



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**Título de la Tesis**

**PRODUCCIÓN DE RAMNOLÍPIDOS DE *Pseudomonas aeruginosa*  
PARA SU APLICACIÓN EN LA REMOCIÓN DE  
HIDROCARBUROS CONTENIDOS EN SUELO**

**Tesis que presenta**

**Carolina Guatemala Hernández**

**Para obtener el grado de:**

**DOCTORA EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD DE  
BIOTECNOLOGÍA**

**Directora de Tesis:**

**Josefina Barrera Cortés**

**Ciudad de México**

**Noviembre 2021**

Agradezco al CONACYT por otorgarme la beca de posgrado número 262988

## **Agradecimientos**

Agradezco:

A mi directora de tesis: Dra. Josefina Barrera Cortés por su confianza y apoyo en el desarrollo de este proyecto de investigación.

A mis sinodales: Dra. Ma. Teresa Ponce Noyola, Dr. Mauricio Carbajal Tinoco, Dra. Margarita Sánchez Domínguez y Dr. Fernando José Esparza García. Cada uno aportó al proceso de construcción de esta investigación y en mi desarrollo profesional.

Al Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas, por el apoyo del equipo de RMN y el análisis de los espectros.

A mis compañeros de laboratorio: Dr. Abdi Escalante Sánchez por su amistad y apoyo en el uso del biorreactor. Dra. Ma. Elena López Mancera, por su amistad, consejos y asesoría en el laboratorio.

A los estudiantes de estancia: Katia, Karina, Rosalía, Gerardo, Jesús, Juana, Mari Cruz, Libertad y Jorge, por su entrega y esfuerzo para aportar a este trabajo.

Al Biol. Héctor Mauricio Suárez Gómez por sus atenciones y asistencia en el laboratorio.

Al Ing. Fernando Maldonado García por su amistad, paciencia y apoyo en el uso de la liofilizadora.

Al Dr. Luis Bernardo Flores Cotera, por prestar sus instalaciones y equipo para complementar este trabajo.

A la Q.F.B Elvira Ríos Leal y sus colaboradores por el apoyo técnico del Cromatógrafo de Gases.

A la Ing. Lorena Ramírez Reyes (LANSE) por su apoyo en la obtención de los espectros de masas

A la Biol. María de Lourdes Rojas Morales por su apoyo en el uso del TEM  
Al CINVESTAV por permitirme ser parte de sus estudiantes.

## *Contenido*

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Listado de figuras .....</b>  | <b>6</b>  |
| <b>Listado de tablas.....</b>  | <b>8</b>  |
| <b>Anexos .....</b>  | <b>9</b>  |
| <b>Resumen.....</b>  | <b>11</b> |
| <b>Abstract .....</b>  | <b>13</b> |
| <b>1. Introducción.....</b>  | <b>15</b> |
| <b>2. Antecedentes .....</b>   | <b>19</b> |
| 2.1 Hidrocarburos totales de petróleo .....  | 20        |
| 2.2 Diésel.....  | 21        |
| 2.3 Derivados de HAPs.....   | 23        |
| 2.4 Tecnologías utilizadas en la remediación de suelos contaminados con<br>hidrocarburos ..... | 24        |
| 2.5 Lavados de suelo.....  | 26        |
| 2.6. Surfactantes.....   | 26        |
| 2.7 Biosurfactantes .....  | 27        |
| 2.8 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....  | 30        |
| 2.9 Síntesis de ramnolípidos.....  | 30        |
| 2.10 Biosurfactantes ramnolípidos y sus propiedades.....                                       | 31        |
| 2.11 Aplicaciones de los ramnolípidos.....   | 33        |
| 2.12 Mecanismo de desorción de hidrocarburos en el lavado de suelos.....                       | 35        |
| <b>3. Justificación.....</b>   | <b>37</b> |
| <b>4. Hipótesis y Objetivos .....</b>  | <b>39</b> |
| 4.1 Hipótesis .....  | 40        |
| 4.2 Objetivos.....   | 40        |
| 4.2.1 Objetivo general.....  | 40        |
| 4.2.2 Objetivos particulares .....   | 40        |
| <b>5. Materiales y Métodos .....</b>   | <b>41</b> |
| 5.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....  | 42        |

|   |           |
|---|-----------|
| 5.2 Producción del biosurfactante ramnolípido por <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 .....                                    | 42        |
| 5.3 Evaluación preliminar del biosurfactante .....  | 43        |
| 5.3.1 Carga iónica del biosurfactante .....   | 43        |
| 5.3.2 Identificación de tipo de ramnolípido .....   | 43        |
| 5.3.3 Selección de la fuente de carbono.....  | 44        |
| 5.4 Separación y purificación del ramnolípido .....   | 44        |
| 5.5 Propiedades del ramnolípido purificado.....   | 46        |
| 5.5.1 Actividad emulsificante .....   | 46        |
| 5.6 Caracterización estructural del biosurfactante ramnolípido .....  | 47        |
| 5.7 Caracterización del suelo contaminado .....   | 47        |
| 5.8 Efecto del Tween 80 en la remoción del diésel.....  | 48        |
| 5.9 Efecto de los mono-ramnolípidos en la remoción del diésel .....   | 48        |
| 5.10 Fracciones de hidrocarburos removidos por lavado con mono-ramnolípidos,<br>de un suelo contaminado con diésel.....   | 50        |
| 5.11 Mecanismo de desorción del diésel y análisis de micelas por TEM.....   | 53        |
| 5.12 Análisis estadísticos.....   | 54        |
| <b>6. Resultados y Discusión .....</b>  | <b>55</b> |
| 6.1 Evaluación preliminar del biosurfactante .....  | 56        |
| 6.1.1 Carga iónica del biosurfactante .....   | 56        |
| 6.1.2 Identificación del tipo de ramnolípido.....   | 56        |
| 6.1.3 Selección de la fuente de carbono.....  | 57        |
| 6.2 Producción de ramnolípidos por <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027.....  | 59        |
| 6.3 Caracterización química de los ramnolípidos purificados producidos por <i>P.</i><br><i>aeruginosa</i> ATCC 9027 ..... | 61        |
| 6.3.1 Análisis de ESI-MS.....   | 61        |
| 6.3.2 RMN .....   | 63        |
| 6.4 Propiedades fisicoquímicas de los mono-ramnolípidos purificados.....  | 66        |
| 6.4.1 Actividad emulsificante .....   | 66        |
| 6.4.2 Tensión superficial y CMC.....  | 67        |
| 6.5 Características del suelo contaminado .....   | 69        |
| 6.6 Efecto de los mono-ramnolípidos en la desorción del diésel añejo contenido en<br>suelo .....                          | 71        |
| 6.7 Fracciones de hidrocarburos desorbidos del suelo contaminado .....  | 76        |

|   |            |
|---|------------|
| 6.8 HAPs desorbidos del suelo contaminado lavado con mono-ramnolípidos.....                                 | 79         |
| 6.9 Desorción del diésel añejo contenido en suelo, mediante Tween 80 (surfactante sintético no-iónico)..... | 81         |
| 6.10 Mecanismo de desorción del diésel y análisis del tamaño de micela .....                                | 83         |
| <b>7. Conclusiones .....</b>  | <b>87</b>  |
| <b>8. Recomendaciones .....</b>   | <b>89</b>  |
| <b>9. Anexos .....</b>  | <b>92</b>  |
| <b>10. Referencias .....</b>  | <b>103</b> |

### *Listado de figuras*

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> Estructura molecular de los 16 HAPs considerados contaminantes prioritarios por la US EPA (Yan et al. 2004).....   | 21 |
| <b>Figura 2.</b> Principales sustancias involucradas en emergencias ambientales reportadas a la PROFEPA entre 1997 y 1999 (PROFEPA, 2002). .....   | 23 |
| <b>Figura 3.</b> Derivados de HAPs (Sigma-Aldrich) .....   | 23 |
| <b>Figura 4.</b> Surfactante.....  | 27 |
| <b>Figura 5.</b> Tensión superficial y CMC (Santos et al. 2016) .....  | 28 |
| <b>Figura 6.</b> Biosíntesis de ramnolípidos (Suh et al. 2019) .....   | 31 |
| <b>Figura 7.</b> Estructuras de los ramnolípidos (Bai & McClements 2016) .....   | 33 |
| <b>Figura 8.</b> Agregados moleculares del biosurfactante ramnolípidos (Bodagh et al 2013) .....   | 33 |
| <b>Figura 9.</b> I. Sorción del surfactante en la superficie. II. Formación de la micela. III. Sorción del surfactante en la materia orgánica IV. Partición de los Hidrocarburos entre el agua y materia orgánica. V. Partición de los Hidrocarburos entre el agua y la micela VI. Partición de los Hidrocarburos entre la fase pseudomicelar y el agua. VII. Solubilización de los Hidrocarburos. Tomado de: (Chong et al. 2014). ..... | 35 |
| <b>Figura 10.</b> Producción y extracción del mono-ramnolípidos.....   | 44 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 11.</b> Purificación del mono-ramnolípido. A) Purificación en columna, B) Fracciones obtenidas de la columna cromatográfica, C) TLC, D) mono-ramnolípido purificado .....   | 45 |
| <b>Figura 12.</b> Índice de emulsificación .....  | 46 |
| <b>Figura 13.</b> Lavado de suelos y extracción de hidrocarburos .....  | 49 |
| <b>Figura 14.</b> Análisis de hidrocarburos .....   | 51 |
| <b>Figura 15.</b> Separación de hidrocarburos. a) Eliminación de asfaltenos b) muestras libres de asfaltenos c) EFS de muestras d) fracciones de hidrocarburos .....  | 52 |
| <b>Figura 16.</b> Prueba del halo azul CTAB. A) control negativo (Tween 80); B) control positivo (SDS); C) <i>P. aeruginosa</i> en PPGAS con glicerol; D) <i>P. aeruginosa</i> en PPGAS con glucosa.....  | 56 |
| <b>Figura 17.</b> TLC. Muestra del estándar y del extracto crudo.....   | 57 |
| <b>Figura 18.</b> Prueba de colapso de gota de <i>P. aeruginosa</i> . Medio libre de células de un cultivo en PPGAS. A) fuente de carbono: glicerol B) fuente de carbono: glucosa C) control. ....  | 58 |
| <b>Figura 19.</b> Dispersión de gota en aceite de motor. Extracto crudo del biosurfactante producido por <i>P. aeruginosa</i> en medio PPGAS con glucosa o glicerol. A) Control; B) Glucosa: 20g/L y 280 µl; C) Glicerol: concentración 4g/L y 20 µl. ....  | 59 |
| <b>Figura 20.</b> Cinética de crecimiento microbiano y tensión superficial de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 propagada en matraz agitado en medio PPGAs. ....   | 60 |
| <b>Figura 21.</b> Capacidad de dispersión de gota del mono-ramnolípido. La zona clara es formada por el desplazamiento del medio de cultivo a partir de colocar una gota de aceite de motor. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Prueba de Tukey's y una confianza de 95 %. .... | 60 |
| <b>Figura 22.</b> Espectro ESI-MS (modo negativo) de mono-ramnolípidos producidos por <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027. El principal ion m/z 503 corresponde al mono-ramnolípido Rha-C10-C10.....   | 63 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 23.</b> Espectros de NMR. <sup>13</sup> C-NMR (a) y <sup>1</sup> H-NMR (b) del mono-ramnolípido producido por <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027. H'-Mono-rh indica el protón anomérico de la ramnosa. ....  | 65 |
| <b>Figura 24.</b> Índice de emulsificación (EI <sub>24</sub> ) del diésel, keroseno, aceite de oliva y aceite de maíz con distintas concentraciones de mono-ramnolípido purificado. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Prueba de Tukey's y una confianza de 95%.....                           | 66 |
| <b>Figura 25.</b> CMC del mono-ramnolípido purificado. ....  | 68 |
| <b>Figura 26.</b> Remoción de HTP a diferentes concentraciones de mono-ramnolípidos. Control: agua destilada. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Prueba de Tukey's y una confianza de 95%. ....  | 73 |
| <b>Figura 27.</b> Fracción de hidrocarburos remanentes en el suelo contaminado con mono-ramnolípidos (0.5% p/v). F1: alifáticos; F2 HAPs neutros, metilados y nitrados; F3 HAPs oxigenados; F4: asfaltenos. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Prueba de Tukey's y una confianza del 95%. .... | 77 |
| <b>Figura 28.</b> Remoción de HTP a distintas concentraciones (1, 2, 5 y 10%) de Tween 80. Control: agua destilada. (*) Indican diferencias significativas con respecto al control (P≤0.05).....   | 83 |
| <b>Figura 29.</b> A) Micrografía TEM del sobrenadante del lavado de suelo y B) distribución de tamaño de micelas, ajustada por la función de Schulz. ....  | 84 |
| <b>Figura 30.</b> Probable mecanismo involucrado en la remediación de suelo contaminado con diésel a) solubilización y petróleo b) movilización.....   | 85 |

### *Listado de tablas*

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> Fracciones del petróleo obtenidas por métodos de destilación (Solomons y Frhyle 2000).....             | 20 |
| <b>Tabla 2.</b> Límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en suelo (NOM-138-SEMARNAT/SS-2003) ..... | 22 |
| <b>Tabla 3.</b> Métodos utilizados en la remediación de hidrocarburos (Ossai et al. 2019) 25                           |    |



|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 4.</b> Clases de biosurfactantes y microorganismos productores (Pacwa-Płociniczak et al. 2011; Cortés-Sánchez et al. 2013) .....                      | 29 |
| <b>Tabla 5.</b> Ion Pseudo molecular y abundancia relativa de mezcla de mono-ramnolípidos obtenidos de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 cultivada en PPGAS ..... | 62 |
| <b>Tabla 6.</b> Propiedades fisicoquímicas del suelo .....   | 69 |
| <b>Tabla 7.</b> Porcentajes de remoción de diésel mediante tecnologías y suelos diversos. ....   | 74 |

### *Anexos*

|   |    |
|---|----|
| <b>Anexo 1.</b> Curva de calibración de dispersión de gota .....  | 93 |
| <b>Anexo 2.</b> Reacción de antrona en muestras de lavado de suelo, obtenidas después de la extracción en Soxhlet. .... | 93 |
| <b>Anexo 3.</b> Curva de calibración de antrona .....   | 93 |
| <b>Anexo 4.</b> Curva de naftaleno .....  | 94 |
| <b>Anexo 5.</b> Curva de acenaftileno .....   | 94 |
| <b>Anexo 6.</b> Curva de acenafteno .....   | 94 |
| <b>Anexo 7.</b> Curva de Fenantreno .....   | 95 |
| <b>Anexo 8.</b> Fermentación de <i>P. aeruginosa</i> en reactor de tanque agitado (Hernández-Cruz 2018). ....           | 95 |
| <b>Anexo 9.</b> Caracterización del suelo problema. ....  | 95 |
| <b>Anexo 10.</b> Fragmento 475 ESI-MS/MS .....  | 96 |
| <b>Anexo 11.</b> Fragmento 503 ESI MS/MS .....  | 97 |
| <b>Anexo 12.</b> Fragmento 529 ESI MS/MS .....  | 97 |
| <b>Anexo 13.</b> Fragmento 333 ESI MS/MS .....  | 98 |
| <b>Anexo 14.</b> Fragmento 531 ESI MS/MS .....  | 98 |
| <b>Anexo 15.</b> Fragmentos: 567, 683, 698.9 y 710 ESI-MS .....   | 99 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Anexo 16.</b> Desplazamientos químicos de las señales seleccionadas del espectro RMN de $^{13}\text{C}$ NMR para el mono-ramnolípido producido por <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027. .... | 100 |
| <b>Anexo 17.</b> Desplazamientos químicos de las señales seleccionadas del espectro de RMN de $^1\text{H}$ NMR para el mono-ramnolípido producido por <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027. .... | 100 |
| <b>Anexo 18.</b> Solubilidad de diésel en una solución de mono-ramnolípido (0.5 %) a 150 rpm en 72 h. ....   | 100 |
| <b>Anexo 19.</b> Cromatografía de gases de la F2 del diésel, del suelo inicial y tratado. .  | 101 |

## *Resumen*

La contaminación de suelos por hidrocarburos derivados de petróleo es un problema que ha aumentado en México debido, principalmente, a derrames en el sitio de extracción y refinamiento, o durante su almacenamiento y transporte (Torres et al. 2003; Cavazos-Arroyo et al. 2014). El diésel es una mezcla de más de 2000 compuestos, conformado por hidrocarburos alifáticos (70 %) y aromáticos (30 %) entre los cuales se encuentran los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs). Los HAPs pueden sufrir transformación en el ambiente por efecto fotoquímico o por combustión y producir derivados más tóxicos, cancerígenos y mutagénicos para el ser humano. Su persistencia en el ambiente es debida a su baja solubilidad en agua, característica que aumenta proporcionalmente con el peso molecular del hidrocarburo, y que, al mismo tiempo, los hace recalcitrantes a la degradación biológica (Yap et al. 2010). Para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos se han aplicado diversas tecnologías; dentro de las cuales se encuentra el lavado de suelos con surfactantes (Mao et al. 2015). La relevancia de esta técnica es el posible uso de biosurfactantes, de los cuales, los del tipo ramnolípido producidos por *P. aeruginosa* son los más usados.

Este trabajo se enfocó en la producción de mono-ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* ATCC 9027, usando glicerol como fuente de carbono, para su aplicación en la remoción de diésel recalcitrante contenido en el suelo. Los mono-ramnolípidos purificados presentaron una CMC de 70.3 mgL<sup>-1</sup>, tensión superficial de 30.3 mNm<sup>-1</sup> y un índice de emulsificación de 73 % en mezclas complejas de hidrocarburos. En este estudio el suelo problema fue obtenido de una estación de ferrocarril que operó por

años. El suelo fue caracterizado como franco-arenoso, con un total de 11,600 mgKg<sup>-1</sup> de diésel añejo. El suelo fue tratado con soluciones de diferente concentración (0.01, 0.1, 0.2, 0.5 % p/v) del biosurfactante (mono-ramnolípidos). El porcentaje de diésel añejo removido fue del 40% (solución 0.5% de mono-ramnolípidos), de los cuales el 66% fueron hidrocarburos alifáticos y el remanente HAPs. El análisis cromatográfico de los HAPs removidos permitió identificar 4 derivados de los HAPs, dentro de los cuales predominaron los oxi-HAPs. La presencia de este tipo de compuestos permite suponer que los mono-ramnolípidos favorecen la oxidación de los HAPs y consecuentemente, su desorción.

## *Abstract*

Soil contamination by hydrocarbons derived from petroleum is a problem that has increased in Mexico, mainly due to spills at the extraction and refining site, or during its storage and transport (Torres et al. 2003; Cavazos-Arroyo et al. 2014). Diesel is a mixture of more than 2000 compounds, which includes 70 % aliphatic hydrocarbons and 30 % aromatic hydrocarbons, among which are Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), which can undergo transformation in the environment by photochemical effect or combustion of vehicles diesel and obtain more toxic, carcinogenic and mutagenic derivatives PAHs for the human. Their persistence in the environment is due to their low solubility in water, a characteristic that increases proportionally to their molecular weight and at the same time makes them recalcitrant to biological degradation (Yap et al. 2010). Various technologies have been applied to the remediation of soils contaminated by hydrocarbons, within which is the soil washing with surfactants (Mao et al. 2015). The relevance of this technique is the use of surfactants of biological origin, where the most widely used have been the rhamnolipids produced by *P. aeruginosa*.

This work is focused on the production of mono-rhamnolipids produced by *P. aeruginosa* ATCC 9027, using glycerol as a carbon source, for its application in the removal of recalcitrant hydrocarbons present in diesel-contaminated soil. The CMC which  $70.3 \text{ mgL}^{-1}$ , with decreased the surface tension of deionized water of  $30.3 \text{ mNm}^{-1}$  and emulsified complex mixtures of petroleum hydrocarbons (73%). In this study, the problem soil was obtained from a railway station. The soil was characterized as a type of loamy-sand contaminated with  $11,600 \text{ mgKg}^{-1}$  of aged diesel. The soil was treated with solutions of different concentrations (0.01, 0.1, 0.2, 0.5 % w/v) of biosurfactant

(mono-rhamnolipid). The aged diesel removed was 40 % (0.5 % solution of mono-rhamnolipids), of which 66 % were aliphatic hydrocarbons and the remainder were HAPs. The chromatographic analysis of removed HAPs identify 4 derivatives of PAHs, among which oxy-HAPs predominated. The presence of this type of compounds allows us to assume that mono-rhamnolipids favor the oxidation of HAPs and consequently, their desorption.

# *1. Introducción*

El diésel representa una fuente permanente de contaminación de suelo debido a su uso extensivo en máquinas generadoras de energía. El diésel de petróleo es una mezcla de más de 2000 compuestos, el cual incluye fracciones de Hidrocarburos Aromáticos Políciclicos (HAPs) (ATSDR 1995; Khalladi et al. 2009; Lominchar et al. 2018). La hidrofobicidad y recalcitrancia de estos hidrocarburos ha sido sujeto de estudios extensivos y la Agencia de Protección Ambiental (US EPA) ha documentado la clasificación de 16 HAPs con potencial mutagénico y carcinogénico para humanos. De acuerdo con Koshlaf & Ball (2017) el porcentaje y la velocidad con la cual los hidrocarburos pueden ser removidos de los suelos contaminados son fuertemente dependientes del envejecimiento de la contaminación. Respecto a la hidrofobicidad de los HAPs del diésel añejo, la absorción de estos en las pequeñas partículas del suelo se limitaría a su biodisponibilidad, y por tanto su remoción (Befkadu & Quanyuan 2018). Los hidrocarburos absorbidos en el suelo son susceptibles a la transformación fotoquímica y biodegradación, los cuales pueden llevar a la producción de hidrocarburos más tóxicos como los siguientes derivados de HAPs: HAPs-nitrados, HAPs-metilados y HAPs-oxigenados (Wei et al. 2015; Lawal et al. 2017). El suelo contaminado con una baja concentración de hidrocarburos puede ser remediado por su misma microflora (Vecchioli et al. 1990). Sin embargo, en concentraciones altas, además de provocar estrés en los microorganismos, los hidrocarburos inhiben el metabolismo microbiano debido a la capa impermeable que éstos forman alrededor de las partículas del suelo (Koshlaf & Ball 2017; Takawira et al. 2014). El lavado de suelo es una tecnología basada en la desorción de contaminantes por medio de un agente extractante que puede ser un surfactante, una mezcla de surfactantes, o fluidos como son las ciclodextrinas, algunos ácidos, disolventes orgánicos, e incluso aceites



vegetales (Trellu et al. 2016). Los surfactantes sintéticos son los agentes extractantes más comunes usados en la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos (Mao et al. 2015; Befkadu & Quanyuan 2018). Sin embargo, de acuerdo con Bai et al. (1997), los surfactantes de origen biológico son más efectivos no solo por potenciar la solubilidad de los contaminantes orgánicos hidrofóbicos, sino por facilitar la biotransformación de los hidrocarburos de petróleo, incluyendo los de alto peso molecular (Koshlaf & Ball 2017). Los surfactantes son moléculas anfifílicas cuya capacidad emulsificante está determinada por su balance hidrofílico-lipofílico (HLB) y su concentración micelar crítica (CMC) (Pacwa-Płociniczak et al. 2011; Trellu et al. 2016). La solubilización y movilización son dos mecanismos involucrados en la desorción de hidrocarburos con surfactantes (Mao et al. 2015). Mientras la solubilización se refiere a la capacidad de los surfactantes para incorporar los compuestos hidrofóbicos al corazón de las micelas, la movilización involucra la reducción de la tensión superficial entre el contaminante y las partículas de suelo; la solubilidad ocurre por encima de la CMC y la movilización por debajo de su valor (Mao et al. 2015; Chong et al., 2014). La disposición de un surfactante en micro y nano-micelas permitió la desorción de los contaminantes hidrofóbicos ubicados en los poros más internos de las partículas de suelo (Oliveira et al. 2014; Bera & Mandal 2015; Zhong et al. 2016b). Basado en la estructura molecular de los biosurfactantes, estos son clasificados en glicolípidos, lipopéptidos, ácidos grasos, fosfolípidos y poliméricos (Pacwa-Płociniczak et al. 2011; Santos et al. 2016). De los distintos tipos de biosurfactantes, los ramnolípidos del grupo de los glucolípidos son de particular interés en la biotecnología ambiental debido a su alta capacidad emulsificante, su baja toxicidad, y alta biodegradabilidad (Liu et al. 2017). La diversidad de microorganismos

reportados con la capacidad de producir surfactantes del tipo ramnolípido, y de entre los cuales destaca *P. aeruginosa*, explica los diversos congéneres de ramnolípidos, que pueden ser conformados por una (mono-) o dos (di-) moléculas de ramnosa, así como una o dos cadenas de ácidos grasos del tipo 3-hidroxicanoato con diferente longitud (8-16) y números de átomos de carbono (8-32). En el área de Biotecnología Ambiental, el estudio de los mono-ramnolípidos ha sido enfocado a la solubilización y biodegradación de n-alcanos (Zhang & Miller 1992; Zhong et al. 2016 a,b). En lo que corresponde a sus propiedades tensoactivas, se ha encontrado que los mono-ramnolípidos poseen alta capacidad para emulsificar mezclas de hidrocarburos (Rahimi et al. 2019) y que se adhieren más fuertemente que los di-ramnolípidos a la superficie celular. La adhesión de los mono-ramnolípidos a la membrana celular incrementa la hidrofobicidad de ésta (Zhong et al. 2008), aumentando así la probabilidad de la incorporación de compuestos orgánicos hidrofóbicos al metabolismo microbiano (Kaczorek et al. 2013). De acuerdo con una revisión bibliográfica realizada, no hay estudios respecto al efecto de los mono-ramnolípidos en la remediación de suelos contaminados con diésel añejo. No obstante, dadas las propiedades de este tipo de ramnolípidos consideramos que su aplicación en la desorción de hidrocarburos altamente recalcitrantes y tóxicos es una opción viable y amigable con el medio ambiente.

El objetivo del presente estudio es evaluar la capacidad de los surfactantes mono-ramnolípidos para desorber hidrocarburos recalcitrantes del diésel añejo contenidos en un suelo colectado de una estación ferrocarrilera que ha operado por décadas.

## *2. Antecedentes*

## 2.1 Hidrocarburos totales de petróleo

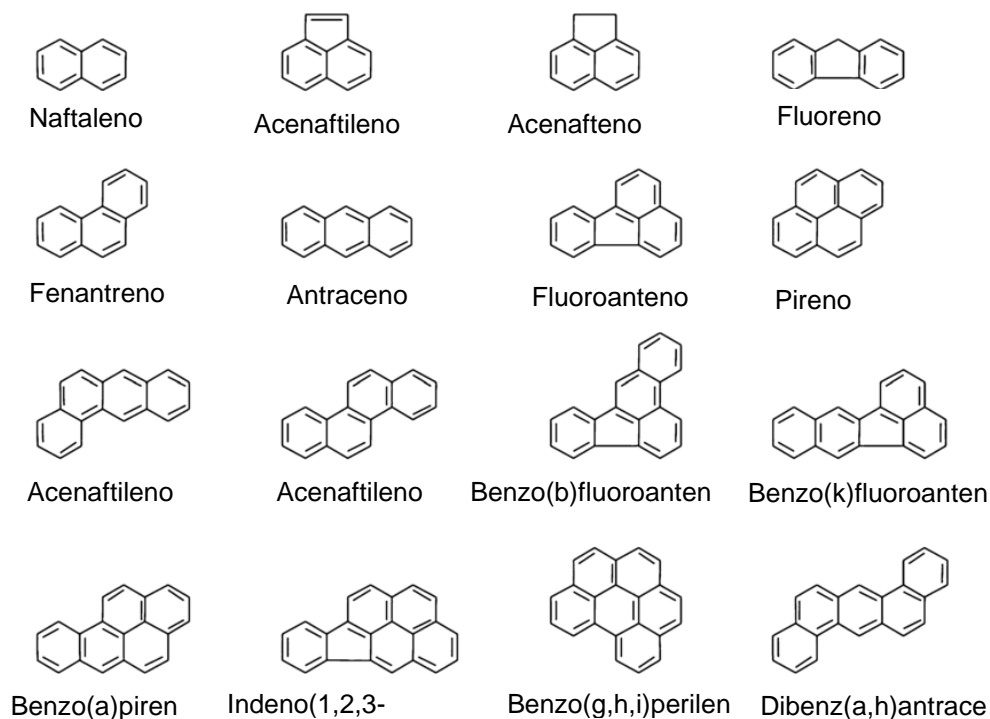
Los hidrocarburos totales de petróleo (HTP) son un grupo extenso de cientos de sustancias químicas compuestas principalmente de hidrógeno y carbono, originadas del petróleo crudo y sus derivados (Méndez et al. 2010) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Fracciones del petróleo obtenidas por métodos de destilación (Solomons y Frhyle 2000)

| Intervalo de ebullición de la fracción (°C) | Número de átomos de carbono por moléculas | Uso   |
|---|---|---|
| Inferior a 20                               | C <sub>1</sub> – C <sub>4</sub>           | Gas natural, gas en cilindros, petroquímicos      |
| 20-60                                       | C <sub>5</sub> – C <sub>6</sub>           | Éter de petróleo, disolventes                     |
| 60-100                                      | C <sub>6</sub> – C <sub>7</sub>           | Lingroína, disolventes                            |
| 40-200                                      | C <sub>5</sub> – C <sub>10</sub>          | Gasolina (gasolina de destilación directa)        |
| 175-325                                     | C <sub>12</sub> – C <sub>18</sub>         | Queroseno y combustible para aviones              |
| 250-400                                     | C <sub>12</sub> y superiores              | Gasóleo, combustóleo y aceite diésel              |
| Líquidos no volátiles                       | C <sub>20</sub> y superiores              | Aceite mineral refinado, aceite lubricante, grasa |
| Sólidos no volátiles                        | C <sub>20</sub> y superiores              | Cera de parafina, asfalto y alquitrán             |

El análisis de una muestra de HTP colectada de un suelo contaminado da información sobre el tipo de contaminación y la concentración en que ésta se encuentra. Los HAPs

forman parte de una de las fracciones de mayor interés para remover de los sitios contaminados. De las numerosas estructuras de HAPs, la EPA clasifica a 16 HAPs como los más importantes a eliminar del ambiente, considerando su alta hidrofobicidad y propiedades carcinogénicas y mutagénicas para el ser humano (Yan et al. 2004). En la Figura 1 se muestran las estructuras químicas de estos HAPs.



**Figura 1** Estructura molecular de los 16 HAPs considerados contaminantes prioritarios por la US EPA (Yan et al. 2004)

## 2.2 Diésel

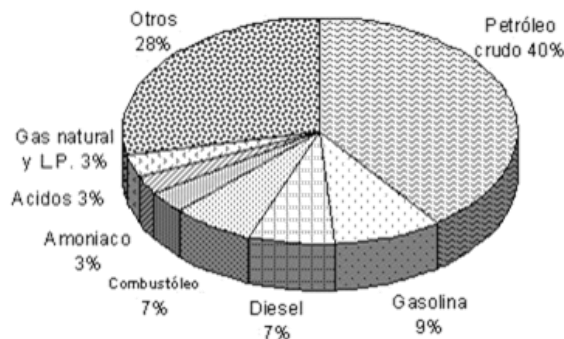
El Diésel, también conocido como gasóleo, es la fracción de petróleo destilada después del queroseno (250–400 °C) (Tabla 1). El diésel está conformado por una mezcla de más de 2000 compuestos (Khalladi et al. 2009) de los cuales el 64% son hidrocarburos saturados en la forma de parafinas (alcanos) y cicloparafinas (cicloalcanos), entre un 1 - 2% son hidrocarburos no saturados y un 35 % hidrocarburos

aromáticos (ATSDR 1995). Dependiendo de la calidad del diésel, los HAPs pueden estar presentes entre un 5% y un 30 % (Liang et al. 2005). De acuerdo con la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003, del diésel debe analizarse la fracción media (C10 a C28) y los HAPs (Tabla 2).

**Tabla 2.** Límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en suelo (NOM-138-SEMARNAT/SS-2003)

| Fracción de Hidrocarburos | Uso de suelo predominante (mgKg <sup>-1</sup> base seca) |             |            |
|---------------------------|--|-------------|------------|
|                           | Agrícola   | Residencial | Industrial |
|                           | Forestal   | Comercial   |            |
|                           | Recreativo   |             |            |
| Ligera                    | 200  | 200         | 500        |
| Media                     | 1,200  | 1,200       | 5,000      |
| Pesada                    | 3,000  | 3,000       | 6,000      |

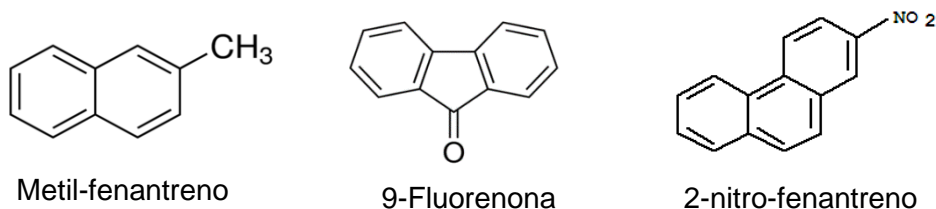
El diésel es uno de los contaminantes detectado en un 7 por ciento a nivel nacional (Figura 2). No obstante que el alto contenido de parafinas en el diésel desfavorece su filtración hacia las capas inferiores de suelo, las propiedades impermeables de éstas conducen a la infertilidad y erosión de los suelos; al cubrir las partículas de suelo, las parafinas alteran el equilibrio del agua y consecuentemente los procesos bioquímicos del suelo (Takawira et al. 2014; Koshlaf y Ball 2017).



**Figura 2.** Principales sustancias involucradas en emergencias ambientales reportadas a la PROFEPA entre 1997 y 1999 (PROFEPA, 2002).

### 2.3 Derivados de HAPs

Los derivados de los HAPs pueden ser oxigenados (-oxi HAPs), metilados (metil-HAPs) y nitrados (nitro-HAPs). Estos hidrocarburos son producto de la combustión del diésel y la gasolina, así como de reacciones químicas en el ambiente con  $O_3$ , OH, y  $NO_x$  o durante su biodegradación (Wei et al. 2015; Bandowe et al. 2017). En el caso de los HAPs metilados, también pueden encontrarse originalmente en el diésel (Hong et al. 2016). En la Figura 3 se pueden observar algunas estructuras de los derivados de los HAPs.



**Figura 3.** Derivados de HAPs (Sigma-Aldrich)

Los derivados de los HAPs pueden ser más tóxicos, mutagénicos y persistentes en el ambiente que sus compuestos padres (Hu et al. 2019; Hong et al. 2016). Otra característica de los derivados de HAPs es su solubilidad, los oxi-HAPs son más solubles en agua (Hu et al. 2019) y de acuerdo con Hong et al. (2019) y Bandowe et al. (2016) los metil-HAPs y nitro-HAPs pueden ser menos solubles (más lipofílicos) que sus compuestos de origen. En contraste Cochran et al. (2016), encontraron que algunos nitro-HAPs son más solubles en agua y por tanto pueden ser más biodisponibles y potenciar su toxicidad mientras que los metil-HAPs, dependiendo de los grupos metilos asociados a los HAPs, aumentará o disminuirá su solubilidad en agua (Kan et al. 2016).

#### **2.4 Tecnologías utilizadas en la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos**

Los distintos tratamientos para la recuperación de suelos contaminados se han diseñado con el fin de controlar, disminuir o eliminar los contaminantes presentes. La elección de la tecnología de remediación es resultado de evaluar el tipo de contaminante, así como de las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. Existen distintas tecnologías en la remediación de suelos (Tabla 3), no obstante, debido a inconvenientes como son los altos costos de remediación, deterioro de la textura del suelo (tratamientos térmicos) y los largos tiempos de tratamiento (procesos de biodegradación), el desarrollo tecnológico continúa su curso en la búsqueda de procesos más eficaces, menos costosos y más ecológicos. En el caso específico de la remediación del diésel, se han utilizado principalmente las siguientes tecnologías: biorremediación (Mariano et al. 2008; Al Disi et al. 2017), oxidación química (Lominchar et al. 2018) y lavado o enjuague de suelos con surfactantes sintéticos y biológicos



(Torres et al. 2003; Shin & Kim 2004; da Rosa et al. 2015). Las distintas tecnologías de remediación permiten conseguir los valores de contaminación que reviertan el daño ambiental y eviten un deterioro ecológico y nocivo para la salud de las personas.

| Tipo de tratamiento          | Tecnología  |
|------------------------------|---|
| Fisicoquímico                | Lavado de suelos<br>Enjuague de suelos<br>Extracción de vapor<br>Aislamiento y contención (Barreras de contención, cubierta de superficies)<br>Bombeo y tratado   |
| Biológico                    | Biorremediación<br>Composteo<br>Bioaumentación, tratamiento aeróbico y anaeróbico<br>Bioestimulación<br>Fitorremediación<br>Biopilas  |
| Químico                      | Oxidación química (reacción de fenton, ozonización, peroxi-ácidos, $\text{KMnO}_4$ , $\text{H}_2\text{O}_2$ , persulfato de sodio)<br>Oxidación ultravioleta y fotoquímica<br>Estabilización/solidificación |
| Térmico                      | Desorción<br>Incineración térmica<br>Pirólisis  |
| Eléctrico y electromagnético | Electrocinética<br>Calentamiento por radiofrecuencia<br>Calentamiento por resistencia eléctrica<br>Vitrificación  |
| Ultrasónico                  | Extracción ultrasónica<br>Degradación y oxidación sonoquímica   |

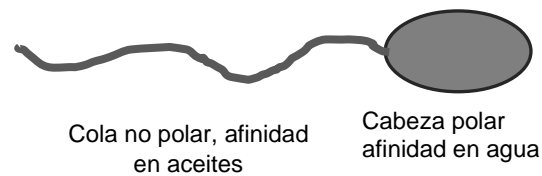
**Tabla 3.** Métodos utilizados en la remediación de hidrocarburos (Ossai et al. 2019)

## 2.5 Lavados de suelo

El lavado de suelos es una tecnología basada en la desorción de contaminantes por medio de un agente extractante que puede ser un surfactante, una mezcla de surfactantes, ciclodextrinas, ácidos, disolventes orgánicos, y aceites vegetales (Trellu et al. 2016). El lavado puede llevarse a cabo mediante tecnologías conocidas como, *ex-situ*, lavado de suelos (*soil washing*) o *in-situ*, enjuague de suelo (*flushing*). La primera utiliza el agente extractante junto con un proceso mecánico para remover el suelo, mientras que la segunda requiere la perforación de pozos de inyección y de extracción en el sitio contaminado (Khan et al. 2004). El lavado de suelos es una técnica rápida, costo-efectiva y se caracteriza por remediar suelos con alta concentración de contaminantes (Urum et al. 2004). La remediación de suelos contaminados con hidrocarburos, utilizando surfactantes, se recomienda para tratar suelos de textura arenosa y/o bajo contenido de partículas finas (limo y arcilla) y de materia orgánica (Bekfadu et al. 2015; US EPA, 1993). De acuerdo con la US EPA, 1993, la técnica de lavado de suelos no es recomendable para suelos con un contenido mayor al 30 % de limo, arcilla y materia orgánica, mientras que Bekfadu et al. (2015) la considera ineficiente en suelos con más del 20-30% de partículas finas.

## 2.6. Surfactantes

Los surfactantes son moléculas de naturaleza anfifílica que poseen en su estructura química una porción hidrofílica y otra hidrofóbica (Figura 4), lo que les permite reducir la tensión superficial e interfacial en soluciones acuosas y generar emulsiones (agua en aceite o aceite en agua). Se clasifican de acuerdo a su carga iónica como: catiónicos, zwitteriónicos, aniónicos o no iónicos (Salager 2002).



**Figura 4.** Surfactante

Las moléculas de surfactantes existen como unidades monoméricas y con el aumento de su concentración en solución estas unidades monoméricas forman agregados en la interfaz disolvente-tensoactivo formando así una estructura micelar. El número de agregados o número de moléculas por micela va a depender del tipo de surfactante y del ambiente fisicoquímico (Mnif et al. 2013; Salager, 1993).

## 2.7 Biosurfactantes

Los agentes tensoactivos biológicos, generalmente denominados biosurfactantes, son compuestos producidos a partir del metabolismo secundario, principalmente, durante la fase estacionaria del crecimiento microbiano (Pacwa-Płociniczak et al. 2011). Las levaduras y bacterias pueden producir biosurfactantes de distintos sustratos, incluyendo aceites, glicerol, carbohidratos y productos derivados del petróleo. En los últimos años, los biosurfactantes han adquirido gran importancia y podrían ser una alternativa al uso de surfactantes sintéticos, especialmente en las industrias farmacéutica, alimentaria y ambiental, debido entre muchos factores a su alta biodegradabilidad y seguridad (Sekhon Randhawa & Rahman 2014; Liu et al. 2017). De acuerdo con su estructura molecular los biosurfactantes se clasifican en: glicolípidos, lipopéptidos, fosfolípidos, ácidos grasos, lípidos neutros, componentes poliméricos y particulados (Pacwa-Płociniczak et al. 2011; Cortés-Sánchez et al. 2013) (Tabla 4).

En soluciones diluidas, las moléculas de surfactante se encuentran en el seno del medio acuoso en forma de monómeros, pero a partir de la Concentración Micelar Crítica (CMC), la fase acuosa se satura y la adición de nuevas moléculas de surfactante ocasiona la formación de agregados de tipo coloidal llamados *micelas* (Figura 5). El Balance lipofílico-hidrofílico (HLB) es otra propiedad importante, debido a que es la medida del grado en el que el surfactante es hidrófilo o lipófilo, esto con el fin de preparar emulsiones más estables (Paria 2008)

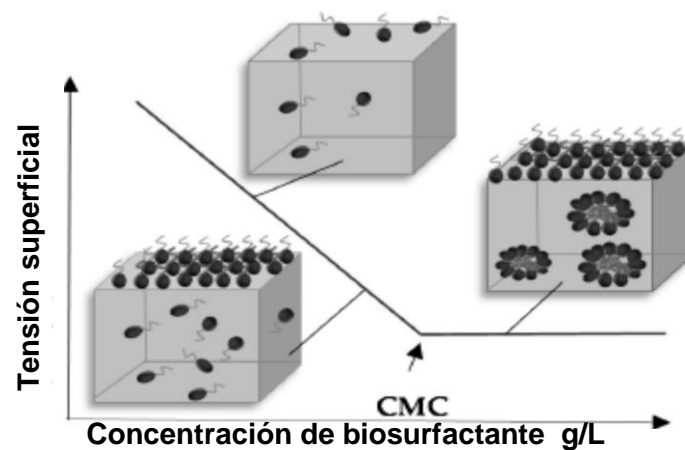


Figura 5. Tensión superficial y CMC (Santos et al. 2016)

**Tabla 4.** Clases de biosurfactantes y microorganismos productores  
(Pacwa-Płociniczak et al. 2011; Cortés-Sánchez et al. 2013)

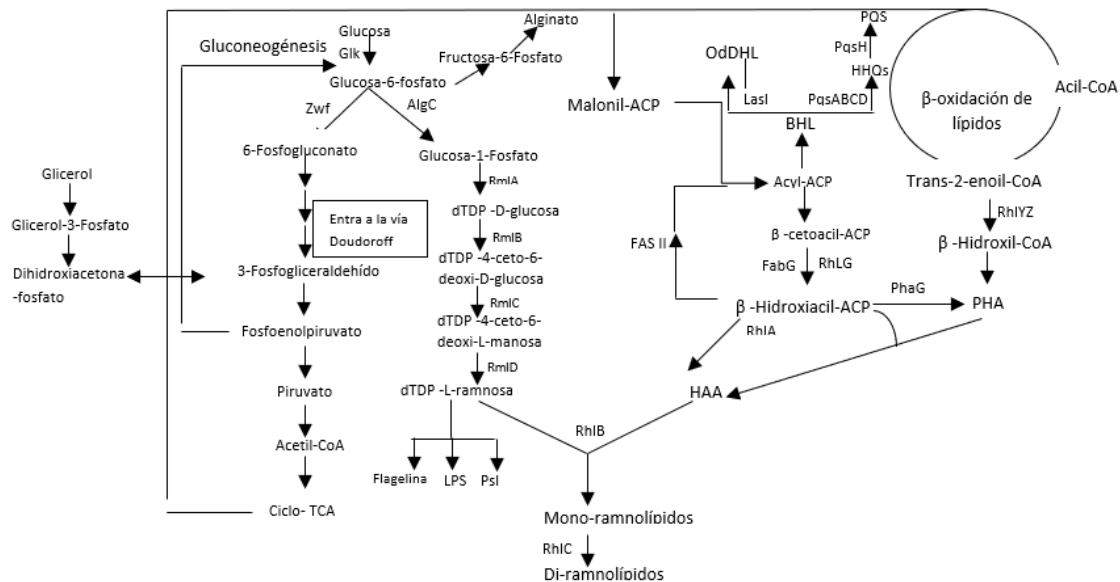
| <b>Grupo</b>  | <b>Tipo</b>  | <b>Microorganismo</b>  |
|---|--|--|
| Glicolípidos  | Ramnolípidos   | <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br><i>Serratia rubidea</i><br><i>Burkholderia thailandensis</i>                |
|   | Trehalolípidos   | <i>Rhodochococ</i><br><i>Mycobacterium ssp.</i>  |
|   | Lípidos de Manosiliretritol                              | <i>Torulopsis bombicola</i>  |
|   | Soforolípidos A  | <i>Candida antarctica</i>  |
|   | Surfactina, fengecina,<br>Turina, subtilisina            | <i>Bacillus subtilis</i>   |
| Lipopéptidos  | Polimixinas  | <i>Bacillus polymyxa</i>   |
|   | Gramicidinas   | <i>Bacillus Brevis</i>   |
|   | Liquenicina (péptido-<br>lípidos)                        | <i>Bacillus licheniformis</i>  |
|   | Viscocina  | <i>Pseudomonas<br/>fluorenses, Leuconostoc<br/>mesenteriodes</i>   |
|   | Serrawitina  | <i>Serratia marcescens</i>   |
|   | Fomafungi  | <i>Phomasp 231</i>   |
| Ácidos grasos,<br>lípidos neutros y<br>fosfolípidos | Ácido spucilscorico                                      | <i>Penicillium spiculisporum</i>   |
|   | Diglicosil diglicerides<br>Glicerol Liamosin             | <i>Lactobasilus fermentum</i><br><i>Aerobacidiumpullants</i>   |
|   | Otros Lípidos neutrales<br>Otros Fosfolípidos<br>Emulsan | <i>Nocardia erithropolis</i><br><i>Thiobacillus tiooxidants</i><br><i>Acinetobacter colcoaceticus</i>        |
| Surfactantes<br>poliméricos                         | Liposan  | <i>Candida lipolítica, Acinetobacter<br/>radioresistens KA-53</i>  |
|   | Biodespersan<br>Manoproteínas                            | <i>Arthrobacter colcoaceticus RAG-1</i><br><i>Sacharomyces cerevissiae,</i><br><i>Kluyvermyces marxianus</i> |
|   | EPS  | <i>Galactomices sp,</i>  |
| Biosurfactantes<br>particulados                     | Vesículas y fimbrias                                     | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>   |

## **2.8 *Pseudomonas aeruginosa***

*P. aeruginosa* es una bacteria gram-negativa que no esporula. Habita en el agua, suelo y plantas, lo que le ha permitido sobrevivir a un amplio intervalo de condiciones ambientales, y adquirir su carácter de patógeno oportunista. No obstante esta característica generalizada, *P. aeruginosa* ATCC 9027 es una cepa segura, no patógena y utilizada en la producción de distintos metabolitos, de entre cuales destacan los surfactantes mono-ramnolípidos (Grosso-Becerra et al. 2016).

## **2.9 Síntesis de ramnolípidos**

La L-ramnosa, uno de los precursores de los ramnolípidos, puede ser sintetizada ya sea a partir de la glucosa adquirida por *P. aeruginosa* del ambiente, de la degradación de glicógeno intracelular, o mediante gluconeogénesis. En lo que respecta a la cadena hidrocarbonada (ácidos grasos), ésta es sintetizada por la enzima RhLA a partir de la síntesis de lípidos (Suh et al. 2019). Los ramnolípidos son sintetizados por dos enzimas: ramnosiltransferasa 1 (RhIB) y ramnosiltransferasa 2 (RhIC). La primera enzima forma los mono-ramnolípidos a partir de la transferencia de la L-ramnosa a la cadena de ácidos grasos. La enzima ramnosiltransferasa 2 (RhIC) forma los di-ramnolípidos al transferir una segunda molécula de L-ramnosa a los mono-ramnolípidos (Figura 6). *P. aeruginosa* ATCC 9027 pertenece al grupo de cepas que carecen del gen *rhIC*, que codifica para la enzima RhIC, y por tanto solo produce surfactantes del tipo mono-ramnolípidos (Grosso-Becerra et al. 2016).



**Figura 6.** Biosíntesis de ramnolípidos (Suh et al. 2019)

## 2.10 Biosurfactantes ramnolípidos y sus propiedades

Los ramnolípidos son los biosurfactantes más ampliamente estudiados, producidos principalmente por distintas cepas de *P. aeruginosa*. La producción de ramnolípidos puede iniciarse en la fase estacionaria o exponencial del crecimiento microbiano (Mnif et al. 2017). La mayoría de estas cepas producen mono y di-ramnolípidos (Figura 7) con una o dos cadenas de 3-hidroxi ácidos grasos de entre 8 y 32 átomos de carbono (Abdel-Mawgoud et al. 2010) y más de 60 congéneres (Tiso et al. 2017). La distribución de congéneres depende de la cepa, la composición del medio, fuente de carbono, condiciones del cultivo y el tiempo del cultivo (Nogueira et al. 2015).

Los ramnolípidos más abundantes en los cultivos microbianos son el ramnosil-3-hidroxi-decanoil-3-hidroxi-decanoato (Rha-C10-C10), un mono-ramnolípidos y el ramnosil-ramnosil-3-hidroxi-decanoil-3-hidroxi-decanoato (Rha-Rha-C10-C10), un di-ramnolípidos. Sus principales ventajas son: actividad superficial, baja toxicidad, alta biodegradabilidad, diversidad estructural y estabilidad a condiciones extremas de pH,

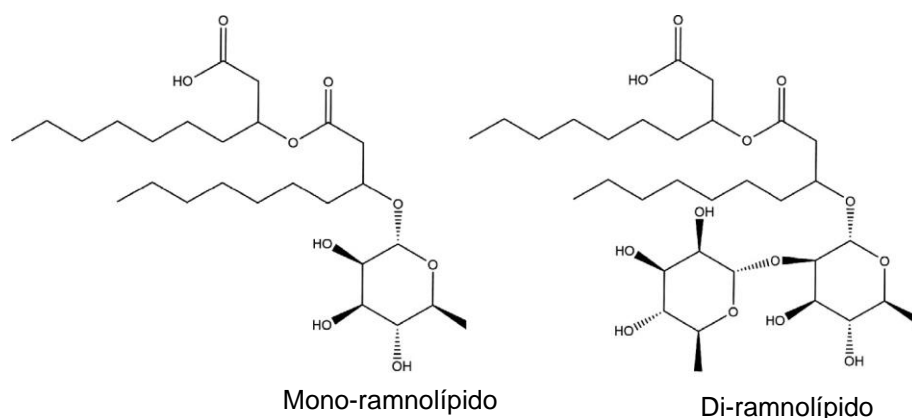
temperatura y concentración de sales (Abdel-Mawgoud et al. 2009; Johann et al. 2016).

Se ha reportado que los mono-ramnolípidos tienen un pKa de 5.5-5.9 y los di-ramnolípidos de 5.6. Por tanto, por arriba de su pKa (pH neutro o alcalino) los mono-ramnolípidos pueden ser aniónicos ( $-\text{COO}^-$ ) y por debajo de su pKa (pH ácido) no-iónicos ( $-\text{COOH}$ ) (Lebrón-Paler y Pemberton, 2006; Abbasi et al. 2013). Esta propiedad determina la solubilidad en agua del ramnolípidos; a pH ácidos son menos solubles y a pH neutro y alcalino son más solubles. El pH también afecta la morfología y tamaño de los agregados moleculares, por ejemplo, Champion et al. (1995) observó cambios en la estructura de los mono-ramnolípidos a distintos pH. Estos autores reportaron que a pH 7.0 prevalecen las estructuras micelares, y que en un intervalo de pH de 6.8-8.0 se pueden encontrar micelas de tamaños muy pequeños (3-5 nm), mientras que a pH de 5.5-6.5 predominaban las estructuras lamelares y vesiculares (Figura 8). Estos agregados, también pueden ser afectados por la concentración del surfactante, co-solutos, metales presentes y por la concentración iónica (Lovaglio et al. 2011).

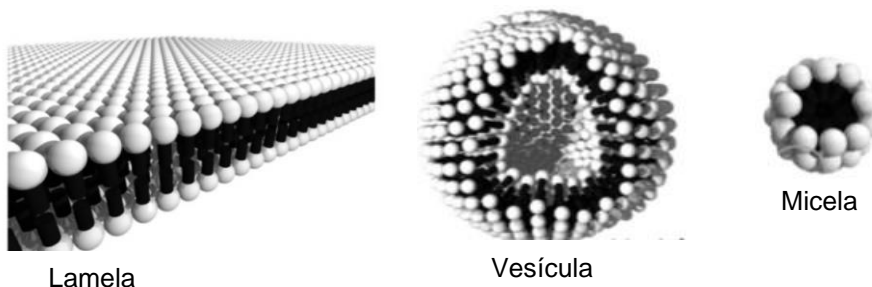
Los distintos agregados moleculares se forman por arriba de la CMC. La CMC está determinada por distintos factores, entre ellos, la naturaleza del biosurfactante y la longitud de la cadena hidrocarbonada, por ejemplo, cadenas más cortas proporcionarán una CMC más alta (Nitschke et al. 2005;). Para los ramnolípidos se ha reportado una CMC en un intervalo de 5 a 200 mg/L (Lebrón-Paler y Pemberton, 2006). Los valores del HLB de los ramnolípidos, estará de acuerdo a la estructura del surfactante, así como por el método analítico aplicado para la determinación de este parámetro. Por ejemplo, en una escala de 0-20, el HLB de los ramnolípidos producidos por *Pseudomonosa* AT10 se reportó igual a 10.07 (Abalos et al. 2004), mientras que



para los ramnolípidos producidos por *Pseudomonas* UG2 dos valores diferentes de HLB fueron obtenidos, de 17 y 24.1 al aplicar dos métodos de cálculo distintos (Noordman et al. 2002). Para mono-ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* se ha reportado un HLB de 6.5 por el método de Griffin (De Rienzo et al. 2016) y de 8.4 con el método de Davies (Müller et al. 2012). De acuerdo con Akbari et al. (2018), surfactantes con un HLB alto (>8) son adecuados para formular emulsiones aceite en agua y con HLB bajo (3-6), son adecuados para formular emulsiones agua en aceite.



**Figura 7.** Estructuras de los ramnolípidos (Bai & McClements 2016)



**Figura 8.** Agregados moleculares del biosurfactante ramnolípido (Bodagh et al 2013)

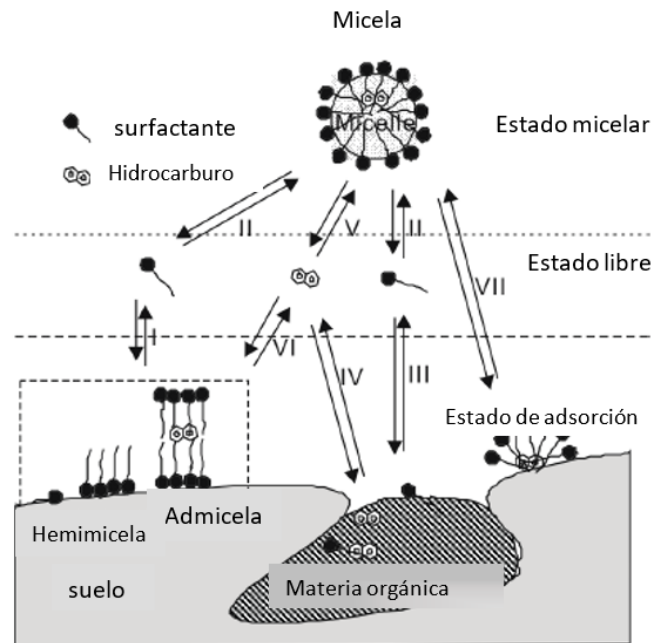
## 2.11 Aplicaciones de los ramnolípidos

Entre las distintas aplicaciones de los ramnolípidos se encuentran la recuperación mejorada del petróleo, biorremediación y remediación de sitios contaminados con

hidrocarburos, plaguicidas químicos y metales (Ni, Cr, Zn, Cd etc.) (Liu et al. 2017). En la limpieza de membranas de ultrafiltración, los ramnolípidos han tenido buenos resultados (Long et al. 2014). En la agricultura, en el control de plagas, así como en la formulación de plaguicidas como agentes emulsificantes y dispersantes, y como agentes insecticidas o antimicrobianos, por ejemplo, contra la larva *Aedes aegypti* y contra *Phytophthora sojae* (Chen et al. 2017; Chong & Li 2017). En la protección de cultivos. Debido a sus propiedades antifúngicas, se utiliza como agente para biocontrol. Actúa como un agente estimulador de genes involucrados en la defensas de algunas plantas (Chen et al. 2017). Mejora la calidad de los suelos agrícolas, manteniendo su humectabilidad (Sekhon Randhawa & Rahman 2014). En la industria alimentaria también los ramnolípidos poseen importancia como agentes emulsificantes y solubilizantes, así como antimicrobianos y como fuente de (L)-ramnosa para la producción de saborizantes. En el área médica, en tratamientos de psoriasis y como agente para prevenir infecciones. Los ramnolípidos inhiben la formación de biofilm de patógenos resistentes, como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* entre otros (Chen et al. 2017). Funcionan también como inhibidores del crecimiento de algunas líneas celulares cancerígenas, por ejemplo, JMSU-1 y Hella. En el área cosmética y farmacéutica también han mostrado aplicaciones importantes en la formulación de pastas dentales, desodorantes, repelentes de insectos, shampoos y jabones, así como en la síntesis de nanopartículas de zinc (Sekhon Randhawa & Rahman 2014; Rikalović et al. 2015).

## 2.12 Mecanismo de desorción de hidrocarburos en el lavado de suelos

El mecanismo de desorción de hidrocarburos en el lavado de suelos se da por dos mecanismos, movilización y solubilización (Figura 9).



**Figura 9.** I. Sorción del surfactante en la superficie. II. Formación de la micela. III. Sorción del surfactante en la materia orgánica. IV. Partición de los Hidrocarburos entre el agua y materia orgánica. V. Partición de los Hidrocarburos entre el agua y la micela. VI. Partición de los Hidrocarburos entre la fase pseudomicelar y el agua. VII. Solubilización de los Hidrocarburos. Tomado de: (Chong et al. 2014).

La movilización ocurre por debajo de la CMC y está asociada a la disminución de la tensión superficial e interfacial entre los sistemas aire/agua y suelo/agua, debido a esto, aumenta el ángulo de contacto entre el contaminante y el suelo disminuyendo las fuerzas capilares que los mantienen unidos, transfiriendo al contaminante a la fase acuosa. En el caso de la solubilización, ocurre por arriba de la CMC, por la incorporación del contaminante en el corazón de las micelas (Chong et al. 2014; Mao

et al. 2015; Pacwa et al. 2011). Generalmente, la solubilización es seguida de la movilización (Mnif et al. 2013).

### *3. Justificación*

El derrame de petróleo y sus derivados, como el diésel representan una de las principales causas de contaminación de suelos, agua y aire. Debido a las propiedades tóxicas cancerígenas y recalcitrantes que poseen algunos de sus componentes, el desarrollo de tecnologías para su eliminación del medio ambiente ha sido de sumo interés en los últimos años. El lavado de suelos mediante surfactantes sintéticos ha sido una de las estrategias que ha demostrado resultados exitosos en la recuperación de suelos impactados con hidrocarburos en tiempos cortos. El inconveniente del uso de los surfactantes sintéticos es su toxicidad, a diferencia de los surfactantes de origen biológicos que poseen baja toxicidad y alta biodegradabilidad. Los biosurfactantes ramnolípidos han sido probados en estudios de remediación de diversos compuestos tóxicos presentes en el suelo. Por lo que podrían ser una alternativa para la remediación de suelos contaminados con diésel recalcitrante.

# *4. Hipótesis y Objetivos*

#### **4.1 Hipótesis**

Los mono-ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* ATCC 9027 aplicados en el proceso de lavado de suelos contaminados con diésel recalcitrante, pueden mejorar la remoción de hidrocarburos en comparación con el agua y un surfactante sintético.

#### **4.2 Objetivos**

##### **4.2.1 Objetivo general**

Evaluar la efectividad de los mono-ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* ATCC 9027 sobre la remoción del diésel recalcitrante contenido en un suelo franco-arenoso.

##### **4.2.2 Objetivos particulares**

- Producir y caracterizar los mono-ramnolípidos de *P. aeruginosa* ATCC 9027.
- Determinar las características fisicoquímicas del suelo contaminado con diésel.
- Evaluar el efecto de la concentración del Tween 80 y de los mono-ramnolípidos, así como el tiempo de lavado del suelo en la remoción del diésel.



# *5. Materiales y Métodos*

### **5.1 *Pseudomonas aeruginosa***

La cepa de *P. aeruginosa* fue obtenida de la colección nacional de microbiología y cultivos celulares (CDBB) del CINVESTAV-IPN. Se cultivó en caldo nutritivo (50 mL) durante 24 horas a 37 °C y 150 rpm. La biomasa se separó por centrifugación (10,000 rpm por 15 min) y el paquete celular fue resuspendido en 1 ml de leche descremada (Santa Clara) para la liofilización y conservación a 4°C (Burguet-Lago et al. 2014).

### **5.2 Producción del biosurfactante ramnolípido por *P. aeruginosa* ATCC 9027**

La producción de mono-ramnolípidos fue realizada por el método propuesto por Zhang & Miller (1992), utilizando glicerol como fuente de carbono (Santos et al. 2002). Una muestra de *P. aeruginosa* fue inoculada en 125 ml de medio mínimo Kay's (0.3 %  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 0.2 %  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.5  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{FeSO}_4$ , y 0.1 %,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) e incubado a 250 rpm y 37 °C por 20-24 h. Una alícuota (4 mL) del cultivo con bacterias fue inoculado en un matraz Erlenmeyer de 1 L con 400 mL de medio PPGAS (0.02 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.02 M  $\text{KCl}$ , 0.12 M  $\text{Tris-HCl}$ , 1 % proteosa-peptona, y 0.0016M  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), ajustado a un pH de 7.0 y preparado con 3 % de glicerol como fuente de carbono. La propagación se realizó a 250 rpm y 37°C por 144 horas.

Para el análisis del crecimiento microbiano por peso seco (50°C), se tomaron muestras del cultivo cada dos horas, y luego se centrifugaron a 10,000 rpm por 15 min. El sobrenadante se utilizó para determinar la actividad superficial, mediante el método del anillo en un tensiómetro Lauda model TD1-C, Du Noüy. La prueba de dispersión de gota se realizó en 40 ml de agua destilada contenidos en una caja Petri (9 cm). Una gota de aceite de motor se colocó sobre la superficie de agua y posteriormente se adicionaron 20  $\mu\text{l}$  del sobrenadante. El diámetro de la zona clara fue medido y la

concentración del ramnolípido fue determinado por interpolación en una curva de calibración (Zhao et al. 2016) (Anexo 1).

### **5.3 Evaluación preliminar del biosurfactante**

#### **5.3.1 Carga iónica del biosurfactante**

Para identificar el carácter iónico del biosurfactante, se prepararon placas de Agar Siegmund y Wagner, constituido por un medio mínimo de sales, agar y glicerol al 2 % o glucosa 2 g/L. Además, se adicionó Bromuro de Cetiltrimetil-Amonio (CTAB) 0,2 g/L y azul de metileno 0,005 g/L (Siegmund & Wagner 1991; Pinzon & Ju 2009). Posteriormente, en el agar se realizaron perforaciones con puntas estériles y se colocaron 40 µl de medio de cultivo, tomado de un cultivo de *P. aeruginosa* ATCC 9027 de 48 horas. Como control negativo se utilizó Tween 80 y como control positivo duodecil sulfato de sodio (SDS) (Sigma Aldrich). La presencia del biosurfactante se constató por la presencia de un halo azul alrededor de las colonias, después de 48 horas de incubación a 30 °C (Tabuchi et al. 2015).

#### **5.3.2 Identificación de tipo de ramnolípido**

Para identificar el biosurfactante ramnolípido se usó Cromatografía en capa fina (TLC). Se prepararon placas de gel de sílice en porta objetos, una vez solidificadas se colocaron 5 µl de extracto crudo a las placas y se eluyeron con una mezcla de disolventes (fase móvil) cloroformo:metanol:ácido acético (70:10:2). El revelado se realizó mediante el reactivo de antrona, para identificar indirectamente moléculas de ramnolípido mediante una coloración verde-azulada (Smyth et al. 2014). Como estándar se utilizó R90 (Sigma Aldrich) que consiste en una mezcla de di-ramnolípidos y mono-ramnolípidos. Todos los disolventes usados fueron grado HPLC.

### **5.3.3 Selección de la fuente de carbono**

#### **5.3.3.1 Prueba de colapso de gota y prueba de dispersión de gota**

La prueba de colapso de gota se realizó en un portaobjetos cubierto con una capa de keroseno. Sobre el keroseno se colocó una gota de medio de cultivo libre de células, es decir, los cultivos implementados con glucosa o glicerol como fuente de carbono. Después de 5 minutos se observó si la gota colapsó (Joy et al. 2017). Como control negativo se utilizó medio sin inocular. La prueba de dispersión de gota se realizó para seleccionar la fuente de carbono y posteriormente para la cuantificación de la producción de ramnolípidos, como se describe en el apartado 6.3.

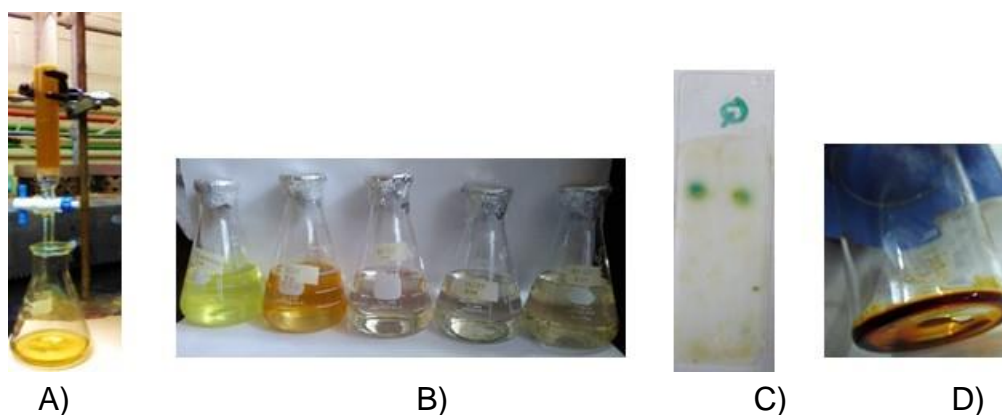
### **5.4 Separación y purificación del ramnolípidos**

El sobrenadante se acidificó a pH 2-3 con HCl concentrado y se guardó toda la noche a 4°C. El biosurfactante fue separado del sobrenadante por extracción líquido-líquido con etil acetato en una proporción 1:1 v/v; el mono-ramnolípidos fue recuperado de la fase orgánica por evaporación del solvente a 67 °C (Buchi RE 121, Switzerland) (Smyth et al. 2014) ( Figura 10).



**Figura 10.** Producción y extracción del mono-ramnolípidos

La purificación del biosurfactante crudo se realizó por cromatografía en columna como lo reporta Smyth et al. (2014) y Patowary et al. (2017). Una muestra del biosurfactante crudo (0.8 g) fue disuelto en 25 ml de cloroformo y colocado en una columna de vidrio de 1.4x35 cm, empacada con 11 g de silica gel. La columna se lavó con cloroformo hasta que los lípidos neutros fueron completamente eluidos. Luego, 8 mezclas de cloroformo-metanol (97:3; 95:5; 90:10; 85:15; 80:20; 75:25; 70:20; 50:50 v/v) se adicionaron secuencialmente a la columna hasta la elución del biosurfactante (Figura 11). El cambio del eluyente en la mezcla se controló por TLC sobre placas de silica gel, usando cloroformo/metanol/ácido acético (70:10:2 v/v/v) como eluyente; el ramnolípido se detectó por medio del reactivo de antrona como agente revelador (Smyth et al. 2014). Para confirmar la presencia de ramnolípidos se usó un estándar de ramnolípidos (R90 Sigma Aldrich). La elusión del ramnolípido se recuperó por evaporación de la mezcla de solventes a 60 °C. El biosurfactante ramnolípido (sólido café) fue colectado con alcohol absoluto, filtrado con un filtro de 0.22 µm, liofilizado y almacenado a -20 °C hasta su uso.



**Figura 11.** Purificación del mono-ramnolípido. A) Purificación en columna, B) Fracciones obtenidas de la columna cromatográfica, C) TLC, D) mono-ramnolípido purificado

## **5.5 Propiedades del ramnolípido purificado**

### **5.5.1 Actividad emulsificante**

La actividad emulsificante del biosurfactante ramnolípido (Figura 12), se realizó por duplicado en tubos de ensayo usando keroseno, diésel, aceite de oliva y aceite de maíz como fase oleosa



**Figura 12.** Índice de emulsificación

Se mezcló la solución del mono-ramnolípido purificado a distintas concentraciones (0.05, 0.1, 0.2 y 0.5%) en una relación 1:1 en un vortex a altas revoluciones por 2 min, a las 24 horas, se midió la capa de la emulsión. El índice de emulsificación se calculó como la capa de la emulsión y el total del líquido ( $\%E = (\text{altura de emulsión} / \text{altura total}) \times 100\%$ ) (Patowary et al. 2017).

### **5.5.2 Concentración Micelar Crítica (CMC)**

La CMC del ramnolípido purificado se determinó por duplicado mediante la tensión superficial (tensiómetro Lauda modelo TD1-C) de la solución del ramnolípido en un intervalo de concentración de 0 a 200 mg L<sup>-1</sup>. El ramnolípido fue disuelto en alcohol absoluto y diluido con agua desionizada a la concentración deseada. El pH de la solución biosurfactante fue ajustado a 7 con NaOH 1 N y la medida de la tensión

superficial se realizó a 25 °C. La CMC se calculó del punto de inflexión en la curva de la tensión superficial versus concentración (Lan et al. 2015).

### **5.6 Caracterización estructural del biosurfactante ramnolípido**

La caracterización del biosurfactante producido se realizó por Espectrometría de masas de ionización por electroespray (ESI- MS) y resonancia magnética nuclear (NMR). ESI-MS se utilizó para identificar los posibles congéneres, y la RMN para confirmar la estructura molecular del biosurfactante.

Una muestra del 0.5 mg se disolvió en 1 ml de metanol HPLC y se inyectó directamente en el sistema ESI-MS (3200 QTRAP, Linear Ion Trap Quadrupole, AB Sciex Instruments, Foster City, CA, USA) en modo ion negativo a un flujo de 10  $\mu\text{L min}^{-1}$ . El nitrógeno se utilizó para nebulizar y como gas de colisión. Se usó un voltaje de -4000 V a una temperatura de 150 °C. La producción de diferentes congéneres de mono-ramnolípidos se obtuvo de la intensidad relativa de su correspondiente ion pseudomolecular (Monteiro et al. 2007). Para el análisis de la fragmentación de la molécula (ESI-MS/MS), se usó una energía de colisión de -50 eV.

En cuanto a los espectros  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN del ramnolípido purificado, estos se midieron por un espectrómetro Varian Mercury 300 operado a 300 MHz. Se utilizó metanol deuterado como disolvente. Las señales se asignaron usando datos de la literatura y con el estándar R90 (mezcla de mono-ramnolípido y di-ramnolípido).

### **5.7 Caracterización del suelo contaminado**

El suelo contaminado fue colectado cerca de una estación ferrocarrilera del estado de Tlaxcala, México. Se secó a temperatura ambiente y se pasó a través de un tamiz de 2 mm, después se almacenó a 4 °C hasta su uso. La caracterización del suelo se

realizó en relación con sus propiedades fisicoquímicas y biológicas. Densidad real, pH, humedad, capacidad de retención de agua, carbono orgánico total, materia orgánica, fósforo disponible, porosidad, densidad aparente, conductividad eléctrica, cuenta microbiana y textura (NOM-021-RECNAT-2000. 2002; Jaramillo 2002; Black et al. 1965; Fernández Linares 2006). La clasificación de la textura del suelo se determinó de acuerdo con la World Reference Base-FAO (WRB 2015).

### **5.8 Efecto del Tween 80 en la remoción del diésel**

Las pruebas de lavado se realizaron en viales de 120 ml, cada uno preparado con 5 g de suelo contaminado y 25 ml de soluciones de tween 80 en concentraciones porcentuales del 1, 2, 5 y 10. El control positivo se implementó con 25 mL de agua destilada. El proceso de lavado se realizó durante un tiempo de 24, 48 y 72 horas, bajo condiciones de agitación de 150 rpm y a una temperatura de  $29 \pm 1$  °C. Al término del proceso de lavado, el suelo se dejó sedimentar en los viales (aprox. 1 hora) para su posterior recuperación por sedimentación y filtración; los restos de agua en el suelo fueron eliminados por evaporación a temperatura ambiente. Una vez seco el suelo, éste fue sometido a un proceso de extracción sólido-líquido para la extracción en Soxhlet de hidrocarburos residuales.

### **5.9 Efecto de los mono-ramnolípidos en la remoción del diésel**

Se prepararon 5 g de suelo que fueron suspendidos en 25 mL de una solución de biosurfactante de concentración conocida (0.05, 0.1, 0.2 y 0.5%); en cada caso el ramnolípidos fue adicionado en solución alcohólica (Baziar et al. 2013). El lavado de suelo contaminado se realizó por triplicado a  $29 \pm 1$  °C y 150 rpm en intervalos de



tiempo de 24, 48, 72, 168 y 360 horas. Una solución alcohólica (0.5-5 %v/v) de pH=7 (1N de NaOH) se utilizó como control negativo.

El diésel residual en el suelo tratado se determinó por una extracción sólido-líquido en un sistema Soxhlet usando como solvente acetona-hexano en una relación 1:1 (EPA 1986; NOM-138-SEMARNAT/SS-2003. 2005). La extracción de los hidrocarburos se realizó durante 8 horas, en muestras de suelo de 2-3 g empacadas en cartuchos de fibra de vidrio de 28 x 60 mm; en cada cartucho, el suelo se adicionó mezclado con sulfato anhidro de sodio en una relación 1:1. Los hidrocarburos extraídos se colectaron con una solución de acetona:hexano (1:1) y se filtraron (0.22  $\mu$ m) en viales ámbar de peso conocido. El disolvente se evaporó a temperatura ambiente y la masa de los hidrocarburos se determinó por diferencia de pesos (Figura 13).

La concentración de posibles ramnolípidos extraídos juntos con los hidrocarburos del suelo tratado fue determinado utilizando el reactivo de antrona como lo documenta Smyth et al. (2014) (Anexo 2).

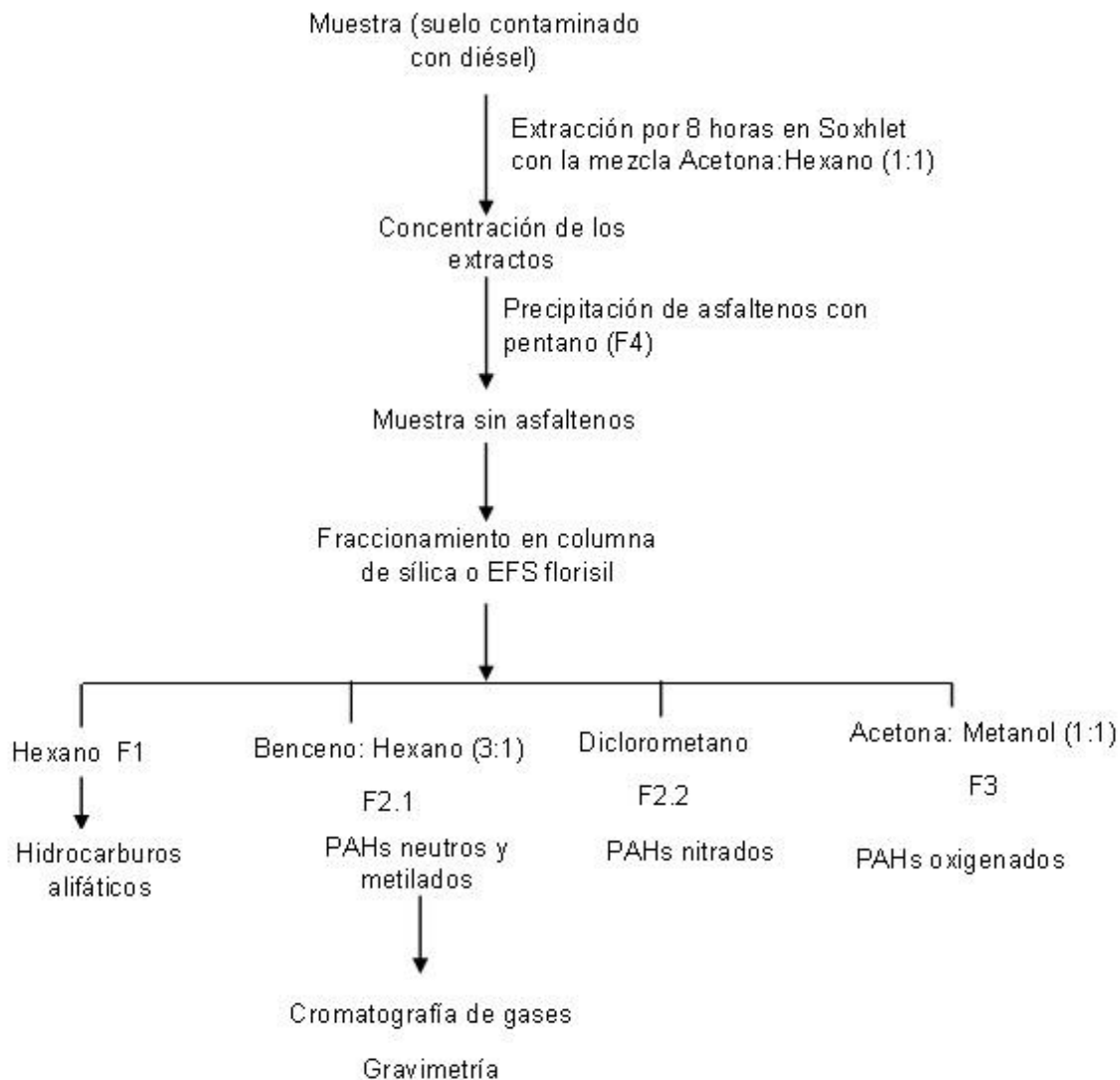


**Figura 13.** Lavado de suelos y extracción de hidrocarburos

Los hidrocarburos extraídos se diluyeron en 8 ml de diclorometano, y las muestras de 20-100  $\mu\text{L}$  de disolvente se mezclaron con 1 ml del reactivo de antrona. La mezcla se calentó por 8 min a  $80^{\circ}\text{C}$  y la absorbancia se determinó a 625 nm. La concentración de los ramnolípidos en las muestras de hidrocarburos se determinó por interpolación en una curva de calibración de mono-ramnolípidos purificados trazada para un intervalo de concentración  $0.05\text{-}0.8\text{ g L}^{-1}$  (Anexo 3).

#### **5.10 Fracciones de hidrocarburos removidos por lavado con mono-ramnolípidos, de un suelo contaminado con diésel**

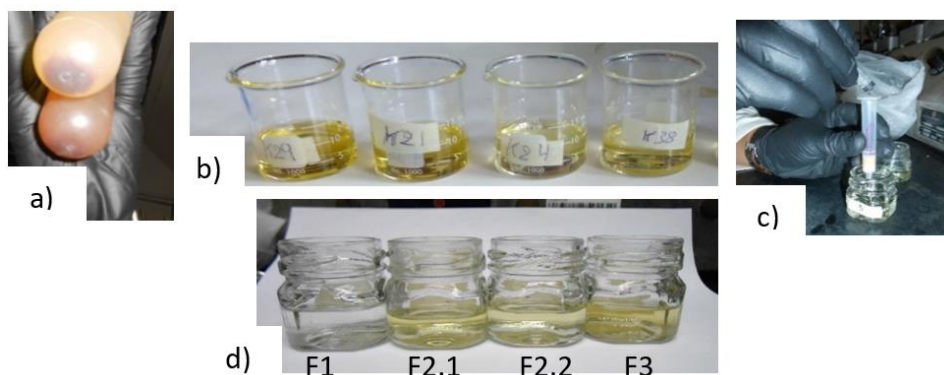
Los hidrocarburos extraídos del suelo tratado se fraccionaron para el análisis. Asfaltenos (ASPH), hidrocarburos alifáticos (F1) y alguno de los distintos compuestos de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs): HAPs neutros y metilados (F2.1), HAPs nitrados (F2.2), y HAPs oxigenados (F3) (Fushimi et al. 2012). Los asfaltenos se precipitaron con 8 ml de pentano a partir de muestras de hidrocarburo entre 20 y 50 mg. (Figura 14). Los sólidos se separaron por centrifugación (10,000 rpm y  $4^{\circ}\text{C}$  por 5 min) y colectados con benceno HPLC para su almacenamiento en viales color ámbar de peso conocido. La masa de los asfaltenos y de los hidrocarburos ligeros fue determinada por diferencia de pesos después de la evaporación del disolvente.



**Figura 14.** Análisis de hidrocarburos

Las diferentes fracciones de hidrocarburos fueron separadas por extracción en fase sólida (EFS), usando cartuchos de florisil (Strata® FL-PR Florisil 500 mg of 3 ml). Los cartuchos de EFS fueron acondicionados con n-hexano y diclorometano (4 ml de hexano, 4 ml de diclorometano y 4 ml de n-hexano) y posteriormente cargados con 15-20 mg de la fracción de hidrocarburos ligeros solubilizados en 1 ml de n-hexano. Las fracciones F1, F2.1, F2.2, y F3 de hidrocarburos, fueron secuencialmente separadas

por elución con 12 ml de n-hexano, 6 ml de una mezcla de disolvente de benceno y n-hexano (3:1), 6 ml de diclorometano y 4 ml de mezcla (1:1) preparada con acetona y metanol (Later et al. 1981; Del Rosario Sienna & Rosazza 2006). La elución se realizó con el apoyo de una jeringa y las fracciones se colectaron a través de un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  y se colocaron en un vial ámbar de peso conocido (Figura 15).



**Figura 15.** Separación de hidrocarburos. a) Eliminación de asfaltenos b) muestras libres de asfaltenos c) EFS de muestras d) fracciones de hidrocarburos

Después de la evaporación del disolvente a temperatura ambiente, la masa de los hidrocarburos recuperados se determinó por diferencia de peso y las muestras se almacenaron a 4 °C hasta su identificación por cromatografía de gases.

El análisis de hidrocarburos se realizó en un cromatógrafo Perkin Elmer Clarus 500 implementado con una columna de 100% Dimetil polisiloxano Thermo Scientific (30 mL x 0.25mm ID x 1.0  $\mu\text{m}$ ). La temperatura del programa implementado permitió la detección de estándares de HAPs compuesta por 16 compuestos (EPA 610 PAH), los cuales se diluyeron con una mezcla de disolvente hexano:diclorometano (3:1). La temperatura del detector y del inyector fue de 290 y 320 °C respectivamente, el flujo

del nitrógeno, utilizado como gas acarreador, fue de 50 mL/min. La temperatura inicial del horno se fijó a 65 °C por 3 minutos y esta temperatura se incrementó a 310°C en tres rampas de temperatura. Primera rampa: incremento de la temperatura a 25 °C/min hasta 180°C (5 min); segunda rampa: aumento de la temperatura a 10°C/min hasta 280 °C (2 min); tercera rampa: aumento de la temperatura a 5°C/min hasta 310°C (45 min). Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) para el análisis cromatográfico de los HAPs probados, calculados a partir de los datos de la desviación estándar de los datos experimentales y la pendiente de la curva de calibración (Shrivastava & Gupta 2011), son los siguientes: naftaleno (NAF) 0.92 y 2.8 mg L<sup>-1</sup>, acenaftileno (ACI) 2.48 y 7.53 mg L<sup>-1</sup>, acenafteno (ACE) 0.92 y 2.79 mg L<sup>-1</sup>, fenantreno (FE) 2.92, y 8.87 mg L<sup>-1</sup>. La linealidad correspondiente a cada fracción fue de 0.998, 0.995, 0.997 and 0.998. El tiempo de retención (min) correspondiente a cada hidrocarburo mencionado fue de 13.63, 18.65, 19.25 y 24.17, respectivamente (anexo 4,5,6,7).

### **5.11 Mecanismo de desorción del diésel y análisis de micelas por TEM**

La solución del biosurfactante que mejor desorbió el diésel añejo (0.5 %) y el sobrenadante del sistema de lavado se analizaron por Microscopía electrónica de transmisión (TEM). Una gota de cada muestra fue colocada sobre unas rejillas de cobre. Las muestras fueron teñidas durante 30 s con una gota de solución de ácido fosfotungstínico (2%, w/v). Las rejillas se examinaron por TEM (JEOL: JEM 1400), bajo un voltaje de 80 kV. Las imágenes del TEM se analizaron por MATLAB (versión 7.0 (R14/2004) y el tamaño de gota se ajustó con una función proporcional a la función de distribución de Schulz (SDF),  $\sim r^z \exp(-(z+1)r/\langle r \rangle) / \langle r \rangle^{z+1}$ , donde  $\langle r \rangle$ , es la media del

radio. En esta función el parámetro  $z$  se usó para definir la desviación de la media cuadrática ( $\sigma = \langle r \rangle (z+1)^{-1/2}$ ) de la media del tamaño de gota. Cabe señalar que el SDF se usa frecuentemente para describir suspensiones coloidales polidispersas (Schulz 1939).

### **5.12 Análisis estadísticos**

Los diseños experimentales se realizaron por duplicado o triplicado y los resultados fueron expresados como la media del error estándar. El análisis estadístico se realizó usando Minitab 18. Las diferencias significativas entre la media se determinaron por la prueba de Tukey's ( $P < 0.05$ ).

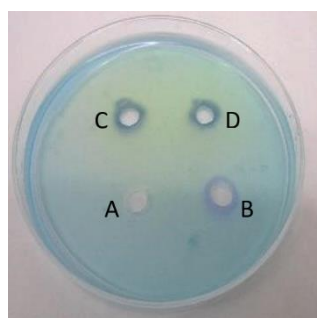
## *6. Resultados y Discusión*

## 6.1 Evaluación preliminar del biosurfactante

Se evaluó de manera preliminar el extracto crudo del biosurfactante obtenido a partir de una extracción líquido-líquido con etil acetato, para identificar la carga iónica, el tipo de biosurfactante y posteriormente se seleccionó la fuente de carbono para su producción en matraz agitado y en biorreactor.

### 6.1.1 Carga iónica del biosurfactante

El carácter aniónico del biosurfactante fue confirmado por la formación del halo azul (Figura 16), producido a partir de la interacción entre el mono-ramnolípido, el CTAB y el azul de metileno (Siegmund & Wagner 1991).



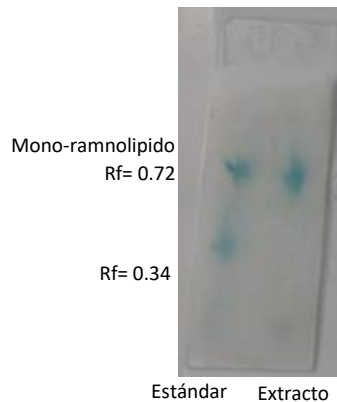
**Figura 16.** Prueba del halo azul CTAB. A) control negativo (Tween 80); B) control positivo (SDS); C) *P. aeruginosa* en PPGAS con glicerol; D) *P. aeruginosa* en PPGAS con glucosa.

### 6.1.2 Identificación del tipo de ramnolípido

Se determinó un factor de retención de 0.7 para la mancha del biosurfactante producido por *P. aeruginosa* crecida en glicerol como fuente de carbono. Este valor sugiere la presencia de un mono-ramnolípido (Figura 17), de acuerdo con los resultados publicados por Bhat et al. (2015). Al analizar un estándar de ramnolípido (Jeniel), estos autores midieron factores de retención de 0.35 y 0.73, para el Di y mono-ramnolípido, respectivamente. Por otro lado, Smyth et al. (2014), quienes analizaron diferentes muestras de surfactantes del tipo mono y di ramnolípido, determinaron un



intervalo de valores para el factor de retención de cada tipo de ramnolípido. Los intervalos reportados fueron de 0.3–0.4 para el di-ramnolípido y 0.75–0.85 para mono-ramnolípido. Smyth et al. (2014) reportaron que estos intervalos pueden variar dependiendo del tipo de disolvente utilizado.



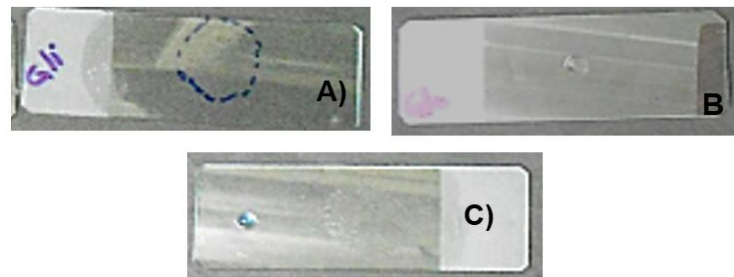
**Figura 17.** TLC. Muestra del estándar y del extracto crudo.

### **6.1.3 Selección de la fuente de carbono**

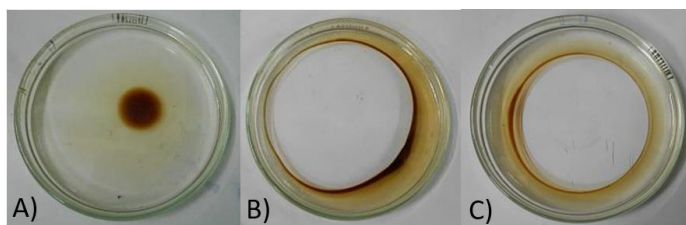
Se evaluaron medios de cultivo preparados con dos fuentes de carbono diferentes, glucosa y glicerol. La prueba de colapso de gota en los medios de cultivo preparados con glucosa y glicerol como fuente de carbono, así como la prueba de dispersión de gota de los respectivos biosurfactantes crudos, ambos métodos, arrojaron mejores propiedades surfactantes para el medio preparado con el glicerol, así como para el biosurfactante crudo extraído de éste.

El medio de cultivo preparado con glucosa no mostró efecto surfactante alguno por el método de colapso de gota (Figura 18). En lo que respecta al método de dispersión de gota, se utilizó una concentración de biosurfactante crudo que permitiera observar la máxima dispersión de una gota de aceite en agua (zona clara); 20 g/L y 4 g/L fueron

las concentraciones de surfactante crudo obtenido con glucosa y glicerol, respectivamente. La dispersión máxima fue de 9 cm, y ésta fue obtenida al aplicar el extracto crudo de los cultivos de glicerol y glucosa en aceite de motor quemado. Cabe destacar que la concentración del biosurfactante crudo fue más eficaz con el extracto crudo de los cultivos de glicerol (Figura 19). De acuerdo con Nordin et al. (2013) y Zhang et al. (2012), estos métodos son utilizados para determinar la eficiencia de los microorganismos para producir biosurfactantes. En este trabajo, *P. aeruginosa* resultó más eficiente con glicerol como fuente de carbono para la producción de ramnolípidos, por lo que se utilizó para la producción del biosurfactante.



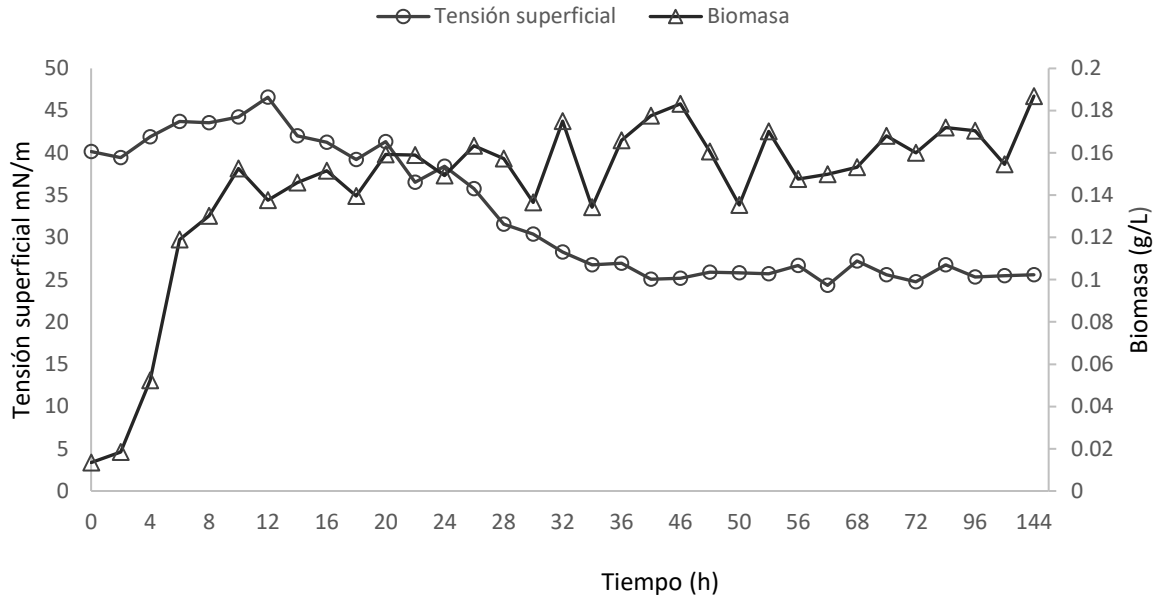
**Figura 18.** Prueba de colapso de gota de *P. aeruginosa*. Medio libre de células de un cultivo en PPGAS. A) fuente de carbono: glicerol B) fuente de carbono: glucosa C) control.



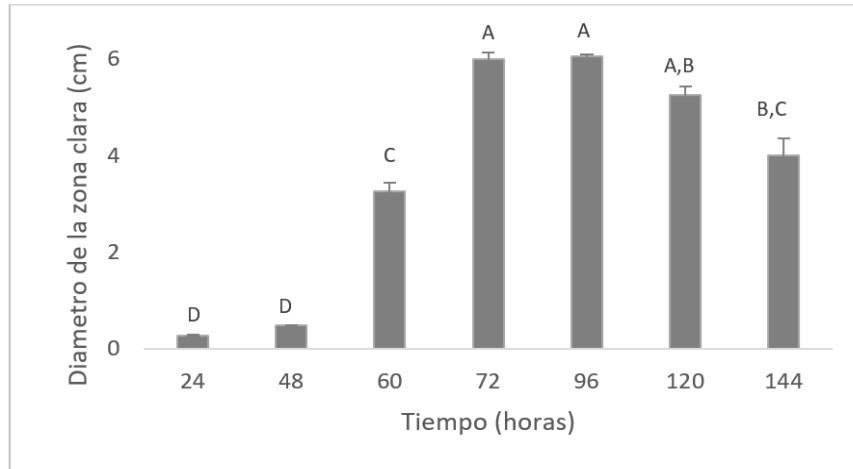
**Figura 19.** Dispersión de gota en aceite de motor. Extracto crudo del biosurfactante producido por *P. aeruginosa* en medio PPGAS con glucosa o glicerol. A) Control; B) Glucosa: 20g/L y 280  $\mu$ l; C) Glicerol: concentración 4g/L y 20  $\mu$ l.

## 6.2 Producción de ramnolípidos por *P. aeruginosa* ATCC 9027

La producción del biosurfactante ramnolípidos de *P. aeruginosa* (ATCC 9027) crecida en el medio de cultivo PPGAS con glicerol, se registró en forma indirecta, mediante la medición de la tensión superficial del medio de cultivo y la prueba de dispersión de gota. La caída de la tensión superficial se observó al final de la fase de crecimiento exponencial, la cual se alcanzó a las 10 horas de iniciado el cultivo, y en el que *P. aeruginosa* creció a una tasa de  $0.015 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Durante la fase de estabilización, la concentración de la biomasa y los valores de la tensión superficial fueron de  $0.16 \pm 0.01 \text{ g L}^{-1}$  y  $25.7 \pm 0.8 \text{ mNm}^{-1}$ , respectivamente (Figura 20). Seis centímetros (6 cm) fue el diámetro de la zona clara formada por la dispersión de una gota de aceite de motor quemado, con muestras de cultivo extraídas a las 72 y 96 h (Figura 21). La concentración en el medio de cultivo a las 72 horas se estimó en  $1.5 \text{ g L}^{-1}$ . Este valor se obtuvo al interpolar el diámetro en una curva de calibración previamente trazada con datos experimentales del diámetro de dispersión de aceite versus concentración de biosurfactante. Para mejorar la producción de los ramnolípidos en un reactor de tanque agitado de 7 L, se produjeron alrededor de  $12 \text{ g L}^{-1}$  utilizando la misma composición del medio de cultivo (Hernández-Cruz et al. 2018) (Anexo 8).



**Figura 20.** Cinética de crecimiento microbiano y tensión superficial de *P. aeruginosa* ATCC 9027 propagada en matraz agitado en medio PPGAs.



**Figura 21.** Capacidad de dispersión de gota del mono-ramnolípido. La zona clara es formada por el desplazamiento del medio de cultivo a partir de colocar una gota de aceite de motor. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Prueba de Tukey's y una confianza de 95 %.

La concentración del biosurfactante obtenido depende del método de producción, la cepa y los nutrientes en el medio (Radzuan et al. 2017). Rahimi et al. (2019) han reportado hasta 12 cm de diámetro de la zona clara por efecto de la dispersión de gota, utilizando mono-ramnolípidos y petróleo crudo como fase oleosa. Mientras que Zhao et al. (2016) igualmente con petróleo crudo asocia 2.0 cm de diámetro de la zona clara con la producción de 0.25 g/L de ramnolípidos de *P. aeruginosa* SG. La dispersión de gota es una prueba muy sensible para determinar la actividad superficial de los surfactantes en solución, así como determinar la concentración de éstos en el medio de cultivo (Lara-Severino et al. 2018; Zhao et al. 2016).

### **6.3 Caracterización química de los ramnolípidos purificados producidos por *P. aeruginosa* ATCC 9027**

La caracterización de la mezcla de mono-ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* ATCC 9027 se llevó a cabo con el biosurfactante previamente purificado en columna cromatográfica.

#### **6.3.1 Análisis de ESI-MS**

El biosurfactante producido por *P. aeruginosa* ATCC 9027 está compuesto de una mezcla de congéneres de mono-ramnolípidos (> 90% saturados), con los siguientes iones pseudomoleculares  $[M-H]^-$ : 333 (RhC<sub>10</sub>), 475 (Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub>/Rha-C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>), 503 (Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>), 529 (Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>12:1</sub>/Rha-C<sub>12:1</sub>-C<sub>10</sub>) and 531 (Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>/RhaC<sub>12</sub>C<sub>10</sub>) (Tabla 5 y Figura 22). El porcentaje de abundancia en que cada uno fue obtenido es el siguiente: 2.5, 8.2, 68.2, 6.9 and 14.1 %, respectivamente (Anexo 9-13). El congénere ramnosil-3-hidroxidecanoil-3-hidroxidecanoato (m/z 503)  $[M-H]^-$  producido

por *P. aeruginosa* ATCC 9027 fue el identificado en mayor proporción, en el presente trabajo, así como el reportado como mayoritario por otros autores (Liu et al. 2014).

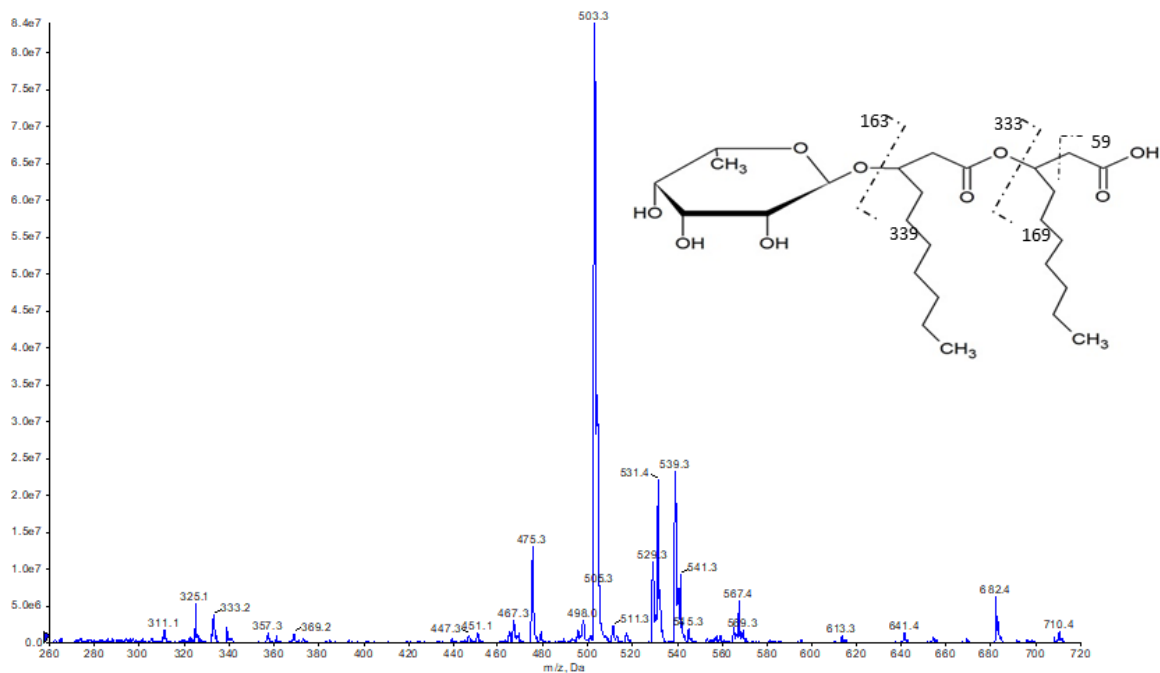
La presencia del ion con  $m/z$  503 fue también atribuido a  $[M + 2 H_2O]^-$  el cual se ha encontrado en 539 (Sha et al. 2012). El análisis de fragmentación (ESI-MS/MS) de  $m/z$  503 y  $m/z$  de 333,339,163,169 y 59 fue igual que para el 539. Al analizar los espectros de masas, se encontraron también cuatro iones de posibles mono-ramnolípidos que coinciden con su patrón de fragmentación, pero que no se encuentran reportados en la literatura, esto son:  $m/z$  567, 683, 698, y 710. Sus iones precursores (59, 141 y 169) coincidieron con los iones frecuentemente encontrados en los mono-ramnolípidos identificados (Anexo 14).

**Tabla 5.** Ion Pseudo molecular y abundancia relativa de mezcla de mono-ramnolípidos obtenidos de *P. aeruginosa* ATCC 9027 cultivada en PPGAS

| Mono-ramnolipido<br>congéneres   | ion pseudo<br>molecular $m/z$ | % Abundancia<br>Relativa | Ion fragmentado<br>( $m/z$ ) |
|--|-------------------------------|--------------------------|------------------------------|
| Rha-C <sub>10</sub>  | 333.2                         | 2.5                      | 169,163,59                   |
| Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>8</sub> /Rha-C <sub>8</sub> - C <sub>10</sub>      | 475.4                         | 8.2                      | 333,304,169,59               |
| Rha-C <sub>10</sub> .C <sub>10</sub>   | 503.4                         | 68.2                     | 333,339,163,169,59           |
| Rha-C <sub>10</sub> .C <sub>12:1</sub> /Rha-C <sub>12:1</sub> .C <sub>10</sub> | 529.4                         | 6.9                      | 333,169,59                   |
| Rha-C <sub>10</sub> .C <sub>12</sub> /Rha-C <sub>12</sub> .C <sub>10</sub>     | 531.5                         | 14.1                     | 531,333,197,169,59           |

El valor del HLB se calculó de la mezcla de congéneres de los ramnolípidos purificados por el método de Davies con un valor de 8.4 (Davies 1957; Müller et al. 2012; Khoshdast y Sam 2012), los surfactantes con un HLB de esta magnitud son efectivos para emulsificar sustancias lipofílicas. En el caso particular de la desorción de

hidrocarburos Kang et al. (2010) recomendó el uso de los surfactantes de un HLB en el intervalo de 5-15. El HLB encontrado se encuentra en este intervalo, por lo que se supone que la mezcla de congéneres de mono-ramnolípidos podría ser adecuado para la desorción de hidrocarburos del diésel añejo fuertemente sorbidos en el suelo Franco-arenoso aquí estudiado.



**Figura 22.** Espectro ESI-MS (modo negativo) de mono-ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* ATCC 9027. El principal ion  $m/z$  503 corresponde al mono-ramnolípidos Rha-C10-C10.

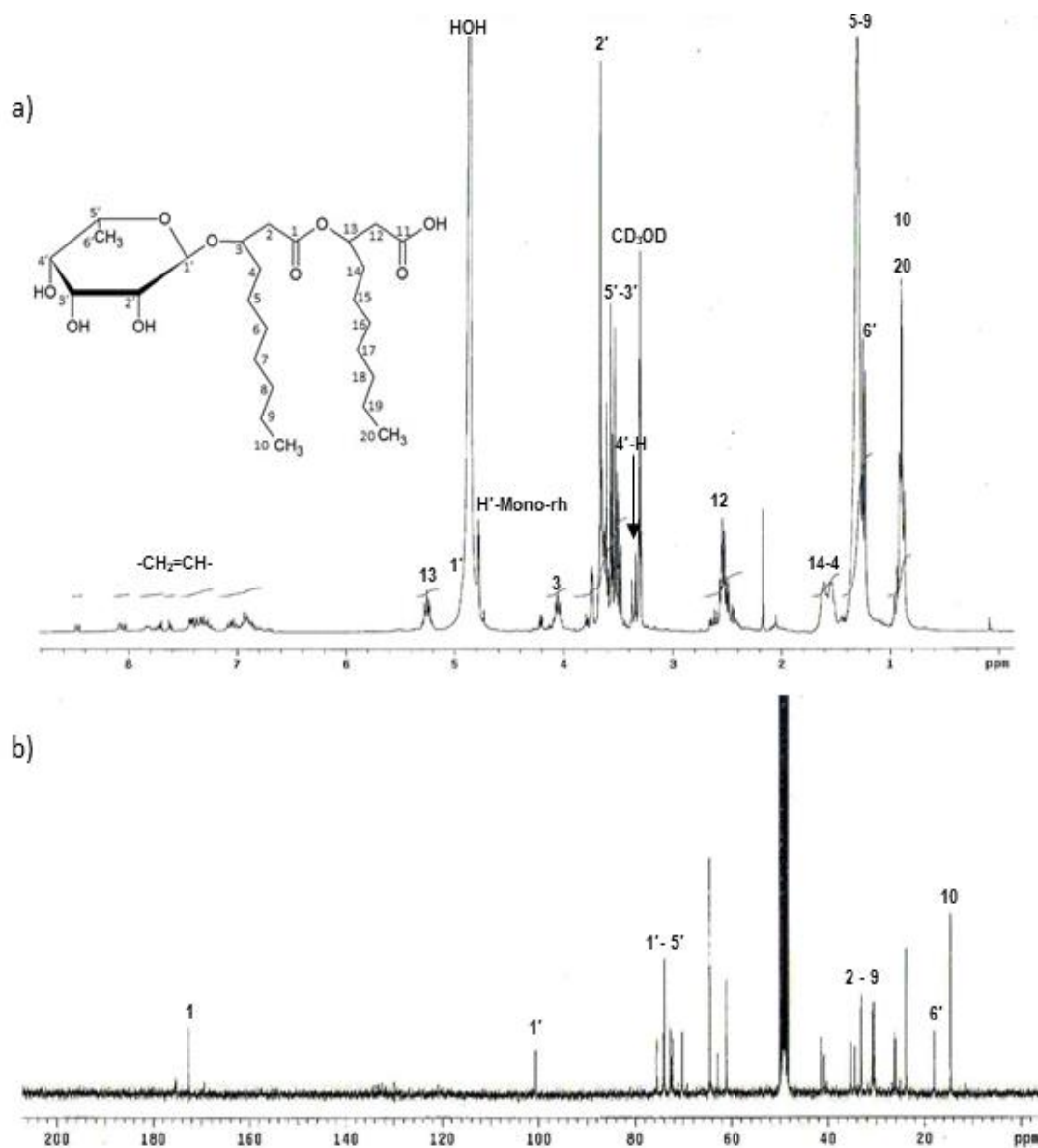
### 6.3.2 RMN

El espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR (Figura 23) muestra las características de los principales grupos químicos, alifáticos y carboxílicos, que constituyen el biosurfactante del tipo mono-ramnolípidos. Las señales para el hidroxi-ácido se encontraron a 14.5 ppm ( $-\text{CH}_3$ ) y a 23.8-35.2 ppm  $(\text{CH}_2)_n$ -  $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$  (Monteiro et al. 2007; Lan et al. 2015), mientras que el grupo carboxílico se encontró a 172.60 ppm ( $-\text{C}=\text{O}$ ) (Lan et al. 2015). Se

identificó el grupo metil (-CH<sub>3</sub>) del anillo de ramnosa a 18.0 ppm, mientras que a 100.58 ppm corresponde al carbón anomérico del anillo de la ramnosa. Los picos a 70.10-75.49 ppm representan los átomos de carbono del anillo de ramnosa.

El espectro <sup>1</sup>H NMR (Figura 23) de la mezcla de mono-ramnolípidos purificados, muestra los siguientes datos: los picos a 0.99 ppm corresponden al grupo metilo (-CH<sub>3</sub>), 1.29 ppm al (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, mientras que los picos a 1.53-1.60 ppm se asignaron a grupos de cadenas de ácidos grasos CH-CH<sub>2</sub><sub>n</sub> (Lan et al. 2015; Nicolò et al. 2017). El pico a 4.78 ppm pertenece a un protón anomérico de ramnosa. El anillo de metil-ramnosa se detectó en las señales a 1.22-1.24 ppm. Los picos a 2.52-2.55 demostraron la presencia de CH<sub>2</sub>-COO; mientras que los picos a 4.15 y 5.25 ppm representan a los grupos -O-CH- and COO-CH-, respectivamente, que pertenecen a las cadenas de hidroxí-ácidos (Nicolò et al. 2017). Las señales químicas en 3.30 (4'-H), 3.59 - 3.66 (2',-3',-5'-H) y 4.78 (1'-H) corresponden a átomos de hidrogeno del anillo de la ramnosa (Lan et al. 2015; Nicolò et al. 2017). Las señales de ácidos grasos no saturados (-CH<sub>2</sub>=CH-) se encontraron en 6.83-7.40. En el anexo 15 y 16 se encuentran más detalles.



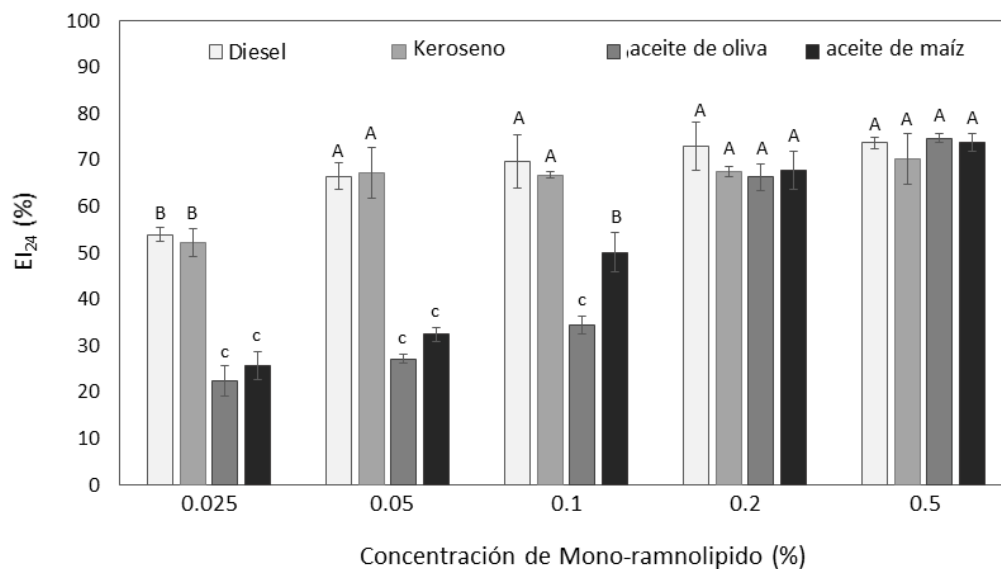


**Figura 23.** Espectros de NMR.  $^{13}\text{C}$ -NMR (a) y  $^1\text{H}$ -NMR (b) del mono-ramnolípido producido por *P. aeruginosa* ATCC 9027. H'-Mono-rh indica el protón anomérico de la ramnosa.

## 6.4 Propiedades fisicoquímicas de los mono-ramnolípidos purificados

### 6.4.1 Actividad emulsificante

La actividad emulsificante de los mono-ramnolípidos purificados se realizó en dos aceites vegetales y dos aceites de petróleo (Figura 24). La concentración de los mono-ramnolípidos y el tipo de aceite mostraron un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) en un intervalo de concentración de 0.025% - 0.1%. A estas concentraciones, el diésel y el keroseno mostraron mejor índice de emulsificación, entre 100-130 % más que los obtenidos con aceites vegetales.



**Figura 24.** Índice de emulsificación ( $IE_{24}$ ) del diésel, keroseno, aceite de oliva y aceite de maíz con distintas concentraciones de mono-ramnolípidos purificados. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Prueba de Tukey's y una confianza de 95%.

De acuerdo con el efecto de la concentración del surfactante, un aumento de 0.2 a 0.5 % incrementó en un 30% el  $IE_{24}$  de los dos derivados del petróleo, el mayor  $IE_{24}$  fue de 73%. En el caso de los aceites vegetales, un  $IE_{24}$  del 73 % solo se logró aumentando

8 veces la concentración del biosurfactante. La eficiencia de los ramnolípidos para emulsificar hidrocarburos ha sido previamente reportado por Abbasi et al. (2012) y Wasoh et al. (2017). Rahimi et al. (2019) reportaron que los mono-ramnolípidos purificados a una concentración del 0.1% tienen la capacidad de emulsificar el keroseno en un 72%. Por otro lado, Rahman et al. (2010) identifican a un biosurfactante como eficiente a aquel con un índice de emulsificación >50 %.

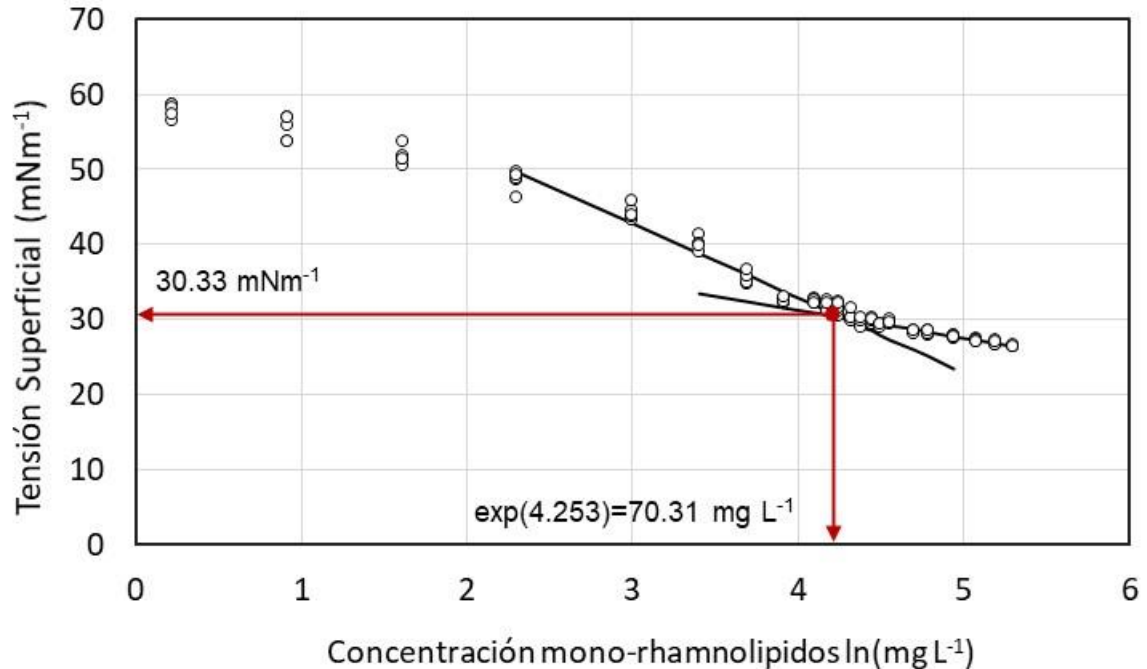
En el anexo 18, se puede observar la solubilidad del diésel en una solución de mono-ramnolípidos (0.5%) después de 72 horas de agitación (150 rpm). Al término de este tiempo, se puede percibir una solución aparentemente homogénea, y después de 24 horas en reposo se puede observar una capa de emulsión en la superficie, esto es indicativo también de la capacidad de los ramnolípidos para solubilizar derivados del petróleo como el diésel.

#### **6.4.2 Tensión superficial y CMC**

La CMC de los mono-ramnolípidos purificados fue de  $70.3 \text{ mgL}^{-1}$  (0.0070%). A esta CMC, la tensión superficial del agua disminuyó del  $67.2$  a  $30.3 \text{ mNm}^{-1}$  (Figura 25). No se observó diferencia significativa de la tensión superficial que registró el agua desionizada y la solución alcohólica (10% w/v) usada para disolver los mono-ramnolípidos.

La CMC para mono-ramnolípidos purificados se ha reportado en el intervalo de 15 a  $150 \text{ mg L}^{-1}$ , y la tensión superficial entre  $24$  y  $42 \text{ mNm}^{-1}$  (Bai et al. 1997; Samadi et al. 2012; De Rienzo et al. 2016; Herman et al. 1995; Medina-Moreno et al. 2011; Singh et al. 2013; Zhong et al. 2008; Liu et al. 2014). Estos amplios intervalos de valores podrían atribuirse a varios factores, entre ellos el grado de purificación, el medio de disolución,

el pH de la solución, el método para encontrar el punto de inflexión de la tensión superficial, así como la longitud de la cadena de ácidos grasos que conforman los distintos congéneres (Nitschke et al. 2005; Raza et al. 2014; Rahimi et al. 2019).



**Figura 25.** CMC del mono-ramnolípido purificado.

En lo que respecta a los hidrocarburos, varios autores sugieren el uso de los surfactantes a concentraciones superiores a su CMC (Bezza & Chirwa 2017). Dicha sugerencia se centra en acelerar la formación de micelas, teniendo en cuenta que los contaminantes quedan atrapados en su núcleo. En este contexto, debe señalarse que los mono-ramnolípido producidos, permitieron la disminución de la tensión superficial de  $25.7 \text{ mNm}^{-1}$ , al adicionarse en una concentración de  $125 \text{ mg L}^{-1}$  ( $0.013\%$ ). Aunque esta concentración es más alta que su CMC, es importante decir que está por debajo

del valor máximo (0.5 %) al cual los surfactantes sintéticos se usan comúnmente para la desorción de contaminantes (Peng et al. 2011).

### 6.5 Características del suelo contaminado

En la siguiente tabla se presentan las características fisicoquímicas del suelo.

**Tabla 6.** Propiedades fisicoquímicas del suelo

| <b>Propiedades del suelo</b>    | <b>Resultado</b>                         |
|---------------------------------|--|
| Textura                         | 13.6 % arcilla 11.28 % limo 75.12% arena |
| Porosidad                       | 45.2 %                                   |
| Densidad real                   | 2.19 g/ml                                |
| Densidad aparente               | 1.20 g/ml                                |
| pH                              | 7.63                                     |
| Humedad                         | 1.35 %                                   |
| Retención de agua               | 580 g/Kg                                 |
| Carbono orgánico total          | 2.14 %                                   |
| Materia orgánica                | 3.68 %                                   |
| Contenido de Fosforo asimilable | 2.7 mg/Kg                                |
| Conductividad eléctrica         | 0.016 dS m <sup>-1</sup> .               |
| Cuenta microbiana               | 1.1 X10 <sup>5</sup> UFC/g               |
| HTP                             | 11,600 ± 860 mg Kg <sup>-1</sup>         |

Se identificó un suelo de textura tipo franco-arenoso, con un contenido de partículas finas (limo y arcilla) del 24.8 % y un 75.12% de arena. La USEPA 1993, recomienda

un máximo de 30 % de partículas finas para el lavado de suelos contaminados con hidrocarburos. Por lo que el suelo de estudio tiene la textura adecuada para utilizar la técnica de lavado; sin embargo, es importante mencionar que la tecnología de lavado de suelos ha sido aplicada en suelos con un alto contenido de partículas finas, (>50%) (Kujawski 2009; Urum et al., 2004;).

El contenido de materia orgánica es otro de los parámetros críticos para el tratamiento de suelos contaminados. De acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000, en el apartado de suelos minerales, los límites de materia orgánica que se consideran altos son de 3.6 a 6.0 %, intervalo en el que se ubica el contenido de materia orgánica obtenido en el presente estudio (3.68%). Sin embargo, la US EPA 1993 recomienda la técnica de lavado de suelos hasta con un 30 % de materia orgánica. Por lo que el porcentaje de materia orgánica obtenido en este trabajo es adecuado para esta técnica.

La concentración de los HTP del diésel presentes en el suelo problema se encuentra por arriba de los límites permisibles en referencia a un suelo industrial (>5,000 mgKg<sup>-1</sup>) (NOM-138-SEMARNAT/SS-2003). Por lo que es un suelo que es necesario remediar.

Otra de las propiedades importantes a tomar en cuenta cuando se utilizan surfactantes con carga, son el pH y la concentración. En este trabajo se encontró un pH de 7.63 y según la NOM-021-SEMARNAT-2000, lo clasifica como un suelo medianamente alcalino (pH 7.4 a 8). Como se menciona en el apartado 2.9 a pH ácido los ramnolípidos son menos solubles en agua, mientras que a pH neutros o alcalinos son más solubles. De acuerdo a lo reportado por Bai et al. (1997) y Zhong et al. (2016 a,b); las estructuras

micelares de los mono-ramnolípidos predominan a un pH de 7.0 y 6.8, mientras que Bai y McClements (2016), documenta la formación de emulsiones estables de distintos aceites con ramnolípidos a un pH de 5.0-9.0. Por lo que consideramos que el pH del suelo no afecta en el proceso de lavado de suelos con ramnolípidos.

### **6.6 Efecto de los mono-ramnolípidos en la desorción del diésel añejo contenido en suelo**

La concentración del biosurfactante mono-ramnolípidos y el tiempo de lavado tuvo efectos significativos ( $p > 0.05$ ) en la desorción del diésel añejo contenido en el suelo franco arenoso estudiado. La máxima concentración de HTP removidos fue de  $40.7 \pm 2.3\%$ , en un tiempo de 72 - 360 horas y ésta fue obtenida con una solución al 0.5 % del mono-ramnolípidos. Una reducción en la concentración de éste de 0.5 % a 0.2 % disminuyó la remoción de HTP en un 27.9 %, en los tratamientos de 72 horas, y en solo un 13.6 % cuando el tratamiento de lavado se extendió hasta las 360 horas. El lavado del suelo con soluciones surfactantes de concentración inferior al 0.1% no presentaron porcentajes de remoción mayores al obtenido con el experimento control, en el cuál la remoción de HTP fue del 24% (Figura 26). Porcentajes de remoción de esta magnitud han sido reportadas por Riojas et al., (2010) en la extracción de diésel fresco con agua destilada usada como agente extractante. El alto porcentaje en el cual los hidrocarburos del diésel pueden ser removidos con agua es atribuido a la alta fracción de hidrocarburos alifáticos ( $\approx 70\%$ ) (Nitschke et al. 2005).

Los porcentajes de remoción de hidrocarburos del diésel, fresco y añejo, contenido en suelos, se presentan en la Tabla 7. De acuerdo a la información recopilada, los mayores porcentajes de remoción de diésel (cerca del 100%) corresponden a estudios

realizados en suelos modelos y en su mayoría en procesos de desorción realizados con surfactantes sintéticos (Khalladi et al. 2009). El término modelo se refiere a suelos de un tamaño de partícula definido y tiempos de contaminación cortos, es decir, lo que se ha denominado diésel fresco. En el caso de los suelos contaminados por muchos años con diésel, el llamado diésel añejo, los mayores porcentajes de remoción reportados oscilan entre un 60 y un 77%. No obstante, es importante mencionar que estos porcentajes altos de remoción de diésel son usualmente obtenidos a través de tratamientos secuenciales que incluyen el lavado de suelos con surfactantes o la oxidación química y un posterior tratamiento biológico. Un ejemplo es el trabajo reportado por Bajagain et al. (2018), quienes en un suelo contaminado con diésel aplicaron la oxidación con persulfato de sodio (NaOH:PS 50mN) seguido por bioaumentación con *acinetobacter sp.* a escala laboratorio, ambos tratamientos se utilizaron en presentación de espuma en spray aplicado directamente al suelo.

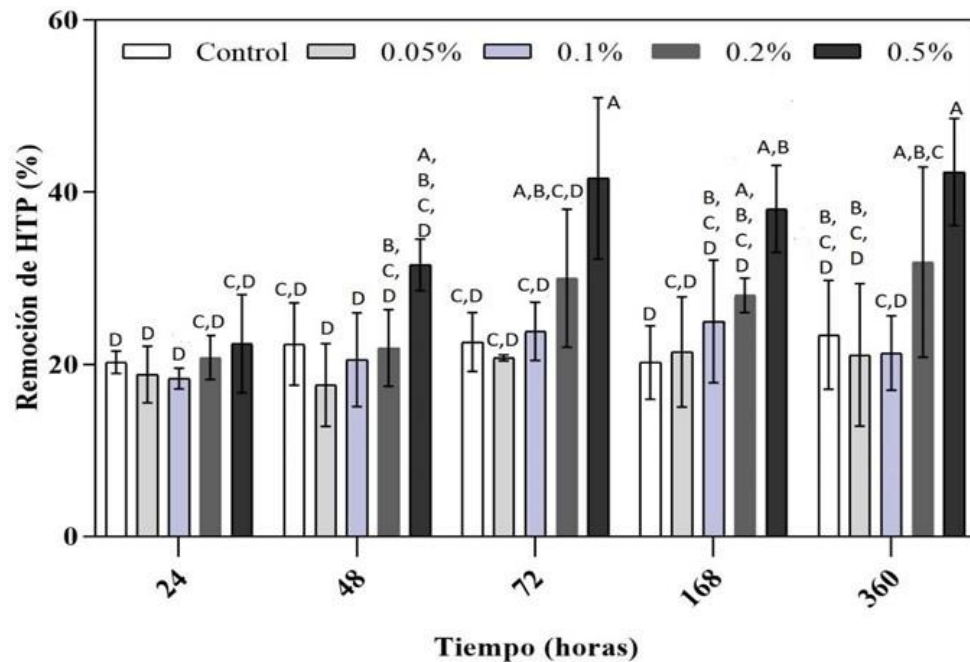
El diésel es un contaminante muy tóxico para la flora microbiana. No obstante, la remoción de una importante fracción de hidrocarburos durante el proceso de lavado, disminuye el riesgo de inhibición microbiana, así como los tiempos de tratamiento (Kuráñ et al. 2014). En un proceso de biorremediación por bioaumentación, los microorganismos deben pasar por una etapa de adaptación, por tanto, este tipo de procesos son usualmente largos.

Aunque los surfactantes son los agentes extractantes comúnmente utilizados en la remediación de los suelos contaminados, es importante mencionar que cuando se utilizan grandes cantidades, los surfactantes pueden ser adsorbidos a las partículas del suelo y los contaminantes previamente desorbidos pueden ser readsorbidos nuevamente en el suelo (Wang et al. 2009; Mao et al. 2015; Befkadu & Quanyuan



2018). En el presente trabajo, el lavado de suelos con una solución 0.5% de mono-ramnolpidos reveló la acumulación de éstos en concentraciones de 4.8, 8 y 12.5 mg por gramo del suelo tratado, en muestras de suelo extraídos a las 72, 168 y 360 horas, respectivamente.

La acumulación de ramnolpidos en el suelo ha sido reportada por Renfro et al. (2014). Esta adsorción de los surfactantes en el suelo, podría ser un inconveniente para un tratamiento biológico subsecuente al lavado del suelo. Sin embargo, considerando las propiedades biodegradables de los mono-ramnolpidos, y su capacidad para adherirse a las células microbianas, su presencia en el suelo tratado podría mejorar la remoción de contaminantes si el suelo es sujeto de un tratamiento biológico adicional (Zhong et al. 2008).



**Figura 26.** Remoción de HTP a diferentes concentraciones de mono-ramnolpidos. Control: agua destilada. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Prueba de Tukey's y una confianza de 95%.

**Tabla 7.** Porcentajes de remoción de diésel mediante tecnologías y suelos diversos.

| Suelo  | Diésel<br>mg·kg <sup>-1</sup> | Edad del suelo<br>contaminado                  | Tratamiento  | Duración del<br>tratamiento   | Diésel<br>removido<br>(%) | Referencia                          |
|--|-------------------------------|--|--|-------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|
| Arena (2.4 %)<br>Limo (94%)<br>Arcilla (2.9)<br>Materia orgánica<br>(8.5%) | 70000                         | 15 días  | <i>Flushing</i> con SDS<br>(0.23 % w/v)                | 3.2 mL/min                    | 97                        | Khalladi et al.<br>(2009)           |
| Arena (82%)<br>Limo (8%)<br>Arcilla (10%)                                  | 50000                         | 72 horas                                       | <i>Flushing</i> con<br>ramnolipidos al<br>0.1% w/v     | 100 mL/min                    | 37.4±0.9                  | da Rosa et al.<br>(2015)            |
| Densidad<br>(2.65g/cm <sup>3</sup> )<br>(Arena)                            | 20000                         | 7 días   | <i>Flushing</i> con<br>ramnolipidos<br>(0.3%-0.5% w/v) | 2 mL/min (20 pore<br>volumes) | 60                        | Shin K.-H. &<br>Kim K.-W.<br>(2004) |
| Arena (58 %)<br>Limo (18%)<br>Arcilla (24%)<br>Materia orgánica<br>(0.15%) | 5000                          | Sitio contaminado<br>(no especifica<br>tiempo) | Flushing<br>NaOH:Persulfato<br>(4:1)                   | 56 días                       | 60-77                     | Lominchar et al.<br>(2018)          |
| Suelo de<br>agricultura<br>(arcilloso)                                     | 5240                          | Fresco   | Bioaumentación<br>( <i>P. fluorescens</i> )            | 91 días                       | 60                        | Kuráñ et al.<br>(2014)              |

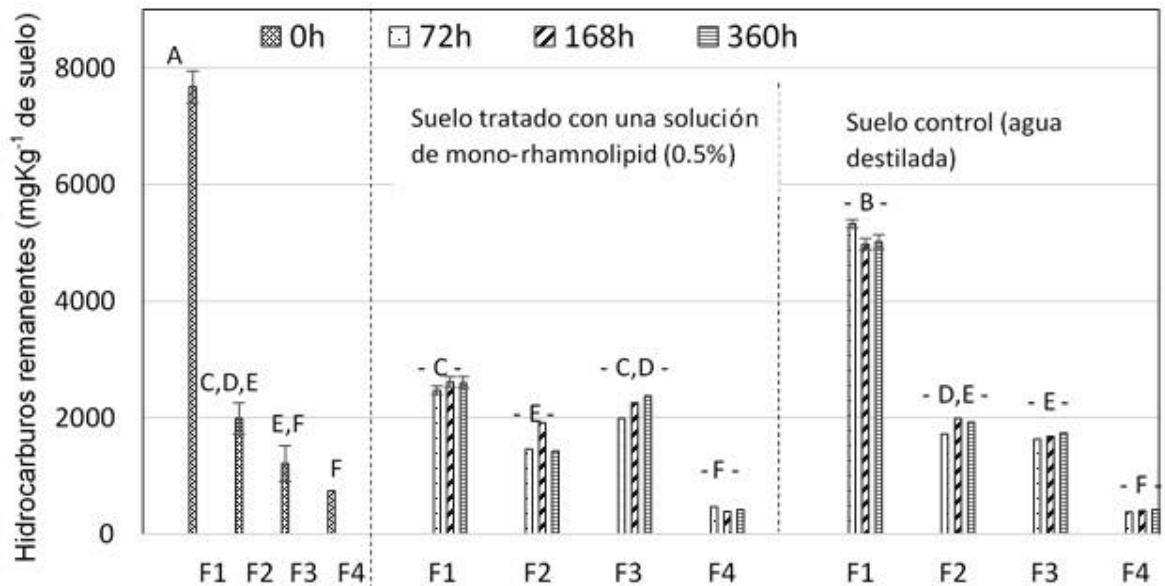
|  |                 |  |  |          |          |                                |
|--|-----------------|--|--|----------|----------|--------------------------------|
| Materia orgánica<br>(~6.9%)  |                 |  |  |          |          |                                |
| Arena (61%)<br>Limo (32 %)<br>Arcilla (7%)<br>Materia orgánica<br>(25.9%)  | 12250           | Sitio contaminado<br>(no especifica<br>tiempo) | Bioaumentación<br>(consorcio<br>bacteriano)                      | 84 días  | 72.7     | Menezes-Bento<br>et al. (2003) |
| Franco-arenoso<br>(84 % de arena)  | 7000            | Sitio contaminado<br>(no especifica<br>tiempo) | Biopilas y solución<br>de ramnolípidos<br>0.1% w/v               | 88 días  | 97       | Wang et al.<br>(2008)          |
| Arena (75 %)<br>Limo (11%)<br>Arcilla (14%)<br>Materia orgánica<br>(3.68%) | 11,600 ±<br>860 | décadas  | Lavado de suelos<br>con mono-<br>ramnolípidos a<br>0.2-0.5 % w/v | 72 horas | 40.7±2.3 | Este trabajo                   |

### **6.7 Fracciones de hidrocarburos desorbidos del suelo contaminado**

El análisis del diésel añejo extraído del suelo contaminado permitió identificar cuatro fracciones de hidrocarburos, las cuáles se clasificaron como alifáticos (F1), HAPs neutros y metilados (F2.1), HAPs nitrados (F2.2), oxi-HAPs (F3) y asfaltenos (F4). Estas fracciones de hidrocarburos se separaron en concentraciones del:  $66 \pm 3 \% \pm 3 \%$  (F1:  $7670.6 \pm 353 \text{ mg kg}^{-1}$ ),  $17 \pm 2.3 \%$  (F2.1 y F2.2:  $1981.6 \pm 276 \text{ mg kg}^{-1}$ ),  $10.4 \pm 2.1 \%$  (F3:  $1212.8 \pm 178 \text{ mg kg}^{-1}$ ) y  $6.3 \pm 2.2 \%$  (F4:  $734.7 \pm 257 \text{ mg kg}^{-1}$ ), respectivamente. Las fracciones 2 y 3 integran los derivados de HAPs que han sido identificados en la combustión de diferentes combustibles fósiles incluyendo el diésel (Lawal et al. 2017; Dandajeh et al. 2019; Fushimi et al. 2012). Además de la combustión del diésel y la transformación microbiana, la presencia de derivados de HAPs en el suelo pueden ser atribuidos a la transformación fotoquímica de los HAPs cuando interactúan con:  $\text{OH}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{O}_3$  (Wei et al. 2015; Musa-Bandowe & Meusel, 2017). Contrario a los HAPs, los derivados de HAPs tienen mayor potencial tóxico, mutagénico y carcinogénico para humanos que sus compuestos padres (Taga et al. 2005; Walgreave et al. 2010). La composición del diésel extraído del suelo contaminado es consistente con los reportado por ATSDR (1995), Khalladi et al. (2009) y Lominchar et al. (2018), quienes han reportado que las fracciones alifática y aromática (HAPs) son las fracciones predominantes del diésel a  $67 \pm 4\%$  and  $34 \pm 6\%$ , respectivamente.

El lavado de suelos contaminados con una solución de mono-ramnolípidos a 0.5 %, permitió la disminución de las fracciones F1, F2, y F4 en porcentajes del  $66.6 \pm 1\%$ ,  $23.16 \pm 11\%$ , y  $41.4 \pm 6 \%$ , y el remanente en el suelo tratado a la concentración de  $2558 \pm 84 \text{ mg kg}^{-1}$ ,  $1556.19 \pm 190.73 \text{ mg kg}^{-1}$ , y  $430 \pm 44 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente

(Figura 28). Respecto a la F3, nombrada oxi-HAPs, un aumento gradual se observó entre las 72 y 360 horas; alcanzando más del 96 % de su concentración inicial (Figura 27).



**Figura 27.** Fracción de hidrocarburos remanentes en el suelo contaminado con mono-rhamnolípidos (0.5% p/v). F1: alifáticos; F2 HAPs neutros, metilados y nitrados; F3 HAPs oxigenados; F4: asfaltenos. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Prueba de Tukey's y una confianza del 95%.

El aumento de estos oxi-HAPs ha sido reportado en tratamientos de biorremediación y se ha atribuido a procesos simultáneos de oxidación y degradación de hidrocarburos. En la naturaleza, la oxidación abiótica de los HAPs puede ocurrir por oxidación química o por foto oxidación (Lundstedt et al. 2007). En el presente estudio, ambas, oxidaciones bióticas y abióticas de HAPs podrían ocurrir. La oxidación biótica podría ser tomada como la más relevante debido a la presencia de microorganismos al final de los tratamientos. La presencia de oxi-HAPs en el suelo, en estaciones de gas,

producción de coque y en la industria de madera ha sido reportado por Lundstedt et al. (2007). De acuerdo con estos autores, la baja hidrofobicidad de oxi-HAPs, en comparación con los compuestos de origen, favorece su movilidad en el ambiente y en la contaminación de aguas subterráneas. El aumento de oxi-HAPs obtenido en este trabajo, permite suponer la degradación de HAPs durante el proceso de lavado de suelo impactado con diésel recalcitrante. En algunos procesos de biodegradación, se pueden producir oxi-HAPs; no obstante, no son fácilmente detectados debido a su alta solubilidad y su capacidad para filtrarse a través de las diferentes capas del suelo (Lundset et al. 2003). En este trabajo la cuenta inicial de la población microbiana, que fue de  $1.16 \times 10^5$  UFC/g disminuyó en un orden de magnitud a las 72 horas y en dos a las 360 horas.

La oxidación es uno de los procesos identificados en la transformación microbiana de contaminantes (Lundstedt et al. 2003). No obstante, de acuerdo con la USEPA, una degradación efectiva requiere una cuenta microbiana mínima de  $10^3$  UFC/g (Lin et al. 2010), aunque otros autores han reportados el requerimiento de una mayor concentración, de  $10^5$  UFC/g (Peláez et al. 2013). Se da por hecho que la mayor o menor cuenta microbiana requerida está fuertemente determinada por el tipo de microorganismos presentes en el suelo contaminado, así como por las condiciones ambientales bajo las cuales la degradación tiene lugar (Peláez et al. 2013). Está documentado que la desorción de contaminantes mediante surfactantes hace factible la degradación de contaminantes; no obstante, en el caso particular de los ramnolípidos, la capacidad de éstos para cambiar las propiedades de la membrana celular contribuye a la metabolización de contaminantes (Zeng et al. 2018).

Con relación a los hidrocarburos alifáticos, aunque éstos son considerados de baja o nula toxicidad para el ser humano, la capa cerosa que éstos forman en la superficie de las partículas de suelo, afecta severamente los procesos bioquímicos del suelo, al impedir la transferencia de agua y aire, ambos elementos esenciales para el crecimiento microbiano (Takawira et al. 2014). Los estudios realizados por Zhang & Miller (1992) y Zhong et al. (2016 a,b) indican que los mono-ramnolípidos solubilizan eficientemente los hidrocarburos alifáticos y una explicación es que, su estructura química es similar a la cadena hidrocarbonada de los mono-ramnolípidos (Zhong et al. 2016a).

#### **6.8 HAPs desorbidos del suelo contaminado lavado con mono-ramnolípidos**

De los 16 HAPs reportados por la USEPA como mutagénicos y carcinogénicos (EPA 2000), cuatro fueron identificados en la Fracción 2 de los hidrocarburos extraídos del suelo contaminado con diésel (Anexo 19). Los HAPs identificados son: naftaleno (NAF), acenaftileno (ACI), acenafteno (ACE) y fenantreno (FEN), los cuales fueron detectadas en concentraciones de  $19.1 \pm 1.4 \mu\text{g kg}^{-1}$ ,  $23.3 \pm 4.3 \mu\text{g kg}^{-1}$ ,  $12.99 \pm 3.6 \mu\text{g kg}^{-1}$  y  $11.7 \pm 1.4 \mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente. El porcentaje removido por lavado de estos HAPs fue del  $63.7 \pm 18.2\%$ ,  $44.9 \pm 23.7\%$ ,  $50.3 \pm 12.5\%$  y  $25.9 \pm 16.1\%$ , respectivamente.

El alto porcentaje de remoción de NAF, ACI y ACE, en comparación con el FEN, se atribuye al número de anillos de benzeno (2-3) en su respectiva estructura molecular, como lo reporta Yang et al. (2018), quienes han reportado que el aumento en el número de anillos incrementa la recalcitrancia y la lipofílicidad de los HAPs. La mayor remoción del NAF en comparación con el FEN, ha sido también reportada por Urum et al. (2006)

En comparación con el control, los mono-ramnolípidos al 0.5 % incrementaron significativamente ( $p < 0.05$ ) la remoción del NAF, ACE, ACI y FEN, en porcentajes del 44%, 45 %, 66% y 81%, respectivamente.

Como se mencionó anteriormente, la remoción del diésel añejo en porcentajes superiores al obtenido en el presente trabajo ha sido posible por medio de trenes de tratamiento que combinan técnicas de desorción u oxidación de contaminantes, y la degradación microbiológica del contaminante residual. Así, en tratamientos de lavado de suelos con un 0.6 % del lipopéptido y el subsecuente tratamiento de remoción de contaminantes por bioaumentación con un consorcio microbiano degradador de hidrocarburos, se logró eliminar en 64 días, entre el 50 y el 92 % de HAPs de 2-3 anillos y 64 % de HAPs de 4 anillos (Bezza et al. 2017). La eliminación de HAPs de 2-4 anillos, fue removida entre el 48 y el 67 % por Bocos et al. (2015). La tecnología que éstos últimos autores aplicaron comprendió un lavado del suelo con ácidos débiles y una posterior oxidación mediante la tecnología electrocinética-Fenton. En el presente estudio, donde el lavado del suelo con ramnolípidos permitió la remoción de un 40.07 % de HTP, es de notar que el 66 % corresponde a la fracción alifática y el 23 % a la fracción de HAPs. Distintos autores consideran que un tratamiento microbiológico adicional podría remover los hidrocarburos remanentes en el suelo tratado, aunque el proceso de tratamiento, por supuesto, se prolongaría (Ławniczak et al. 2013; Bezza & Chirwa 2017).

El remanente de HTP del diésel fue de  $6952 \text{ mg/Kg}^{-1}$  (~60%) de HTP, el cual se encuentra por arriba del límite máximo permisible ( $2000 \text{ mg/Kg}^{-1}$ ) que establece la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 ( $>5000 \text{ mg/Kg}^{-1}$ ) para suelos industriales. En cuanto a los HAPs, las Normas Oficiales Mexicanas y la US EPA contemplan los límites



permisibles para algunos HAPs de manera individual. Los valores de 2 de los HAPs encontrados en este trabajo (NAF  $>86 \text{ mgKg}^{-1}$ , ACE  $>45000 \text{ mgKg}^{-1}$ ), se encuentran por debajo del límite máximo permisible para suelos industriales de acuerdo con la US EPA (2020). Sin embargo, para poder reusar este suelo en un área industrial, es necesario disminuir  $2000 \text{ mg Kg}^{-1}$  de HTP adicional al remanente. Para lograr este objetivo en un tiempo corto, al suelo tratado, se le podrían adicionar microorganismos con potencial para degradar hidrocarburos alifáticos, como *acinetobacter sp.* y/o poliaromáticos, como *bacillus sp.* (Varjani 2017). Igualmente, para un uso de suelo comercial o agrícola, es necesario reducir  $5,800 \text{ mgKg}^{-1}$  de HTP adicional para alcanzar los límites máximos permisibles de HTP ( $1,200 \text{ mgKg}^{-1}$ ) para este tipo de suelos. En este caso, también es posible utilizar un tratamiento biológico, aunque por la cantidad de hidrocarburos a remover sería probablemente en un tiempo más largo.

#### **6.9 Desorción del diésel añejo contenido en suelo, mediante Tween 80 (surfactante sintético no-iónico)**

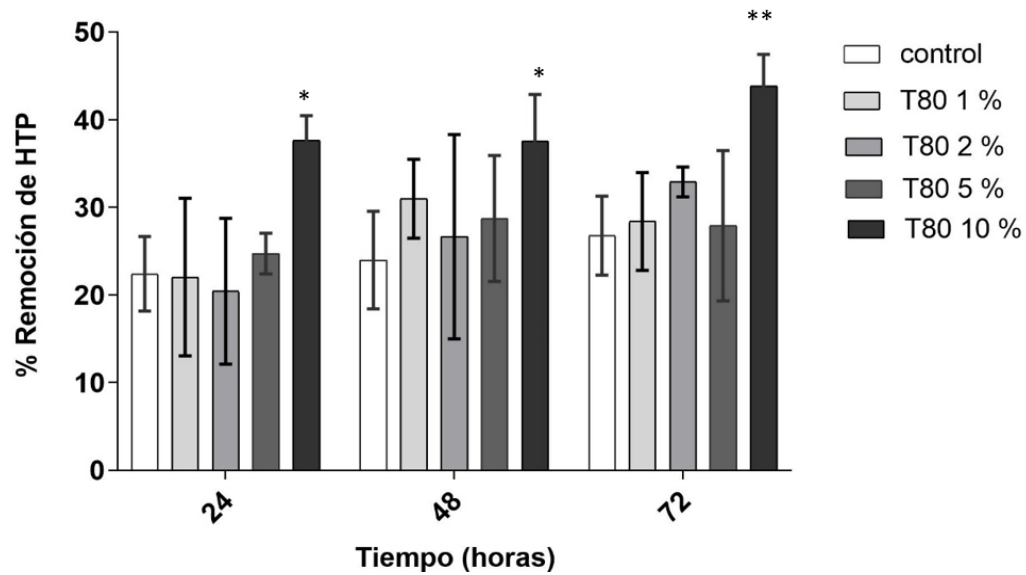
El Tween 80 es uno de los surfactantes sintéticos comúnmente utilizado en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. La evaluación del desempeño de este surfactante en la desorción del diésel añejo demandó una concentración del 10% para remover un porcentaje de HTP similar,  $43.8 \pm 2.7$  al obtenido con la solución de mono-ramnolípidos al 0.5%, en tiempos de tratamiento similares. Al adicionar el Tween 80 en una concentración inferior al 10% ninguna diferencia significativa fue observada en comparación con el control (Figura 28).

En suelos modelo contaminados con diésel fresco, la remoción de diésel también ha sido de mayor magnitud cuando Tween 80 ha sido utilizado como agente desorbente.

Torres et al. (2003) por ejemplo, removieron entre el 42 y el 83 % de diésel fresco impregnado en un suelo arenoso (92.1% de arena), pero utilizando Tween 80 en una concentración inferior al 2%. En este estudio, el mayor porcentaje de remoción de diésel fue atribuida a la textura arenosa del suelo. Riojas et al. (2010), quienes impregnaron diésel fresco en un suelo modelo de textura franco-arcillo-arrenosa (71.96 % arena) removieron un 60% del diésel al utilizar Tween 80 en una concentración del 1% y una desorción del 80% cuando el Tween 80 fue mezclado con D-limoneno como solvente. En estudios de remoción de otros derivados del petróleo, como es la gasolina, los ramnolípidos han generado porcentajes de remoción mayores del 63%, en comparación con los obtenidos con el Tween 80 (40%) (Lai et al. 2009).

En comparación con el Tween 80, el mejor desempeño de los mono-ramnolípidos para desorber el diésel añejo, podría ser explicado, por un lado, al valor de su HLB y por otro, al tipo de carga de la molécula. El HLB de 8.4 del mono-ramnolípidos lo hace más afín a las estructuras orgánicas de tipo hidrofóbico, en tanto que el HLB del Tween 80, de 15, es más afín a compuestos de tipo hidrofílico.

En lo que respecta a la carga de la molécula, se debe recordar que el Tween 80 es un surfactante de tipo no iónico, en tanto que el ramnolípidos de tipo aniónico. Para propósitos de solubilización de una molécula, la presencia de algún tipo de carga podría favorecer la formación de micelas, esto debido a que las partes hidrofóbicas del surfactante que se mantienen enlazadas fuertemente unas y otras lo que permite la formación de micelas más estables (Salager, 1993). En cuanto a la solubilización del diésel por los mono-ramnolípidos, dado la naturaleza química de este surfactante podrían combinarse interacciones electrostáticas e hidrofóbicas durante este proceso.



**Figura 28.** Remoción de HTP a distintas concentraciones (1, 2, 5 y 10%) de Tween 80. Control: agua destilada. (\*) Indican diferencias significativas con respecto al control ( $P \leq 0.05$ )

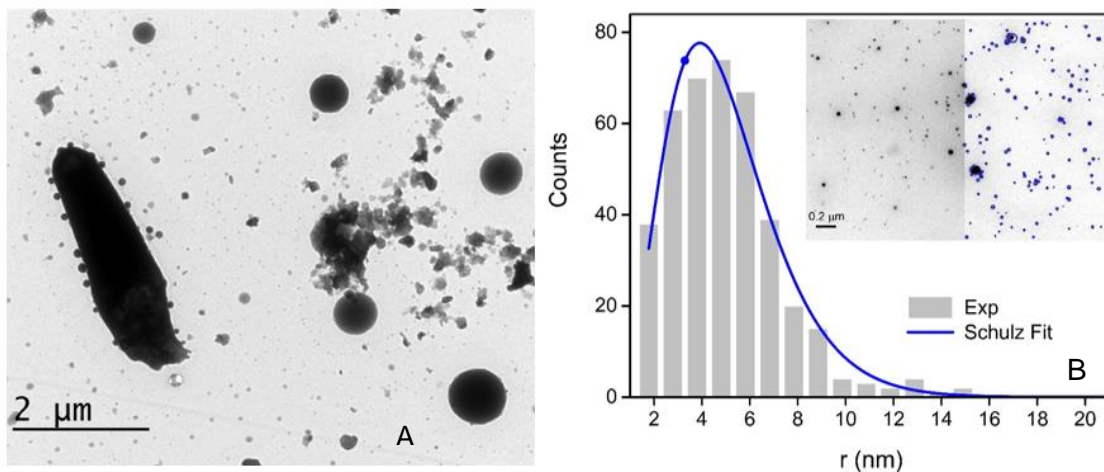
### 6.10 Mecanismo de desorción del diésel y análisis del tamaño de micela

En la Figura 29A) se presenta una micrografía de una muestra de agua drenada del mejor tratamiento del suelo contaminado con diésel, el cual fue realizado con una solución de ramnolípidos al 0.5% en un tiempo de 72 horas. En la figura se observan agregados micelares, así como gotas de hidrocarburos, los cuales son un indicador de la desorción del diésel por el efecto de su solubilización y movilización respectivamente, como se ha reportado en trabajos previos (Javanbakht & Goual 2016; Pacwa et al. 2011).

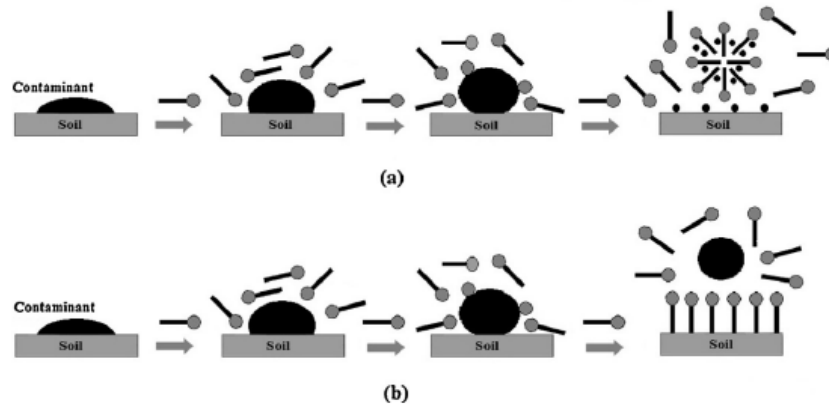
El mecanismo de desorción de diésel y petróleo crudo, utilizando mono-ramnolípidos fue reportado por da Rosa et al. (2015). Estos autores identificaron *la solubilidad* como

el principal mecanismo de desorción de diésel, y a *la movilidad* como el principal mecanismo para desorber petróleo crudo (Figura 30). Bai et al. (1997), no identificó un mecanismo de desorción preferencial, *solubilidad/movilidad*, en el proceso de desorción de hexano contenido en suelo, utilizando mono-ramnolípidos. Esto podría ser un indicador sobre la importancia de la naturaleza del contaminante en el mecanismo de desorción de éste.

El análisis de la distribución de tamaño de micela, determinado a partir de la función de distribución de Schultz (SDF), permitió determinar un diámetro de micela de  $10 \pm 1$  nm (Schultz 1939). A partir de este dato se determinó un valor promedio de la superficie de gota, de  $117 \pm 12$  Angstrom<sup>2</sup> (a pH = 8), y a partir de éste, el número de mono-ramnolípidos por micela, el cuál fue determinado de  $280 \pm 82$  (Palos Pacheco et al. 2017) (Figura 29B).



**Figura 29.** A) Micrografía TEM del sobrenadante del lavado de suelo y B) distribución de tamaño de micelas, ajustada por la función de Schulz.



**Figura 30.** Probable mecanismo involucrado en la remediación de suelo contaminado con diésel a) solubilización y petróleo b) movilización

La solubilidad de los compuestos hidrofóbicos, como son los HAPs, puede aumentar de 100 a 1000 veces con el uso de surfactantes. Se ha reportado que una alta concentración de surfactante favorece la formación de micelas de tamaño micro e incluso nanomicelas (Shah et al. 2016; Li et al. 2015). En los tratamientos de lavado de suelos contaminados, se presume que las micro y nanomicelas de surfactante desempeñarán un mejor trabajo para desorber el contaminante que se sorbe en los poros más internos de las partículas de suelo (Pornsunthorntawee et al.2010).

El diámetro promedio de los agregados formados durante el lavado del suelo aquí estudiado es similar al reportado por Zhong et al. (2016b). En el proceso de emulsificación de dodecano con soluciones de mono-ramnolípidos, en concentraciones de 0.015, 0.005 y 0.0025 %, el diámetro de micela registrado por estos autores fue de 9.1, 13.2 y 18.4 nm respectivamente. Estudios dedicados a la formulación de nano-emulsiones del tipo aceite en agua, pero usando una mezcla de

los surfactantes mono y di-ramnolípidos, el diámetro de micela reportado es de 150 - 631 nm (Saeedi et al. 2014; Bai y McClements 2016).

Se ha reportado que en las soluciones de mono-ramnolípidos de pH en el intervalo 6.8-7.0, predominan las micelas y que estas favorecen la solubilización de los hidrocarburos alifáticos (Bai et al.1997; Zhong et al.2016a). Sin embargo, en otros estudios se ha observado que algunos HAPs, como el fenantreno se solubilizan mejor por vesículas multilamelares de ramolípidos a un pH de 5.0 (Shin et al. 2008). Li et al. (2015), por su parte, reportó que la mejor solubilización micelar de naftaleno, fenantreno y pireno fue obtenida con una solución de ramnolípidos de pH 11. La diversidad de estos resultados permite asumir que el pH no es el único factor que afecta la desorción de hidrocarburos y que el estudio de la solubilidad debe ampliarse a otros parámetros como son la temperatura, la concentración del surfactante, la fuerza iónica, co-solutos, la salinidad y la concentración de metales en el medio (Pornsunthorntawee et al. 2009; Lovaglio et al. 2011).

## *7. Conclusiones*

*P. aeruginosa* ATCC 9027 produjo ramnolípidos al crecer tanto a nivel matraz como en biorreactor, con rendimientos de 1.5 y 12 g L<sup>-1</sup> respectivamente. El espectro de ESI-MS arrojó que la principal estructura de los mono-ramnolípidos es el congénero Rh-C10-C10, ya reportado en la literatura para esta cepa. La caracterización fisicoquímica de los mono-ramnolípidos demostró su capacidad tensoactiva y emulsificante. Este efecto se relacionó con su HLB de 8.4, lo que sugiere mayor afinidad hacia los compuestos más hidrofóbicos.

La mezcla de mono-ramnolípidos producida por *P. aeruginosa* ATCC 9027 permitió desorber los hidrocarburos del diésel añejo en mayor concentración que el Tween 80, surfactante utilizado comúnmente en la biorremediación de suelos contaminados. Se encontró que los mono-ramnolípidos removieron en un 23 y 66 % las diferentes fracciones de hidrocarburos, siendo la alifática la principalmente desorbida. El aumento en la concentración de oxi-HAPs durante el proceso de lavado permite suponer que los mono-ramnolípidos contribuyen a la oxidación de los HAPs. Las micrografías TEM de la solución de lavado permitieron observar las micelas y gotas de hidrocarburos formadas durante el proceso de lavado. Su presencia evidencia los fenómenos de solubilización y movilización que debieron presentarse para propósitos de la desorción del diésel añejo.

Finalmente, los mono-ramnolípidos demostraron ser efectivos en el lavado de suelos contaminados con diésel añejo a concentraciones de 0.2-0.5% en un tiempo de tratamiento corto (72 h). Sin embargo, los resultados obtenidos permiten suponer que el alto contenido de partículas finas en el suelo, así como la recalcitrancia del hidrocarburo, limitaron el porcentaje de desorción de los hidrocarburos del diésel.

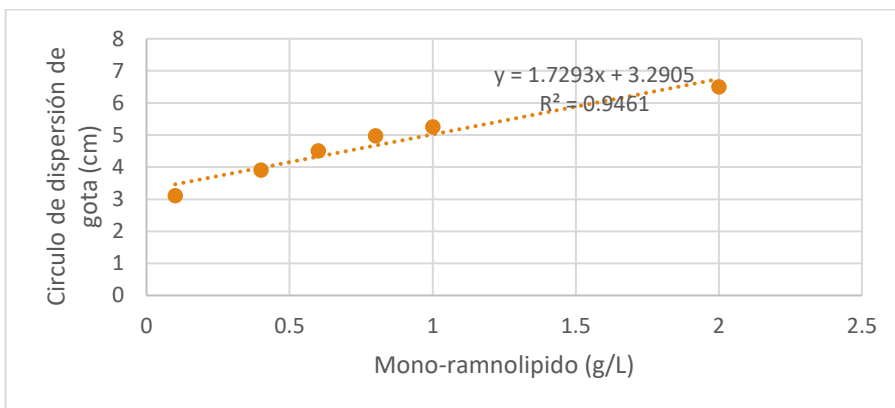
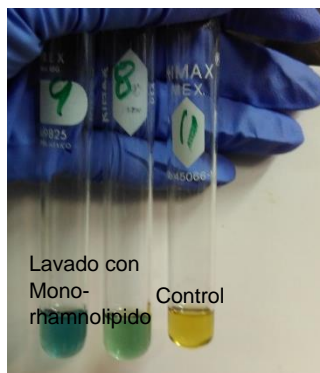
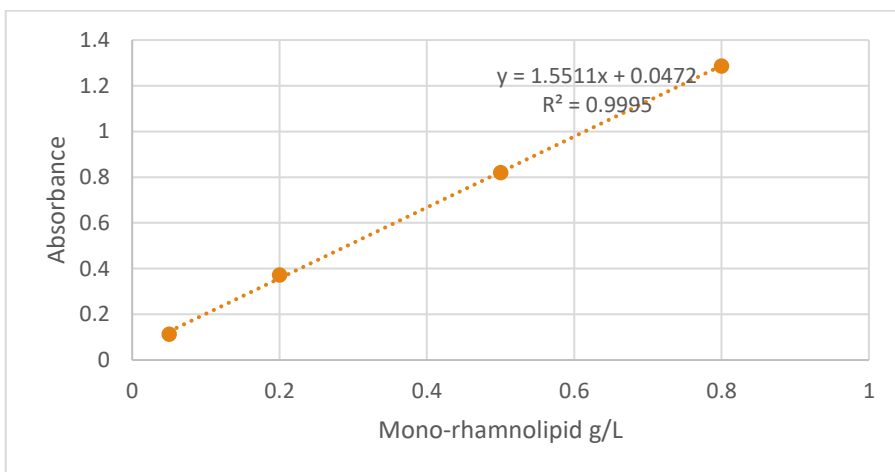


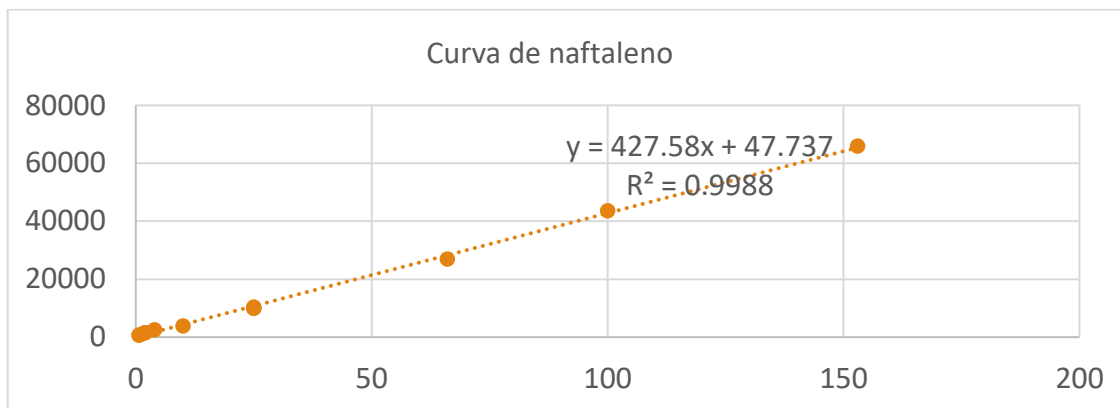
## *8. Recomendaciones*

- Se encontró que en el biorreactor la producción de ramnolípidos aumento 8 veces, por lo que se deberían evaluar otras fuentes de carbono y calcular los costos de producción.
- En el análisis del espectro de masas, se identificaron 4 iones moleculares de posibles mono-ramnolípidos no reportados en la literatura. Para poder confirmar este hallazgo, sería necesario purificarlos mediante HPLC y posteriormente realizar RMN de cada uno.
- Se sugiere Identificar y cuantificar los derivados de HAPs de la fracción 2 y 3 mediante CG-MS.
- La fracción mayormente removida fue la de los hidrocarburos alifáticos, sin embargo, para ampliar el conocimiento respecto a este resultado, se sugiere identificarlos mediante CG, utilizando estándares.
- Se lograron obtener micrografías en TEM de las micelas en los lavados de suelos contaminados con diésel. Para confirmar el principal mecanismo de remoción se requieren otros estudios complementarios como tinción con rojo oleoso (Zhong et al. 2016b) y la medición del potencial z al final del tratamiento.
- Confirmar mediante CRYOTEM, el tamaño de micelas y número de agregados obtenidos en el lavado de suelos contaminados con diésel mediante mono-ramnolípidos.
- Si bien, se obtuvieron algunos datos de la cantidad adsorbida de los mono-ramnolípidos en el suelo después de los tratamientos de lavado, es necesario realizar isothermas de adsorción para conocer si la adsorción del biosurfactante al suelo es constante con las distintas concentraciones aplicadas al suelo.

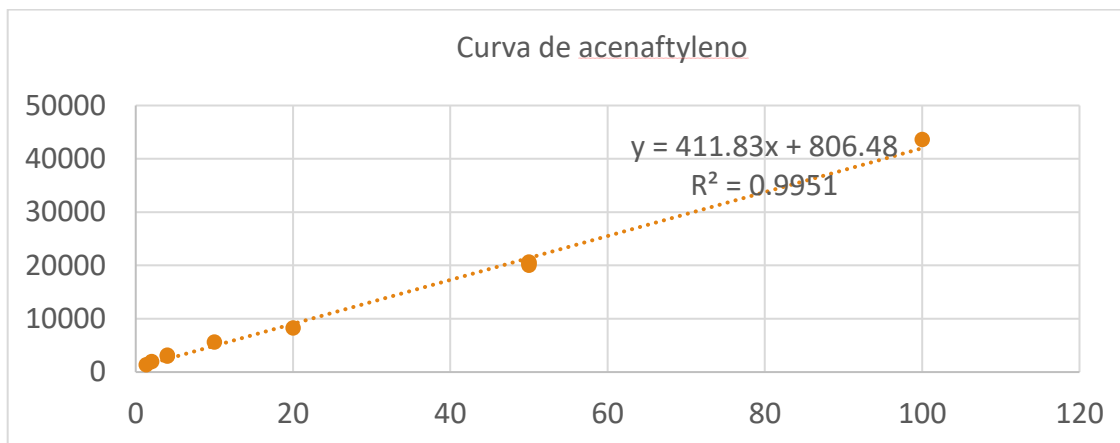
- Para continuar la caracterización del mono-ramnolípido, se podría evaluar el índice de emulsificación a distintos pH.
- Se recomienda también mejorar la remoción del diésel explorando con otro método adicional, como bioaumentación.
- Se sugiere explorar con nanoemulsiones desarrolladas a partir de los ramnolípidos y conocer si con esta formulación se mejora la remoción del diésel añejo.

## *9. Anexos*

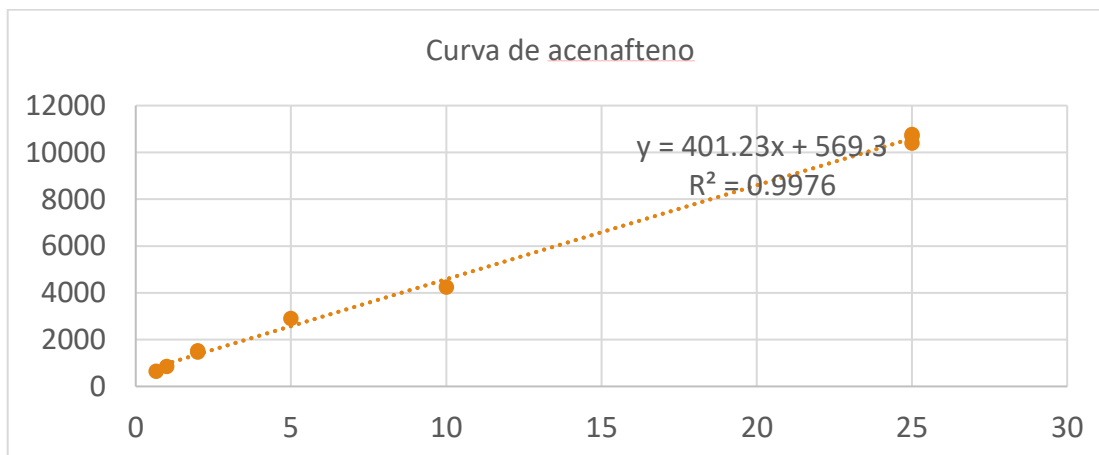
**Anexo 1.** Curva de calibración de dispersión de gota**Anexo 2.** Reacción de antrona en muestras de lavado de suelo, obtenidas después de la extracción en Soxhlet.**Anexo 3.** Curva de calibración de antrona

**Anexo 4. Curva de naftaleno**

LOD 0.92 (mg/L) LOQ 2.8 (mg/L)

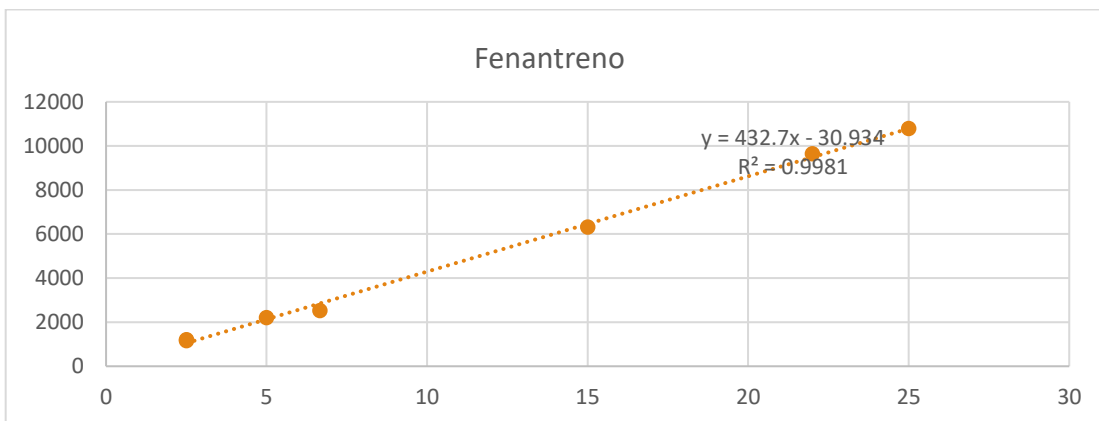
**Anexo 5. Curva de acenaftileno**

LOD 2.48 (mg/L) LOQ 7.53 (mg/L)

**Anexo 6. Curva de acenafteno**

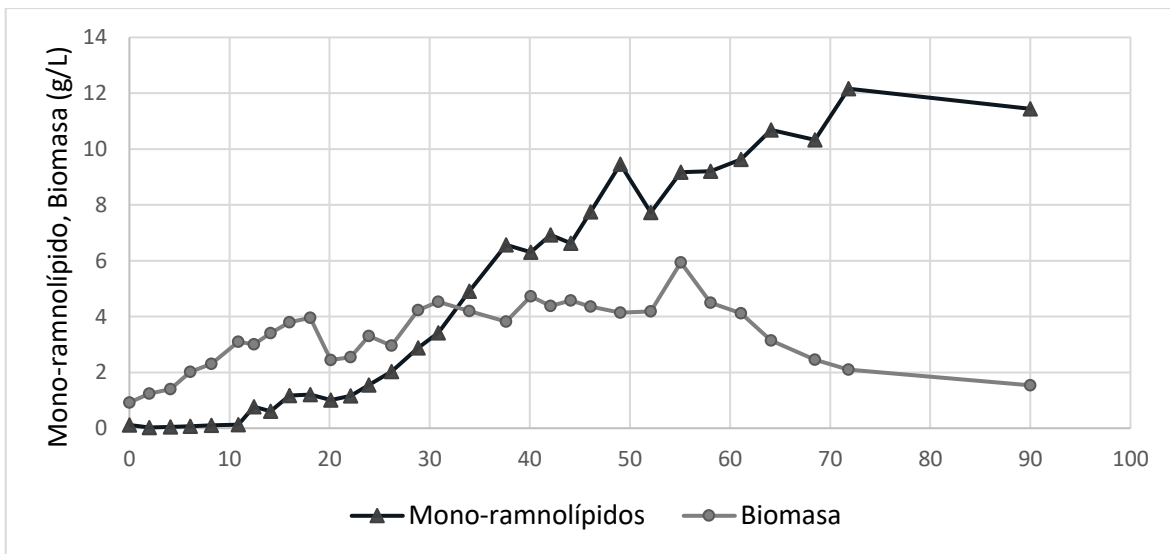
LOD 0.92 LOQ 2.79 (mg/L)

**Anexo 7.** Curva de Fenantreno



LOD 2.92 and LOQ 8.87 (mg/L)

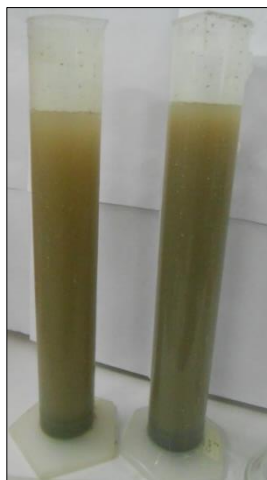
**Anexo 8.** Fermentación de *P. aeruginosa* en reactor de tanque agitado (Hernández-Cruz 2018).



**Anexo 9.** Caracterización del suelo problema.



Retención de



Textura del

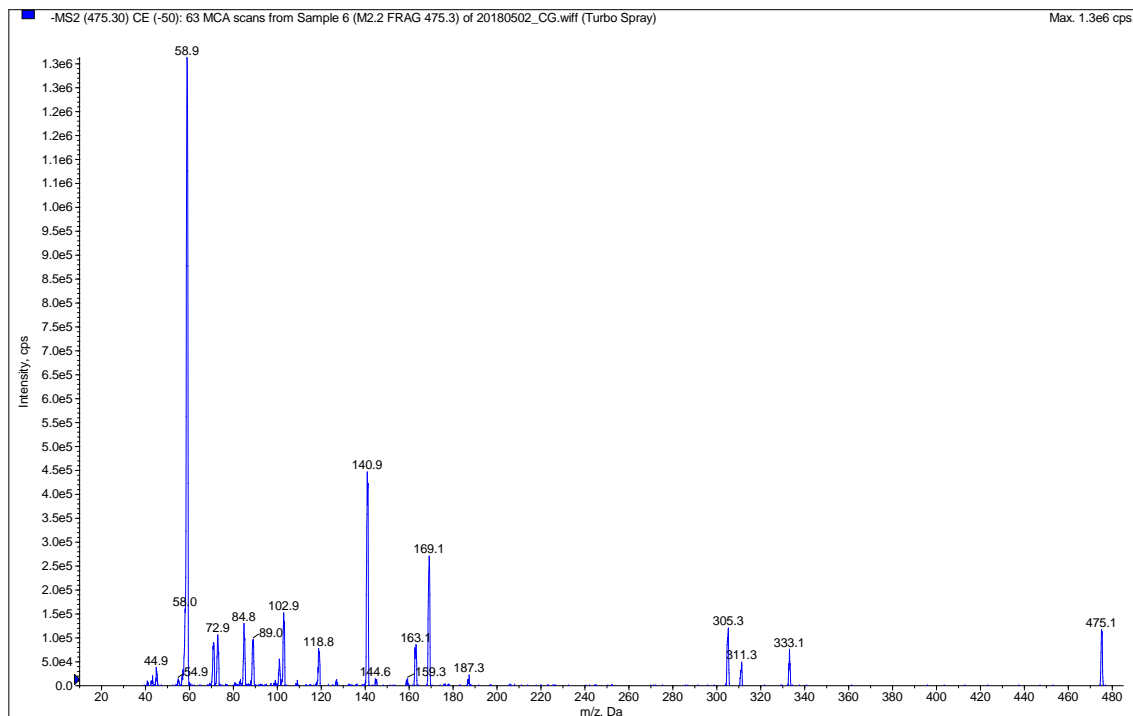


UF

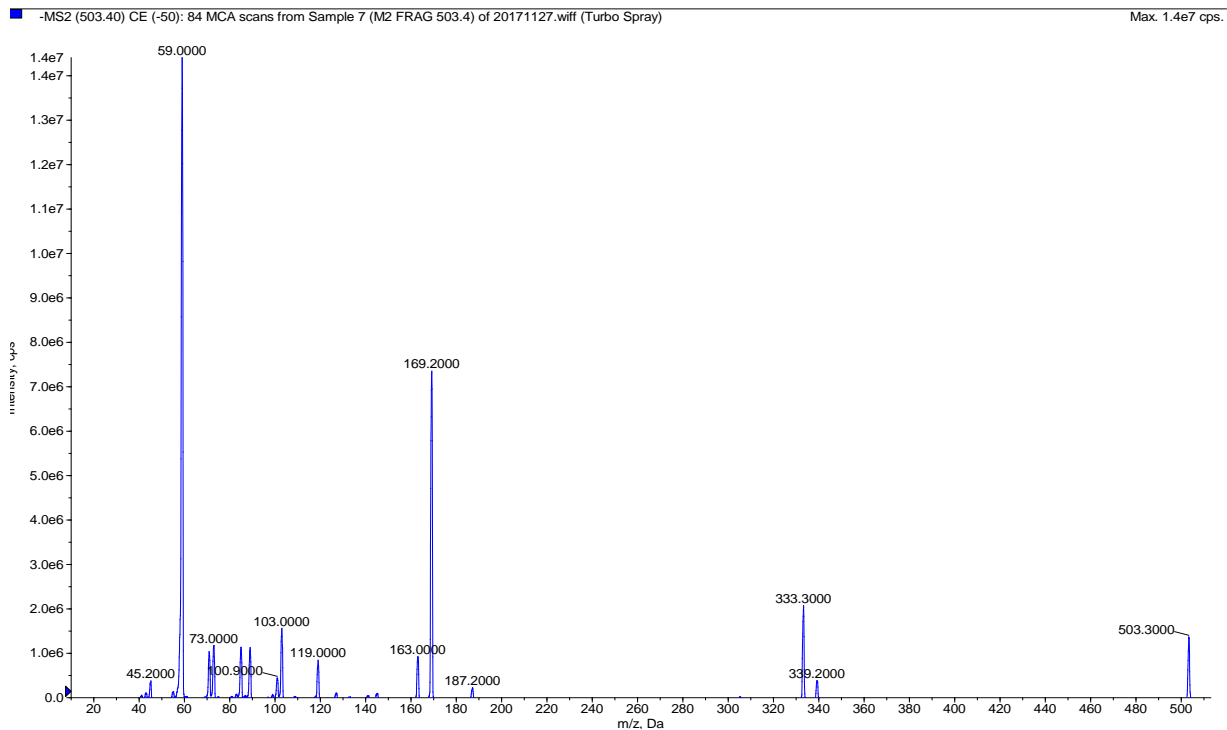
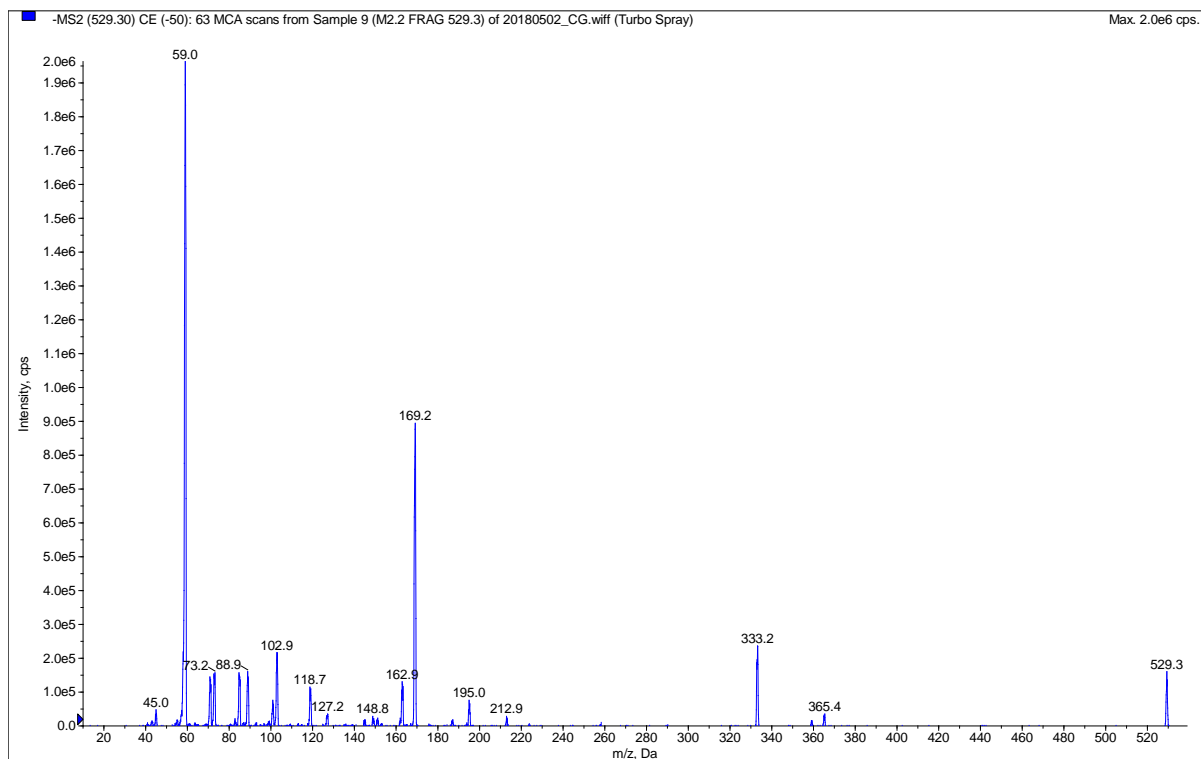


Contenido de

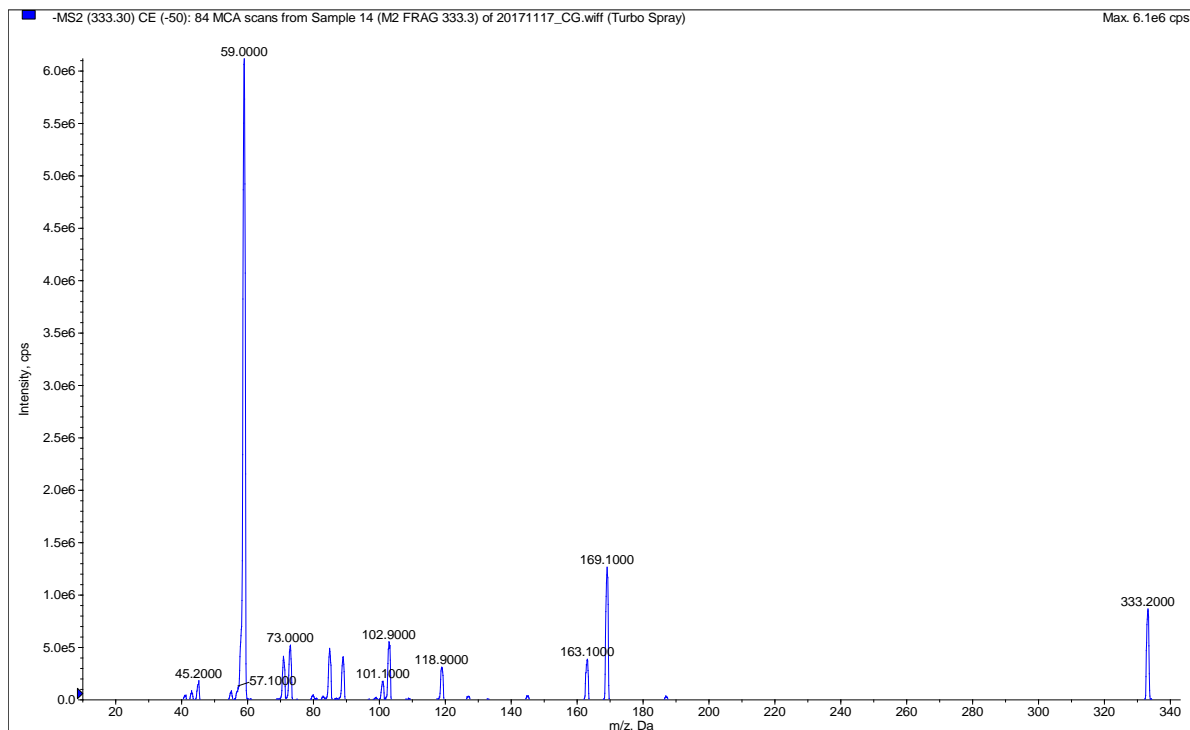
**Anexo 10. Fragmento 475 ESI-MS/MS**



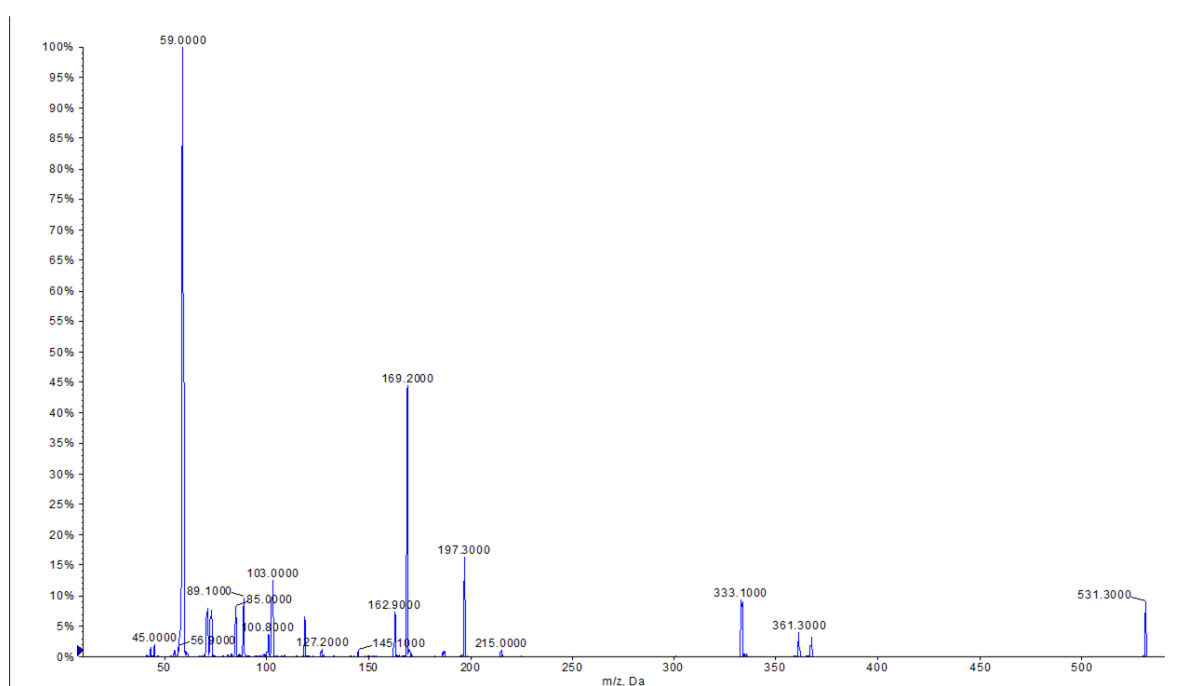


**Anexo 11. Fragmento 503 ESI MS/MS****Anexo 12. Fragmento 529 ESI MS/MS**

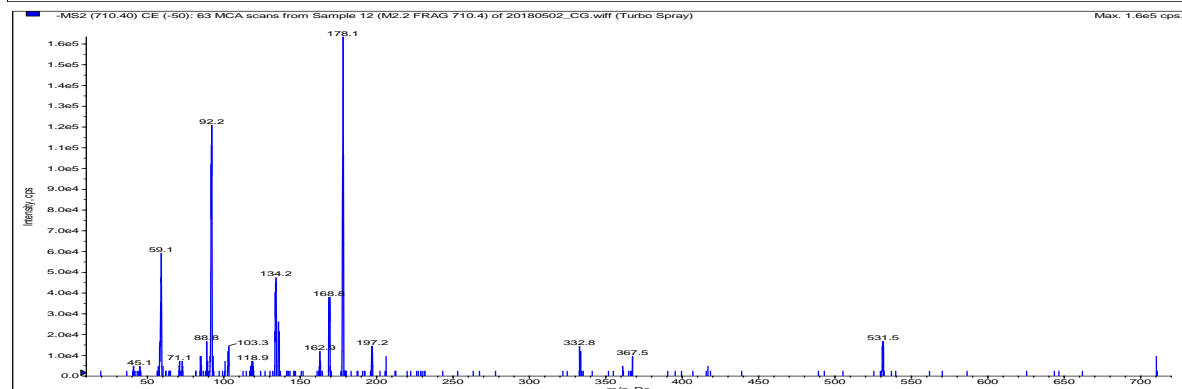
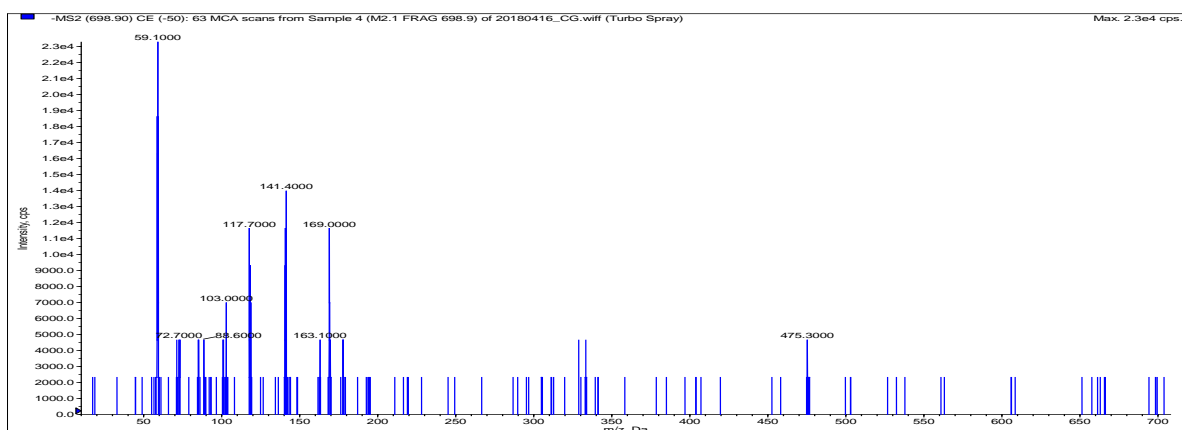
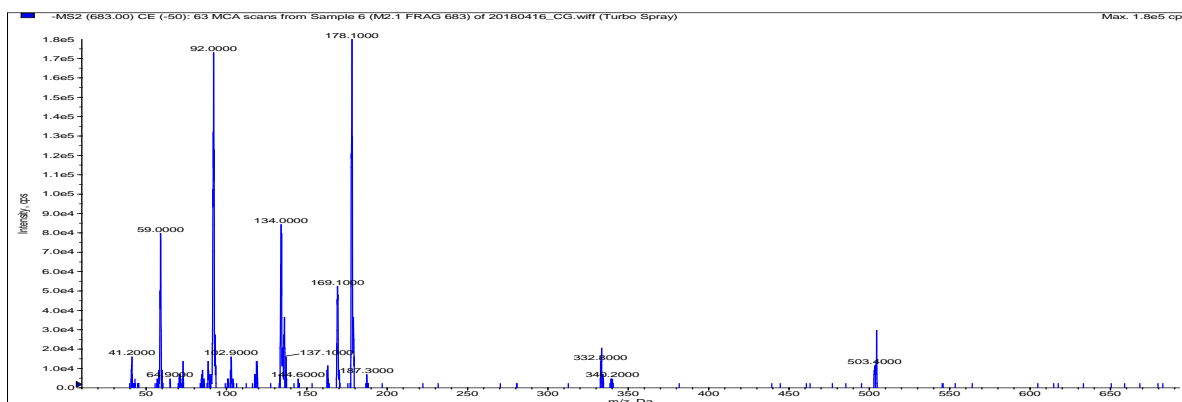
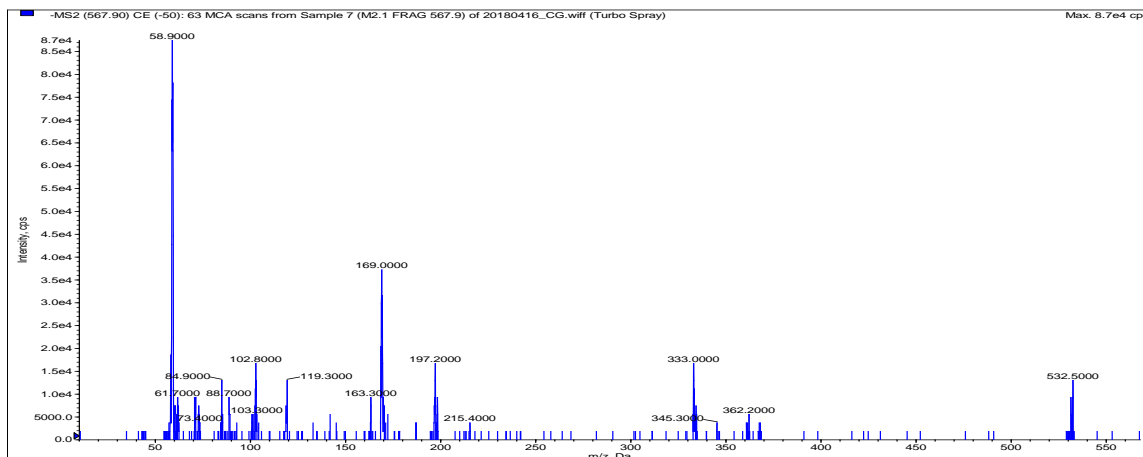
### Anexo 13. Fragmento 333 ESI MS/MS



### Anexo 14. Fragmento 531 ESI MS/MS



### Anexo 15. Fragmentos: 567, 683, 698.9 y 710 ESI-MS



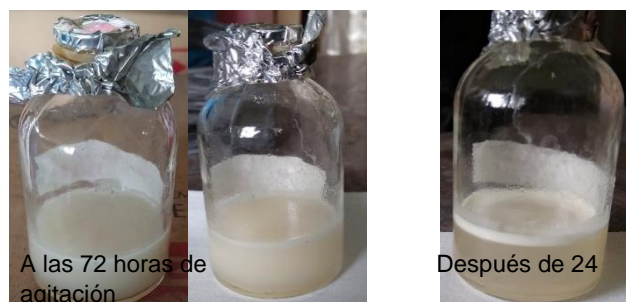
**Anexo 16.** Desplazamientos químicos de las señales seleccionadas del espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  NMR para el mono-ramnolípido producido por *P. aeruginosa* ATCC 9027.

| Grupo asignado   | desplazamiento (ppm) |
|--|----------------------|
| $\text{CH}_3$ -(HAAs)                                    | 14.5                 |
| $\text{CH}_3$ -(ring)                                    | 18.0                 |
| $(\text{CH}_2)_n$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ (HAAs) | 23.8-35.2            |
| COO (ring)   | 100.58               |
| C=O (HAAs)   | 172.67               |
| C-(ring)   | 70.1-75.49           |

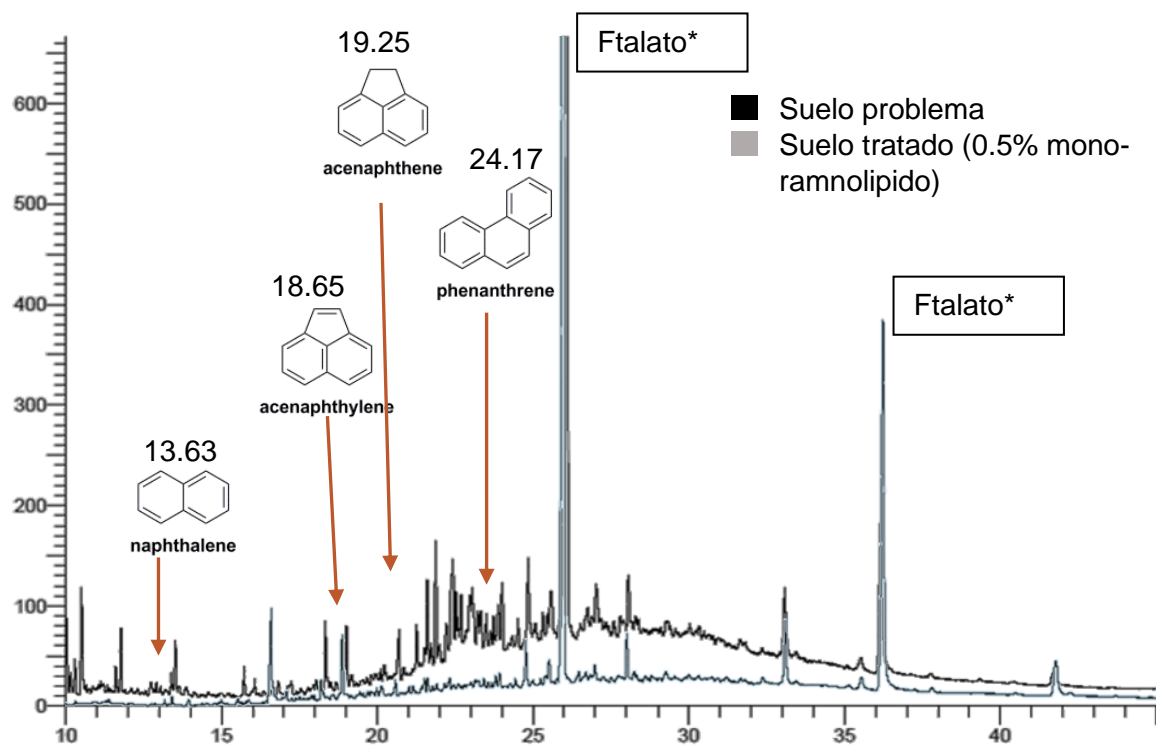
**Anexo 17.** Desplazamientos químicos de las señales seleccionadas del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  NMR para el mono-ramnolípido producido por *P. aeruginosa* ATCC 9027.

| Grupo asignado                | desplazamiento (ppm) |
|-------------------------------|----------------------|
| $-\text{CH}_3$ (HAAs)         | 0.9                  |
| $-(\text{CH}_2)_n$ (HAAs)     | 1.29                 |
| $-(\text{CH}_2)$ (HAAs)       | 1.53-1.60            |
| $-(\text{CH}_3)$ (ring)       | 1.22-1.24            |
| $-\text{CH}_2$ -COO (HAAs)    | 2.52-2.55            |
| $-\text{O}-\text{CH}-$ (HAAs) | 5.25                 |
| 4'-H                          | 3.30                 |
| 2',-3',-5'-H                  | 3.59-3.66            |
| 1'-H                          | 4.89                 |
| H'-Mrh                        | 4.78                 |
| $\text{CH}_2=\text{CH}$       | 6.83-7.40            |

**Anexo 18.** Solubilidad de diésel en una solución de mono-ramnolípidos (0.5 %) a 150 rpm en 72 h.



**Anexo 19.** Cromatografía de gases de la F2 del diésel, del suelo inicial y tratado.



\*Contaminación por ftalatos se confirmó por CG-MS.

Se identificó también por CG-MS en la misma fracción, contaminación por ftalatos. El origen de la contaminación no es claro, sin embargo, de acuerdo con la US EPA, 1996 (método 8061) es posible encontrar ftalatos en cartuchos de florisil, equipo Soxhlet, papel filtro y en sulfato de sodio almacenado en frascos de plásticos y aunque el material a utilizar se enjuague con disolventes, es posible que queden algunos residuos en los materiales.

Como dato importante en el minuto 36.44, tiempo de retención de uno de los picos más altos en la muestra del suelo problema, se detectó el estándar de

benzo(a)ntraceno. Sin embargo, se descartó que pudiera estar en la muestra del suelo una vez que se analizó con el mismo programa de HAPs el estándar de Di(2-etilhexil-) ftalato (Sigma), el cual fue detectado al mismo tiempo.

# *10. Referencias*

- Abalos A, Vinas M, Sabate J et al. (2004) Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of a rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *Biodegradation* 15, 249-260.
- Abbasi H, Hamed MM, Lotfabad TB et al. (2012) Biosurfactant-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples: physicochemical and structural characteristics of isolated biosurfactant. *Journal of bioscience bioengineering* 113, 211-219.
- Abbasi H, Noghabi KA, Hamed MM et al. (2013) Physicochemical characterization of a monorhamnolipid secreted by *Pseudomonas aeruginosa* MA01 in aqueous media. An experimental and molecular dynamics study. 101, 256-265.
- Abdel-Mawgoud AM, Aboulwafa MM, Hassouna NA-H (2009) Characterization of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolate Bs20. *Applied Biochemistry Biotechnology* Advances 157, 329-345.
- Abdel-Mawgoud AM, Lépine F, Déziel E (2010) Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied microbiology Biotechnology* Advances 86, 1323-1336.
- Akbari S, Nour AH, Yunus RM et al. (2018) Biosurfactants as promising multifunctional agent: A mini review. *International Journal of Innovative Research Scientific Studies* 1.
- Al Disi Z, Jaoua S, Al-Thani D et al. (2017) Considering the specific impact of harsh conditions and oil weathering on diversity, adaptation, and activity of hydrocarbon-degrading bacteria in strategies of bioremediation of harsh oily-polluted soils. *BioMed Research International* 2017.
- ATSDR (1995) Toxicological profile for fuel oils, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Department of Health and Human Services PHS (ed), Atlanta.
- Bai G, Brusseau ML, Miller RM (1997) Biosurfactant-enhanced removal of residual hydrocarbon from soil. *Journal of Contaminant Hydrology* 25, 157-170.
- Bai L, McClements DJ (2016) Formation and stabilization of nanoemulsions using biosurfactants: Rhamnolipids. *Journal of Colloid Interface Science* 479, 71-79.
- Bandowe BAM, Meusel H (2017) Nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons (nitro-PAHs) in the environment—a review. *Science of the Total Environment* 581, 237-257.
- Bhat R, Dayamani K, Hathwar S et al. (2015) Exploration on production of rhamnolipid biosurfactants using native *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Journal of BioScience Biotechnology Advances* 4.
- Bajagain R, Lee S, Jeong S-W (2018) Application of persulfate-oxidation foam spraying as a bioremediation pretreatment for diesel oil-contaminated soil. *Chemosphere* 207, 565-572.
- Baziar M, Mehrasebi MR, Assadi A et al. (2013) Efficiency of non-ionic surfactants-EDTA for treating TPH and heavy metals from contaminated soil. *Journal of Environmental Health Science Engineering* 11, 41.
- Black, C. A., Klute, A., Miller, R., & Page, A. L. (1965). Physical and mineralogical properties, including statistics of measurement and sampling: American Society of Agronomy.
- Befkadu AA, Quanyuan C (2018) Surfactant-enhanced soil washing for removal of petroleum hydrocarbons from contaminated soils: a review. *Pedosphere* 28, 383-410.
- Bera A, Mandal A (2015) Microemulsions: a novel approach to enhanced oil recovery: a review. *Journal of Petroleum Exploration Production Technology* 5, 255-268.
- Bezza FA, Chirwa EMN (2017) The role of lipopeptide biosurfactant on microbial remediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil. *Chemical Engineering Journal* 309, 563-576.
- Bodagh A, Khoshdast H, Sharafi H et al. (2013) Removal of cadmium (II) from aqueous solution by ion flotation using rhamnolipid biosurfactant as an ion collector. *Industrial Engineering Chemistry Research* 52, 3910-3917.
- Burguet-Lago N, Sierra-Prado N, Acosta Estrada M (2014) Evaluación de una formulación para la conservación de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 45.
- Cavazos-Arroyo J, Pérez-Armendáriz B, Mauricio-Gutiérrez A (2014) Afectaciones y consecuencias de los derrames de hidrocarburos en suelos agrícolas de Acatzingo, Puebla, México. *Agricultura, sociedad y desarrollo* 11, 539-550.
- Chen J, Wu Q, Hua Y et al. (2017) Potential applications of biosurfactant rhamnolipids in agriculture and biomedicine. *Applied Microbiology Biotechnology* Advances 101, 8309-8319.
- Chong Z-Y, Liao X-Y, Yan X-L et al. (2014) Enhanced Desorption of PAHs from Manufactured Gas Plant Soils Using Different Types of Surfactants. *Pedosphere* 24, 209-219.



- Chong H, Li Q (2017) Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies. *Microbial Cell Factories* 16, 137.
- Cortés-Sánchez AdJ, Troconis-Torres IG, Jaramillo -Flores ME (2013) Surfactantes biológicos con aplicación potencial en tecnología de alimentos: una revisión. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias* 15, 16-23.
- da Rosa CF, Freire DM, Ferraz HC (2015) Biosurfactant microfoam: application in the removal of pollutants from soil. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 3, 89-94.
- Davies JT, 1957, A quantitative kinetic theory of emulsion type, I. Physical chemistry of the emulsifying agent. In: *Gas/Liquid and Liquid/Liquid Interface. Proceedings of the International Congress of Surface Activity*: 426-38
- De Rienzo MD, Kamalanathan I, Martin P (2016) Comparative study of the production of rhamnolipid biosurfactants by *B. thailandensis* E264 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 using foam fractionation. *J Process Biochemistry* 51, 820-827.
- Del Rosario Sienra M, Rosazza NG (2006) Occurrence of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons in urban particulate matter PM10. *Atmospheric Research* 81, 265-276.
- Fernández Linares, L. C. (2006). Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. (No. Sirsi 9684890397).
- Fushimi A, Hashimoto S, Ieda T et al. (2012) Thermal desorption-comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry for determination of trace polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives. *Journal of Chromatography A* 1252, 164-170.
- Grosso-Becerra M-V, González-Valdez A, Granados-Martínez M-J et al. (2016) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 is a non-virulent strain suitable for mono-rhamnolipids production. *Applied microbiology biotechnology* 100, 9995-10004.
- Herman DC, Artiola JF, Miller RM (1995) Removal of cadmium, lead, and zinc from soil by a rhamnolipid biosurfactant. *Environmental science & technology* 29, 2280-2285.
- Hernández Cruz, Mari Cruz (2018). Producción y Cuantificación de los metabolitos producidos por *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico Superior de Álama Temapache.
- Jaramillo, J. (2002). Introducción a la ciencia del suelo. In F. d. C. M. Universidad Nacional de Colombia (Ed.), (pp. 613). Colombia.
- Javanbakht G, Goual L (2016) Impact of surfactant structure on napl mobilization and solubilization in porous media. *Industrial Engineering Chemistry Research* 55, 11736-11746.
- Johann S, Seiler T-B, Tiso T et al. (2016) Mechanism-specific and whole-organism ecotoxicity of mono-rhamnolipids. *Science of the Total Environment* 548, 155-163.
- Joy S, Rahman PK, Sharma S (2017) Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon degradation potentials of bacteria isolated from extreme and hydrocarbon contaminated environments. *Chemical Engineering Journal* 317, 232-241.
- Kaczorek E, Sałek K, Guzik U et al. (2013) The impact of long-term contact of *Achromobacter* sp. 4 (2010) with diesel oil-Changes in biodegradation, surface properties and hexadecane
- Kang S-W, Kim Y-B, Shin J-D et al. (2010) Enhanced biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial biosurfactant, sophorolipid. *Applied Biochemistry Biotechnology* 160, 780-790.
- Khalladi R, Benhabiles O, Bentahar F et al. (2009) Surfactant remediation of diesel fuel polluted soil. *Journal of Hazardous Materials* 164, 1179-1184.
- Khan FI, Husain T, Hejazi R (2004) An overview and analysis of site remediation technologies. *Journal of Environmental Management* 71, 95-122.
- Khoshdast H, Sam A (2012) An efficiency evaluation of iron concentrates flotation using rhamnolipid biosurfactant as a frothing reagent. *Environmental Engineering Research* 17, 9-15.
- Koshlaf E, Ball AS (2017) Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments. *AIMS Microbiology* 3, 25.
- Kuráň P, Trögl J, Nováková J et al. (2014) Biodegradation of spilled diesel fuel in agricultural soil: Effect of humates, zeolite, and bioaugmentation. *The Scientific World Journal* 2014.
- Kuyukina MS, Ivshina IB, Makarov SO et al. (2005) Effect of biosurfactants on crude oil desorption and mobilization in a soil system. *Environment International* 31, 155-161.
- Lai C-C, Huang Y-C, Wei Y-H et al. (2009) Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* 167, 609-614.

- Lan G, Fan Q, Liu Y et al. (2015) Rhamnolipid production from waste cooking oil using *Pseudomonas* SWP-4. *Biochemical engineering journal* 101, 44-54.
- Lara-Severino, R.d.C., Gómez Oliván, L.M., Sandoval Trujillo, Á.H., Isaac-Olive, K., Ramírez-Durán, N., 2017. Búsqueda de capacidad productora de biosurfactantes en haloalcalófilas y haloalcalotolerantes. *Revista internacional de contaminación ambiental* 33, 529-539. doi:10.20937/rica.2017.33.03.15.
- Later DW, Lee ML, Bartle KD et al. (1981) Chemical class separation and characterization of organic compounds in synthetic fuels. *Analytical Chemistry* 53, 1612-1620.
- Lawal AT (2017) Polycyclic aromatic hydrocarbons. A review. *Cogent Environmental Science* 3, 1339841.
- Ławniczak Ł, Marecik R, Chrzanowski Ł (2013) Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 2327-2339.
- Lebrón-Paler A, Pemberton JE, Becker BA et al. (2006) Determination of the acid dissociation constant of the biosurfactant monorhamnolipid in aqueous solution by potentiometric and spectroscopic methods. *Analytical Chemistry* 78, 7649-7658.
- Liang F, Lu M, Keener TC et al. (2005) The organic composition of diesel particulate matter, diesel fuel and engine oil of a non-road diesel generator. *Journal of Environmental Monitoring* 7, 983-988.
- Liu G, Zhong H, Yang X et al. (2017) Advances in applications of rhamnolipids biosurfactant in environmental remediation: A review. *Biotechnology and Bioengineering* 115, 796-814.
- Liu Y, Ma X, Zeng G et al. (2014) Role of low-concentration monorhamnolipid in cell surface hydrophobicity of *Pseudomonas aeruginosa*: adsorption or lipopolysaccharide content variation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98, 10231-10241.
- Lominchar M, Santos A, de Miguel E et al. (2018) Remediation of aged diesel contaminated soil by alkaline activated persulfate. *Science of the Total Environment* 622, 41-48.
- Long X, Meng Q, Zhang G (2014) Application of biosurfactant rhamnolipid for cleaning of UF membranes. *Journal of Membrane Science* 457, 113-119.
- Lovaglio RB, dos Santos FJ, Junior MJ et al. (2011) Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces Progress* 85, 301-305.
- Lundstedt, S., Haglund, P., Öberg, L., 2003. Degradation and formation of polycyclic aromatic compounds during bioslurry treatment of an aged gasworks soil. *Environmental Toxicology Chemistry: An International Journal* 22, 1413-1420. doi: 10.1002/etc.5620220701
- Lundstedt S, White PA, Lemieux CL et al. (2007) Sources, fate, and toxic hazards of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) at PAH-contaminated sites. *AMBIO: A Journal of the Human Environment* 36, 475-486.
- Mao X, Jiang R, Xiao W et al. (2015) Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: a review. *Journal of Hazardous Materials* 285, 419-435.
- Medina-Moreno S, Jiménez-Islas D, Gracida-Rodríguez J et al. (2011) Modeling rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa* from immiscible carbon source in a batch system. *International Journal of Environmental Science & Technology* 8, 471-482.
- Méndez M, Rennola L, Peña M et al. (2010) Determinación de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) usando CG-FID en suelos de un patio de tanques en desuso situado en Catia La Mar—Venezuela. *Ciencia e Ingeniería* 32, 31-37.
- Mariano AP, Bonotto DM, Angelis DdFd et al. (2008) Biodegradability of commercial and weathered diesel oils. *Brazilian Journal of Microbiology* 39, 133-142.
- Monteiro SA, Sasaki GL, de Souza LM et al. (2007) Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614. *Chemistry Physics of Lipids* 147, 1-13.
- Mnif I, Ellouz-Chaabouni S, Ghribi D (2017) Glycolipid biosurfactants, main classes, functional properties and related potential applications in environmental biotechnology. *Journal of Polymerthe Environment* 26, 2192-2206.
- Mnif I, Sahnoun R, Ellouze-Chaabouni S et al. (2013) Evaluation of *B. subtilis* SPB1 biosurfactants' potency for diesel-contaminated soil washing: optimization of oil desorption using Taguchi design. *Environmental Science Pollution Research* 21, 851-861.
- Müller MM, Kügler JH, Henkel M et al. (2012) Rhamnolipids—next generation surfactants? *Journal of Biotechnology* 162, 366-380.

- Nicolò MS, Cambria MG, Impallomeni G et al. (2017) Carbon source effects on the mono/di-rhamnolipid ratio produced by *Pseudomonas aeruginosa* L05, a new human respiratory isolate. *New biotechnology* 39, 36-41.
- Nitschke M, Costa SG, Contiero J (2005) Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. *Biotechnology Progress* 21, 1593-1600.
- NOM-021-RECNAT-2000. (2002) Norma Oficial Mexicana, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. In: *Diario Oficial de la Federación*, SEMARNAT (ed). pp. 85.
- NOM-138-SEMARNAT/SS-2003. NOM (2005) Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación. 29, 21.
- Noordman WH, Wachter JH, De Boer GJ et al. (2002) The enhancement by surfactants of hexadecane degradation by *Pseudomonas aeruginosa* varies with substrate availability. *Journal of Biotechnology* 94, 195-212.
- Oliveira PF, Oliveira TM, Spinelli LS et al. (2014) Development and evaluation of solbrax-water nanoemulsions for removal of oil from sand. *Journal of Nanomaterials* 2014.
- Ossai IC, Ahmed A, Hassan A et al. (2019) Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review. *Environmental Technology Innovation*.
- Pacwa-Płociniczak M, Płaza GA, Piotrowska-Seget Z et al. (2011) Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *International Journal of Molecular Sciences* 12, 633-654.
- Palos Pacheco R, Eismín RJ, Coss CS et al. (2017) Synthesis and characterization of four diastereomers of monorhamnolipids. *Journal of the American Chemical Society* 139, 5125-5132.
- Paria S (2008) Surfactant-enhanced remediation of organic contaminated soil and water. *Advances in Colloid Interface Science* 138, 24-58.
- Patowary K, Patowary R, Kalita MC et al. (2017) Characterization of Biosurfactant Produced during Degradation of Hydrocarbons Using Crude Oil As Sole Source of Carbon. *Front Microbiol* 8, 279.
- Pelaez A, Lores I, Sotres A et al. (2013) Design and field-scale implementation of an "on site" bioremediation treatment in PAH-polluted soil. *Environmental pollution* 181, 190-199.
- Peng S, Wu W, Chen J (2011) Removal of PAHs with surfactant-enhanced soil washing: influencing factors and removal effectiveness. *Chemosphere* 82, 1173-1177.
- Pinzon NM, Ju L-K (2009) Improved detection of rhamnolipid production using agar plates containing methylene blue and cetyl trimethylammonium bromide. *Biotechnology Letters* 31, 1583-1588.
- Radzuan MN, Banat IM, Winterburn J (2017) Production and characterization of rhamnolipid using palm oil agricultural refinery waste. *Bioresource Technology* 225, 99-105.
- Rahimi K, Lotfabad TB, Jabeen F et al. (2019) Cytotoxic effects of mono- and di-rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* MR01 on MCF-7 human breast cancer cells. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*.
- Rahman PK, Pasirayi G, Auger V et al. (2010) Production of rhamnolipid biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa* DS10-129 in a microfluidic bioreactor. *Biotechnology Applied Biochemistry* 55, 45-52.
- Raza ZA, Rehman A, Hussain MT et al. (2014) Production of rhamnolipid surfactant and its application in bioscouring of cotton fabric. *Carbohydr Res* 391, 97-105.
- Renfro TD, Xie W, Yang G et al. (2014) Rhamnolipid surface thermodynamic properties and transport in agricultural soil. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* 115, 317-322.
- Rikalović MG, Vrvic MM, Karadžić IM (2015) Rhamnolipid biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa*: from discovery to application in contemporary technology. *Journal of the Serbian Chemical Society* 80, 279-304.
- Saeedi LH, Assadi MM, Heydarian SM et al. (2014) The Production and Evaluation of a Nano-biosurfactant. *Petroleum Science Technology* 32, 125-132.
- Salager J-L (2002) *Surfactantes tipos y usos, interfaciales*. CFS-AMdeef (ed), Universidade de Los Andes, Venezuela.
- Samadi N, Abadian N, Ahmadkhaniha R et al. (2012) Structural characterization and surface activities of biogenic rhamnolipid surfactants from *Pseudomonas aeruginosa* isolate MN1 and synergistic effects against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Folia microbiologica* 57, 501-508.

- Santos AS, Sampaio APW, Vasquez GS et al. (2002) Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of rhamnolipids by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnology for Fuels and Chemicals*, 1025-1035.
- Santos D, Rufino R, Luna J et al. (2016) Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. *International Journal of Molecular Sciences* 17, 401.
- Schulz G.V. (1939). Über die Kinetik der Kettenpolymerisationen. *Z. Phys. Chem. B* 43, 25-46
- Sekhon Randhawa KK, Rahman PK (2014) Rhamnolipid biosurfactants—past, present, and future scenario of global market. *Frontiers in Microbiology* 5, 454.
- Sha R, Jiang L, Meng Q et al. (2012) Producing cell-free culture broth of rhamnolipids as a cost-effective fungicide against plant pathogens. *Journal of basic microbiology* 52, 458-466.
- Shah A, Shahzad S, Munir A et al. (2016) Micelles as soil and water decontamination agents. *Chemical Reviews* 116, 6042-6074.
- Shin K-H, Kim K-W (2004) A biosurfactant-enhanced soil flushing for the removal of phenanthrene and diesel in sand. *Environmental Geochemistry Health* 26, 5-11.
- Shrivastava A, Gupta VB (2011) Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of young scientists* 2, 21.
- Siegmund I, Wagner F (1991) New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. *Biotechnology Techniques* 5, 265-268.
- Singh AK, Cameotra SS (2013) Rhamnolipids production by multi-metal-resistant and plant-growth-promoting rhizobacteria. *Applied biochemistry biotechnology* 170, 1038-1056.
- Smyth TJP, Rudden M, Tsaousi K et al. (2014) Protocols for the Detection and Chemical Characterisation of Microbial Glycolipids. In: *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols*. Springer Protocols Handbooks. pp. 29-60.
- Solomons TG, Fryhle C (2000) *Organic Chemistry*, John Wiley&Sons. (Inc., 6th edn).
- Suh S-J, Invally K, Ju L-K (2019) Rhamnolipids: Pathways, Productivities, and Potential. In: *Biobased Surfactants*. Elsevier. pp. 169-203.
- Tabuchi T, Martínez D, Hospinal M et al. (2015) Optimización y modificación del método para la detección de ramnolípidos. *Revista Peruana de Biología* 22, 247-258.
- Taga, R., Tang, N., Hattori, T., Tamura, K., Sakai, S., Toriba, A., Kizu, R., Hayakawa, K., 2005. Direct-acting mutagenicity of extracts of coal burning-derived particulates and contribution of nitropolycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation Research/Genetic Toxicology Environmental Mutagenesis* 581, 91-95. doi:10.1016/j.mrgentox.2004.11.013
- Takawira A, Gwenzi W, Nyamugafata P (2014) Does hydrocarbon contamination induce water repellency and changes in hydraulic properties in inherently wettable tropical sandy soils? *Geoderma* 235, 279-289.
- Tiso T, Zauter R, Tulke H et al. (2017) Designer rhamnolipids by reduction of congener diversity: production and characterization. *Microbial Cell Factories* 16, 225.
- Torres LG, Orantes JL, Iturbe R (2003) Critical micellar concentrations for three surfactants and their diesel-removal efficiencies in petroleum-contaminated soils. *Environmental Geosciences* 10, 28-36.
- Trellu C, Mousset E, Pechaud Y et al. (2016) Removal of hydrophobic organic pollutants from soil washing/flushing solutions: a critical review. *Journal of Hazardous Materials* 306, 149-174.
- Urum K, Pekdemir T, Çopur M (2004) Surfactants treatment of crude oil contaminated soils. *Journal of Colloid Interface Science* 276, 456-464.
- Urum K, Grigson S, Pekdemir T et al. (2006) A comparison of the efficiency of different surfactants for removal of crude oil from contaminated soils. *Chemosphere* 62, 1403-1410.
- US EPA (1986) Test methods for evaluating solid waste, US Physical/Chemical Methods.
- US EPA (1993). "Innovative Site Remediation Technology: Soil Washing/Soil Flushing." EPA 542-B-93-012.
- US EPA (2020) Users' Guide and Background Technical Document for USEPA. Regional Screening Level (RSL)Table. Disponible en: <https://www.epa.gov/risk/regional-screening-levels-rsls-generic-tables> y <https://semspub.epa.gov/work/HQ/200043.pdf>.
- Vecchioli G, Del Panno M, Paineira M (1990) Use of selected autochthonous soil bacteria to enhanced degradation of hydrocarbons in soil. *Environmental Pollution* 67, 249-258.
- Wang LK, Hung Y-T, Shammass NK (2009) *Handbook of advanced industrial and hazardous wastes treatment*. CRC Press.

- 
- Whang L-M, Liu P-WG, Ma C-C et al. (2008) Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *Journal of Hazardous Materials* 151, 155-163.
- Wasoh H, Baharun S, Halim M et al. (2017) Production of rhamnolipids by locally isolated *Pseudomonas aeruginosa* using sunflower oil as carbon source. *Bioremediation Science Technology Research* 5, 1-6.
- Wei C, Bandowe BAM, Han Y et al. (2015) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their derivatives (alkyl-PAHs, oxygenated-PAHs, nitrated-PAHs and azaarenes) in urban road dusts from Xi'an, Central China. *Chemosphere* 134, 512-520.
- WRB (2015) World reference base for soil resources 2014, update 2015: International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. In: *World Soil Resources Reports*, Group IW (ed), FAO, Rome. pp. 192.
- Yan J, Wang L, Fu PP et al. (2004) Photomutagenicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons from the US EPA priority pollutant list. *Mutation Research/Genetic Toxicology Environmental Mutagenesis* 557, 99-108.
- Yang, S., Gou, Y., Song, Y., Li, P., 2018. Enhanced anoxic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a highly contaminated aged soil using nitrate and soil microbes. *Environmental Earth Sciences* 77, 432. doi:10.1007/s12665-018-7629-6
- Yap C, Gan S, Ng H (2010) Application of vegetable oils in the treatment of polycyclic aromatic hydrocarbons-contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials* 177, 28-41.
- Zhang, Miller RM (1992) Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Applied and Environmental Microbiology* 58, 3276-3282.
- Zhao F, Liang X, Ban Y et al. (2016) Comparison of methods to quantify rhamnolipid and optimization of oil spreading method. *Tenside Surfactants Detergents* 53, 243-248.
- Zhong H, Zeng GM, Liu JX et al. (2008) Adsorption of monorhamnolipid and dirhamnolipid on two *Pseudomonas aeruginosa* strains and the effect on cell surface hydrophobicity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79, 671-677.
- Zhong H, Yang X, Tan F et al. (2016a) Aggregate-based sub-CMC solubilization of n-alkanes by monorhamnolipid biosurfactant. *New Journal of Chemistry* 40, 2028-2035.
- Zhong H, Zhang H, Liu Z et al. (2016b) Sub-CMC solubilization of dodecane by rhamnolipid in saturated porous media. *Scientific Reports* 6, 33266.
- Zeng Z, Liu Y, Zhong H et al. (2018) Mechanisms for rhamnolipids-mediated biodegradation of hydrophobic organic compounds. *Science of the Total Environment* 634, 1-11.