramnolípidos en forma de PSC a 28 y 38 °C y por abajo o iguales a 0.1 veces el valor de su CMC. Mientras que las mínimas remociones se obtuvieron con PSB al 0.01 veces la CMC y PSC a 1.0 veces la CMC, a 38 y 48 °C, respectivamente (Tabla 6-16).

De los microcosmos 1, 2 y 4 se puede observar el efecto de la concentración de 0.01 a 1 veces el valor de la CMC de ramnolípidos a 38 °C para biotensoactivo tipo PSA en la biodegradación de HTP, así ante el aumento de la dosis de ramnolípidos la remoción disminuye aproximadamente 4%, aunque en general la remoción estuvo alrededor de 60% para los tres microcosmos y la población microbiana aumenta de  $5.6 \times 10^5$  a  $1.2 \times 10^8$  UFC/g. El aumento en número de la población autóctona podría estar relacionado con la degradación preferencial de los biotensoactivos contenidos en el PSA o alguno de sus componentes y por lo que la remoción de los HTP no aumentó paralelamente con el aumento de la dosis de ramnolípidos (Tabla 6-16). Pérez *et al.*, (2003) reportaron que la degradación de naftaleno por *P. aeruginosa* AT18 en medios líquidos con naftaleno como fuente de carbono es menor a la degradación obtenida en medios que tienen glucosa como suplemento, lo cual sugiere que la co-biodegradación es un mecanismo posible en la remoción de compuestos en el suelo. El PSA contiene fracciones de ácido oleico, que tal vez podrían ser utilizadas para inducir el fenómeno de la co-degradación. Más importante aún, es que lo anterior sugiere la posibilidad de emplear bajas concentraciones de tensoactivos biológicos para remover HTP hasta en

un 65%, remociones mayores o quizás iguales a las obtenidas con los mismos ramnolípidos del PSA pero a 100 veces más de concentración.

Tabla 6-16. Efecto combinado del tipo de producto no purificado, dosis y temperatura, en la remoción de HTP, la generación de bacterias y velocidad de biodegradación de HTP del suelo grava-arenoso.

No. de experimento	Tipo de producto no purificado	No. veces CMC	Temperatura (°C)	Remoción (%)	Bacterias Heterótrofas (UFC/g)	Velocidad de BD (mg HTP/ día*Kg)
1	PSA	0.01	38	64,7	5,60E+05	75,1
2	PSA	0.1	38	55,9	1,40E+06	64,9
3	PSA	0.1	48	62,7	2,90E+08	72,8
4	PSA	1.0	38	62,0	1,20E+08	72,0
5	PSB	0.01	38	51,3	1,20E+07	59,5
6	PSB	0.1	28	65,3	2,30E+08	75,8
7	PSB	0.1	48	68,6	7,00E+07	79,7
8	PSB	0.1	38	65,2	2,70E+08	75,7
9	PSC	0.01	28	73,0	3,80E+08	84,8
10	PSC	0.01	48	57,8	8,50E+07	67,0
11	PSC	0.1	38	74,0	6,20E+06	85,9
12	PSC	0.1	38	70,7	2,80E+07	82,1
13	PSC	0.1	38	56,9	2,80E+08	66,1
14	PSC	1.0	28	63,8	2,30E+08	74,0
15	PSC	1.0	48	50,1	3,30E+06	58,2
16	Estéril	0	38	0,0	0	0
17	Sin ramnolípidos	0	38	61,1	1,30E+08	70,9

BD: biodegradación.

En los experimentos 6, 7 y 8 se usaron ramnolípidos del tipo PSB a una sola concentración (0.1 veces CMC) pero a distinta temperatura, se observa que ante el aumento de la temperatura desde 28 hasta 48°C el porcentaje de remoción paso de 65% a 68% aproximadamente, aunque el número de bacterias heterótrofas disminuyó un orden de magnitud a 48°C. Aunque el aumento en la remoción podría no ser netamente significativo, la disminución de bacterias si lo fue. Esta misma tendencia también se presentó en los microcosmos 9 y 10 donde se usaron 0.01 veces la CMC de ramnolípidos del PSC y en los microcosmos 14 y 15 donde se utilizó 1 vez la CMC de los ramnolípidos del PSC y para ambos casos la temperatura evaluada fue de 28 a 48°C, en esos experimentos el aumento de la temperatura lleva consigo la reducción

del número de bacterias heterótrofas. Estos resultados son contrarios a los obtenidos por Cort & Bielefeldt, (2000) quienes evaluaron el efecto de la temperatura en la biodegradación de PCB utilizando tensoactivos químicos. Ellos enfatizaron que el efecto tóxico de los tensoactivos aumenta con la disminución de la temperatura y es atribuido al estrés celular. Bajas temperaturas disminuyen la velocidad de crecimiento de las células bacterianas de *Sphingomonas Chlorophenolicum* RA2, lo cual en combinación con el estrés de los tensoactivos puede causar efectos que llegan a ser más pronunciados a bajas temperaturas. No obstante las temperaturas que Cort & Bielefeldt, (2000) utilizaron en sus estudios son distintas a las del presente estudio. Los resultados obtenidos aquí parecen estar de acuerdo con lo reportado por Margesin & Schinner, (2001) quienes sugieren que tal vez la adaptación de los microorganismos este en función de la temperatura.

Con el control abiótico no se removieron HTP ni se generó biomasa, esto indican que los contaminantes del suelo se degradan mediante la oxidación catalizada por microorganismos. En general, los experimentos donde la remoción de HTP aumentó con respecto al control sin tensoactivos, se debieron al aumento en la biodisponibilidad de los compuestos hidrofóbicos. Se ha reportado que los ramnolípidos disminuyen la barrera fisicoquímica entre microorganismos y contaminantes, lo que da paso a la mineralización de hidrocarburos (Jain *et al.*, 1992; Rouse *et al.*, 1994; Volkering, Breure, & Rulkens, 1998; Barathi & Vasudevan, 2001; Zhang *et al.*, 2005 ; Chrazanowski *et al.*, 2011). El control sin tensoactivos tuvo un porcentaje de remoción de 61.1% con  $1.3 \times 10^8$  UFC/g, esto indica que los microorganismos autóctonos pueden consumir HTP sin la necesidad de emplear tensoactivos. La biodegradación de hidrocarburos puede ser significativamente estimulada bajo condiciones favorables de nutrientes (Masrgesin & Schinner, 2001). Iturbe *et al.*, (2007) evaluaron la bioestimulación proporcionando nutrientes, humedad y oxígeno a biopilas de 23 m<sup>3</sup>, encontrando que algunos compuestos considerados de alta toxicidad como PHAs y

BTEX fueron altamente degradados por microorganismos autóctonos en un periodo de 8 semanas, sin la adición de tensoactivos. En este sentido, la adición de tensoactivos tendría que mejorar la remoción de HTP para que la alternativa sea considerada como una opción viable en términos de eficiencia-costos.

El diseño experimental utilizado considera repeticiones en los microcosmos 11, 12 y 13, los valores de la desviación estándar para la remoción de hidrocarburos, bacterias heterótrofas y velocidad de biodegradación fueron de 9.0%,  $1.5 \times 10^8$  UFC/g y 10.5 mg/Kg·día, en este sentido la heterogeneidad de las muestras en las repeticiones podría estar introduciendo variabilidad al sistema de análisis. Todas las concentraciones utilizadas están por abajo de la CMC de los productos no purificados, el rango de temperaturas evaluadas limita el crecimiento a microorganismos mesófilos (20 a 45 °C) y los PSA, PSB y PSC son distintos en tanto a su valor de CMC. Los reportes en literatura indican que no es conveniente utilizar concentraciones elevadas de ramnolípidos porque pueden afectar las propiedades de las membranas de microorganismos del suelo (Maier & Soberón-Chavez, 2000). Además se ha recomendado utilizar bajas dosis de tensoactivos en remediaciones in situ, para evitar una posible contaminación al movilizar contaminantes (Jain *et al.*, 1992) fuera de la pluma de contaminación.

Hasta esta parte del análisis no es posible dar explicación del efecto combinado en el proceso de biodegradación. Para ello fue necesario realizar cálculos estadísticos con el programa SPSS 17.0. Los resultados se presentan como ecuaciones lineales multivariantes que describen la interacción de las variables independientes en sus tres niveles, en respuesta a una variable dependiente (Tabla 6-17). Los coeficientes de  $R^2$  son bajos en comparación a otros reportados en Torres *et al.*, (2005) quienes usaron el mismo diseño experimental, esto quiere decir que los datos se ajustan débilmente a la línea que representa el sistema. Aunque es posible realizar la determinación de

ecuaciones más complejas que se ajusten mucho más a los datos experimentales el inconveniente es la determinación de sus coeficientes.

Tabla 6-17. Ecuaciones lineales obtenidas con SPSS versión 17.0 a partir de los resultados del diseño experimental Box Benhken.

Ecuación	R <sup>2</sup>
Remoción(%) = 76.75 + 0.223 (CMC de PS) - 6.16 (dosis) - 0.39 (temperatura) .....ec.1	0.227
Bacterias (UFC/g) = 4.4x10 <sup>8</sup> - 5.2x10 <sup>5</sup> (CMC de Ps) - 2.2x10 <sup>7</sup> (dosis) - 7.6x10 <sup>6</sup> (temperatura) .....ec.2	0.156
Velocidad de degradación (mg TPH/dia*kg) = 89.08 + 0.26 (CMC de PS) - 7.15 (dosis) - 0.46 (temperatura) .....ec.3	0.226

ec: ecuación

Por lo tanto, las ecuaciones aunque débilmente, dan una idea aproximada de la remoción de HTP, del número de bacterias y la velocidad de degradación con respecto a el tipo de ramnolípido según su valor de CMC en cada producto no purificado, de la dosis y de la temperatura. Así entonces, se puede decir que la remoción esta afectada en orden decreciente por la dosis, el tipo de biotensoactivo y a temperatura (Tabla 6-17, ec. 1), en este caso el aumento de la dosis de los ramnolípidos, reduce aproximadamente 6 veces la remoción de HTP. Adicionalmente, para el caso de la generacion de bacterias heterotrofas el nivel de efecto en orden decreciente fue; tipo de tensoactivo, dosis y temperatura, aunque para la velocidad de biodegradacion el efecto combinado de las variables estudiadas ordenado de forma decreciente fue; la dosis, el tipo de tensoativo y la temperatura. El valor del coeficiente que acompaña a la variable independiente indica que nivel de efecto tiene sobre la variable dependiente, mientras que el simbolo indica la proporcionalidad directa o inversa de cada variable independiente sobre la dependiente (Tabla 6-17).

Se ha reportado que el aumento en la biodegradación de hidrocarburos ante la presencia de tensoactivos se debe a los cambios en las propiedades de la membrana celular. En los estudios realizados por Beal & Betts, (2000) se encontró una correlación entre el aumento de la hidrofobicidad de *P. aeruginosa* PG201 y el consumo de n-hexadecano. Por su parte, Vyas & Dave, (2011) al estudiar a *Nocardia otitidiscaviarum* encontraron que la producción de biotensoactivos esta correlacionada

con el aumento en la hidrofobicidad de la superficie celular y el consumo de sustratos hidrofóbicos. Sin embargo este fenómeno no aplica para todo tipo de microorganismos, de esta manera Miller & Zhang, (1994) reportaron que la hidrofobicidad de bacterias está afectada de manera distinta en las bacterias de rápida o lenta degradación de octadecano, es así que las bacterias que se denominaron de lenta biodegradación aumentan la hidrofobicidad de su superficie celular cuando los ramnolípidos son agregados conluciendo a un aumento en la capacidad de biodegradación de octadecano mientras que las bacterias de rápida degradación no tienen un efecto en el cambio de las propiedades de la superficie celular ante la presencia de ramnolípidos.

El cambio de las propiedades de las membranas celulares está ampliamente documentado. Por una parte se ha reportado que la inserción de ramnolípidos en la superficie celular es posible y esto asegura un transporte eficiente de las sustancias hidrofóbicas, al interior de las células (Aranda *et al.*, 2007; Chrazanowski *et al.*, 2011), y por el otro se ha reportado que los ramnolípidos pueden interactuar con los LPS (lipopolisacaridos) por dos vías para causar su remoción desde la membrana externa. Primero, causan la remoción directa de LPS por su solubilización, segundo, causan la remoción indirecta de LPS a través de la complejación de  $Mg^{2+}$ , catión que permite la estabilización de los LPS (Al-Thhan *et al.*, 2000), la remoción de LPS esta acompañada del aumento de la hidrofobicidad de la superficie celular. Aunque un problema reciente con respecto a la hidrofobicidad de la superficie celular, esta en el método empleado en su determinación porque tiene errores que pueden sobreestimar su valor. Así por ejemplo, en los experimentos realizados por Owsianiak *et al.*, (2009) sobre la biodegradación de diesel mediante un consorcio microbiano se encontró que la hidrofobicidad no está correlacionada con la biodegradación y este hecho se atribuyó en parte a la mala determinación de la hidrofobicidad de la superficie celular mediante el método MATH. Se han propuestos métodos adicionales para determinar la

hidrofobicidad de la superficie celular por Zoueki *et al.*, (2010). Aunque la hidrofobicidad de los microorganismos autóctonos en el presente estudio no fue determinada, los resultados sobre el contenido de bacterias en cada microcosmo sugieren que ante la presencia de ramnolípidos, las células bacterianas están variando en número debido quizás a su adaptación con los biotensoactivos lo que probablemente este asociado a un cambio las propiedades a nivel de membrana.

## 7. Conclusiones

De acuerdo a los datos obtenidos y en función de los objetivos propuestos en la presente investigación se han llevado a las siguientes conclusiones:

- Fue posible la producción de ramnolípidos a nivel de matraces utilizando aceite de olivo como fuente de carbono y la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 9027 hasta alcanzar niveles de 100 mg/L.
- La capacidad tensoactiva de los ramnolípidos fue elevada y mayor a la comparada con datos en literatura.
- Fue posible la preparación de un polvo que contenía 1.19 % de ramnolípidos, aunque la concentración fue baja no fue muy diferente a la de un producto que actualmente comercializa (15%).
- El producto no filtrado presentó mejores propiedades como tensactivo que el producto filtrado.
- El pH tiene un efecto en la CMC del los ramnolípidos de manera que promueve su comportamiento como tensoactivo iónico o tensoactivo no iónicos. Las CMCs encontradas son semejantes a las reportadas en literatura para ramnolípidos puros.
- La fuerza iónica con  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  tiene un efecto en la CMC los ramnolípidos de manera que la disminuye en un rango de 35 a 41 mg/L en presencia de 0.5 a 2 mM de metales, estos valores son semejantes a los reportados en literatura para ramnolípidos puros.
- Los ramnolípidos del PSA sirvieron para lavar un suelo contaminado con 6500 mg/Kg de HTP aumentado su remoción a bajas concentraciones y siendo tan efectivos como los tensoactivos químicos.
- Se encontró que altas remociones de metales están asociadas a las altas concentraciones de biotensoactivos. La remoción de metales esta correlacionada con sus propiedades de la siguiente manera:

Radio atómico < número atómico < peso atómico < radio iónico < radio covalente << densidad << constante de afinidad < potencial primero de ionización.

- Se encontró que la velocidad de degradación de HTP aumenta en presencia de ramnolípidos a bajas concentraciones y su valor es semejante al de tween 80.
- Se encontró que la remoción de HTP está relacionada con el tipo de ramnolípidos y su concentración a distintas temperaturas de la siguiente manera:  $\text{Remoción(\%)} = 76.75 + 0.223 (\text{CMC de PS}) - 6.16 (\text{dosis}) - 0.39 (\text{temperatura})$

## 8. Recomendaciones

Con base en los resultados encontrados en el presente estudio y su minuciosa comparación con la literatura se han detectado que no hay estudios sobre los gastos de producción de ramnolípidos en tanto a las distintas fuentes de carbono que se han estudiado y que las técnicas utilizadas para su cuantificación rápida son escasas por lo que resulta complicado compararlas de los diferentes resultados reportados, así lo anterior sugiere profundizar en los aspectos económicos de la producción de ramnolípidos y proponer una técnica para cuantificarlos estandarizada.

Las propiedades tensoactivas de los ramnolípidos en sistemas liquido-liquido son distintas a las que se observan en los sistemas solido-liquido, por ejemplo el valor de la CMC, por lo que algunas desviaciones de los comportamientos estimados son presentadas al momento de evaluar los biotensoactivos en la remediación, por lo tanto se recomienda usar las propiedades determinadas de los tensoactivos en sistemas solido-liquido para cuando sea necesario, tal como en la remediación de suelos.

Como el suelo usado en sección de “lavado de suelo contaminado con metales ” fue altamente ácido, sería interesante probar los ramnolípidos del PSA en suelos alcalinos contaminados con metales, con la idea de analizar su capacidad de complejación.

## 9. Referencias

- Abdel-Mawgoud, A. M., Lépine, F., & Déziel, E. (2010). Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl Microbiol Biotechnol* , 86, 1323-1336.
- Abu-Zreig, M., Rudra, R. P., & Dickinson, W. T. (2003). Effect of Application of Surfactants on Hydraulic Properties of Soils. *Byosystems Engineering* , 84 (3), 363-372.
- Al-Araji, L. Y., Rahman, R. Z., Basri, M., & Salleh, A. B. (2007). Optimization of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* 181 using Response Surface Modeling. *Annals of Microbiology* , 57 (4), 571-575.
- Al-Thhan, R. A., Sandrin, T. R., Bodour, A. A., & Maier, R. M. (2000). Rhamnolipid-induced Removal of Lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: Effect on Cell Surface Properties and Interaction with Hydrophobic Substrates. *Applied and Environmental Microbiology* , 66 (8), 3262-3268.
- Aranda, F. J., Espuny, M. J., Marqués, A., Teruel, J. A., Manresa, A., & Ortiz, A. (2007). Thermodynamics of the Interaction of Dirhamnolipid Biosurfactant Secreted by *Pseudomonas aeruginosa* with Phospholipid Membranes. *Langmuir* , 23, 2700-2705.
- Balba, M. T., Al-Awadhi, M., & Al-Dahen, R. (1998). Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of microbiological methods* , 32, 155-164.
- Barathi, S., & Vasudevan, N. (2001). Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. *Environmental international* , 26, 413-416.
- Beal, R., & Betts, W. B. (2000). Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology* , 158-168.
- Benincasa, M., Abalos, A., Oliveira, I., & Manresa, A. (2004). Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonie van Leeuwenhoek* , 85, 1-8.
- Billingsley, K. A., Backus, S. M., Wilson, S., Singh, A., & Ward, O. P. (2002). Remediation of PCBs in the soil by surfactant washing and biodegradation in wash by *Pseudomonas sp.* LB4000. *Biotechnol Lett* , 21, 1827-1832.
- Bofani, L. (2008). *Biodegradazione assistita con surfactanti naturali e sintetici di idrocarburo presenti nel suolo della ex Refineria di Azcapotzalco, Messico. Tesi di Laurea Magistrale*. . Italia: I Facoltà di Ingegneria Corso di Laurea Specialistica in Ingegneria Per l'Ambiente ed il Territorio.
- Breure, A. M., Volkering, F., Mulder, H., Rulkens, W. H., & Van-Andel, J. G. (1995). Enhancement of bioavailability by surfactants. *Contaminated Soil* , 95, 939-948.

Chandrasekaran, E. V., & BeMiller, J. (1980). *Methods in carbohydrates chemistry*. New York: Whistler RL.

Chang, S. H., Wang, K. S., Kuo, C. Y., Chang, C. Y., & Chou, C. T. (2005). Remediation of metal-Contaminated Soil by an Integrated Soil Washing-Electrolysis Process. *Soil and Sediment Contamination* , 14, 559-569.

Chrazanowski, L., Lawniczak, L., & Czaczyk, K. (2011). Why do microorganisms produce rhamnolipids? *World Journal of Microbiology and biotechnology* , 1-19.

Clarke, K. G., Ballot, F., & Reid, S. J. (2010). Enhanced rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under phosphite limitation. *World J Microbiol Biotechnol* , 26, 2179-2184.

Cort, T., & Bielefeldt, A. (2000). Effects of Surfactants and Temperature on PCP Biodegradation. *Journal of Environmental Engineering* , 635-643.

Dahrazma, B., & Mulligan, C. N. (2007). Investigation of the removal heavy metals from sediments using rhamnolipid in a continue flow conFiguration. *Chemosphere* , 69, 705-711.

De Lima, C. J., Franca, F. P., Sérvulco, E. C., Resende, M. M., & Cardoso, V. L. (2007). Enhancement of Rhamnolipid Production in Residual Soybean Oil by an Isolated Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* , 136-140, 463-470.

Edwards, K. R., Lepo, J. E., & Lewis, M. A. (2003). Toxicity comparison of biosurfactants and synthetic surfactants used in oil spill remediation to two estuarine species. *Marine Pollution Bulletin* , 46, 1309-1316.

Espuny, M. J., Andres, C., Mercade, M. E., Roberts, M., Manresa, M. A., & Guinea, J. (1991). R-bodies in *Pseudomonas aeruginosa* strain 44T1. *Antonie van Leeuwenhoek* , 60, 83-86.

Eweis, J. B., Ergas, S. J., Chang, D. P., & Schroeder, E. D. (1999). *Principios de Biorrecuperacion (Bioremediation) Tratamientos para la sescontaminación y regeneración de suelos y aguas subterranas mediante procesos biológicos y fisico-químicos*. (A. García Brage, Ed.) España: McGRAW-HILL.

Fahnestock, F. M. (1998). *Biopile design. Operation and maintenance hand-book for testing hydrocarbon-contaminated soils*. USA: Battelle press.

Fernández, L. C., Rojas, N. G., Roldan, T. G., Ramírez, M. E., Zegarra, H. G., Uribe, H., y otros. (2006). *Manual de técnicas de análisis de suelo aplicadas a la remediación de sitios contaminados*. . México D.F.: Instituto Mexicano del Petróleo.

González, R. R. (2009). *Biosíntesis de tensoactivos con Pseudomonas aeruginosa usando desechos agroindustriales y su aplicación en l remediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo (Tesis de licenciatura)*. Zempoala Hidalgo: Universidad Politecnica de Pachuca. Reporte de proyecto de titulación.

- Guerra-Santos, L., Kâppeli, O., & Fiechter, A. (1984). *Pseudomonas aeruginosa* Biosurfactant Production in Continuous Culture with Glucose Source. *Applied and Environmental Microbiology*, 4 (8), 301-305.
- Haba, E., Abalos, A., Jáuregui, O., Espuny, M. J., & Manresa, A. (2003). Use of Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy for studying the Composition and Properties of Rhamnolipids Produced by Different Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Surfactants and Detergents*, 6 (2), 155-161.
- Helvacı, S. S., Peker, S. & Ozdemir, G. (2004). Effect of electrolytes on the surface behavior of rhamnolipids R1 and R2. *Colloids and Surfaces*, 35, 225-233.
- Heyd, M., Kohbert, A., Tan, T.-H., Nusser, M., Kirschhöfer, F., Brenner-Weiss, G., y otros. (2008). Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example. *Anal Bioanal Chem*, 391, 1579-1590.
- Iturbe, R., Flores, C., & Torres, L. G. (2007). Operation of 27-m<sup>3</sup> Biopile for the Treatment of Petroleum-Contaminated Soil. *Remediation*, 97-108.
- Iturbe, R., Flores, C., Chavez, C., Bautista, G., & Torres, L. G. (2004). Remediation of Contaminated Soil Using Washing and Biopile Methodologies a Field Level. *Journal of Soils & Sediments*, 1-8.
- Iturbe, R., Flores, R. M., & Torres, L. G. (2003). Soil and Water contamination levels in an out-of-service oil distribution storage station in Michoacan, Mexico. *Water, Air, and Soil Pollution*, 146, 261-281.
- Iturbe, R., Flores, R. M., Flores, C., & Torres, L. G. (2006). Cleanup levels at an oil distribution and storage station in eastern central Mexico determined from a health risk assessment. *International Journal of Environment and Pollution*, 23 (1), 106-128.
- Jain, D. K., Lee, H., & Trevors, J. T. (1992). Effect of addition of *Pseudomonas aeruginosa* UG2 inocula or biosurfactants on biodegradation of selected hydrocarbons in soil. *Journal of Industrial Microbiology*, 10, 87-93.
- Jarvis, F. G., & Johnson, M. J. (1949). A Glyco-lipide Produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the American Chemical Society*, 71, 4124-4126.
- Jiménez-Islas, D., Medina-Moreno, S. A., & Gracida-Rodríguez, J. N. (2010). Propiedades, aplicaciones y producción de biotensioactivos. *Int. Contam. Ambient*, 26 (1), 65-84.
- Juwarkar, A. A., Nair, A., Dubey, K. V., Singh, S. K., & Devotta, S. (2007). Biosurfactant technology for remediation of cadmium and lead contaminated soils. *Chemosphere*, 68, 1996-202.
- Khan-Faisal, I., Husain, T., & Hejazi, R. (2004). An Overview and analysis of site remediation technologies. *Journal of environmental Management*, 71, 95-122.
- Kuo, M. T., Ray, J. K., & Manthey, K. L. (2003). A facile reactor process for producing 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid from oleic acid conversion by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnology Letters*, 25, 29-33.

Kuyukina, M. S., Ivshiona, I. B., Makarov, S. O., Litvinenko, L. V., Cunningham, C. J., & Philp, J. C. (2005). Effect of biosurfactants on crude oil desorption and mobilization in a soil system. *Environment International* , 31, 155-161.

Lai, C.-C., Huang, Y.-H., Wei, Y.-H., & Chang, J.-S. (2009). Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* , 167, 609-614.

Lang, S., & Wullbrandt, D. (1999). Rhamnolipids-biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl Microbiol Biotechnol* , 51, 22-32.

Lee, K. M., Hwang, S.-H., Ha, S. D., Jang, J.-H., Lim, D.-J., & Kong, J.-Y. (2004). Rhamnolipid Production in Batch and Fed-batch fermentation Using *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 KCTC 18012P. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* , 9, 267-273.

López, J., Iturbe, R., & Torres, L. G. (2004). Washing of Soil Contaminated with PAHs and Heavy Petroleum Fractions Using Two Anionic and One Ionic Surfactant: Effect of Salt Addition. *Journal of environmental science and health Part A- Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* , A39 (9), 2293-2306.

López-Franco, Y. L., Valdez, M. A., Hernández, J., Calderón de la Barca, A. M., Rinaudo, M., & Goycoolea, F. M. (2004). Macromolecular Dimensions and Mechanical Properties of Monolayer Films on Sonoran Mesquite gum. *Macromolecular Bioscience* , 4 (19), 865-874.

Lovaglio, R. B., Jose dos Santos, F., Junior, M. J., & Contiero, J. (2011). Rhamnolipid emulsifying and emulsion stability: pH rules. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* , 85 (2), 301-305.

Maier, R. M., & Soberón-Chavez, G. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol* , 54, 625-633.

Marks, P. J., Wujcik, W. J., & Loncar, A. F. (1994). *Remediation technologies screening Matrix and Reference Guide, DOD environmental Technology Transfer Committee*. USA: Second Edition.

Martínez, T., A. (2005). Producción de Biosurfactantes *in situ* por *Pseudomonas putida* y remoción de compuestos polinucleoáromaticos del suelo. Tesis Doctoral. Centro de Investigaciones de estudios avanzados del instituto politécnico nacional CINVESTAV-IPN, México, D.F.

Masgesin, R., & Schinner, F. (2001). biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 56, 650-663.

Monteiro, S. A., Sasaki, G. L., De Souza, L. M., Meira, J. A., De Araújo, J. M., Mitchell, D. A., y otros. (2007). Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614. *Chemistry and Physics of Lipids* , 147, 1-13.

Medina, S. A., Jiménez, D., Gracida, J., Gutiérrez, M., & Díaz, I. J. (2011). Modeling rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa* from immiscible carbon source in bath system. *Journal of environmental science and technology* , 8 (3), 471-482.

Moutsatsou, A., Gregou, M., Matsas, D., & Protonotarios, V. (2006). Washing as a remediation technology applicable in soils heavily polluted by mining-metallurgical activities. *Chemosphere* , 63, 1632-1640.

Mukherjee, S., Das, P., & Sen, R. (2006). Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends in Biotechnology* , 24 (11), 509-515.

Mulligan, C. N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental pollution* , 133, 183-198.

Mulligan, C. N., & Wang, S. (2004). Rhamnolipid foam enhanced remediation of cadmium and nickel contaminated soil. *Ater, Air, and Soil pollution* , 157, 315-330.

Mulligan, C. N., Yong, R. N., & Gibbs, B. F. (2001). Heavy metals from sediments by biosurfactants. *Journal of Hazardous Materials* , 85, 111-125.

Mulligan, C. N., Yong, R. N., & Gibbs, B. F. (1999). Removal of heavy metals from contaminated soil and sediments using the biosurfactant Surfactin. *Journal of Soil Contamination* , 8 (2), 231-254.

Mutsufuji, M., Nakata, K., & Yoshimoto, A. (1997). High production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* growing on ethanol. *Biotechnology Letters* , 19 (12), 1213-1215.

Neilson, J. W., Artiola, J. F., & Maier, R. M. (2003). Characterization of Lead Removal from Contaminated Soils by Nontoxic Soil-Washing Agents. *Journal of environmental Quality* , 32, 899-908.

Nguyen, T. T., Youssef, N. H., Mc Inerney, M. J., & Sabatini, D. A. (2008). Rhamnolipid biosurfactant mixtures for environmental remediation. *Water Research* , 42, 1735-1743.

Ochoa-Loza, F. J., Artiola, J. F., & Maier, R. M. (2001). Stability Constants for the complexation of Various Metals with Rhamnolipid Biosurfactant. *Journal of Environmental Quality* , 30, 479-485.

Ochoa-Loza, F. J., Noordman, W. H., Jannesen, D. B., Brusseau, M. L., & Maier, R. M. (2007). Effect of clays, metal oxides, and organic matter on rhamnolipid biosurfactant sorption by soil. *Chemosphere* , 66, 1634-1642.

Owsianiak, M., Szule, A., Chrzanowski, L., Cyplik, P., Bogacki, M., Olejnik-Schmidt, A. K., y otros. (2009). Biodegradation and surfactant-mediated biodegradation of diesel fuel by 218 microbial consortia are not correlated to cell surface hydrophobicity. *Applied microbiology and Biotechnology* , 84, 545-553.

Park, O.-J., Lee, Y.-E., Cho, J.-H., Shin, H.-j., Yoon, B.-D., & yang, J.-Y. (1998). Purification and Structural Characterization of Glycolipid Biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* YPJ-80. *Biotechnol. Bioprocess* , 3, 61-66.

Petrucci, R., H. (1986) Química general. Adisson-Wesley iberoamericana. E.U.A, ISB 0-201-05813-8.

Porta, J., López-Acevedo, M., & Roquero, C. (2003). *Edafología para la agricultura y el medio ambiente* (Tercera edición ed.). Madrid: Editores Mundi-Prensa.

Pratap, A., Wadekar, S., Kale, S., Lali, A., & Bhowmick, D.N. (2011). Non-traditional Oils as Newer Feedstock for Rhamnolipids Production by *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145). *Journal of the American Oil Chemists' Society*. Published online: 15 June 2011.

Prizzia, R. (2001). Natural attenuation as a viable remediation method. *Environmental Management and Health* , 12 (4), 428-435.

PROFEPA. (2009). *Informa anual PROFEPA 2009*. México, D.F.

Raza, Z. A., Khalid, Z. M., Khan, M. S., Banat, I. M., Rehman, A., Neem, A., y otros. (2010). Surface properties and sub-surface aggregate assimilation of rhamnolipid surfactants in different aqueous system. *Biotechnol Lett* , 32, 811-816.

Reiling, H. E., Thanei-wyss, U., Guerra-Santos, L. H., Hirt, R., Käppeli, O., & Fiechter, A. (1986). Pilot Plant Production of Rhamnolipid Biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* , 985-989.

Riser-Roberts, E. (1992). *Bioremediation of Petroleum Contaminated Sites*. United States of America: C.K. SMOLEY.

Rouse, J. D., Sabatini, D. A., Suflita, J. M., & Harwell, J. H. (1994). Influence of Surfactants on Microbial Degradation of Organic Compounds. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* , 24 (4), 325-370.

Santos, A. S., Sampaio, A.-P. W., Vasquez, G. S., Santa Anna, L. M., Pereira Jr., N., & Freire, D. M. (2002). Evaluation of different Carbon and Nitrogen Sources in production of Rhamnolipids by a Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* , 98 (100), 1025-1035.

SEMARNAT. (2003). *Limites maximos permisibles de hidrocarburos en suelo y las especificaciones para su caracterización y remediación*. México.

Soberón-Chávez, G., Lépine, F., & Déziel, E. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* , 68, 718-725.

Srivastava, M., & Kapoor, V. P. (2007). Seed Galactomannans: An Overview. *Chemistry & Biodiversity* , 2, 295-317.

Thanomsub, B., Pumeeechockchai, W., Limtrakul, A., Arunrattiyakorn, P., Petchleelaha, W., Nitoda, T., y otros. (2006). Chemical structures and biological activities of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* B189 isolated from mik factory. *bioresource Technology* , 97, 2457-2461.

Tharwat, F. T. (2005). *Applied Surfactants Principles and Applications*. Federal Republic of Germany: wiley-vch Verlag GmbH & Co.KGaA, Weinheim.

Torrens, J. L., Herman, D. C., & Maier-Miller, R. M. (1998). Biosurfactant (Rhamnolipid) Sorption and impact on Rhamnolipid-Facilitated Removal of Cadmium from Various Soils under Saturated Flow Conditions. *Environ. Sci. Technol.* , 32, 776-781.

Torres, L. G., & Bandala, E. R. (2009). Soil washing for remediation of soils contaminated with petroleum hydrocarbons and/or metals. En L. G. Torres, & E. R. Bandala, Remediation of soils and aquifers (págs. 231-243). New York: nova.

Torres, L. G., Climent, M., Saquelares, J., Bandala, E., Urquiza, G., & Iturbe, R. (2007a). Characterization and treatability of a contaminated soil from an oil exploration zone. *Journal of Environmental Science and Technology* , 4 (3), 311-322.

Torres, L. G., Lemus, X., & Iturbe, R. (2007b). Do the characteristics of crude oil in contaminated soils affect its removal by washing? *Land contamination & reclamation* , 18 (4), 1-8.

Torres, L. G., Lopez, R. B., & Beltran, M. (2011). Removal of As, Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn a highly contaminated industrial soil using surfactant enhanced soil washing. *Physics and Chemistry of the Earth Parts A/B/C*. In press, corrected proof, doi: 10.1016/j.pce.2011.1002.1003.

Torres, L. G., Rojas, N., & Iturbe, R. (2004). Use of two-surfactants mixture to attain specific HLB values for assisted TPH-diesel biodegradation. *Journal of environmental science* , 16 (6), 950-956.

Torres, L. G., Rojas, N., Bautista, G., & Iturbe, R. (2005). Effect of temperature, and surfactant' s HLB and dose over the TPH-diesel biodegradation process in aged soils. *Process biochemistry* , 40, 3296-3302.

Urum, K., & Pekdemir, T. (2004). Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. *Chemosphere* , 57, 1139-1150.

Urum, K., Grigson, S., Pekdemir, T., & McMenamy, S. (2006). A comparison of the efficiency of different surfactants for removal of crude oil from contaminated soils. *Chemosphere* , 62, 1403-1410.

Van-Deuren, J., Wang, Z., & Ledbetter, J. (1997). *Remediation Technologies Screening and Reference Guide* (3 ed.). USA: Technology Innovation Office.

Van-Dyke, M. I., Couture, P., Brauer, M., Lee, H., & Trevors, J. T. (1993). *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. *Journal of Microbiology* , 39, 1071-1078.

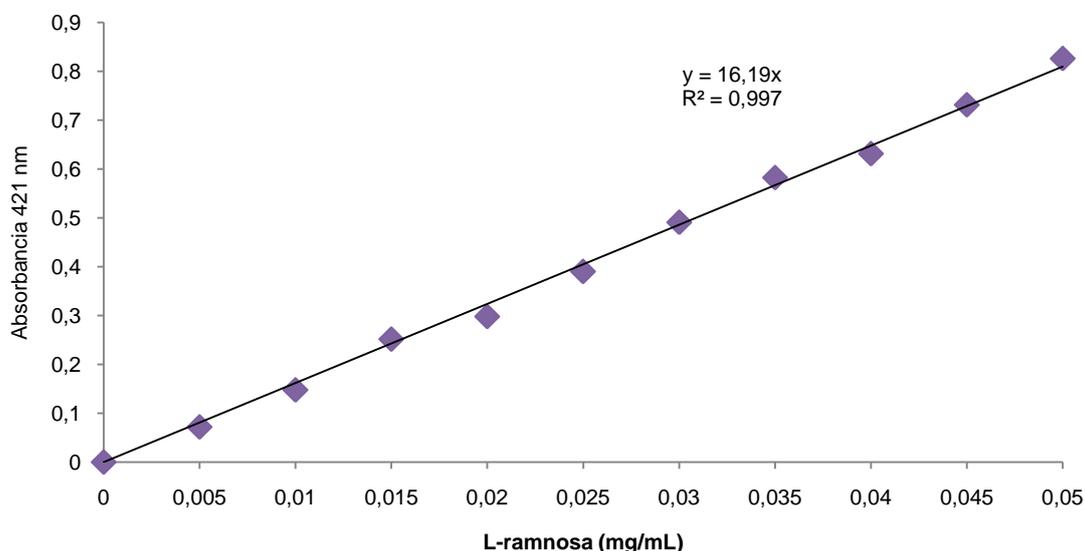
Volke, T., & Velasco, J. A. (2002). *tecnologia de remediacion de suelos contaminados*. México: Editores e Empresores S.A. de C.V.

Volkering, F., Breure, A. M., & Rulkens, W. H. (1998). Microbial aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation* , 8, 401-417.

- Vyas, T., & Dave, B. P. (2011). production of biosurfactants by *Nocardia otitidiscaviarum* and its role in biodegradation of crude oil. *Int. J. Environ. Sci. Tech.* , 8 (2), 425-432.
- Wang, Q., Fang, X., Bai, B., Liang, X., Shuler, P. J., Goddard III, W. A., y otros. (2007). Engineering Bacteria for production of Rhamnolipid as an Agent for Enhanced Oil Recovery. *Biotechnology and Bioengineering* , 98 (4), 842-853.
- Wei, Y.-H., Cheng, C.-L., Chien, C.-C., & Wan, H.-M. (2008). Enhanced di-rhamnolipids production with an indigenous isolate *Pseudomonas aeruginosa* J16. *Process Biochemistry* , 43, 769-774.
- Wen, J., Stacey, S. P., McLaughlin, M. J., & Kirby, J. K. (2009). Biodegradation of rhamnolipid, EDTA and citric acid in cadmium and zinc contaminated soils. *Soil Biology & Biochemistry* , 41, 2214-2221.
- Wu, J.-Y., Yeh, K.-L., Lu, W.-B., Lin, C.-L., & Chang, J.-S. (2008). Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. *Bioresourse Technology* , 99, 1157-1164.
- Zacarias, M. (2009). In situ and Ex situ Phytoextraction of Ni, As and Cu from contaminated soil. *Master Degree on environmental science and engineering thesis, universidad autonoma Metropolitana-Azcapozalco, Mexico* .
- Zhang, G. L., Wu, Y. T., Qian, X. P., & Meng, Q. (2005). Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. *Journal of Zhejiang University SCIENCE* , 6B (8), 725-730.
- Zhang, Y., & Miller, R. M. (1994). Effect of a *Pseudomonas* Rhamnolipid Biosurfactant on Cell Hydrophobicity and Biodegradation of Octadecane. *Applied and Environmental Microbiology* , 60 (6), 2101-2106.
- Zhu, Y., Gan, J. J., Zhang, G. L., Yao, B., Zhu, W. J., & Meng, Q. (2007). Reuse of waste frying oil for production of rhamnolipids using *Pseudomonas aeruginosa* zju.u1M. *Journal of Zhejiang University science A* , 8 (9), 1514-1520.
- Zoueki, C. W., Tufenkji, N., & Ghoshal, S. (2010). A modified microbial adhesion to hydrocarbons assay to account for the presence of hydrocarbon droplets. *Journal of Colloid and Interface Science* , 344, 492-496.

## 10. Anexos

### Anexo 1. Curva estándar de L-ramnosa



### Anexo 2. Método de Du Nouy para determinar tensión superficial y método grafico para determinar CMC.

La tensión superficial puede ser determinada con apoyo de un tensiómetro de Du Nouy (Figura 10-1) el cual usa un anillo de platino e iridio, el método se basa en medir la fuerza necesaria para separar un anillo de la superficie, bien suspendido el anillo del brazo de una balanza, o utilizando un sistema de hilo de torsión. La fuerza para despegarlo está relacionada con la tensión superficial o interfacial por la expresión:

$$\gamma = \frac{\beta * \epsilon}{4 * \pi * r}$$

Donde  $\gamma$  es la tensión superficial,  $\epsilon$  es el empuje aplicado al anillo en dinas;  $r$  es el radio medio del anillo y  $\beta$  es un factor de corrección. Para tener un ángulo de contacto cero, se utilizan anillos de platino perfectamente limpios. Es esencial que el anillo repose plano sobre la superficie líquida. La tensión superficial actúa sobre toda la circunferencia de este anillo, y la nueva superficie que se forma posee dos lados. Al momento de la ruptura, el peso del líquido desprendido será igual al producto de la

tensión superficial por dos veces (la superficie externa y la superficie interna) el perímetro del círculo. Si  $m$  es la masa medida, se puede escribir:

$$P = m \cdot g = 2 \rho \cdot d \cdot g$$

$$g = m \cdot g / 2 \rho d = m \cdot g / 4 \rho r$$

En realidad es necesario tomar en cuenta un factor de corrección el cual varía de 0.75 a 1.07 que depende de una pequeñísima porción de líquido que quedó adherido (Martínez, 2005).



Figura 10-1. Se ilustran las principales partes del tensiómetro de Du Nouy.

#### Procedimiento:

1. Se recomienda usar el tensiómetro con la puerta abierta sin cerrarla hasta el final de sus determinaciones (Figura 10-1).
2. La determinación de la tensión superficial para el agua (como blanco para notificar si el equipo está ajustado) o las muestras problema, inicia con la preparación de la muestra. Use 35 mL de muestra y ubíqueles en un recipiente de 70 x 50 cm de la marca PYREX. Procure que los recipientes estén limpios y secos, además es recomendable lavar los recipientes con agua desionizada pues la tensión superficial de la muestra podría variar con la presencia de sales del agua potable.
3. Prepare el tensiómetro valiéndose de la gota de ajuste de equilibrio y ubicando en posición elevada la palanca (Figura 10-1).
4. Ubique el recipiente con la muestra en la plataforma, con el tornillo de la plataforma súbala totalmente.

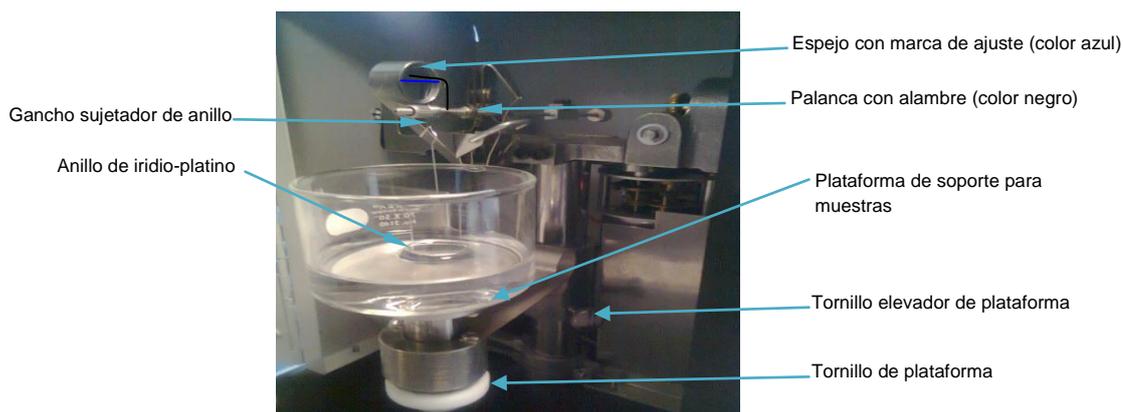
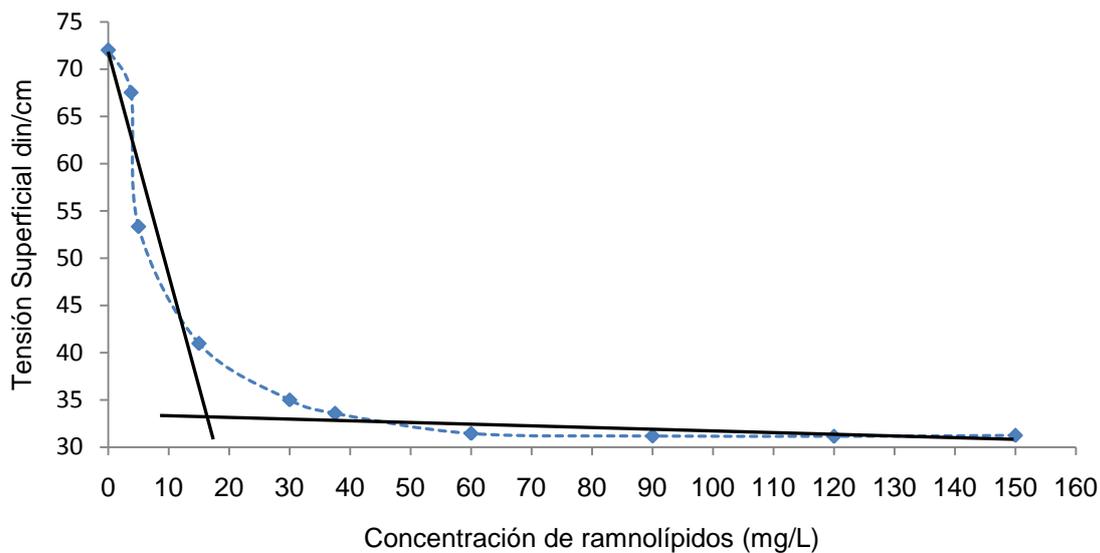


Figura 10-2. Compartimento interior del tensiómetro.

5. Del anillo de iridio-platino previo a su uso, debe cerciorarse de que este limpio y sin modificaciones en su forma. Para limpiar el anillo, suméjalo en acetona durante unos segundos, sáquelo y acérquelo a la flama de una lámpara de alcohol para que el solvente se evapore. Evite que el alambre del anillo se caliente hasta el tener un tono anaranjado. Finalmente colóquelo en el gancho sujetador de la palanca del tensiómetro.
6. Con ayuda del tornillo elevador de la plataforma, ubíquela hasta sumergir el anillo 2 mm aproximadamente por debajo de la interface aire/solución de la muestra. Nota: el tornillo elevador de plataforma solo mantiene inmóvil la plataforma de manera que para subir y bajar la plataforma debe emplear sus manos (Figura 10-2).
7. Use el ajustador externo del anillo para sobreponer el alambre de la palanca con la línea dibujada en el espejo con marca de ajuste. Debido al volumen de la muestra será necesario reacomodar constantemente el anillo a la interface aire/solución (paso 6) hasta sobreponer completamente la marca con el alambre lo cual indica que la muestra está en posición correcta para determinar la tensión superficial.
8. Use el ajustador de escala numérica para ubicar en cero (punto inicial) la guía de la escala numérica.
9. Arranque el proceso de determinación de la tensión superficial con el interruptor.
10. Durante el proceso de determinación notara que el anillo sube constantemente tratando de alejarse de la solución, provocando que la marca del espejo se separe del alambre de la palanca, para evitar que esto use el tornillo de plataforma que servirá para reacomodar la marca del espejo con el alambre de la palanca.

11. Cuando el anillo de ha separado totalmente de la solución, el equipo en automático de apaga, puede tomar el valor de la tensión superficial.

La CMC se puede determinar mediante el método gráfico que consiste en tomar el punto de intersección entre las dos rectas que se ajustan a los puntos que describen el perfil de la tensión superficial tal como se presenta a continuación.



Las rectas deberán pasar por el mayor número de puntos experimentales posibles. El valor de la CMC no es exacto por este método, aunque para fines del presente proyecto el valor obtenido es útil.

### Anexo 3. Extracción de hidrocarburos con equipo soxhlet y determinación de humedad

Se colocaron de 3 a 5 g de suelo seco (a temperatura ambiente) en un cartucho de celulosa de 35 mm de diámetro x 80 mm de altura (*Whatman*) con sulfato de sodio anhidro en una relación suelo-sulfato 1:1. Cada cartucho fue ubicado dentro de la camisa extractora del equipo soxhlet, se adicionaron  $125 \pm 5$  mL de n-hexanos en un matraz de bola, se permitió que se desarrollaran 80 ciclos de sifoneo del solvente en el soxhlet. Posterior a la extracción, el solvente fue evaporado con ayuda de un roto-evaporador (*Yamato*, modelo *RE 300*) hasta que los hidrocarburos se concentraran en una cantidad mínima de solvente. Los recipientes con el extracto de hidrocarburos y solvente fueron totalmente sacados en un horno a 60 °C durante 24 h. Por diferencia de peso se calculo la cantidad de hidrocarburos y se reporto en mg HTP/Kg en base seca (SEMARNAT, 2003).

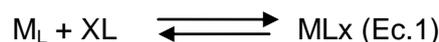
La humedad para cada muestra de suelo fue determinada como a continuación se describe: 1 g de suelo el fue ubicado en un recipiente previamente seco y a peso constante, después se sometieron a secado en un horno a 100 °C durante 24 h, posteriormente se peso el recipiente con el suelo seco.la siguiente ecuación usada para calcular la humedad.

$$H = \frac{(P2 - P3)(100)}{P3 - P1}$$

Donde: H es la humedad (%), P1 es recipiente sin suelo (mg), P2 es recipiente con suelo húmedo (mg) y P3 es recipiente con suelo seco (mg) (Fernández *et al.*, 2006).

## Anexo 5. Cálculo de constantes de estabilidad entre ramnolípidos y metales

El cálculo de las constantes de estabilidad, sigue el principio del equilibrio del intercambio iónico. Fue utilizado para investigar la totalidad de la composición y la afinidad relativa de un número de metales para complejos con ramnolípidos. Las reacciones de equilibrio de metales con ligandos orgánicos y con resina de intercambio iónico son:



Donde  $M_L$  es el metal libre en solución en equilibrio en un sistema que contiene ligando orgánico (mol/L),  $M_R$  es el metal libre en la solución en equilibrio en un sistema libre de ligando orgánico (mol/L), X es el numero de moles del ligando orgánico combinado con 1 mol de ion metálico (mol/mol), L es el ligando orgánico soluble (mol/L), R es la resina de intercambio iónico (Kg/L), y MR es el metal unido a la resina de intercambio iónico en el equilibrio por unidad de peso (mol/Kg).

De las reacciones de formación de complejos (Ec. 1), la constante de equilibrio, llamada como constante de estabilidad, K, puede ser determinada usando la ecuación:

$$K = [ML_x]/[M] [L]^x \text{ (Ec.3)}$$

En equilibrio, el cociente de la distribución de metales entre MR y  $M_R$  en ausencia del agente acomplejante es una constante,  $\xi^\circ$ :

$$\xi^\circ = MR/ M_R \text{ (Ec.4)}$$

Y la constante de distribución en la presencia del agente acomplejante,  $\xi$ , es:

$$\xi = MR/( M_L + ML_x) \text{ (Ec.5)}$$

Una determinación experimental de las constantes de distribución de metales (Eq. 4 y Eq. 5) puede ser desarrollada y una constante de estabilidad condicional,  $\log K$ , puede ser obtenida a través de la relación lineal:

$$\log ((\xi^\circ/\xi)-1) = \log K + X \log L \text{ (Ec.6)}$$

El valor desconocido de X y  $\log K$  pueden ser determinados separadamente para cada metal de la pendiente y el intercepto, respectivamente, de la gráfica de  $\log ((\xi^\circ/\xi)-1)$  contra  $\log L$ , donde L es la concentración de ramnolípidos (Ochoa-Loza *et al.*, 2001).

## Anexo 5. Propiedades químicas de los metales pesados

De acuerdo Petrucci, (1986) se defeniran los siguientes terminos.

**Densidad:** es la masa de una sustancia dividida por su volumen, es una propiedad intensiva, es decir su valor solamente depende de variables tales como la temperatura y la presión, pero no de la cantidad de material elegido.

**Peso atómico:** es una cantidad física adimensional definida como la razón de las masas promedio de los átomos de un elemento (de un origen dado) a 1/12 de la masa de un átomo de carbono-12.

**Número atómico:** H. G. J. Moseley (1887-1915) publico en el año de 1913 los resultados de varios experimentos donde se habían usado varios elementos, o sus compuestos, como blancos en un tubo de rayos X. Ciertas propiedades de los rayos X generados, en particular sus longitudes de onda, variaban de acuerdo con el material empleado. Moseley pudo relacionar estas longitudes de onda mediante una ecuación matemática en la que se debía asignar a cada elemento un número entero único. Estos números enteros los denomino números atómicos; el resultado más notable es que estos números coincidían con la carga nuclear descrita por Rutherford.

**Electronegatividad:** describe la tendencia de un átomo a competir por electrones con otro, al que se encuentra unido.

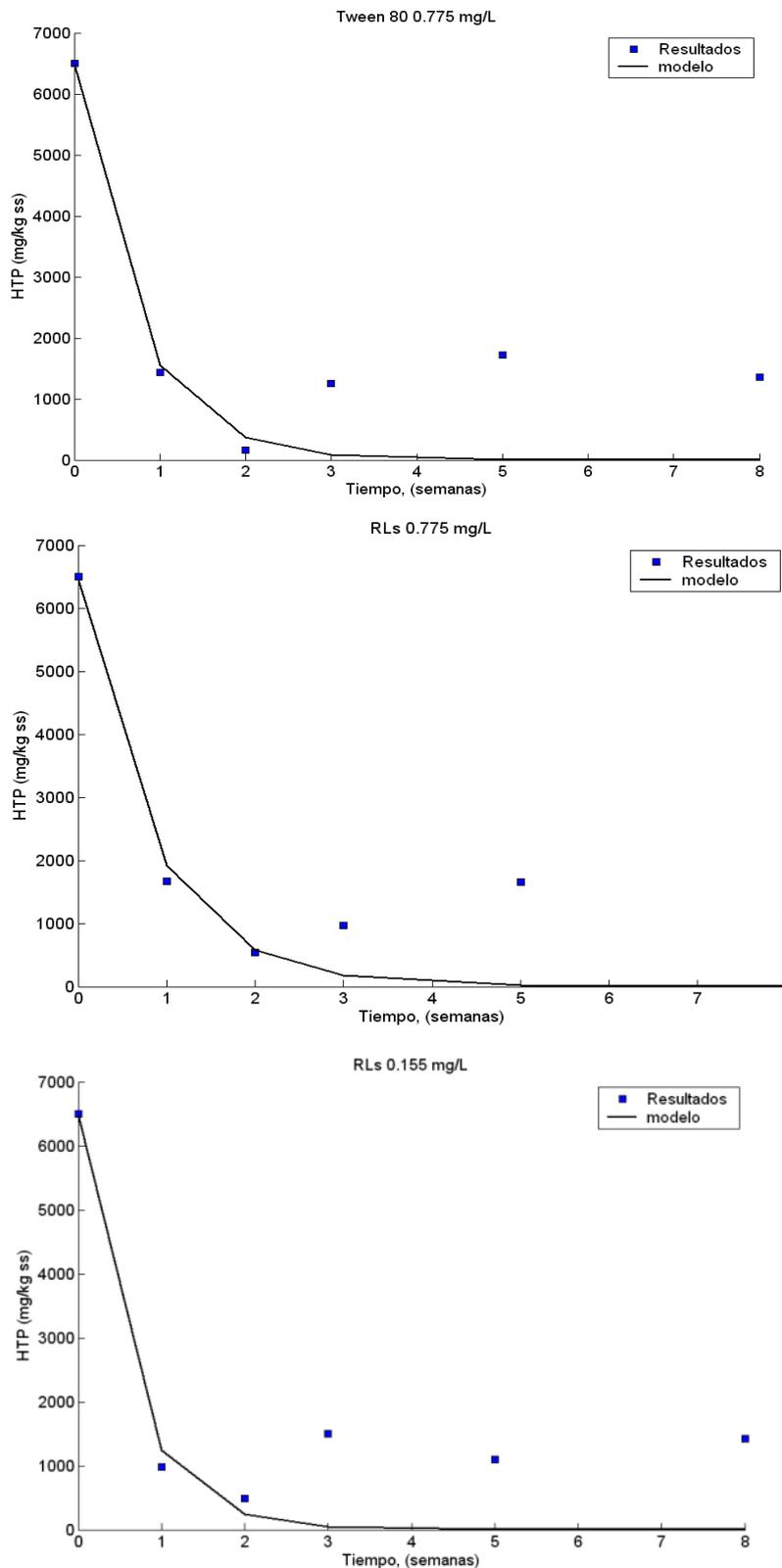
**Radió atómico:** se considera como la mitad de la distancia entre los centros de átomos adyacentes.

**Radio iónico:** se basa en la distancia entre los centros de los iones en un compuesto iónico.

**Radio Covalente:** es la mitad de la distancia entre los centros de dos átomos idénticos unidos entre sí covalentemente.

**Potencial primero de ionización:** la pérdida de electrones por los átomos puede suceder por iluminación de un material adecuado con luz de frecuencia apropiada (efecto fotoeléctrico); por calentamiento de ciertos materiales (efecto termoiónico); y por colisiones entre un haz de electrones y átomos gaseosos. En todo caso, en condiciones ordinarias ningún átomo tiende a perder electrones espontáneamente; debe absorber energía para que pueda ionizar. La energía de ionización o el potencial primero de ionización de un átomo es la cantidad de energía que debe absorben un átomo gaseoso para que logre separar el electrón menos firmemente sujeto.

## Anexo 6 Perfiles de degradación de HTP por bioestimulación en presencia de tensoactivos



## Anexo A

Los resultados del presente proyecto fueron presentaron en los siguientes eventos:

1. Foro ambiental 2011 cualli ohtli ingeniería e investigación, el camino de hoy hacia el futuro, en la modalidad de cartel con el trabajo que llevó por nombre: *Producción de un biotensoactivo microbiano y su aplicación en el lavado de suelos contaminados.*
2. Sociedad Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal en la modalidad de cartel con el trabajo que llevó por nombre: *Producción de un ramnolípido por Pseudomonas aeruginosa y su aplicación en el lavado y biodegradación de HTP presentes en suelos contaminados.* Durante el segundo congreso, Cancún Q. Roo-México.
3. XIV Congreso nacional de Biotecnología y Bioingeniería en la modalidad de cartel con el trabajo que llevó por nombre: *Producción de ramnolípidos y aplicación en el lavado y biodegradación de contaminantes en suelo.* En Juriquilla Querétaro.