

USO DE BIOSURFACTANTES EXTRAIDOS DE LOS LICORES DE LAVADO DE MAÍZ PARA LA ELIMINACIÓN DE ACEITE QUEMADO DE MOTOR EN SUELO ARENOSO

USAGE OF BIOSURFACTANTS EXTRACTED FROM CORN STEEP LIQUOR TO ELIMINATE BURNED ENGINE OIL ON SANDY SOIL

Guadalupe **Bustos-Vázquez**^{1,2*}, Alejandro **Vidal-Fontela**², Xanel **Vecino-Bello**^{2,1},
J. Manuel **Cruz-Freire**², Ana B. **Moldes-Menduña**²

¹Unidad Académica Multidisciplinaria Mante, Área de Ingeniería Bioquímica Industrial, Universidad Autónoma de Tamaulipas. Boulevard E. C. González 1201 Poniente. Colonia Jardín, 89840, Ciudad Mante, Tamaulipas, México. ²Departamento de Ingeniería Química, Escuela de Ingeniería Industrial, Universidad de Vigo, Campus-As Lagoas, Marcosende, 36310 Vigo, Pontevedra, España. ³Departamento de Ingeniería Química, Escuela de Ingeniería de Barcelona Este (EEBE), Universitat Politècnica de Catalunya (UPC)-Barcelona TECH, C/ Eduard Maristany, 19 Campus Diagonal-Besòs, 08930 Barcelona, España. (gbustos@docentes.uat.edu.mx)

RESUMEN

El interés creciente por el uso de biosurfactantes con el propósito de eliminar contaminantes hidrofóbicos en suelos contaminados va en aumento. El objetivo de este estudio fue evaluar el proceso de descontaminación de un suelo arenoso, contaminado con aceite quemado de motor de coche, utilizando un detergente natural, extraído de una corriente residual de licores de lavado de maíz, para su uso como surfactante natural en el tratamiento de vertidos. Primero se evaluó la capacidad emulsionante e interactiva del biosurfactante con el aceite quemado y después se realizaron experimentos de extracción en discontinuo por triplicado con 5 g de suelo arenoso y 50,000 ppm de aceite quemado, utilizando varias disoluciones limpiadores formuladas con el biosurfactante, por encima y por debajo de su concentración micelar crítica (CMC), utilizando relaciones sólido/líquido entre 1/10 y 1/30 (p:v). Los resultados mostraron que la relación sólido/líquido 1/20 (p:v) fue la más adecuada para el lavado; después de 6 h de contacto el proceso de limpieza presentó buenos resultados. La alta biodegradabilidad del extracto de biosurfactante y los tiempos de tratamiento, relativamente bajos, permiten sugerir su uso en procesos de descontaminación *in situ* de áreas contaminadas con aceites derivados del petróleo.

Palabras clave: biosurfactante, aceite quemado, licores de lavado de maíz, arena.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: marzo, 2017. Aprobado: septiembre, 2017.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 52: 581-591. 2018.

ABSTRACT

The interest in biosurfactants for the removal of hydrophobic contaminants on contaminated soils is increasing. The objective of this study was to evaluate the decontamination process in sandy soils polluted with burned car engine oil, using a natural detergent, extracted from a residual stream from the corn milling industry named "corn steep liquor". The emulsifier and interactive capacity of the biosurfactant with the burnt oil was first evaluated. Then, discontinuous extraction experiments were carried out in batch by triplicate on a mixture of 5 g of sandy soil containing 50,000 ppm burned oil, using several formulated cleaner solutions with the biosurfactant, above and below its critical micelle concentration (CMC), using solid/liquid relations between 1/10 and 1/30 (w:v). Results show that the 1/20 solid/liquid ratio (w:v) was the most suitable for the washings. After 6 h in contact, the cleaning process showed good results. The high biodegradability of the biosurfactant extract and the relatively low treatment times allow us to suggest its use in *in-situ* decontamination processes of petroleum-based oils contaminated areas.

Key words: biosurfactant, burnt oil, corn steep liquor, sand.

INTRODUCTION

Mobilization and solubilization are the mechanisms to eliminate hydrophobic contaminants from soils (Edwards *et al.*, 1991; West and Harwell, 1992; Mulligan, 2005;

INTRODUCCIÓN

Los mecanismos para eliminar un contaminante hidrófobo del suelo son movilización y solubilización (Edwards *et al.*, 1991; West y Harwell, 1992; Mulligan, 2005; Vreysen y Maes, 2005). La movilización depende de la capacidad del tensioactivo de disminuir la tensión superficial y facilitar que la disolución de lavado arrastre el contaminante (Cameotra y Makkar, 2010). Las moléculas de tensioactivo reducen la tensión interfacial en el sistema aceite/agua y hacen que aumente el ángulo de contacto del contaminante con el suelo, se reducen las fuerzas capilares que los mantienen unidos y se facilita la eliminación del aceite (Moldes *et al.*, 2011). La solubilización tiene lugar por encima de la concentración micelar crítica (CMC), momento a partir del cual el tensioactivo forma micelas en el interior de las cuales queda retenido el contaminante, de modo que la cantidad de aceite eliminada aumentará con la concentración de tensioactivo. La solubilización depende tanto del tensioactivo como del grado de contaminación de la matriz sólida, y puede no ser significativo en el proceso de remediación cuando la contaminación es muy elevada (Abdul *et al.*, 1990; Urum y Pekdemir, 2004).

Una gran cantidad de residuos industriales, como los aceites sintéticos y combustibles, los aceites de cocina y metales pesados procedentes de envases metálicos encontrados en los residuos domésticos, son la causa principal de la contaminación del suelo, ríos y lagos, provocando la destrucción de hábitats en casos extremos (Solans y Gadea 2015, Reglamento (UE) N°1357/2014). Por ejemplo, la contaminación de suelos y aguas subterráneas causada en gasolineras por la naturaleza de los lubricantes, gasolinas o gasóleos tiene gran importancia debido a su magnitud y el impacto negativo que produce debe evaluarse con cuidado.

Dentro de estos residuos está el aceite quemado de motor, que por su peligrosidad para el medio ambiente, es uno de los principales residuos sometido a una estricta regulación (Solans y Gadea 2015, Reglamento (UE) N°1357/2014). La mayoría de los hidrocarburos causantes de la contaminación ambiental son muy insolubles en agua y generan uniones hidrofóbicas a determinadas superficies, como las rocas, por lo cual su eliminación es muy difícil, ya que los microorganismos que pueden degradarlos no

Vreysen and Maes, 2005). Mobilization depends on the surfactant's capacity to reduce surface tension and facilitate the washing solution to drag the contaminant (Cameotra and Makkar, 2010). Tensioactive molecules reduce the interfacial tension in oil/water systems and increase the contact angle of the contaminant with the soil, reducing capillary forces that kept them together, and facilitates oils elimination (Moldes *et al.*, 2011). Solubilization takes place above the critical micelle concentration (CMC). At these concentrations, surfactants form micelles, inside of which the contaminant is retained, so that the amount of removed oil will increase when surfactants are above their CMC. Solubilization depends both, on the surfactant and the degree of contamination of the solid matrix, and might not be significant in the remediation process when the pollutants concentration is very high (Abdul *et al.*, 1990; Urum and Pekdemir, 2004).

A lot of industrial waste, such as fuels and synthetic oils, kitchen oils and with heavy metals, from metal containers found in household waste, are the main source of pollution of soils, rivers and lakes, causing habitats destruction in extreme cases (Solans and Gadea 2015; Regulation (UE) No. 1357/2014). For example, soil and groundwater pollution at gas stations due to the nature of lubricants, petrol or diesel should be carefully evaluated because of its magnitude and the negative impact that produces.

Within this waste there is burnt engine oil, which by its impact on the environment, is one of the major residues that undergo strict regulations (Solans and Gadea 2015, Regulation (UE) No. 1357/2014). Most of the hydrocarbons causing pollution are water insoluble and generate hydrophobic unions to certain surfaces, such as rocks, for which their disposal is very difficult, since microorganisms that could degrade them cannot access them because they are not bioavailable. For this reason, bioremediation is trying to find microorganisms that produce biosurfactants substances favoring these hydrocarbons bioavailability (Banat *et al.*, 2000; Ortíz-Hernández *et al.*, 2001; Youssef *et al.*, 2007; Yañez-Ocampo *et al.*, 2009, 2011 and 2013; Vecino *et al.*, 2015).

Biosurfactants are amphiphilic compounds from microbial origin with high tensio-active properties that allow to reduce the environmental impact caused by different pollutants released to the

pueden acceder a ellos por no estar biodisponibles. Por esto, en el campo de la biorremediación se intenta encontrar microorganismos productores de sustancias biosurfactantes que favorezcan la biodisponibilidad de estos hidrocarburos (Banat *et al.*, 2000; Ortíz-Hernández *et al.*, 2001; Youssef *et al.*, 2007; Yañez-Ocampo *et al.*, 2009, 2011, 2013; Vecino *et al.*, 2015b).

Los biosurfactantes son compuestos anfílicos de origen microbiano con altas propiedades tensioactivas que permiten reducir el impacto ambiental causado por diversos residuos liberados al medio ambiente como los hidrocarburos (Moldes *et al.*, 2011). En comparación con los surfactantes producidos por síntesis química, los biosurfactantes son menos tóxicos que sus homólogos derivados del petróleo (Levison, 2009). Debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad, los biosurfactantes se estudian en varios campos industriales (Kourkoutas *et al.*, 2004; Banat *et al.*, 2010; Reis *et al.*, 2013): en la industria farmacéutica (Rodríguez *et al.*, 2004; Cameotra y Makkar, 2010), cosmética (Gharai-Fathabad, 2011; Vecino *et al.*, 2017), en el tratamiento de aguas residuales (Perez-Ameneiro *et al.*, 2015), así como en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos (Desai y Banat, 1997; Banat *et al.*, 2010; Damasceno *et al.*, 2012; Moldes *et al.*, 2011; 2013).

Vecino *et al.* (2014a, 2014b, 2014c, 2015a) evaluaron y patentaron los licores de lavado de maíz como fuente para obtener biosurfactantes de bajo coste y propusieron un proceso para la extracción y caracterización de estos compuestos tensioactivos que se pueden aplicar en distintos sectores industriales. La ventaja de estos biosurfactantes, comparados con sus homólogos, es que son económicamente competitivos con los surfactantes químicos porque su producción no requiere ningún proceso fermentativo controlado, y se producen de forma espontánea en un corriente residual procedente de la industria del maíz.

El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad del biosurfactante extraído de los licores de lavado de maíz, para la eliminación de aceite quemado de motor, sobre un suelo arenoso. Esta es la primera vez que se evalúa este biosurfactante como agente limpiador de aceite sobre suelo y se espera que los resultados permitan establecer las condiciones idóneas para su uso como surfactante natural, de origen renovable, en vertidos industriales.

environment as hydrocarbons (Moldes *et al.*, 2011). Compared to surfactants produced by chemical synthesis, biosurfactants are less toxic than their petroleum counterparts (Levison, 2009). Due to their biodegradability and biocompatibility, biosurfactants are studied in several industrial fields (Kourkoutas *et al.*, 2004; Banat *et al.*, 2010; Reis *et al.*, 2013): in the pharmaceutical industry (Rodríguez *et al.*, 2004; Cameotra and Makkar, 2010), cosmetics (Gharai-Fathabad, 2011; Vecino *et al.*, 2017), in waste water treatment (Perez-Ameneiro *et al.*, 2015), as well as in the bioremediation of soils contaminated with hydrocarbons (Desai y Banat, 1997; Banat *et al.*, 2010; Moldes *et al.*, 2011 and 2013; Damasceno *et al.*, 2012).

Vecino *et al.* (2014a, b and c and 2015a) evaluated and patented the corn steep liquors as a source of “low-cost” biosurfactants and proposed a method for the extraction and characterization of these surfactant compounds that could be applied in different industrial sectors. The advantage of these biosurfactants, compared with its chemical counterparts, is that they are economically competitive with chemical surfactants because their production does not require a controlled fermentation process and spontaneously occur in liquid residual from corn industry.

The objective of this study was to evaluate the biosurfactant extract, obtained from corn steep liquor, for the removal of burned motor oil from sandy soil. This is the first time that this biosurfactant is evaluated as a cleaning agent of oil on soil and it is expected that the results allow to establish the conditions for their use as natural surfactant of renewable origins on industrial discharges.

MATERIALS AND METHODS

Soil and contaminant

Sandy soil was obtained from a beach in the Galician coast, Northwestern Spain, which was mixed with car engine burned oil from a local automotive workshop (Vigo, Spain).

Biosurfactant extraction from corn steep liquors

Biosurfactant (BS) in the corn steep liquors (CSL) was extracted with chloroform in three stages (Vecino *et al.*, 2015): 1) a liquid-liquid extraction at 65 °C using a CSL/chloroform

MATERIALES Y MÉTODOS

Suelo y contaminante

El suelo arenoso se obtuvo de una playa de la Costa Gallega, del Noroeste de España, que se mezcló con aceite quemado de motor de coche de un taller automovilístico local (Vigo, España).

Extracción del biosurfactante a partir de los licores de lavado de maíz

El biosurfactante contenido en los licores de lavado de maíz (CSL) se extrajo con cloroformo en tres etapas (Vecino *et al.*, 2015): 1) una extracción líquido-líquido a 65 °C utilizando una relación CSL/cloroformo de 1/2 (v:v) durante 1 h; 2) luego, la mezcla permaneció 24 h en un embudo de decantación para permitir alcanzar el equilibrio, la separación de la fase acuosa y la fase orgánica que contiene el biosurfactante; 3) el cloroformo fue destilado y recuperado, y se obtuvo un extracto de biosurfactante concentrado que se diluyó en agua para obtener la disolución limpiadora.

Evaluación de la capacidad del biosurfactante para formar emulsiones con el aceite quemado de motor

La capacidad emulsionante del biosurfactante obtenido desde licores de lavado de maíz para formar emulsiones se calculó en función de dos variables, EV (% volumen de emulsión relativo) (ecuación 1) y ES (% estabilidad del biosurfactante para mantener la emulsión cuando se mezclan aceite con agua) (ecuación 2). Las variables que miden la capacidad emulsionante del biosurfactante (*EV* y *ES*) se registraron 30 d con las ecuaciones de Neufeld y Zajíc (1984) y Das *et al.* (1998). Para ello, una muestra de 2 mL de aceite quemado se puso en una disolución de BS a la CMC (200 mg L⁻¹), se agitó 2 min en un vortex, se estabilizó 72 h y se cuantificó el *EV* y el *ES*. El cálculo de *EV* se basa en el porcentaje de emulsión formada entre la fase oleosa y la fase acuosa, respecto al volumen total. Para ello se toman los valores de la altura de emulsión, de la altura total de ambas fases y la sección transversal de tubo (ecuación 1). *ES* es la relación entre *EV* a un tiempo determinado y *EV* a tiempo 0 (ecuación 2):

$$EV (\%) = \frac{\text{altura de la emulsión (mm)} \times \text{sección transversal del tubo (mm}^2\text{)}}{\text{volumen total de fases empleada (mm}^3\text{)}} \quad (1)$$

$$ES (\%) = \frac{EV \text{ a un tiempo } t}{EV \text{ a tiempo } 0} \times 100 \quad (2)$$

ratio of 1:2 (v:v) for 1 h, 2) the mixture remained 24 h in a separating funnel to allow its equilibrium, we obtained aqueous phase and the organic phase containing the biosurfactant, and 3) we obtained a concentrated biosurfactant in chloroform extract by distilling and after diluting in water to obtain the cleaning solution.

Evaluation of the biosurfactant capacity to form emulsions with burnt engine oil

The emulsifying ability of the biosurfactant obtained from corn steep liquors to form emulsions was calculated as a function of two variables, EV (relative emulsion volume, %) (Equation 1) and ES (biosurfactant stability, %, to maintain emulsion when mixed with oil and water) (Equation 2). Variables that measure the emulsifying ability of the biosurfactant (EV and ES) were assessed 30 d with the Neufeld and Zajíc (1984) and the Das *et al.* (1998) equations. For this purpose, a 2 mL sample of burned oil was dissolved in BS to the CMC (200 mg L⁻¹), stirred 2 min in a vortex, stabilized for 72 h and then quantified the EV and ES. The EV calculation is based on the percentage of emulsion formed between the oil phase and the aqueous phase, respect to the total volume. For it, height of emulsion and both phases total height values are taken, as well as the cross section of tube (equation 1). ES is the relationship between EV at a determinate time and EV at time zero (equation 2):

$$EV (\%) = \frac{\text{height of the emulsion (mm)} \times \text{the pipe cross section (mm}^2\text{)}}{\text{total volume of used phases (mm}^3\text{)}} \quad (1)$$

$$ES (\%) = \frac{EV \text{ at time } t}{EV \text{ at time } 0} \times 100 \quad (2)$$

Oil displacement test

The test of the oil displacement by the biosurfactant indicates its ability to solubilize oil. To perform this test, 20 mL of water were placed in a Petri dish, then, 40 μL of the engine burned oil were added and 80 μL of the biosurfactant dissolution were added over the oil, above the CMC. As a control, two other experiments were performed. On them, water or a sodium dodecyl sulphate solution (SDS) was added (detergent used for cleaning oil tanks, obtained by chemical synthesis) at its CMC (2365 mg L⁻¹). The cleaning solution that displaces the largest oil quantity over the water and shows a greater diameter of displacement will have greater capacity as a cleaning solution.

Test de desplazamiento de aceite

El test de desplazamiento de aceite por el biosurfactante indica su capacidad para solubilizar el aceite. Para realizar este test se depositaron 20 mL de agua en una placa Petri, se adicionaron 40 mL de aceite quemado de motor, y sobre el aceite se adicionaron 80 mL de disolución de biosurfactante por encima de la CMC. Además, como testigo se prepararon otros dos experimentos en los cuales se adicionó agua o una disolución de dodecil sulfato sódico (SDS) (detergente usado en la limpieza de tanques petrolíferos, obtenido por síntesis química) a su CMC (2365 mg L⁻¹). Aquella disolución limpiadora que logre desplazar en mayor medida el aceite sobre el agua y que muestre un mayor diámetro de desplazamiento tendrá mayor capacidad como disolución limpiadora.

Medida de la tensión superficial

La tensión superficial de la disolución de biosurfactante, así como de los testigos realizados con agua, antes y después del lavado de la arena, se midieron con un tensiómetro superficial (KRUSS K6, España) equipado con un anillo de platino 1.9 cm (método del anillo de Du Noüy). Las medidas se realizaron por triplicado a temperatura ambiente.

Pruebas de lavado del suelo contaminado a escala de laboratorio

Para estas pruebas se pesaron 5 g de suelo arenoso contaminado con aceite quemado de motor de coche con un contenido de aceite de 0.25 g (50,000 ppm) presente en este suelo. Los experimentos de lavado a escala de laboratorio se realizaron en discontinuo, en matraces Erlenmeyer de 250 mL, a temperatura ambiente en un agitador orbital a 150 rpm. La relación sólido / líquido establecida entre el suelo contaminado y las disoluciones limpiadoras fue entre 1:10 y 1:30 (p:v). Las disoluciones limpiadoras se prepararon con biosurfactante dos veces por debajo de la CMC (BS/2) o a la CMC (BS). El tiempo de limpieza se fijó en 6 h.

Tras el lavado de la arena se separó la disolución limpiadora mediante filtración, utilizando un embudo de placa porosa, cuantificando el aceite extraído en la disolución limpiadora mediante análisis gravimétrico y para ello se tomó 1 mL de la disolución limpiadora y permaneció 48 h en estufa a 100 °C.

La arena descontaminada y filtrada se sometió a un proceso de extracción utilizando acetona en un dispositivo Soxhlet (Nahita. Heating mantles. Mod 655. Navarra-España), para cuantificar el aceite que permaneció en la arena, el cual tiene que ser complementario al aceite extraído en las disoluciones limpiadoras.

Surface tension evaluation

The surface tension of the biosurfactant solution, as well as the water made control, were assessed before and after the sand washing with a surface tensiometer (KRUSS K6, Spain) equipped with a 1.9 cm platinum ring (Du Noüy ring method). The measurements were carried out by triplicate at room temperature.

Contaminated soil washing test at laboratory scale

For these tests, 5 g of sandy soil we weighed. These were contaminated with burnt car engine oil with 0.25 g (50,000 ppm) oil content. Laboratory scale washing experiments were performed in batch, in 250 mL Erlenmeyer flasks, at room temperature in an orbital shaker at 150 rpm. The solid/liquid ratio established between the contaminated soil and the cleaning solutions was between 1:10 and 1:30 (w:v). Cleaning solutions were prepared with the biosurfactant twice below the CMC (BS/2) or the CMC (BS). Cleaning time was set at 6 h.

After washing the sand, the cleaning solution was separated by filtration, using a porous plate funnel, and then quantifying the extracted oil in the cleaning solution by gravimetric analysis. For this, 1 mL cleaning solution sample remained 48 h in an oven at 100 °C.

The decontaminated and filtered sand then passed to an extraction process in a Soxhlet device using acetone (Nahita, Heating mantles, Mod 655. Navarra-Spain) to quantify the oil that remained in the sand, which must be complementary to the oil extracted in the cleaning solutions.

Process to extract remaining oil in sandy soil

For the extraction of the oil remaining in the sand from the Soxhlet, the treated sand was introduced into a cellulose cartridge, and acetone was placed inside a heating mantle at 65 °C (temperature higher than the acetone's boiling point, 56 °C), which allowed its evaporation. The Soxhlet device includes a condensation system that drags as it falls the remaining oil in the sand. This device worked for 1 h, then the Soxhlet cartridge was removed, and an acetone sample containing the residual oil from the sand was assessed in a double beam spectrophotometer at 328 nm (Jasco Mod. V-650, Spain). The relationship between the oil concentration in the acetone and the absorbance measured at 328 nm was linear (Figure 1), in this way the equation for oil concentration was obtained in relation to absorbance.

Proceso de extracción del aceite remanente en el suelo arenoso

Para la extracción del aceite remanente en la arena con el Soxhlet, la arena tratada se introdujo en un cartucho de celulosa, y la acetona se colocó dentro de una manta calefactora a 65 °C (temperatura mayor que la de ebullición de la acetona, de 56 °C), lo cual permitió su evaporación. El dispositivo Soxhlet incluye un sistema de condensación que permite pasar a la acetona de estado vapor a estado líquido, arrastrando en su caída al aceite remanente en la arena. Este dispositivo funcionó por 1 h, después se retiró el cartucho del Soxhlet, se tomó una muestra de la acetona que contenía el aceite residual en la arena y se midió a 328 nm en un espectrofotómetro de doble haz (Jasco Mod. V-650, España). La relación entre la concentración de aceite en la acetona y la absorbancia medida a 328 nm fue lineal (Figura 1), y así se obtuvo la ecuación de la concentración de aceite en relación con la absorbancia.

Cálculo de la eficacia del proceso de extracción

La eficacia de extracción (EE) se define de acuerdo con la ecuación (3) como el porcentaje del aceite eliminado de la arena:

$$EE = ((A_0 - A_1) / A_0) \times 100 \quad (3)$$

donde A_0 y A_1 representan los gramos iniciales y finales de aceite presente en la arena, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de la capacidad emulsionante y dispersante del biosurfactante sobre aceite quemado de motor

Tras el proceso de extracción se obtuvo un extracto biosurfactante con un rendimiento de 8 ± 0.5 g extracto kg^{-1} de CSL con 50 % en sólidos, aunque este rendimiento puede sufrir variaciones pequeñas entre lotes porque los licores de lavado de maíz son fermentados espontáneamente en condiciones no controladas, si se supone un residuo industrial.

El extracto obtenido se disolvió en agua por encima de su CMC (Figura 2), y CMC es la concentración de surfactante que puede reducir al máximo la tensión superficial del agua. A la CMC (200 mg L^{-1}) o por encima de esta, el biosurfactante puede mantener la tensión superficial del agua constante en valores cercanos a 40 mN m^{-1} , punto donde el

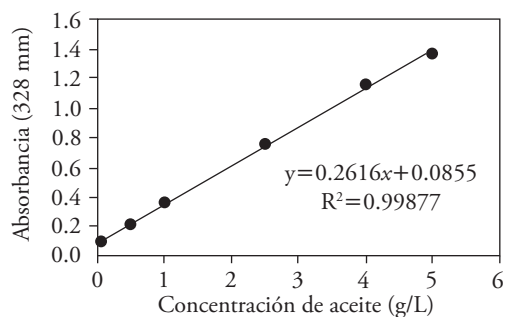


Figura 1. Recta de calibrado establecida para la cuantificación del aceite residual extraído con acetona mediante el Soxhlet.

Figure 1. Calibration line established for the quantification of residual oil extracted with acetone via Soxhlet.

Calculation of the extraction process efficiency

Extraction efficiency (EE) is defined according to equation 3 as the percentage of the oil removed from the sand:

$$EE = ((A_0 - A_1) / A_0) \times 100 \quad (3)$$

where A_0 and A_1 represent the initial and final grams of oil present in the sand, respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

Evaluation of the emulsifying and dispersing capacity of the biosurfactant on burnt engine oil

After the extraction process, a biosurfactant extract with a yield of 8 ± 0.5 g extract kg^{-1} of CSL with 50 % solids was obtained, although this yield may vary slightly between batches because the corn washing liquors are spontaneously fermented in uncontrolled conditions, if an industrial waste is assumed.

The extract was dissolved in water above its CMC (Figure 2). At the CMC (200 mg L^{-1}) or above it, the biosurfactant can keep the water surface tension constant at values close to 40 mN m^{-1} , this is the value where the biosurfactant begins to form micelles with the capacity to surround those molecules not soluble in water, which facilitates their mobilization and solubilization.

Once established the biosurfactant CMC the cleaning solution was prepared to CMC concentration



Figura 2. Aspecto de la disolución de biosurfactante extraído de los licores de lavado de maíz, solubilizado en agua.

Figure 2. Aspect of the biosurfactant dissolution extracted from corn steep liquors solubilized in water.

biosurfactante empieza a formar micelas con capacidad para rodear a aquellas moléculas no solubles en agua, lo que facilita su movilización y solubilización.

Una vez establecida la CMC del biosurfactante se preparó una disolución limpiadora con una concentración de biosurfactante a la CMC (BS) o a la mitad de la CMC (BS/2) y se evaluó su capacidad para estabilizar emulsiones aceite/agua. El biosurfactante a la CMC (BS) pudo emulsionar el aceite con el agua en su totalidad en comparación con el sistema agua/aceite en ausencia de biosurfactante (Figura 3). Esta emulsión fue estable durante más de un mes, periodo durante el cual se evaluó su estabilidad.

El biosurfactante obtenido de los licores de lavado de maíz dispersó el aceite y lo desplazó en mayor medida hacia los bordes de la placa, en comparación con el detergente de origen sintético, SDS, lo que indica una mayor capacidad del biosurfactante para extraer y solubilizar el aceite (Figura 4).

Pruebas de lavado del suelo arenoso contaminado con aceite quemado de motor de coche

La eficacia del proceso de extracción logrado con el biosurfactante y extraído desde los licores de lavado de maíz fue notablemente mayor que la alcanzada con agua como testigo, sobre todo cuando la disolución

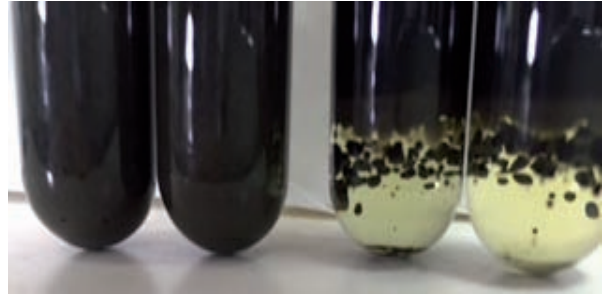


Figura 3. Sistema aceite/agua estabilizado y emulsionado con biosurfactante procedente de los licores de lavado de maíz (izquierda), comparado con un sistema aceite/agua sin biosurfactante (derecha).

Figure 3. Water/oil system stabilized and emulsified with a biosurfactant from corn steep liquors (left), compared to an oil/water system without biosurfactant (right).

(BS) or to half of the CMC (BS/2) and their ability to stabilize oil/water emulsions was assessed. The biosurfactant to the CMC (BS) was able to emulsify the oil with water as a whole, compared to the water/oil system in absence of the biosurfactant (Figure 3). This emulsion was stable for more than one month, period during which its stability was evaluated.

The biosurfactant from corn steep liquor scattered the oil and displaced it to a greater extent to the edges of the plate compared with the detergent of synthetic origin, SDS, indicating a greater capacity of the biosurfactant to extract and solubilize oil (Figure 4).



Figura 4. Desplazamiento del aceite quemado de motor en agua en presencia del biosurfactante (BS), extraído de los licores de lavado de maíz, y dodecil sulfato sódico (SDS), respecto a un control con agua.

Figure 4. Burnt oil motor displacement in water in presence of a biosurfactant (BS), extracted from corn steep liquor and dodecyl sulfate sodium (SDS), respect to a water control.

limpiadora se formuló con concentraciones de biosurfactante en torno a la CMC (Figura 5).

Concentraciones de biosurfactante alrededor de la CMC, definidas como BS, presentaron alrededor de 67 % de extracción de aceite, mientras que al reducir la concentración de biosurfactante a la mitad de su CMC, definidas como BS/2, el porcentaje de extracción de aceite fue 28 %. Aunque el volumen de la disolución limpiadora aumentó, los resultados alcanzados fueron similares a los obtenidos con la disolución limpiadora testigo consistente en agua.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio con BS son mejores que los reportados por Vreysen y Maes (2005) de 50 % y 20 % de extracción de aceite diésel usando el tensioactivo Tergitol NP-10. Moldes *et al.* (2011) usaron un biosurfactante producido por *Lactobacillus pentosus*, y eliminaron 58.6 % de octano después de 15 d de contacto entre el BS y el suelo contaminado.

Esto permite considerar que las causas de los peores resultados obtenidos por debajo de la CMC en nuestro estudio, podrían deberse a que en tales concentraciones el biosurfactante no forma micelas que rodeen a las moléculas de aceite, ni favorece la movilización y solubilización del aceite presente en el suelo arenoso.

En la Figura 6 se muestran los valores de tensión superficial alcanzados en las distintas disoluciones limpiadoras, tras el tratamiento de la arena contaminada. En los experimentos en los que se usaron 100 mL de disolución limpiadora la relación sólido/líquido fue 1:20 (p:v), mientras que con 150 mL dicha

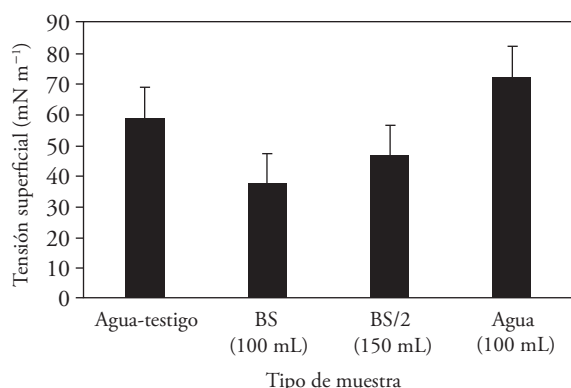


Figura 6. Comparación de la tensión superficial de las disoluciones limpiadoras utilizadas.

Figure 6. Surface tension comparison between the evaluated cleaning solutions.

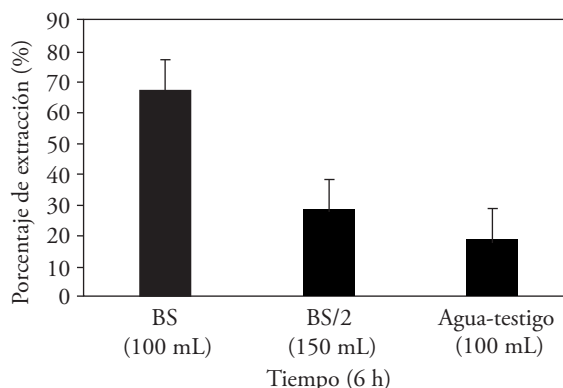


Figura 5. Porcentajes de extracción de aceite, alcanzados con el biosurfactante obtenido de los licores de lavado de maíz después de 6 h de tratamiento comparados con agua (testigo).

Figure 5. Oil extraction percentages reached with a biosurfactant obtained from corn steep liquors after 6 h of treatment compared with water (control).

Washing tests for sandy soils contaminated with burned car engine oil

The efficiency of the extraction process achieved with the biosurfactant extracted from corn steep liquor was significantly greater than that achieved with water as the control, especially when the cleaning solution was formulated with biosurfactant concentrations around the CMC (Figure 5).

Biosurfactant concentrations around the CMC, defined as BS, produced nearby 67 % of oil extraction, while BS/2 set the oil extraction percentage at 28 %, in these conditions although, the cleaning solution volume increased, the results were closer to those obtained with the cleaning solution consisting of the water control.

The results obtained in our study regard the BS are better than those reported by Vreysen and Maes (2005) of 50 % and 20 % extraction of diesel oil using Tergitol NP-10 surfactant. Moldes *et al.* (2011) used a biosurfactant produced by *Lactobacillus pentosus* and eliminated 58.6 % octane after 15 d of contact between the BS and contaminated soil.

This allows us to consider that the causes of the less satisfactory results below the CMC in our study could be due the low biosurfactant concentrations, which does not form micelles that surround oil molecules, or promotes mobilization and solubilization of the oil present in the sandy soil.

relación fue 1:30 (p:v). La tensión superficial menor (37 mN m^{-1}) se observó en la disolución limpiadora con la concentración mayor de biosurfactante (200 mg L^{-1}), pero la disolución limpiadora BS/2 con 100 mg L^{-1} de biosurfactante tiene una tensión superficial superior (46 mN m^{-1}), lo que explica su menor capacidad de limpieza en comparación con la disolución limpiadora BS, y la tensión superficial aproximada de la disolución limpiadora a base de agua (denominada agua testigo) fue 60 mN m^{-1} (Figura 6).

Moya-Ramírez *et al.* (2014) durante el tratamiento de un suelo arenoso con 10 g L^{-1} de un surfactante sintético (G600) demostraron que al aumentar la temperatura se alcanza mayor eficacia en el proceso de extracción. Estos autores observaron extracciones menores del 20 % a temperatura ambiente, y hasta casi 40 % cuando la temperatura aumentó hasta $65 \text{ }^\circ\text{C}$. El uso de temperaturas en torno a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ no hacen factible este proceso a nivel industrial, principalmente en procesos de extracción *in situ*, ya que el costo energético y de los equipos para dicho proceso sería muy elevado. En comparación con detergentes naturales Moya-Ramírez *et al.* (2014) usaron un biosurfactante producido por *B. subtilis* y obtuvieron mejores porcentajes de limpieza que los obtenidos con el surfactante sintético G600, aunque concentraciones mayores de biosurfactante causaron rendimientos menores. Pero la extracción alcanzada con el biosurfactante usado por dichos autores fue inferior al 40 %, para $45 \text{ }^\circ\text{C}$, y es menor al obtenido con el biosurfactante evaluado en nuestro estudio (67 %) a temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$).

CONCLUSIONES

El biosurfactante extraído de los licores de lavado de maíz pudo solubilizar el aceite quemado de motor en agua y desplazó al mismo en mayor medida que el SDS. Concentraciones de biosurfactante en torno a la CMC muestran buenas propiedades como agente limpiador de suelos arenosos contaminados. Por lo tanto, este detergente natural se podría usar en vertidos industriales, de carácter hidrofóbico, en sustitución de agentes limpiadores de origen no renovable.

AGRADECIMIENTOS

Guadalupe Bustos-Vázquez agradece el apoyo financiero otorgado por CONACyT en la Convocatoria 2015 del programa

Figure 6 shows the surface tension values recorded in the different cleaning solutions after the treatment of the contaminated sand. Experiments that used 100 mL cleaning solution had a solid/liquid ratio of 1:20 (w:v), while with 150 mL this ratio was of 1:30 (w:v). The lowest surface tension (37 mN m^{-1}) was observed in the cleaning solution with the highest biosurfactant concentration (200 mg L^{-1}), but the BS/2 cleaning solution with 100 mg L^{-1} biosurfactant has a higher surface tension (46 mN m^{-1}), which explains its lower cleaning capacity compared with the BS cleaning solution. The approximate surface tension of the water-based cleaning solution (water control) was 60 mN m^{-1} (Figure 6).

Moya-Ramírez *et al.* (2014) showed that, during the treatment of a sandy soil with 10 g L^{-1} of a synthetic surfactant (G600), the increase of temperature makes the extraction process more effective. These authors reported extraction rates under 20 % at room temperature, and up to almost 40 % when the temperature increased up to $65 \text{ }^\circ\text{C}$. The use of temperatures around $65 \text{ }^\circ\text{C}$ makes this process unviable for industrial scale, mainly in “*in situ*” extraction processes, since the energy cost and equipment for such a process would be high. Compared to natural detergents Moya-Ramírez *et al.* (2014) used a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* and obtained higher percentages than those obtained with G600 synthetic surfactant cleaning agent; although, higher biosurfactant concentrations caused lower yields. The extraction with biosurfactant used by these authors was less than 40 %, at $45 \text{ }^\circ\text{C}$, and was less than that obtained with the biosurfactant evaluated in our study (67 %) at room temperature ($25 \text{ }^\circ\text{C}$).

CONCLUSIONS

The biosurfactant extract obtained from corn steep liquor could solubilize engine burned oil in water and displaced it to a greater extent than the SDS. Biosurfactant concentrations around the CMC show good properties as contaminated sandy soil cleaning agent. Therefore, this natural detergent could be used on hydrophobic industrial discharges instead of cleaning agents from non-renewable sources.

—End of the English version—

-----*-----

de Estancias Sabáticas en el Extranjero para realizar este estudio. Además, se agradece la colaboración de X. Vecino con su contrato Juan de la Cierva (FJCI-2014-19732).

LITERATURA CITADA

- Abdul S., A., T. Gibson, and S. Kia. 1990. Contamination of soil and groundwater by automatic transmission fluid: Site description and problem assessment. *J. Hydrol.* 121: 133–153.
- Banat, I., R. Makkar, and S. Cameotra. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 495–508.
- Banat, I. M., A. Franzetti, I. Gandolfi, G. Bestetti, M. G. Martinotti, L. Fracchia, T. J. Smyth and R. Marchant. 2010. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87: 427–444.
- Cameotra, S. S., and R. S. Makkar. 2010. Biosurfactant enhanced bioremediation of hydrophobic pollutants. *Pure Appl. Chem.* 82: 97–116.
- Damasceno, F. R. C., M. C. Cammarota, and D. M. G. Freire. 2012. The combined use of a biosurfactant and an enzyme preparation to treat an effluent with a high fat content. *Colloids Surf., B.* 95: 241–246.
- Das, M., S. K. Das, and R. K. Mukherjee. 1998. Surface active properties of the culture filtrates of a *Micrococcus* species grown on n-alkenes and sugars. *Bioresour. Technol.* 63: 231–235.
- Desai, J., and I. Banat. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol.* 61: 47–64.
- Edwards D., A., R. G. Luthy, and L. Zhongbao. 1991. Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactant solutions. *Environ. Sci. Technol.* 25: 127–133.
- Gharaei-Fathabad, E. 2011. Biosurfactants in pharmaceutical industry: A mini-review. *Am. J. Drug Discov. Dev.* 1: 58–69.
- Kourkoutas, Y., and M. Banat, 2004. Biosurfactant production and application. In: Pandey, A. (ed). *Concise Encyclopedia of Bioresources Technology*. pp: 505–516.
- Levison, M. I. 2009. Surfactant production: present realities and future perspectives. In: Zoller, U., and P. Sosis (eds). *Handbook of Detergents, Part F*. Vol. 142. pp: 1–37.
- Moldes, A. B., R. Paradelo, D. Rubinos, R. Devesa-Rey, J. M. Cruz, and M. T. Barral. 2011. *Ex Situ* treatment of hydrocarbon-contaminated soil using biosurfactants from *Lactobacillus pentosus*. *J. Agric. Food Chem.* 59: 9443–9447.
- Moldes, A. B., R. Paradelo, X. Vecino, J. M. Cruz, E. Gudiña, L. Rodrigues, J. A. Teixeira, J. M. Domínguez, and M. T. Barral. 2013. Partial characterization of biosurfactant from *Lactobacillus pentosus* and comparison with sodium dodecyl sulphate for the bioremediation of hydrocarbon contaminated soil. *BioMed Research International*. Vol. 2013, Article ID 961842, 6 pages doi:10.1155/2013/961842.
- Moya-Ramírez, I., M. García-Román, M. Henares-Jiménez, E. Jurado-Alameda, y D. Altmajer-Vaz. 2014. Remediación de suelos contaminados con aceite de motor mediante tensioactivos altamente biodegradables. *Av. Cien. Ing.* 5: 21–29
- Mulligan N., C. 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollut.* 133: 183–198.
- Neufeld, R. J. and J. E. Zajic. 1984. The surface activity of *Acinetobacter calcoaceticus* sp. 2CA2. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 1108–1113.
- Ortiz-Hernández, L., M. Monterrosas-Brisson, G. Yañez-Ocampo, and E. Sánchez-Salinas. 2001. Biodegradation of methyl-parathion by bacteria isolated of agricultural soil. *Rev. Int. Contam. Amb.* 17: 147–155.
- Perez-Ameneiro, M., X. Vecino, J. M. Cruz, and A. B. Moldes. 2015. Wastewater treatment enhancement by applying a lipopeptide biosurfactant to a lignocellulosic biocomposite. *Carbohydrate Polymers* 131: 186–196.
- Reglamento (UE) N°1357/2014 de la comisión de 18 de diciembre de 2014. *Diario oficial de la Unión Europea*. L365:89-96.
- Reis, R. S., G. J. Pacheco, A. G. Pereira, and D. M. G. Freire. 2013. Biosurfactant: Production and Applications. In: Chamy, R., and F. Rosenkranz (eds). *Biodegradation Life of Science*. Chapter 2. pp: 31–61.
- Rodrigues, L., H. Van der Mei, J. Teixeira, and R. Oliveira. 2004. Influence of biosurfactants from probiotic bacteria on formation of biofilms on voice prosthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 4408–4410.
- Solans, X., y E. Gadea. 2015. Gestión de residuos: clasificación y tratamiento: Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo (INSHT). *Notas Técnicas de Prevención*. 1-8.
- Urum, K., and T. Pekdemir. 2004. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. *Chemosphere* 57: 1139–1150.
- Vecino, X., L. Barbosa-Pereira, R. Devesa-Rey, J.M. Cruz, and A.B. Moldes. 2014a. Study of the surfactant properties of aqueous stream from the corn milling industry. *J. Agric. Food Chem.* 62: 5451–5457.
- Vecino-Bello, X., R. Devesa-Rey, J. M. Cruz-Freire, y A.B. Moldes-Menduiña, 2014b. Aplicación de licores de lavado de maíz (“corn steep liquor”) como surfactante. ES 2.424.399 (CI. B09C1/00 (2006.01)), 13 Enero 2014. Solicitud 201.200.330, 27 Marzo 2012. 9 p.
- Vecino-Bello, X., R. Devesa-Rey, J. M. Cruz-Freire, y A. B. Moldes-Menduiña. 2014c. Procedimiento de separación de los surfactantes presentes de licores de lavado de maíz y usos. ES 2.435.324 (CI. B01F17/00, C02F1/26, C09K3/32, B09C1/00, A23L1/035, A61K8/97, A61K36/899, C02F103/26, C02F103/32 (2006.01)), 14 Abril 2014. Solicitud 201.100.649, 18 Junio 2012. 9 p.
- Vecino, X., L. Barbosa-Pereira, R. Devesa-Rey, J. M. Cruz, and A. B. Moldes. 2015a. Optimization of liquid-liquid extraction of biosurfactants from corn steep liquor. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 38: 1629–1637.
- Vecino, X., L. Rodríguez-López, J. M. Cruz, and A. B. Moldes. 2015b. Sewage sludge polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) decontamination technique based on the utilization of a lipopeptide biosurfactant extracted from corn steep liquor. *J. Agric. Food Chem.* 63: 7143–7150.
- Vecino, X., J. M. Cruz, A. B. Moldes, and L. R. Rodrigues. 2017. Biosurfactants in cosmetic formulations: trends and challenges. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2017, DOI: 10.1080/07388551.2016.1269053.
- Vreysen, S., and A. Maes. 2005. Remediation of a diesel contaminated, sandy-loam soil using low concentrated surfactant solutions. *J. Soils Sediments.* 5: 240–244.

- West, C. C., and J. H. Harwell. 1992. Surfactants and subsurface remediation. *Environ. Sci. Technol.* 26: 2324–2330.
- Yañez-Ocampo, G., E. Sanchez-Salinas, G. Jimenez-Tobon, M. Penninckx, and M. L. Ortiz-Hernandez. 2009. Removal of two organophosphate pesticides by a bacterial consortium immobilized in alginate or tezontle. *J. Haz. Mat.* 168: 1554–1561.
- Yañez-Ocampo, G., E. Sanchez-Salinas, and M. L. Ortiz-Hernandez. 2011. Removal of methyl parathion and tetrachlorvinphos by a bacterial consortium immobilized on tezontle- packed up-flow reactor. *Biodegradation* 22: 1203–1213.
- Yañez-Ocampo, G., y A. Wong-Villarreal. 2013. Biosurfactantes microbianos, producción potencial con residuos agroindustriales de Chiapas. *BioTecnología*. 17: 12–28.
- Youssef, N., D. Simpson, K. Duncan, M. McInerney, M. Folmsbee, T. Fincher, and R. Knapp. 2007. In situ biosurfactant production by *Bacillus* strains injected into a limestone petroleum reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 1239–1247.