

---

## Evaluación de la biorremediación aplicando mezclas de surfactante-solvente en suelo contaminado con diesel

H.H. Riojas-González<sup>1\*</sup>, P. Gortáres-Moroyoqui<sup>1</sup>, I. Mondaca-Fernández<sup>1</sup>, J.J. Balderas-Cortes<sup>1</sup> y L.G. Torres-Bustillos<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de Febrero 818 Sur, Colonia Centro, Cd. Obregón, Sonora, C.P. 85000.

<sup>2</sup>UPIBI-Instituto Politécnico Nacional, Av. Acueducto s/n Colonia Barrio La Laguna Ticomán, México, D.F. C.P. 07340.

---

*Evaluation of surfactant-solvent mixtures for bioremediation of contaminated soil.*

### Abstract

Among various technologies for the remediation of contaminated soils with diesel, bioremediation and soil washing emerges as effective alternatives, in both treatments can be applied surfactants. These surfactants can act in synergy with other substances, which is demonstrated through of surface tension analyses. Individual surfactants and formulations were assayed, in order to find the ideal mixture. Once it was chosen the effect of a surfactant-solvent mixture was studied. Two treatments were evaluated in a soil contaminated with diesel at a concentration of 5,950 mg kg<sup>-1</sup> of total petroleum hydrocarbons, the first treatment corresponds to soil washing and the second was a biological treatment. The best results were obtained with mixture Tween 80 with D-Limonene with the highest concentration studied (10,000 mg kg<sup>-1</sup>) for soil washing, achieving 80% of removal. However, for bioremediation better results were obtained with the lowest doses tried (2 mg kg<sup>-1</sup>) with a 78.6% of removal for 50 days. When mixtures of surfactants were used (or added) in soil washing and bioremediation an increase of 60 and 25% of removal was achieved respectively, in comparison without. Therefore, results obtained in this study permit to argue that desorption and removal is improved in both systems. In addition there was a better efficiency by removing the oil by soil washing and facilitated the solubility and bioavailability of petroleum compounds in the case of biological treatment.

*Key words:* surfactant solution, soil washing, D-limonene, kinetic.

### Resumen

Entre las diferentes tecnologías para la remediación de suelos contaminados con diesel, la biorremediación y el lavado de suelo emergen como alternativas efectivas. En ambos tratamientos es posible aplicar surfactantes, los cuales pueden presentar sinergias con otras sustancias, como lo demuestra el análisis de la tensión superficial.

Se realizó una selección de formulaciones y surfactantes individuales, con la finalidad de encontrar la mezcla ideal para los experimentos, una vez escogidas estas, se estudió el efecto de la mezcla surfactante-solvente, compuesta por una solución del surfactante no iónico (Tween 80 o Surfapol 906), más el solvente natural D-Limoneno. Se evaluaron dos tratamientos en un suelo contaminado con diesel a una concentración de 5,950 mg kg<sup>-1</sup> de hidrocarburos totales de petróleo, el primer tratamiento corresponde a un lavado de suelo y el segundo tratamiento fue de tipo biológico. Los mejores resultados se obtuvieron con la mezcla Tween 80 con D-Limoneno, con la dosis más alta (10,000 mg kg<sup>-1</sup>) para el caso del lavado de suelo, logrando una remoción del 80%, mientras que en la biorremediación, la mayor remoción se alcanzó con la dosis más baja (2 mg kg<sup>-1</sup>) con 78.6% durante 50 días. Se obtuvo un incremento en el lavado del suelo y biorremediación del 60 y 25% respectivamente, agregando la mezcla de surfactantes en contraste de no hacerlo. Estos resultados permiten argumentar que puede existir una mejora en la desorción y remoción entre ambos tratamientos. Al final, se observó una mejor eficiencia al remover el hidrocarburo por lavado de suelo y se facilitó la solubilidad y la

---

\*Autor de correspondencia  
Email: h.riojas@gmail.com

biodisponibilidad de los compuestos del petróleo para el caso del tratamiento biológico.

*Palabras clave:* mezcla de surfactantes, lavado de suelo, D-limoneno, cinética.

## Introducción

El petróleo y sus derivados así como otros combustibles fósiles son la principal fuente de energía para las actividades humanas (Raiger-Iustman y López, 2009). El uso masivo y la transportación del petróleo y sus derivados, ocasionan frecuentes derrames, por lo que la contaminación por hidrocarburos es una de las principales causas de destrucción de los ecosistemas edáficos, ya que el uso masivo y el transporte, hace que los derrames de hidrocarburos sean cada vez más frecuentes (Fontúrbel, 2004). El diesel es de los combustibles más usados en la actualidad, tiene una composición constituida por 31.0% aromáticos, 64.1% parafinas y 4.9% olefinas (Tat y Gerpen, 2000), lo cual lo hace más difícil de tratar que la gasolina o el gasoil. Esto puede ser debido a su alta viscosidad, baja movilidad, baja volatilidad y baja biodegradabilidad. Además contiene compuestos más recalcitrantes por lo tanto, los suelos contaminados con diesel se han considerado como un problema en el medioambiente (Fontúrbel, 2004).

Los tratamientos fisicoquímicos y biológicos permiten la recuperación de sitios contaminados. Existe una amplia gama de tecnologías de remediación de suelos contaminados, la biorremediación representa una de las técnicas más usadas (Johnsena *et al.*, 2005), ya que no producen agresiones en el entorno. Sin embargo la dimensión de la contaminación, la complejidad o toxicidad del contaminante y el tiempo requerido para el desarrollo del proceso de descontaminación no la hacen adecuada en todos los casos (Lobo, 2002). En cuanto a los tratamientos fisicoquímicos, el lavado de suelo es una de las técnicas más utilizadas.

Tanto en los tratamientos fisicoquímicos como en los biológicos se pueden emplear surfactantes. Los surfactantes catiónicos no son adecuados en la remediación debido a su toxicidad, igualmente los aniónicos no son recomendables debido a que pueden formar precipitados con cationes y por lo tanto causan una reducción de la conductividad hidráulica del suelo mediante el bloqueo de los poros (Sun *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2005). Los no

iónicos suelen tener menor toxicidad, mayor biodegradabilidad y aplican a valores bajos de concentración micelar crítica (CMC), por lo tanto son los más recomendados para mejorar la eficiencia de remoción, sea mediante lavado o por biorremediación (Chu, 2003). Para el lavado de suelo se agrega el surfactante con el objeto de trasladar el contaminante de una fase sólida a un medio acuoso empleando la propiedad más importante del surfactante que es su capacidad de adsorberse en interfases (Rivas y Gutiérrez, 1999), mientras en el caso de la biorremediación el surfactante puede mejorar la biodegradación, aumentando la solubilidad y la biodisponibilidad del hidrocarburo a los microorganismos degradadores (Singh *et al.*, 2007). Urum *et al.* (2004), señalan que la remoción del hidrocarburo es atribuido a la reducción de las tensiones de superficie e interfase ocurrido por el aumento de movilidad, originando una reducción de las fuerzas capilares del suelo y de hidrocarburo, por lo que la tensión superficial es un parámetro a tener en cuenta para evaluar la remoción del contaminante. El valor del balance lipofílico-hidrofilico (HLB por sus siglas en ingles), es un parámetro empírico que describe la contribución relativa de la fracción hidrofílica con el peso de la molécula de surfactante; este valor también tiene una relación directa con la tensión superficial (Torres y Zamora 2002). Los surfactantes pueden mejorar la eficiencia de remoción si se mezclan con otras sustancias que ocasionen sinergias. En el presente trabajo se describe y analiza la remoción de hidrocarburos en suelos aplicando mezclas de surfactante-solvente tanto para el lavado de suelo como para la biorremediación.

## Material y Métodos

### *Caracterización del suelo*

Las muestras de suelo fueron tomadas de los alrededores de una terminal de almacenamiento y distribución de petróleo de la región de Cd. Obregón, Sonora. Las muestras, fueron secadas a temperatura ambiente y a la sombra, con la finalidad de reducir la humedad logrando con esto, un factor

constante en todas las determinaciones experimentales. Una vez secado el suelo, se molió en mortero y se cribó en un tamiz de malla 10 (apertura de 2 mm), se verificó que el suelo no tuviera HTP, posteriormente se contaminó con 5,950 mg kg<sup>-1</sup> de diesel, se homogeneizó la muestra en toda la matriz de suelo y se dejó en reposo por siete días para favorecer el equilibrio entre los hidrocarburos y las partículas del suelo. Posteriormente se taparon las muestras colocando una película plástica para evitar volatilización y contaminación, se le agregó una contratapa elaborada con plástico y se conservaron a temperatura ambiente. Se analizó el suelo para definir sus características físicas y químicas mediante la determinación de los siguientes parámetros y métodos: el análisis de textura se realizó con el método del hidrómetro de Bouyoucos (Bouyoucos, 1962.), el pH (ASTM D4972-89, determinación potenciométrica del suelo en agua a una relación 2.5:1) y materia orgánica con el método de Walkley-Black (Allison, 1965).

*Obtención de la mezcla de surfactantes más apropiada para la remediación*

Se estudiaron 10 surfactantes y ocho mezclas (Tabla 1) con la finalidad de determinar la mezcla o surfactante más apropiado para los experimentos de lavado y biorremediación de suelo. En todos los casos se aplicó una sola dosis. Para el lavado fue de 10,000 mg kg<sup>-1</sup> y para la biorremediación se le agregó una concentración de 2 mg kg<sup>-1</sup>. Una vez

identificada la mezcla elegida con base en los resultados, se aplicaron tres dosis para ambos tratamientos, de acuerdo a lo recomendado por López et al. (2004), y Torres et al. (2004), (lavado de suelo y biorremediación).

*Evaluación de la mejor dosis del lavado de suelo*

En esta etapa se analizaron tres dosis de las mezclas seleccionadas, se siguió la técnica propuesta por López et al. (2004), e Iturbe et al. (2008). Las pruebas se realizaron en recipientes de 600 ml, en las cuales se pusieron 60 g de suelo contaminado, se adicionaron 200 ml de agua. Las dosis estudiadas de mezcla surfactante-solvente en esta prueba fueron de 0.1, 0.5 y 1% (peso de surfactante/peso del suelo contaminado) equivalente a 1,000, 5,000 y 10,000 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Los recipientes fueron puestos en un agitador rotatorio a 150 r.p.m. por 24 h, después de este período se dejaron sedimentar para retirar el sobrenadante y la muestra de suelo fue secada a temperatura ambiente. A las muestras secas se les determinó la concentración final de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) por extracción Soxhlet de acuerdo con la norma mexicana vigente (NMX-AA-134-SCFI-2006), la remoción de hidrocarburos se calculó mediante la ecuación 1.

$$n = \left[ \frac{HTP_i - HTP_f}{HTP_i} \right] * 100 \quad (1)$$

Donde  $n$  es la eficiencia de remoción de HTPs, en %,  $HTP_i$  es la concentración inicial de

**Tabla 1. Características de los surfactantes, solventes y mezclas que se aplicaron.**

Surfactante	Tipo	Características	Masa molar (g/mol)
<sup>1</sup> Tween 20	no iónico	Monolaurato de Sorbitán Etox	1227.52
<sup>1</sup> Tween 60	no iónico	Monoestearato de Sorbitán Etox	1311.68
<sup>1</sup> Tween 80	no iónico	Monooleato de Sorbitán Etox	1308
<sup>1</sup> Tween 85	no iónico	Trioleato de Sorbitán Etox	NR
<sup>2</sup> Surfacpol 906	no iónico	Nonilfenol Etoxilado	483
<sup>3</sup> Arlatone T	no iónico	Éter con D-glucitol	NR
<sup>3</sup> Butil Carbitol	solvente	Monobutil eter dietilenglicol	162.23
<sup>3</sup> Butil Cellosolve	solvente	2-Butoxietanol	118.2
<sup>3</sup> Monoetilenglicol	solvente	Glicol de etileno-Anticongelante	62.06
<sup>3</sup> D-Limoneno	solvente	Terpeno cítrico	136.24
<sup>4</sup> Mezcla 1	mezcla	Tween85-Tween60-Arlatone T	NR
<sup>4</sup> Mezcla 2	mezcla	Tween20-Tween85-Arlatone T	NR
<sup>4</sup> Mezcla 3	mezcla	D-Limoneno-Butil Carbitol	NR
<sup>4</sup> Mezcla 4	mezcla	Tween80-Monoetilenglicol	NR
<sup>4</sup> Mezcla 5	mezcla	Surfacpol-Butyl Cellosolve	NR
<sup>5</sup> Mezcla 6	mezcla	D-Limoneno-Tween80	NR
<sup>5</sup> Mezcla 7	mezcla	D-Limoneno-Butil Cellosolve	NR
<sup>5</sup> Mezcla 8	mezcla	D-Limoneno-Surfacpol	NR

<sup>1</sup>Lee et al. (2005), <sup>2</sup>Torres et al. (2003), <sup>3</sup>IPCS (1994), <sup>4</sup>Riley (2000), <sup>5</sup>Matta (1985) NR: No Reportado

hidrocarburos totales de petróleo en el suelo, base seca ( $\text{mg kg}^{-1}$ ), HTPf es la concentración final de hidrocarburos totales de petróleo en el suelo, después del tratamiento en lote, base seca ( $\text{mg kg}^{-1}$ ).

*Análisis de la tensión superficial*

El análisis de la tensión superficial de los surfactantes elegidos, se realizó con un tensiómetro manual Fisher (USA). Los promedios de 2 mediciones se evaluaron diluyéndose en agua destilada para los surfactantes y para las mezclas surfactante-solvente (mezcla de surfactantes con D-Limoneno), se prepararon en tres concentraciones 1%, 0.5% y 0.1% (v/v) y se evaluaron por duplicado.

*Evaluación del comportamiento cinético durante el proceso de la biorremediación.*

En esta etapa el experimento se llevó a cabo en columnas compuestas por cloruro de polivinilo (PVC) de 10 cm de altura y un diámetro de 5 cm, en un diseño tipo Raimbault (Raimbault y Alazard, 1980) (fermentador en medio sólido para controlar la humedad y aireación) con capacidad de almacenar hasta 40 g de suelo por columna (Figura 1). 30 g de suelo contaminado fueron agregados a cada columna, se adicionó solución mineral de Rennie modificado (Tabla 2), se mantuvo una velocidad de aireación de 1 VVM (volumen de aire/volumen de líquido-minuto) y la humedad fue entre 30 y 70%.

**Tabla 2. Componentes de la solución mineral de Rennie.**

Componentes	Concentración ( $\text{g l}^{-1}$ )
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1.5
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.5
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	2.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
NaCl	0.5
$\text{FeSO}_4 + \text{EDTA}$	1 ml

Las pruebas consistieron en determinar la eficiencia de la biorremediación durante 50 días aplicando mezclas de surfactantes al suelo contaminado, las dosis empleadas fueron de 2, 5 y 10  $\text{mg kg}^{-1}$ . Se realizó el experimento con dos tipos de mezclas de surfactantes y también se trabajó en columnas sin surfactante. La toma de muestras fue de tipo muestreo destructivo y se tomaron muestras por cada 10 días.

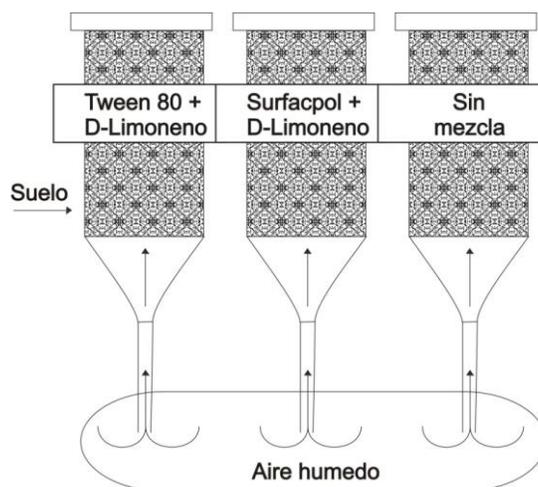
*Determinación de la remoción y cuenta en placa*

La determinación de los hidrocarburos totales de petróleo se realizó por medio de la extracción por Soxhlet de acuerdo con la norma mexicana vigente (NMX-AA-134-SCFI-2006). La determinación de la población de bacterias heterótrofas se realizó por cuenta en placa de acuerdo con las normas mexicanas vigentes (NOM-110-SSA1-1994 y NOM-092-SSA1-1994).

*Cinética de biodegradación*

El modelo del proceso biológico se simuló a partir de la reacción cinética de primer orden:

$$C = C_0 \exp(-kt)$$



**Figura 1. Diseño de columnas tipo Raimbault que se emplearon en el tratamiento biológico.**

Donde:

C = concentración de diesel a un tiempo t.

C<sub>0</sub>= Concentración inicial de diesel,

t= tiempo de residencia.

k = constante cinética de biodegradación.

#### Tratamiento estadístico de los resultados

En todos los casos una vez que fue verificado el cumplimiento de la distribución normal de los datos de remoción de hidrocarburos mediante la prueba de Shapiro Wilk y la homogeneidad de varianzas por el método de Bartlett cumplidos estos dos supuestos, se realizó un análisis de varianza con un diseño de estructura bifactorial para determinar la relación entre las variables a través del tiempo y la prueba de comparación de medias por rangos múltiples de Duncan. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, los testigos y la tensión superficial se llevaron a cabo por duplicado. Para la evaluación de los datos fueron procesados con el programa estadístico Infostat, versión 1.1.

### Resultados y discusión

#### Caracterización del suelo

El suelo de estudio tiene una textura franco arcillo-arenoso, con predominancia de arenas (arena 71.96%, limo 0.52% y arcilla 27.52%), esta composición puede ser un indicativo de que el proceso de biorremediación es viable (Gaceta Oficial, 1998), con buena permeabilidad y bien estructurado, con pH ligeramente alcalino (pH de

8.67) y contenidos bajos de materia orgánica (1.01%) y con ello, bajos contenidos de N y P. Cabe señalar que las variaciones que puedan tener por lo general las partículas de suelo (textura) y pH durante un derrame de hidrocarburos son mínimas, no ocurriendo del mismo modo en presencia de la materia orgánica (Martínez y López, 2001).

#### Identificación de las mezclas de surfactantes elegidas

Se eligieron dos mezclas de surfactantes con solvente con base en los mejores porcentajes de remoción (Tabla 3), los cuales se utilizaron para el lavado y biorremediación. De acuerdo con dichos resultados se decidió aplicar; Tween 80 (Croda, México), y Surfapcol 906 (Polaquimia, México). A cada surfactante se le adicionó con D-Limoneno (Industrias Sikita, México), en una proporción del 50% (v/v).

#### Evaluación de la mejor dosis del lavado de suelo

Los dos tipos de mezclas de surfactantes removieron el diesel: En los resultados del lavado hay evidencias estadísticas para aceptar el supuesto de distribución normal (P<0.05). Estos resultados demuestran claramente la eficiencia de la mezcla de Tween 80 con D-Limoneno con su dosis más alta, como puede observarse en la figura 2. Al realizar el análisis de varianza, se obtuvieron diferencias altamente significativas (P<0.001), entre las variables de clasificación (mezclas de surfactantes y dosis), con relación a su variable dependiente que

Tabla 3. Resultados de los dos tratamientos realizados en el suelo contaminado con diesel.

Surfactante	Lavado de suelo	Biorremediación
	% remoción Dosis 10,000 mg kg <sup>-1</sup>	% remoción Dosis 2 mg kg <sup>-1</sup>
Mezcla 6	80.35	78.15
Mezcla 8	61.33	68.85
Surfapcol	63.85	60.40
Tween 85	48.45	61.40
Mezcla 7	72.7	51.95
Tween 80	62.05	52.25
Tween 20	66.7	53.40
Mezcla 2	59.0	50.90
Tween 60	57.3	50.35
Butil Carbitol	40.45	45.35
Mezcla 3	57.6	42.70
Mezcla 1	58.5	42.35
Monoetilenglicol	53.2	30.20
Mezcla 5	48.95	26.10
D-Limoneno	46.5	25.00
Mezcla 4	42.3	24.65
Arlatone T	64.65	18.50
Butil Cellosolve	36.6	18.40

fue la remoción de HTP. Según la prueba de comparación de medias de rangos múltiples de Duncan dichos valores difieren significativamente ( $P < 0.05$ ), con el resto de los tratamientos. El tratamiento mezcla Tween 80 con D-Limoneno en su dosis de  $10,000 \text{ mg kg}^{-1}$  presentó una remoción del 80%; en las dosis de  $5,000$  y  $1,000 \text{ mg kg}^{-1}$  tuvieron un porcentaje de remoción del 58 y 39% respectivamente. Para el caso de la mezcla Surfapcol 906 con D-Limoneno, se tuvieron remociones bajas, en las dosis de  $10,000$ ,  $5,000$  y  $1,000 \text{ mg kg}^{-1}$  su porcentaje de remoción fue del 61.2, 44.5 y 36.5% respectivamente. También se realizó el lavado de suelo sin surfactantes, es decir se realizaron lavados con agua solamente, y estas obtuvieron una remoción del 20%. Estos resultados nos indican que el Tween 80 tuvo una mejor sinergia con el D-Limoneno que el Surfapcol 906. Cuando se realizaron los lavados de suelo con los surfactantes individuales, el resultado con el Tween 80 individual obtuvo una remoción del 62%. Resultado similar fue reportado por López *et al.* (2004), cuando evaluaron la remoción más alta de distintos surfactantes (con dosis del 0.1%) al realizar el lavado de suelo, el mejor resultado lo encontró con el Tween 80 con un 69.4%, seguido por el Surfapcol 906 con 53.53% y finalmente el SDS con 45.86%. Kang *et al.* (2010), reportaron que los surfactantes con un mayor HLB (Balance Lipofílico-Hidrofílico) como es el caso de las series de Tweens (Tween 80, Tween 60 y Tween 20), dan lugar a una mayor solubilidad. La solubilidad y el HLB están relacionados con la estructura del surfactante y finalmente concluyeron que los surfactantes de

HLB 5-15 se consideran adecuados para la solubilización de hidrocarburos en el suelo.

El Tween 80 fue el surfactante que mejor removió los HTP del suelo contaminado y mejoró considerablemente cuando se mezcló con el D-Limoneno del 62 al 80% en una dosis específica ( $10,000 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Cabe señalar que la dosis alta obtuvo la mejor remoción y esto se puede deber a que de alguna manera se diluye con el solvente (D-Limoneno). Estos resultados se pueden explicar probablemente por dos razones más: 1. La posible sinergia que pueda existir entre la molécula del D-Limoneno y la micela del surfactante ocasionando una ampliación del tamaño en el núcleo y con un avance en la capacidad de separación del contaminante por las micelas, 2. Por la relación del HLB y tensión superficial donde el Tween 80 obtuvo valores superiores al Surfapcol y se acrecentó con la ayuda del D-Limoneno.

#### *Análisis de la tensión superficial de las mezclas escogidas*

La tensión superficial para el Tween 80 con las dosis de 0.1%, 0.5% y 1%, fueron de 48.33, 41 y  $42.1 \text{ dinas cm}^{-1}$  respectivamente, esto nos indica que a menor dosis mayor tensión superficial. En el caso del Surfapcol con las dosis 0.1%, 0.5% y 1%, los valores obtenidos fueron de 32, 31.25 y  $31.5 \text{ dinas/cm}$  respectivamente, se puede observar que su variación es mínima en cuanto a la dosis con la tensión superficial. Torres y Zamora (2002), reportan que existe una relación directa entre la tensión superficial y los valores de HLB, es decir a mayor HLB, mayor tensión superficial. Por lo tanto se puede apreciar que el Tween 80 con un valor de

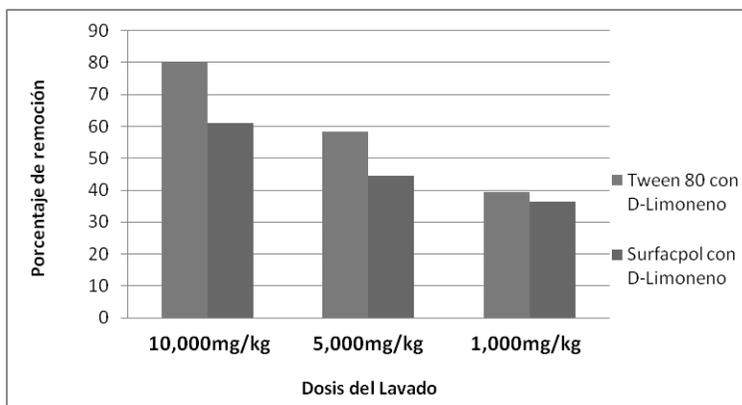


Figura 2. Porcentajes de remoción de HTP mediante el lavado de suelo, con las mezclas elegidas y sus tres dosis.

15 HLB tiene una tensión superficial mayor comparándolo con el Surfapcol que tiene un valor de 11 HLB. Youssef *et al.* (2007), reportan que para superar las fuerzas capilares que atrapan al hidrocarburo de un suelo contaminado, se requiere de la reducción de la tensión interfacial, con un rango bajo ( $0.1 \text{ dinas cm}^{-1}$ ) se puede lograr una remoción del compuesto orgánico hidrofóbico (hidrocarburo). La movilización del hidrocarburo se logra en concentraciones de surfactantes inferiores a la concentración micelar crítica (CMC). Se midió la tensión superficial de las mezclas de surfactantes, encontrando que la mezcla de Tween 80 con D-Limoneno en dosis de 0.1, 0.5 y 1% se obtuvieron valores de 39, 36.5 y 33.5  $\text{dinas cm}^{-1}$  respectivamente. En el caso de la mezcla de Surfapcol con D-Limoneno en dosis de 0.1, 0.5 y 1%, se obtuvieron valores de 31.1  $\text{dinas cm}^{-1}$ , 29.8  $\text{dinas cm}^{-1}$  y 29.55  $\text{dinas cm}^{-1}$ . En ambas mezclas se observa que a menor concentración mayor tensión superficial y que la variación de la dosis es mínima cuando se tiene presencia del surfactante no iónico Surfapcol, a diferencia de lo que ocurre si se trata del Tween 80 en mezcla o de manera individual.

*Evaluación del comportamiento cinético durante el proceso de la biorremediación.*

En los resultados de la biorremediación hay evidencias estadísticas para aceptar el supuesto de distribución normal ( $P < 0.05$ ) y homogeneidad de varianzas. Estos resultados (Figura 3) muestran un porcentaje de remoción para la mezcla de Tween 80 con D-Limoneno en sus tres dosis 2, 5 y 10  $\text{mg kg}^{-1}$ , tuvieron los valores de 78.6, 59.5 y 77.2%

respectivamente. Esto indica que la dosis más eficiente en la degradación del diesel se encontró en la dosis más baja, similar resultado reporta Torres *et al.* (2004), al demostrar que con una dosis de 2  $\text{mg kg}^{-1}$  de surfactante es suficiente para la biodegradación del suelo contaminado con hidrocarburos. En el caso del porcentaje de remoción para la mezcla de Surfapcol 906 con D-Limoneno con sus tres dosis 2, 5 y 10  $\text{mg kg}^{-1}$  los valores obtenidos fueron 67.1, 60.6 y 66.5% respectivamente, siendo estos porcentajes de remoción menores comparados con la mezcla de Tween 80 con D-Limoneno. Al realizar el análisis de varianza de estructura bifactorial, se obtuvieron diferencias altamente significativas ( $P < 0.001$ ). Según la prueba de comparación de medias de rangos múltiples de Duncan dichos valores difieren significativamente ( $P < 0.05$ ) por lo tanto, esto sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos, es decir existen diferencias estadísticamente significativas entre los tipos de mezclas con sus respectivas dosis y la variable respuesta que siempre se evaluó como la remoción del hidrocarburo.

En el análisis cinético de la biodegradación de HTP, donde  $k$  (constante de velocidad específica de degradación), se obtiene de la pendiente de la curva de los datos experimentales, los resultados muestran que al emplear la mezcla de Tween 80 con D-Limoneno se obtuvieron valores de  $k$  para las dosis de 2, 5 y 10  $\text{mg kg}^{-1}$ , valores de 0.025 $\text{d}^{-1}$ , 0.018 y 0.024  $\text{d}^{-1}$ , respectivamente.

En el caso de la mezcla del Surfapcol con D-Limoneno, para las dosis de 2, 5 y 10  $\text{mg kg}^{-1}$  los

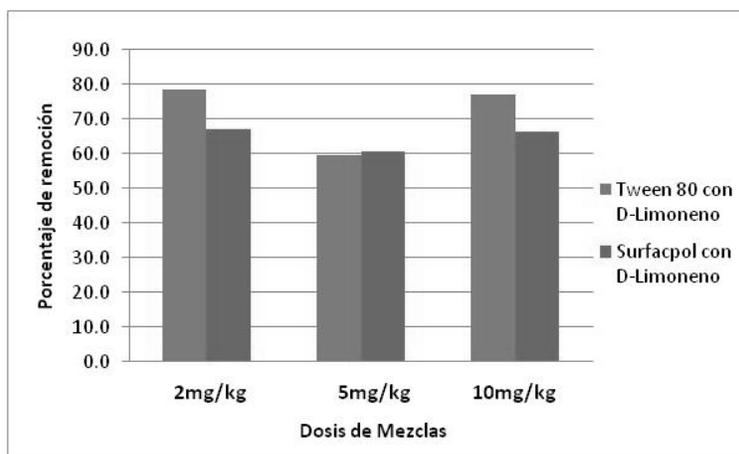


Figura 3. Porcentajes de remoción de HTP en la biorremediación, con las dos mezclas y sus tres dosis

valores obtenidos de  $k$  fueron de 0.018, 0.016, 0.019  $d^{-1}$  respectivamente. Se aprecia que en los primeros 10 días la pendiente de la degradación fue más pronunciada en la mayoría de los tratamientos; esto es debido probablemente a que inicialmente ocurre la degradación de las fracciones menos complejas, y más fáciles de degradar, y posteriormente ocurre la degradación de las fracciones más recalcitrantes.

El valor de  $R^2$  para la mezcla de Tween 80 con D-Limoneno con las dosis de 2, 5 y 10  $mg\ kg^{-1}$  cuyos valores fueron de 0.796, 0.862 y 0.862 respectivamente. En el caso de la mezcla de Surfapcol con D-Limoneno con las dosis de 2, 5 y 10  $mg\ kg^{-1}$  presenta un  $R^2$  de 0.812, 0.878, 0.936 respectivamente. Cardona y Iturbe (2003), reportan constantes cinéticas en biotratamientos (concentración inicial 28,500  $mg\ kg^{-1}$  de HTP), con nutrientes y sin nutrientes en un rango de 0.011  $d^{-1}$  hasta 0.04  $d^{-1}$ . Esto es similar con lo reportado en otros estudios (Márquez-Rocha, 2001; Yang, 2000), donde evaluaron las constantes de velocidad en presencia de nutrientes (0.04  $d^{-1}$ ), encontrando los valores similares a los publicados por otros investigadores para la biodegradación del diesel (Jackson *et al.*, 1994).

Las constantes cinéticas de los experimentos son ligeramente más bajas que las reportadas por otros autores, esto puede deberse a la baja concentración inicial del diesel en el suelo contaminado, a la falta de nutrientes, y posiblemente a la falta de inóculo de microorganismos degradadores de petróleo o diesel. En este estudio la concentración inicial fue de 5,950  $mg\ kg^{-1}$ , se puede considerar baja, comparada con las concentraciones iniciales de varios autores que reportan desde 20,000 hasta más de 80,000  $mg\ kg^{-1}$ . En cuanto a nutrientes, en el presente estudio sólo se adicionó el medio mineral de Rennie. Por otro lado en cuanto a la población microbiana, sólo se considero la contenida de manera natural en el suelo. A modo de comparación (testigo) se realizó el tratamiento de bioestimulación (aireación y nutrientes), bajo las mismas condiciones que los experimentos anteriores solo que en esta ocasión no se le agregaron surfactantes; el resultado dio un porcentaje de remoción del 53.4%, obteniendo un incremento al agregar mezclas de Tween 80 con D-Limoneno y Surfapcol con D-Limoneno del 25 y 14% respectivamente, por lo tanto puede decirse que las eficiencias de remoción están en la secuencia mezcla Tween 80 con D-Limoneno > mezcla Surfapcol con D-

Limoneno > sin mezcla. En los tratamientos asistidos con surfactantes y sin ellos, presentan una diferencia mayor en bajas concentraciones, lo cual ratifica la necesidad del suministro de agentes de superficie esenciales para lograr una adecuada biodisponibilidad (Tsai *et al.*, 2009). Del mismo modo, Helmy *et al.* (2009), reporta una mejora en la biodegradación después de 105 días de tratamiento (concentración inicial 10,000  $mg\ kg^{-1}$  de HAP), la cual obtuvo una eficiencia inicial de 63.8% y esta eficiencia de remoción la mejoró adicionando surfactantes (Tween80), hasta el 90.9% en el mismo tiempo. El autor lo atribuye a que el surfactante aumenta la superficie de contacto del agua con el sustrato hidrofóbico insoluble y el aumento de la biodisponibilidad tanto del agua como de las sustancias insolubles, los surfactantes afectan al proceso de biodegradación aumentando la solubilidad y dispersión de compuestos hidrofóbicos.

La aplicación de la mezcla de surfactantes (Tween 80/Surfapcol/D-Limoneno), obtuvieron una biorremediación mayor que los surfactantes individuales; esto se puede deber a que el D-Limoneno puede ayudar a la remoción, biodisponibilidad, y actuar como un sustrato de crecimiento de los microorganismos degradadores de hidrocarburos. También se tienen reportes que el D-Limoneno ha sido de interés en formulaciones de productos de limpieza en superficie dura, remediación medioambiental y aplicaciones de biodiesel (Lif y Holmberg, 2006; Nguyen y Sabatini, 2009). Los microorganismos autóctonos mesófilos del suelo contaminado durante el biotratamiento obtuvieron una disminución de su densidad poblacional a medida que avanzó el ensayo (Figura 4), y fue más significativa en los primeros días del tratamiento de  $130 \times 10^5$  UFC  $g^{-1}$ , que tenía el suelo, hasta 58, 88 y 84  $\times 10^5$  UFC  $g^{-1}$  en la mezcla Tween 80 con D-Limoneno para las dosis 10, 5, 2  $mg\ kg^{-1}$  respectivamente. En el caso de la mezcla Surfapcol con D-Limoneno disminuyó a 129, 49, y 59  $\times 10^5$  UFC  $g^{-1}$  en las dosis 10, 5, 2  $mg\ kg^{-1}$  respectivamente (Figura 4). Lo anterior posiblemente debido al impacto de la mezcla del surfactante y al agotamiento progresivo de la fuente de carbono (diesel). Después de la reducción en su densidad poblacional se observa ligeramente una recuperación de su crecimiento a los 50 días del tratamiento, y con esto un aumento de la densidad

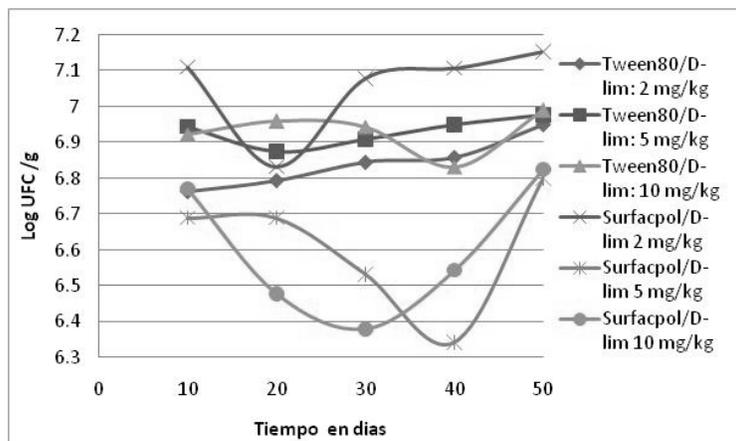


Figura 4. Efecto del comportamiento microbiano sobre las concentraciones de las mezclas Tween 80/D-Limoneno y Surfapcol/D-Limoneno en el suelo contaminado con diesel.

poblacional de 89, 95, y 98  $\times 10^5$  UFC  $g^{-1}$  en la mezcla Tween 80 con D-Limoneno para las dosis 10, 5, 2  $mg\ kg^{-1}$  respectivamente; en el caso de la mezcla Surfapcol con D-Limoneno tuvo 142, 63, y 67  $\times 10^5$  UFC  $g^{-1}$  para la dosis 10, 5, 2  $mg\ kg^{-1}$ .

La concentración inicial en la contaminación del diesel en el suelo fue de 5,950  $mg\ kg^{-1}$ , después de la biorremediación de las dos mezclas, los mejores resultados de degradación se obtuvieron con las dosis más bajas (2  $mg\ kg^{-1}$ ), donde la mezcla Tween 80 con D-Limoneno (78.6% de remoción), pudo reducir la concentración de la contaminación inicial en el suelo y llegar a 1,060  $mg\ kg^{-1}$ . En el caso de la mezcla Surfapcol con D-Limoneno (67.1% de remoción), se pudo alcanzar una remediación de 1,631  $mg\ kg^{-1}$  de hidrocarburos totales de petróleo. De acuerdo con los límites permisibles para hidrocarburos de la norma mexicana vigente (NOM-EM-138-ECOL-2002), establece que la concentración máxima permitida de diesel en zona industrial es de 2,000  $mg\ kg^{-1}$ , por lo que este tratamiento de biorremediación cumple con la normativa vigente.

## Conclusiones

Se comprobó que el adicionar surfactantes a los tratamientos de remediación de suelos contaminados con diesel ayudan a mejorar las eficiencias del tratamiento y se pudo demostrar que la desorción y la remoción del hidrocarburo facilita el tratamiento fisicoquímico y biológico, siendo este

último eficiente a dosis muy bajas (2  $mg\ kg^{-1}$ ), logrando con ello una mejor biodisponibilidad y logrando una biodegradación por parte de los microorganismos autóctonos del suelo.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la Mtra. Guadalupe Aguilar del Laboratorio de Agua-Suelo-Planta del ITSON, por su apoyo para la extracción del hidrocarburo por Soxhlet, y al Ing. Alfredo Moctezuma del Departamento de Bioprocesos UPIBI-IPN, por su apoyo con el análisis de la tensión superficial.

## Bibliografía

- Allison L.E. 1965. Organic carbon. In: Black C.A. (Ed.), Methods of soil analysis, Part 1. American Society of Agronomy, Madison, pp. 1367–1382.
- Bouyoucos G.J. 1962. Hydrometer method improved for making particle size analysis of soils. *Agronomy Journal*, (54):464–465.
- Cardona S. y Iturbe, R. 2003. Biodegradación de diesel mexicano por un consorcio de bacterias de un suelo agrícola. *DYNA*, año 70. (138): 13-26.
- Chu W. 2003. Remediation of Contaminated Soils by Surfactant-Aided Soil Washing. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management*, ASCE, (7) 1: 19-24.
- Fontúrbel F. 2004. Uso de algunos parámetros indicadores microbiológicos y bioquímicos para la evaluación de la contaminación por hidrocarburos y la biodegradación de los mismos, en la zona del Lago Titikaka. *Ecología aplicada* 3(1,2):172-179.
- Gaceta oficial. 1998. Normas para el Control de la Recuperación de Materiales Peligrosos y el Manejo de los Desechos

- Peligrosos. Decreto 2635. Gaceta Oficial Extraordinaria n° 5245 de la República de Venezuela.
- Helmy Q., Kardena, E. y Wisjnaprpto. 2009. Performance of Petrophilic Consortia and Effect Of Surfactant Tween 80 Addition In The Oil Sludge Removal Process. *Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation*, (1): 235-246.
- IPCS. 1994. Fichas de seguridad química. Contexto de Cooperación entre el IPCS y la Comisión de las Comunidades Europeas © CCE. Actualizado a la vigésima adaptación de la Directiva 67/548/CEE traspuesta a la legislación española por el Real Decreto 363/95 (BOE 5.6.95).
- Iturbe R., López, J. y Torres, L.G. 2008. Microbiological and physicochemical changes occurring in a contaminated soil after surfactant-enhanced soil washing. *Environmental Geosciences*, 15(4): 1-9
- Jackson J. 1994. Using microbial kinetics in the bioremediation of contaminated soils. Remediation of hazardous waste contaminated soils. Edited by: Donald L. Wise and Bebra J. Trantolo. Marcel Dekker, Inc. New York. 681-989.
- Johnsena A., Wick, L. y Harmsb, H. 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*. (133): 71-84
- Kang S.-W., Kim, Y.-B., Shin, J.-D. y Kim, E.-K. 2010. Enhanced Biodegradation of Hydrocarbons in Soil by Microbial Biosurfactant, Sophorolipid. *Applied Biochemistry Biotechnology*. (160):780-790
- Lee D.-H., Kim, E.-S., Chang, H.-W. 2005. Effect of Tween surfactant components for remediation of toluene-contaminated groundwater. *Geosciences Journal*, 9(3): 261 - 267.
- Lif A. y Holmberg, K. 2006. Water-in-diesel emulsions and related systems. *Advances in Colloid and Interface Science* (123-126):231-239.
- Lobo C.B. 2002. Descontaminacion de suelos. Instituto Madrileño de Investigación Agraria y Alimentaria. IMIA. N-II 28800 Madrid.
- López J., Iturbe, R., y Torres, L.G. 2004. Washing of soil contaminated with PAHs and heavy petroleum fractions using two nonionic and one ionic surfactant: Effect of salt addition: *Journal of Environmental Science and Health, Part A— Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*. A39 (9) 2293- 2306.
- Márquez-Rocha F. 2001. Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium. *Water, Air and soil Pollution*, (128): 313-320.
- Martínez V.E., y López, F. 2001. Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso. *Terra*, 19(1): 9-17
- Matta B. 1985. D-Limonene based aqueous cleaning compositions United States Patent 4511488.
- Nguyen T.T. y Sabatini, D.A. 2009. Formulating Alcohol-Free Microemulsions Using Rhamnolipid Biosurfactant and Rhamnolipid Mixtures. *Journal of Surfactants and Detergents*, 12:109-115.
- Raiger-Iustman L.J. y López, N.I. 2009. Los biosurfactantes y la industria petrolera. *Química Viva*, año 8, (3): 146-161
- Raimbault M. y Alazard, D. 1980. Culture Method to Study Fungal Growth in Soil Fermentation. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. 9. 199-209
- Riley P. 2000. Methods for extinguishing petroleum-based fires, suppressing petroleum-released vapors and cleaning petroleum-contaminated surfaces. French Patent 6511431
- Rivas H. y Gutiérrez, X., 1999. Los surfactantes: comportamiento y algunas de sus aplicaciones en la industria petrolera. *Acta Científica Venezolana*, Vol. 50, Suplemento (1): 54-65.
- Singh A. Van Hamme J.D. y Ward, O. 2007. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances* (25): 99-121.
- Sun S., Inskeep, W.P., Boyd, S.A. 1995. Sorption of nonionic organic compounds in soil water systems containing a micelleforming surfactant. *Environmental Science and Technology*. (29): 903-913.
- Tat M.E., Gerpen y J.H.V. 2000. The specific gravity of biodiesel and its blends with diesel fuel. *Journal of American Oil Chemical Society* 77(2):115-119
- Torres L.G. y Zamora, E.R. 2002. Preparation and power consumption of surfactant-fuel oil-water emulsions using axial, radial, and mixed flow impellers. *Fuel* (81): 2289-2302
- Torres L.G., Orantes, J.L., Iturbe, R. 2003. Critical micellar concentrations for three surfactants and their diesel-removal efficiencies in petroleum-contaminated soils. *Environmental Geosciences*. 10 (1): 28-36
- Torres, L.G., Rojas, N. y Iturbe, R., 2004. Use of two-surfactants mixtures to attain specific HLB values for assisted TPH-diesel biodegradation: *Journal of Environmental Sciences (China)*, 16 (6): 950-956.
- Tsai T. T., Kao, C.M., Yeh, T.Y., Liang, S.H. y Chien, H.Y. 2009. Remediation of Fuel Oil-Contaminated Soils by a Three-Stage Treatment System. *Environmental Engineering Science*, 26(3): 651-659.
- Urum K., Pekdemir, T., Copur, M. 2004. Surfactant Treatment of Crude Oil Contaminated Soils. *Journal of Colloid and Interface Science* (276): 456-464.
- Yang L. 2000. Biodegradation of dispersed diesel fuel under high salinity conditions. *Water Research*, 13 (34): 3303-3314.
- Youssef N.H., Nguyen, T., Sabatini, D.A., McInerney, M.J. 2007. Basis for formulating biosurfactant mixtures to achieve ultra low interfacial tension values against hydrocarbons. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*. (34): 497-507.