

# REMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON ACEITE DE MOTOR MEDIANTE TENSIOACTIVOS ALTAMENTE BIODEGRADABLES

## REMEDIATION OF SOILS CONTAMINATED WITH MOTOR OIL BY HIGHLY BIODEGRADABLE SURFACTANTS

**Ignacio Moya-Ramírez<sup>1</sup>, Miguel García-Román<sup>1\*</sup>, María Henares-Jiménez<sup>1</sup>,  
Encarnación Jurado-Alameda<sup>1</sup>, Deisi Altmajer-Vaz<sup>1</sup>**

(1) Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, Departamento de Ingeniería Química,  
Campus Fuentenueva s/n, 18071 Granada – España

\*autor de contacto (e-mail: mgroman@ugr.es)

*Recibido: 30/10/2013 - Evaluado: 24/12/2013 - Aceptado: 21/01/2014*

### RESUMEN

En el presente trabajo se ha estudiado el proceso de remediación de un suelo arenoso contaminado con aceite de motor, empleando dos sistemas de lavado, uno discontinuo y otro continuo. Además se evaluó la capacidad de tres surfactantes altamente biodegradables, dos sintéticos (Glucopon 600 y Findet 1214N/23) y un biosurfactante producido por *Bacillus subtilis*, para facilitar la eliminación del contaminante. Los resultados obtenidos con el sistema continuo fueron mejores en todos los casos a los del discontinuo, incluso con agua destilada como solución de lavado. Tanto la incorporación de los tensioactivos como el aumento de la temperatura incrementaron significativamente la remoción del contaminante en ensayos realizados con el sistema discontinuo, destacando los buenos resultados obtenidos con el biosurfactante a concentraciones próximas a la CMC. En el sistema continuo la concentración de tensioactivo no resultó tan determinante para la eliminación del contaminante, al menos por debajo de la CMC.

### ABSTRACT

The remediation of a sandy soil contaminated with motor oil was studied by applying two different washing procedures: one discontinuous and the other continuous. In addition the capacity of three highly biodegradable surfactants, two synthetic (Glucopon 600 and Findet 1214N/23) and a biosurfactant from *Bacillus subtilis*, to enhance oil removal was tested. The results obtained with the continuous procedure were much better than those achieved with the discontinuous one, even in experiments conducted with distilled water. Both the addition of surfactants and the rise in temperature significantly increased the removal of the pollutant in experiments conducted with the discontinuous procedure, but the biosurfactant showed a higher capacity for soil remediation than the synthetic surfactants at concentrations close to its CMC. Conversely, when the continuous method was used, surfactant concentration seems to have a lower effect on motor oil removal, at least below the CMC.

Palabras clave: biosurfactantes; remediación; lavado de suelos; aceite de motor

Keywords: biosurfactants; remediation; soil washing; motor oil

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe una gran preocupación por la contaminación del medio ambiente causada por la actividad humana. De entre los contaminantes de origen antrópico, los hidrocarburos, de carácter hidrófobo y escasa o nula solubilidad en agua, son particularmente difíciles de eliminar, requiriendo para ello de agentes externos que incrementen su miscibilidad en agua. Los surfactantes, gracias a su capacidad para reducir la tensión interfacial, ayudan a eliminar y dispersar dichos contaminantes, por lo que resultan imprescindibles para la remediación de zonas contaminadas con hidrocarburos.

Si bien los primeros surfactantes utilizados (los jabones) eran de origen renovable y biodegradables, posteriormente se introdujeron los derivados del petróleo, algunos de los cuales tienden a acumularse en el medio ambiente (Crescenzi *et al.*, 1996; Field *et al.*, 1992). Es por ello que ciertos surfactantes pueden resultar perjudiciales desde el punto de vista ambiental, y por tanto inadecuados para la remediación de suelos. Desde este punto de vista los surfactantes sintéticos de origen renovable y altamente biodegradables (como son los alquilglucósidos y los alcoholes grasos etoxilados) y los biosurfactantes sí resultan adecuados para este propósito.

Los biosurfactantes, producidos de forma natural por microorganismos (fundamentalmente bacterias) y por plantas, constituyen un grupo muy variado de sustancias, que se clasifican como glicolípidos, lipopéptidos, fosfolípidos, ácidos grasos y polímeros, siendo la mayoría de ellos aniónicos o no iónicos (Mulligan *et al.*, 2001; Nitschke & Costa, 2007). Poseen una elevada compatibilidad ambiental y son particularmente estables y efectivos a pH, temperatura y salinidad extremos (de Gusmão *et al.*, 2010). En la actualidad los biosurfactantes encuentran aplicación en la recuperación mejorada de petróleo, la remediación de ambientes contaminados, así como en la industria alimentaria y farmacéutica, donde podrían acabar sustituyendo a los tensioactivos sintéticos (Muthusamy *et al.*, 2008). Su gran compatibilidad ambiental y excelentes propiedades tensioactivas convierten a los biosurfactantes en una excelente opción para la remediación de suelos contaminados por hidrocarburos o metales pesados, y como tal su aplicación con este fin ha sido estudiada por diferentes autores (Singh & Cameotra, 2013; Kobayashi *et al.*, 2012; Pacwa-Plóciniczak *et al.*, 2011; Santa Ana *et al.*, 2007).

Sin embargo, los inconvenientes del uso de biosurfactantes radican en su elevado coste de producción, que limita a su empleo a aplicaciones de alto valor añadido. Una de las posibles opciones para reducir dicho coste consiste en el empleo como sustratos de materias primas residuales, como pueden ser los subproductos de la industria alimentaria (Pandey *et al.*, 2000). Por otro lado, el uso del biosurfactante crudo, es decir, sin separar del medio de fermentación, siempre que sea aceptable en la aplicación pretendida (como es el caso de la remediación de suelos), contribuye también a reducir considerablemente el coste de producción, al eliminar la etapa de separación.

En el presente trabajo se han evaluado dos procedimientos a escala de laboratorio, uno discontinuo y otro continuo, para la remediación de suelos arenosos contaminados con hidrocarburo. Además se han empleado dichos procedimientos para evaluar la capacidad de remediación de dos surfactantes sintéticos de origen renovable y altamente biodegradables y de un biosurfactante producido por *Bacillus subtilis*.

## MATERIALES Y METODOS

### Reactivos y Materiales

En los ensayos de remediación se emplearon dos tensioactivos sintéticos y un biosurfactante. Los dos tensioactivos sintéticos fueron el Glucopon 600 (G600), un alquilpoliglucósido, y el Findet 1214N/23 (F1214N/23), un alcohol graso etoxilado, suministrados por Sigma (Missouri, EE. UU.) y Henkel KgaA (Düsseldorf, Alemania) respectivamente, y cuyas principales características se detallan en la Tabla 1. El biosurfactante utilizado fue obtenido mediante fermentación con *Bacillus subtilis* y presenta una concentración

micelar crítica (CMC) de 40 mg/L. Mayores informaciones acerca de la producción y caracterización de dicho biosurfactante se encuentran en el trabajo de Altmajer-Vaz *et al.* (2012).

Tabla 1: Propiedades del G600 y el F1214N/23 (R-longitud de la cadena alquílica; DP-grado de polimerización; OE-moles de óxido de etileno; HLB-balance hidrófilo-lipófilo)

	R	DP/OE	PM medio (g/mol)	HLB	% Humedad	CMC (mg/L)
G600	C12-C14	1.59	386	12.7	46.6	56.3
F1214N/23	C12-C14	10.79	629	14.4	96.7	20.2

Como modelo de un suelo arenoso se utilizó arena de mar lavada suministrada por Panreac (Barcelona, España), cuyo tamaño de grano varía entre 0.25-0.30 mm.

Para simular la contaminación del suelo con hidrocarburo se escogió como agente contaminante un aceite lubricante comercial de marca REPSOL 50501 TDI 5W40, que fue adquirido en un comercio local. Otros reactivos utilizados fueron i-octano (calidad PRS) y Sudan III, ambos suministrados por Panreac (Barcelona, España).

#### Preparación de la muestra de suelo contaminada

Con objeto de facilitar la posterior determinación del aceite lubricante se añadió al mismo una pequeña cantidad (0.064% w/w) del colorante soluble en grasa Sudán III. Seguidamente se obtuvo una recta patrón preparando diluciones del aceite coloreado en i-octano y midiendo su absorbancia a 300 nm (espectrofotómetro Cary Bio 100 de la casa Agilent, Colorado, EE.UU.).

El aceite coloreado se empleó para ensuciar la arena utilizada como modelo del suelo, para lo cual se mezclaron 5 partes de arena con 1 de aceite (en peso), se homogeneizó la mezcla por agitación manual y se dejó reposar durante 24 horas sobre un papel de filtro, de forma que se drenara el exceso de aceite. Una vez preparado cada lote de arena contaminada se determinó la cantidad de aceite embebida en la misma. Para ello se lavó la arena con i-octano, y se determinó espectrofotométricamente la concentración de aceite en dicho disolvente.

#### Ensayos de remediación discontinuos

Se realizaron ensayos a 25, 45 y 65°C con concentraciones de G600 o biosurfactante de 0.02, 0.04 y 0.06 g/L. La arena contaminada (5 g) y la disolución de lavado (50 mL) se pusieron en contacto en matraces Erlenmeyer de 100 mL dispuestos a su vez en un agitador orbital (Unimex 1010 de la casa Heidolph, Schwabach, Alemania). La agitación se mantuvo durante 24 h a 200 rpm y temperatura controlada. Al finalizar el ensayo se extrajo cuidadosamente el sobrenadante para evitar que el aceite que se encuentra en la superficie del líquido se depositara de nuevo sobre la arena. Posteriormente se retiró el resto de la disolución de lavado simplemente invirtiendo el matraz y dejando drenar el líquido. Dado que las partículas de arena se encuentran ligadas por el aceite (la agitación empleada durante el ensayo no consigue dispersarlas), es posible drenar el resto de la disolución sin perder partículas de arena. Finalmente, los matraces con la arena tratada se colocaron en una estufa a 65°C durante 24 h para eliminar los restos de humedad. El aceite retenido en la arena ya seca se extrajo con i-octano y a continuación se procedió a su determinación espectrofotométrica.

#### Ensayos de remediación continuos

En los ensayos continuos se utilizaron G600 y F1214N/23 a concentraciones comprendidas entre 0.01 y 0.4 g/L y en todos los casos se trabajó a 25°C. Un esquema del dispositivo experimental se muestra en la Figura 1. Al principio del ensayo la arena contaminada (10 g) se coloca en la columna (4) y la disolución de lavado (500 mL)

en el tanque de alimentación (2) desde el cual se transfiere mediante una bomba peristáltica (3) a la columna (4) en sentido descendente con un caudal de 20 L/h. La arena se retiene en la columna gracias a un disco de vidrio poroso situado en su base, mientras que la disolución de lavado fluye a través de la arena, que queda completamente inundada por ésta. Una vez finalizado el proceso se toma una muestra de arena de 1 g y se seca durante 24 h a 65°C antes de proceder a la determinación del aceite retenido en la misma, para lo que se siguió el mismo procedimiento que en los ensayos discontinuos.

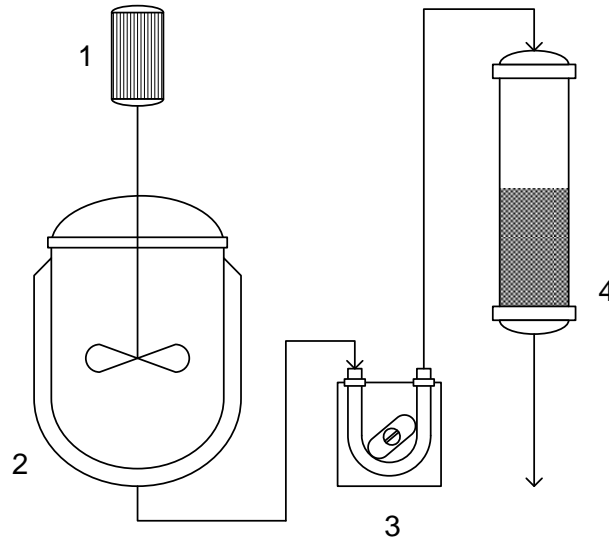


Fig. 1: Esquema del dispositivo experimental empleado en los experimentos de remediación en continuo: 1-agitador de palas, 2-tanque de alimentación de disolución de lavado, 3-bomba peristáltica y 4-columna de lavado.

### Cálculo de la eficacia de remediación

Se define la eficacia de remediación (ER) de acuerdo con la ecuación (1) como el porcentaje del aceite inicialmente presente en la arena que es eliminado durante el ensayo de remediación.

$$ER = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

Donde  $A_0$  y  $A_1$  representan las razones g de aceite / g de arena antes y después del ensayo de remediación respectivamente.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Ensayos discontinuos

En los ensayos discontinuos se estudiaron 2 factores, concentración de G600 y temperatura, mediante un diseño factorial completo con 5 y 3 niveles para cada factor respectivamente. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, lo que determina un total de 45 ensayos, cuyos resultados se muestran en la Figura 2.

El análisis de la varianza (ANOVA de dos factores) aplicado a los resultados obtenidos indica que tanto la concentración de tensioactivo como la temperatura, así como la interacción entre ambos, influyen significativamente en la eficacia de remediación (p-valor de  $2.42 \cdot 10^{-15}$ ,  $4.63 \cdot 10^{-6}$  y  $4.05 \cdot 10^{-7}$ , para concentración, temperatura y su interacción, respectivamente). A pesar de que al resultar significativa la interacción entre

temperatura y concentración, la aplicación de un test de comparación entre grupos sería cuestionable, la simple inspección visual de los resultados mostrados en la Figura 2 pone en evidencia que para concentraciones de tensioactivo comprendidas entre 0.02 y 0.06 g/L, es decir, alrededor de la CMC, la temperatura y la concentración de G600 apenas influyen en la eficacia de remediación. Sin embargo, cuando se utilizan disoluciones de G600 de 10 g/L, concentración equivalente a 250 veces su CMC, se observa un considerable aumento de la detergencia comparada con la obtenida a concentraciones inferiores y se hace más evidente el incremento de la misma con la temperatura.

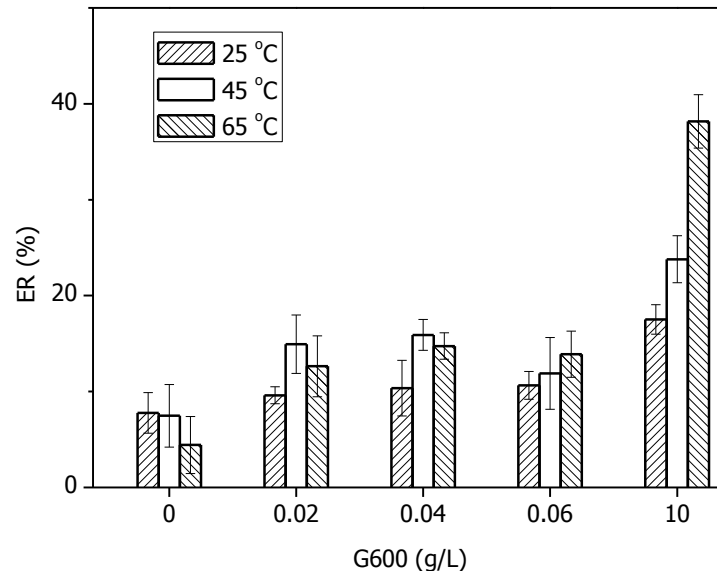


Fig. 2: Eficacia de remediación (ER) obtenida en ensayos discontinuos realizados con disoluciones de G600 de diferente concentración y a distintas temperaturas. Se incluyen los resultados de un ensayo control realizado con agua destilada.

De acuerdo con Mulligan *et al.* (2001) existen dos mecanismos implicados en la eliminación de un contaminante de naturaleza hidrofóbica del suelo: movilización y solubilización. La movilización depende de la capacidad del tensioactivo de disminuir la tensión superficial (West & Harwell, 1992), facilitando de esta manera que la disolución de lavado arrastre el contaminante. 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, reduciéndose las fuerzas capilares que los mantienen unidos y facilitándose la eliminación del aceite. Por otro lado, la solubilización tiene lugar por encima de la CMC, momento a partir del cual el tensioactivo forma micelas, en el interior de las cuales queda retenido el contaminante (Vreysen & Maes, 2005), de modo que la cantidad de aceite eliminada aumentará con la concentración de tensioactivo (Edwards *et al.*, 1991). La solubilización depende tanto del tensioactivo como de la suciedad empleada, pudiendo no ser significativa en el proceso de remediación (Abdul *et al.*, 1990; Urum & Pekdemir, 2004).

Los resultados de lavado en discontinuo con G600 sugieren que el mecanismo predominante para la remoción del contaminante es la solubilización, desempeñando la movilización un papel poco relevante. De esta forma, sólo cuando se alcanzan concentraciones de tensioactivo muy superiores a la CMC, y la solubilización de la fase grasa comienza a ser apreciable, es cuando se produce un incremento notable en la eficacia de remediación (ver Figura 2). La prevalencia del mecanismo de solubilización fue también observada por Singh & Cameotra (2013) y Kobayashi *et al.* (2012) en ensayos discontinuos de lavado de suelos contaminados con diferentes hidrocarburos.

Por otro lado se realizaron también ensayos de remediación discontinuos con un biosurfactante de *Bacillus subtilis* (Altmajer-Vaz *et al.*, 2012) a concentraciones del orden de su CMC (0.02 - 0.06 g/L), y a 45°C. En la

Figura 3 se comparan los resultados obtenidos con los del G600 en las mismas condiciones. Puede apreciarse que el biosurfactante permite alcanzar eficacias de remediación significativamente superiores a las del G600. Urum *et al.* (2006), obtuvieron resultados similares en un dispositivo de lavado discontinuo utilizando otro tipo de biosurfactante (rhamnolípidos).

En cualquier caso la eficacia de remediación obtenida en los ensayos discontinuos fue siempre moderada, no superando en ningún caso el 50%, a pesar de la elevada cantidad de surfactante empleada. Por ello se decidió cambiar el dispositivo empleado en los ensayos de remediación de forma que permitiera el flujo continuo de la solución de tensioactivo a través de la arena contaminada.

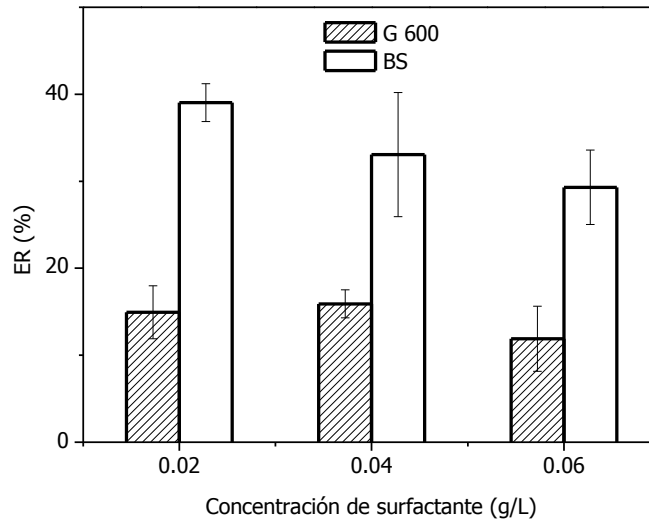


Fig. 3: Comparación de los resultados obtenidos en ensayos de remediación discontinuos a 45°C utilizando el tensioactivo sintético G600 y el biosurfactante de *Bacillus subtilis* a concentraciones próximas a la CMC.

### Ensayos continuos

La circulación de la solución de surfactante a través de la arena consigue mejorar significativamente la remoción del contaminante, lo que se pone de manifiesto en los datos mostrados en la Tabla 2, donde se comparan los resultados de ensayos realizados con agua destilada en el sistema continuo con los de ensayos en discontinuo con soluciones de G600 altamente concentradas (máxima eficacia de remediación alcanzada en dicho sistema). Un ANOVA de dos factores realizado sobre dichos datos indica que tanto el sistema de lavado utilizado (continuo o discontinuo) como la temperatura tienen un efecto significativo sobre la eliminación del contaminante.

Tabla 2: Comparación de la eficacia de remediación obtenida en ensayos discontinuos y continuos a distintas temperaturas.

Temperatura (°C)	Eficacia de Remediación (%)	
	Lavado discontinuo (G600, 10 g/L)	Lavado continuo (agua destilada)
25	17.52	56.67
45	23.79	59.00
65	38.17	74.78

Cuando se usaron soluciones de tensioactivo (F1214N/23 y G600) la eficacia de remediación mejora respecto del ensayo control, si bien dicha mejora es sólo significativa en el caso del G600 y para concentraciones de 0.1 y 0.4 g/L (Figura 4), es decir superiores a la CMC. Este resultado sugiere que la mayor eficacia de remediación observada en los ensayos en continuo se debe en gran parte al arrastre del hidrocarburo por el flujo de la solución de lavado a través de la arena contaminada y a su posterior solubilización, no pudiendo apreciarse en nuestro estudio una aportación significativa del mecanismo de movilización (debido a la reducción de la tensión interfacial), que en cualquier caso no puede descartarse. En otras palabras, la adición de los tensioactivos sólo mejoró significativamente la remoción del contaminante en el caso del G600 y a concentraciones del mismo superiores a la CMC, es decir, cuando el efecto de solubilización comienza a ganar importancia. Urum y Pekdemir (2004), observaron también que el agua era tan eficaz como algunos surfactantes para la eliminación de petróleo de suelos contaminados, mientras que Deshpande *et al.* (1999) sí que consiguieron apreciar tanto el efecto de movilización (a concentraciones de tensioactivo inferiores a la CMC) como el de solubilización (a concentraciones superiores a la CMC) en su estudio de la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos con ocho surfactantes diferentes.

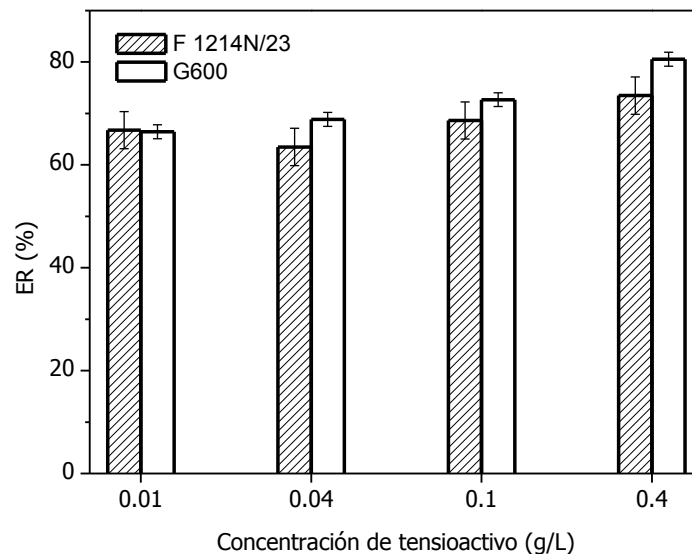


Fig. 4: Eficacia de remediación obtenida mediante ensayos en continuo con los tensioactivos sintéticos G600 y F1214N/23 a 25°C.

Por último se procedió a estudiar la posible adsorción de los tensioactivos en el suelo ya que ésta podría afectar negativamente a su capacidad de remediación, al disminuir la concentración efectiva de los mismos, además de no ser deseable por sus posibles implicaciones medioambientales. El grado de adsorción de cada tensioactivo dependerá de su estructura y de la del suelo (Paria, 2008; West & Harwell, 1992). En nuestro caso se realizaron medidas de la tensión superficial de disoluciones de los tensioactivos G600 y F1214N/23 tras 24 horas de contacto con la arena, comprobándose que ésta no disminuye respecto a su valor inicial (datos no mostrados), lo que descarta que la adsorción sea significativa.

## CONCLUSIONES

El trabajo realizado demuestra claramente la superioridad del sistema de remediación continuo respecto del discontinuo, lo que en gran medida se debe al efecto de arrastre del contaminante debido al flujo de la solución de lavado a través de la arena. En estas condiciones no fue posible apreciar en nuestro estudio la movilización del hidrocarburo provocada por la disminución de la tensión interfacial a concentraciones de tensioactivo inferiores a la CMC. No obstante sí que se observó una mejora significativa en la eficacia de remediación a

concentraciones de tensioactivo superiores a la CMC, tanto en los ensayos en discontinuo como en continuo, que se atribuye a la solubilización del contaminante hidrofóbico en las micelas de surfactante.

Por último, destacar los prometedores resultados obtenidos con el biosurfactante de *Bacillus subtilis* en los ensayos de remediación discontinuos, mejores a igualdad de condiciones que los alcanzados con el tensioactivo G600.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Gobierno Regional Andaluz (Junta de Andalucía) el apoyo concedido para esta investigación (Proyecto de Excelencia P10-TEP-6550 y grupos RNM-332 y TEP-212). I.M.R. también agradece a este organismo la beca predoctoral concedida en el marco del citado proyecto.

## REFERENCIAS

1. Abdul, A.S., Gibson, T.L. & Rai, D.N. (1990). Selection of Surfactants for the Removal of Petroleum Products from Shallow Sandy Aquifers. *Ground Water*, 28, 920-926.
2. Altmajer-Vaz, D., Gudiña, E.J., Jurado Alameda, E., Teixeira, J.A. & Rodrigues, L.R. (2012). Performance of a biosurfactant produced by a *Bacillus subtilis* strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants. *Colloids Surf., B*, 89, 167-174.
3. Crescenzi, C., Di Corcia, A., Marchiori, E., Samperi, R. & Marcomini, A. (1996). Simultaneous determination of alkylbenzenesulfonates and dialkyltetralinsulfonates in water by liquid chromatography. *Water Res.*, 30, 722-730.
4. De Gusmão, C.A.B., Rufino, R.D. & Sarubbo, L.A. (2010). Laboratory production and characterization of a new biosurfactant from *Candida glabrata* UCP1002 cultivated in vegetable fat waste applied to the removal of hydrophobic contaminant. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 1683-1692.
5. Deshpande, S., Shiau, B.J., Wade, D., Sabatini, D.A. & Harwell, J.H. (1999). Surfactant selection for enhancing ex situ soil washing. *Water Res.*, 33, 351-360.
6. Edwards, D.A., Luthy, R.G. & Liu, Z. (1991). Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactant solutions. *Environmental Sci. Technol.*, 25, 127-133.
7. Field, J.A., Leenheer, J.A., Thorn, K.A., Barber II, L.B., Rostad, C., Macalady, D.L. *et al.* (1992). Identification of persistent anionic surfactant-derived chemicals in sewage effluent and groundwater. *J. Contam. Hydrol.*, 9, 55-78.
8. Kobayashi, T., Kaminaga, H., Navarro, R.R., & Iimura, Y. (2012). Application of aqueous saponin on the remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons-contaminated soil. *J. Environ. Sci. Health., Part A*, 47, 1138-1145.
9. Mulligan, C., Yong, R. & Gibbs, B. (2001). Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: A review. *Eng. Geol.*, 60, 371-380.
10. Muthusamy, K., Gopalakrishnan, S., Ravi, T.K. & Sivachidambaram, P. (2008). Biosurfactants: Properties, commercial production and application. *Curr. Sci.* 94, 736-747.
11. Nitschke, M. & Costa, S.G.V.A.O. (2007). Biosurfactants in food industry. *Trends Food Sci. Technol.* 18, 252-259.



12. Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G.A., Piotrowska-Seget, Z. & Cameotra, S.S. (2011). Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. *Int. J. Mol. Sci.*, *12*, 633-654.
13. Pandey, A., Soccol, C.R. & Mitchell, D. (2000). New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochem.*, *35*, 1153-1169.
14. Paria, S. (2008). Surfactant-enhanced remediation of organic contaminated soil and water. *Adv. Colloid Interface Sci.*, *138*, 24-58.
15. Santa Ana, L.M., Soriano, A.U., Gomes, A.C., Menezes, E.P., Gutarra, M.L.E., Freire, D.M.G. *et al.* (2007). Use of biosurfactant in the removal of oil from contaminated sandy oil. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, *82*, 687-691.
16. Singh, A.K. & Cameotra, S. (2013). Efficiency of lipopeptide biosurfactants in removal of petroleum hydrocarbons and heavy metals from contaminated soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, *20*, 7367-7376.
17. Urum, K., Grigson, S., Pekdemir, T. & McMenemy, S. (2006). A comparison of the efficiency of different surfactants for removal of crude oil from contaminated soils. *Chemosphere*, *62*, 1403-1410.
18. Urum, K. & Pekdemir, T. (2004). Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. *Chemosphere*, *57*, 1139-1150.
19. Vreysen, S. & Maes, A. (2005). Remediation of a diesel contaminated, sandy-loam soil using low concentrated surfactant solutions. *J. Soils Sediments*, *5*, 240-244.
20. West, C.C. & Harwell, J.H. (1992). Surfactants and subsurface remediation. *Environ. Sci. Technol.*, *26*, 2324-2330.

