



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍAS

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y METALURGIA

ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD EN UNA BIOMASA ANAEROBIA ACIDOGÉNICA POR CITOMETRÍA DE FLUJO DURANTE LA BIOSORCIÓN DE ZINC

Tesis

Que para obtener el Título de:

INGENIERO QUÍMICO

Presenta:

María del Carmen Trillas Luque

Hermosillo, Sonora

Mayo 2015

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por tantas bendiciones brindadas.

Mil gracias a mi familia por darme la oportunidad de vivir esta experiencia, por apoyarme más que en todo, por ser el motorcito que me impulsa a seguir adelante, por haber estado esperando pacientemente por mí y recibirme con los brazos abiertos. ¡Los amo!

A mis leales compañeros de laboratorio, Diana, Luis, María, Gaby, Citlali, Lupita, por sus consejos y ayuda, pero sobre todo por hacer ameno el ambiente de trabajo y por compartir su amistad.

A mi directora de tesis, la Dra. María Teresa Certucha Barragán, gracias por creer en mí, por su tiempo y dedicación, por apoyarme pacientemente y por las certeras enseñanzas.

A mis asesoras, las Dras. Onofre Monge, Lupita Martínez y Adriana Garibay por su tiempo y conocimientos brindados.

A la Universidad de Sonora, al departamento de Ingeniería Química y Metalurgia, especialmente al laboratorio de biorremediación, por hacer posible que este trabajo se concluyera con éxito.

Gracias especiales a aquellas personas que estuvieron presentes en este trayecto, apoyándome ya sea directa o indirectamente, por aportar un granito de arena a través de su amistad, y darme la dicha de sentirme apreciada. Gracias por las mejores memorias.

DEDICATORIA

Para mis padres, Carmen y Efrén, por la confianza de creer en mí, por darme la dicha de tener un verdadero hogar, por quererme sin medida y mil gracias por su apoyo incondicional.

Para mis hermanos, Linda, Efrén, José, Derek, por tantas enseñanzas y vivencias, por ser los primeros maestros de quienes aprendí algo nuevo.

*Los que se enamoran de la práctica sin la teoría, son como los pilotos sin timón
ni brújula, que nunca podrán saber a dónde van.*

-Leonardo Davinci

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABLAS	X
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN.....	2
II. OBJETIVOS	5
2.1 Objetivo General.....	5
2.2 Objetivos Particulares	5
III. ANTECEDENTES	6
3.1 Contaminación por Metales Pesados.....	6
3.2 Zinc.....	10
3.3 Métodos para la Remoción de Contaminantes.....	13
3.1 Métodos Físico-Químicos.....	13
3.1.1 Ósmosis inversa	13
3.1.2 Electrodialisis.....	13
3.1.3 Ultrafiltración.....	14
3.1.4 Intercambio iónico.....	15
3.1.5 Precipitación química.....	16
IV. MÉTODOS BIOLÓGICOS	16
4.1.1 Fitorremediación	17
4.1.2 Biorremediación microbiana	17
4.2 Biosorción	18
4.2.1 Bioacumulación.....	19
4.2.1 Bioadsorción	19
4.2.3 Biomasa	20
4.3 Digestión aerobia	23
4.4 Digestión anaerobia	23
4.4.1 Hidrólisis	23

4.4.2	Acidogénesis.....	24
4.4.3	Acetogénesis.....	24
4.4.4	Metanogénesis.....	25
V. CITOMETRÍA DE FLUJO.....		26
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....		29
6.1	Caracterización Física de la Biomasa	29
6.1.1	Sólidos totales (ST)	29
6.1.2	Sólidos fijos (SF).....	29
6.1.3	Sólidos suspendidos volátiles (SSV).	30
6.2	Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀)	30
6.3	Cinética de Biosorción	31
6.4	Citometría de Flujo.....	32
6.4.1	Suspensión de control bacteriano y levadura	32
6.4.2	Adquisición de la biomasa anaerobia acidogénica	32
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		34
7.1	Caracterización Física de la Biomasa	34
7.2	Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀)	34
7.3	Cinética de Biosorción	35
7.4	Citometría de Flujo.....	37
VIII. CONCLUSIONES		41
ANEXOS.....		42
Anexo A		42
Anexo B		43
	Curva de calibración de la dextrosa.....	43
	Porcentaje de biosorción	44
BIBLIOGRAFÍA		47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
III-1- Representación esquemática de los procesos de bioacumulación y biomagnificación en las especies de la cadena trófica marina.	12
III-2. Efecto de la Presión Osmótica.....	14
III-3. Representación Esquemática del Proceso de Electrodiálisis.....	14
III-4. Representación esquemática del proceso de ultrafiltración	15
III-5. Representación del proceso de intercambio iónico.....	15
III-6. Ejemplos a nivel laboratorio de la precipitación química.....	16
IV-1. Métodos biológicos para la remoción de metales pesados	18
IV-2. Representación de las etapas de la digestión anaerobia	25
VII-1. Concentración inhibitoria media de la biomasa anaerobia acidogénica ...	34
VII-2. Cinética de biosorción de 5 mg/L de Zn, en 90 minutos.....	35
VII-3. Cinética de biosorción de 20 mg/L Zn, en 90 min.....	36
VII-4. Cinética de biosorción de 35 mg/L de Zn, en 90 minutos.....	36
VII-5. Evaluación de la viabilidad a tiempo cero de operación, con concentraciones de 5, 20 y 35 mg/L Zn.....	38
VII-6. Evaluación de la viabilidad de la BAA a 24 horas de exposición entre el biosorbente y el ion metálico, con concentraciones de 5, 20, 35 mg/L Zn.....	39
VII-7. Evaluación de la viabilidad de la BAA a 48 horas de contacto con 5, 20 y 35 mg/L de Zn.....	40
B-1. Curva de calibración de la dextrosa	43
B-2. Porcentaje de Zn biosorbido por la biomasa después de la cinética de biosorción.	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
III-1. Fuentes antropogénicas de metales y metaloides tóxicos, ton/año.	9
III-2. Límites máximos permisibles de metales pesados	11
IV-1. Tipos de biomasa utilizada como biosorbentes	21
IV-2. Requerimientos nutricionales de los microorganismos.....	22
IV-3. Reacciones bioquímicas en las etapas de la digestión anaerobia.....	26
A-1. Composición del medio mineral.....	42
B-2. Resultados obtenidos en la cinética de biosorción a los 90 minutos	44
B-3 Resultados de la capacidad de biosorción.	45
B-4. Porcentaje de Zn biosorbido por la biomasa anaerobia acidogénica	46

RESUMEN

En este trabajo se estudió la viabilidad de una biomasa anaerobia acidogénica (BAA) después de haber sido sometida al proceso de biosorción de zinc (Zn), para la cual se utilizó un citómetro de flujo. Para llevar a cabo este estudio, se caracterizó físicamente la BAA por medio de análisis gravimétrico. Además, mediante experimentación en lote, se determinó la toxicidad del elemento potencialmente tóxico en términos de la concentración inhibitoria media (CI_{50}). Para determinar la capacidad de la biomasa como biosorbente, se realizó la cinética de biosorción con concentraciones de 5 hasta 35 mg/L de zinc. Finalmente para conocer la viabilidad de la BAA después de la cinética de biosorción, se adquirieron las muestras a diferentes tiempos en un citómetro de flujo. Los resultados del estudio de la toxicidad muestran que la biomasa es inhibida al 50% metabólicamente con una concentración de 22.5 mg/L de Zn. En cuanto al estudio de biosorción, se obtuvo un porcentaje aproximado al 50% del ion Zn biosorbido por la BAA en los primeros 90 minutos de operación, y mayor del 65% a las 48 horas. En los estudios de citometría de flujo los resultados muestran tres poblaciones microbianas bacterias (R-1), levaduras (R-2) y detritos celulares (R-3). La viabilidad de la BAA se ve afectada en una de las poblaciones microbianas (R-1), sin embargo se observa en la población R-2 que es capaz de reproducirse y desarrollarse en presencia del ion metálico. En conclusión se puede decir que la biomasa anaerobia acidogénica metabólicamente activa es una buena alternativa para la remoción del contaminante, ya que se mantiene viable a concentraciones por encima de su inhibición media.

I. INTRODUCCIÓN

La rápida industrialización del mundo tuvo un impacto significativo en la contaminación de depósitos naturales de agua, debido a la enorme descarga de metales pesados en tales yacimientos (Rezic 2013; Mahdavi *et al.*, 2013). Uno de los elementos que contribuye significativamente a la contaminación del agua es el zinc. La respuesta ambiente Integral, Compensación y Responsabilidad act -2007 (The Comprehensive environment response, Compensation and Liability CERLA) ha clasificado al zinc en la 74^a posición con respecto a la contaminación del agua (Mishra *et al.*, 2010).

Constantemente, cobre y hierro acompañan al zinc en el efluente descargado de diversas unidades industriales. La forma más prominente de Zn disponible en la industria es en forma de iones. Los metales pesados son contaminantes del ambiente que no pueden ser destruidos y degradados, representan un serio e importante problema ecológico, con consecuencias para la salud. Por lo que, la eliminación de éstos metales de las aguas de descarga en las industrias se ha convertido en un reto para la normatividad nacional e internacional (Mishra y Patel, 2009; Cazón *et al.*, 2013).

Para el tratamiento de las aguas de descarga de la industria contaminadas con metales potencialmente tóxicos, se utilizan tecnologías o procesos como: destilación, extracción, uso de membranas, adsorción, oxidación catalítica y procesos de oxidación.

Estos métodos frecuentemente son inefectivos y costosos, sobre todo cuando se aplican a efluentes diluidos. Presentan algunas desventajas como: la producción excesiva de lodo, tiempos largos de operación, formación de productos gaseosos tóxicos, difícil manejo de residuos, consumos elevados de energía, taponamientos, entre otros.

Una alternativa, es la biorremediación microbiana, la cual es una tecnología emergente para el tratamiento de efluentes contaminados. Las ventajas de la

biorremediación son: una fácil operación, alta eficiencia, es un proceso amigable al ambiente, minimiza los desechos químicos y el uso natural, tiene bajo costo ya que son biosorbentes que se pueden regenerar (Dotto *et al.*, 2013).

La biosorción es una técnica empleada en la eliminación de metales pesados, y se puede definir como la captación de contaminantes desde una solución acuosa por una biomasa (viva o muerta) (Volesky y Holan 1995; Davis *et al.*, 2003). Este mecanismo es mediante la interacción de grupos funcionales de la pared celular microbiana (polisacáridos, lípidos y proteínas) con los iones metálicos. Estos componentes juegan un rol importante ya que crean los sitios para la unión del ion metálico (Kadukova y Vircikova 2005). La biosorción se lleva a cabo mediante dos mecanismos: la bioacumulación y la bioadsorción.

El primer mecanismo se basa en la capacidad de absorción de especies metálicas hacia el interior de las células que componen la biomasa, mientras que el segundo se refiere a la adsorción de los iones en la superficie de la célula (Certucha-Barragán *et al.*, 2010). Es una tecnología que representa una alternativa a los tratamientos convencionales de recuperación de metales pesados en aguas, permite la reutilización de residuos procedentes de procesos agrícolas e industriales.

En los últimos años ha habido un incremento en las técnicas con el fin de clasificar y separar las células. Estas técnicas se basan en separación gruesa y en separación individual. La primera se refiere a la separación por medio de filtración celular, la centrifugación o sedimentación y el cultivo celular.

La separación individual engloba principalmente a la citometría de flujo, en donde el conteo individual la hace la mejor técnica para proveer información en cuanto al análisis y separación de poblaciones celulares (Salgado 2009).

La citometría de flujo nos permite cuantificar las bacterias de las aguas residuales utilizando tinción fluorescente de ácido desoxirribonucleico (ADN). Las ventajas de esta técnica han destacado en el campo medio ambiental debido al conteo rápido y eficiente de células absorbidas en la población bacteriana. Consiste en contar más de 1000 células por segundo, ya que es un rápido análisis multiparamétrico de células individuales, capaz de dar una ponderación precisa de las células libres en una suspensión, en comparación con la observación convencional de bacterias en un microscopio (Foladori *et al.*, 2010).

Es por esto, que el interés por realizar este trabajo se hizo con el fin de estudiar la viabilidad de la biomasa anaerobia acidogénica, con concentraciones variantes de Zn, y de esta forma aportar conocimientos que contribuyan al uso de este tipo de biomasa para el tratamiento de aguas contaminadas con metales potencialmente tóxicos.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

- Análisis de la viabilidad en una biomasa anaerobia acidogénica por citometría de flujo durante la biosorción de zinc.

2.2 Objetivos Particulares

- Determinar la concentración inhibitoria media de Zn en la biomasa anaerobia acidogénica.
- Determinar la cinética de biosorción de Zn.
- Evaluar la viabilidad de la biomasa anaerobia acidogénica por citometría de flujo utilizando yoduro de propidio.

III. Antecedentes

Todas las formas de vida en la tierra dependen del agua. Cada ser humano necesita diariamente varios litros de agua dulce potable para vivir. Como se sabe, el agua dulce es muy preciada, alrededor del 97% del agua de nuestro planeta es salada y por tanto no es apta para el consumo humano. Sorprendentemente, las tres cuartas partes del agua dulce de la tierra están retenidas en los glaciares y los casquetes polares del hielo de manera que los lagos y los ríos; principales fuentes de agua de consumo para nuestra sociedad, tan sólo constituyen un 0,01 % del recurso hídrico de nuestro planeta.

El agua es un elemento fundamental y determinante en la vida humana. Tanto la escasez como el uso abusivo del agua plantean una creciente y seria amenaza para el desarrollo sostenible y la protección del medio ambiente. La salud y el bienestar humano, la seguridad alimenticia, el crecimiento industrial y el ecosistema del que dependen se hallan en peligro, a no ser que la gestión de los recursos hídricos y del suelo se efectúe en el presente de una forma más eficaz que en el pasado (Blanco, 2006).

La contaminación del agua puede tener distintos orígenes, pero la más común es ocasionada por desechos industriales, debido a la descarga de sustancias tóxicas como ácidas, solventes orgánicos, pinturas, metales pesados y demás derivados de actividades industriales, agrícolas, ganaderas, domésticas. Por consiguiente, tales aguas ya no son aptas para el consumo humano (Heinke *et al.*, 1999).

3.1 Contaminación por Metales Pesados

Los metales pesados constituyen un grupo cercano a los 40 elementos de la tabla periódica que tienen una densidad mayor o igual a 5 g/cm³. Una característica particular de los metales pesados como el sodio, potasio, magnesio, calcio, vanadio, manganeso, hierro, cobalto, níquel, cobre y zinc, es que, aun cuando son primordiales para el desarrollo fisiológico, se ha reportado

que también tienen efectos tóxicos sobre las células, principalmente como resultado de su capacidad de alterar o desnaturalizar las proteínas (Gómez, 2008). El grado de toxicidad de los metales pesados depende de una serie de factores que engloban desde el pH, estado molecular y propiedades físico-químicas, hasta la naturaleza del material y sobre todo de su disponibilidad en el ambiente.

Los metales suelen ingresar a los sistemas acuáticos en el proceso de transformación natural de las rocas durante la formación de los suelos, pero su concentración final no rebasa los umbrales de la toxicidad y se encuentran bajo formas que son muy poco asimilables por los organismos. Sin embargo, la actividad humana ha incrementado su contenido en el medio ambiente de forma accidental o deliberada (Merrero-Coto, 2010). Tal es el caso de la actividad minero-metalúrgica, en donde a través del procesamiento de minerales y fundición, podría causar la dispersión y depósito de grandes cantidades de metales hacia el medio ambiente.

En México, se ha registrado una creciente y preocupante contaminación ambiental a consecuencia del desarrollo de industrias como la minera y la petrolera, esto aunado por la escasa educación ambiental, son factores decisivos que provocan la explotación de recursos naturales. La industria minera es una de las actividades económicas de mayor tradición en nuestro país, por lo cual tiene alto impacto ambiental pues debido al procesamiento de recursos minerales, se han generado una gran cantidad de residuos líquidos, gaseosos y sólidos, contribuyendo a la formación de lodos tóxicos (Monge, 2008).

El Río San Pedro, al norte del estado de Sonora, es un buen ejemplo de contaminación de agua y sedimentos por metales pesados, puesto que este río ha sido severamente contaminado durante muchos años a consecuencia de

descargas de aguas contaminadas con altas concentración de iones metálicos durante la actividad minera de la región (Monge *et al.*, 2013).

En el mes de agosto del año 2014, se dio a conocer la terrible negligencia ocurrida por parte de la mina a cielo abierto Buenavista del Cobre en el Municipio de Cananea, Sonora, subsidiaria de Grupo México, donde aconteció el mayor desastre ambiental en la historia de la minería en este país. Según SEMARNAT se derramaron 40,000 m³ de sulfato de cobre (CuSO₄) acidulado, en el Arroyo Tinajas del municipio mencionado, el cual desemboca en el Río Bacanuchi, afluente del Río Sonora (SEMARNAT, 2014 <http://mexico.cnn.com/nacional/2014/08/28/>).

En comparación de muchos contaminantes orgánicos, los metales pesados generalmente no se eliminan de los ecosistemas acuáticos por procesos naturales, debido a que no son biodegradables, al contrario, son altamente contaminantes y sufren de un ciclo global eco biológico, donde las aguas naturales son el principal camino. Hoy en día, estos elementos metálicos tienen un gran significado como indicadores de la calidad ecológica de todo flujo de agua debido a su toxicidad, y muy especialmente al comportamiento bioacumulativo (Gómez, 2008).

El efecto tóxico de los elementos metálicos es atribuido a la alteración de la función de la enzima, mediante la unión de los metales con determinado grupo en las paredes celulares. En el medio ambiente, los metales pesados pueden estar presentes en las siguientes formas (Zabochnicka *et al.*, 2014)

- Forma iónica (esta es la forma más tóxica para los organismos vivos)
- Ion ligado con diversos compuesto complejos
- Moléculas precipitadas

La mayoría de los elementos metálicos experimentan la bioacumulación en aguas superficiales. Debido a los efectos tóxicos que tienen sobre determinados

elementos del medio ambiente, los metales pesados representan serias amenazas para los organismos vivos.

Se sabe que el uso de las cuencas de los drenajes son la fuente principal de descargas antropogénicas, esto representa un riesgo para la salud humana, particularmente por la contaminación causada a consecuencia de altas concentraciones de metales pesados. Estos iones viajan a través de cuerpos de agua naturales debido a la descarga directa de efluentes industriales, que pueden contener tanto aguas negras como sólidos y sedimentos, los cuales se dispersan alrededor de la biota cercana. (Monge *et al* 2013)

La Tabla III-1 presenta las cifras de metales tóxicos y metaloides presentes en aguas residuales producidas por varias industrias.

Tabla III-1. Fuentes antropogénicas de metales y metaloides tóxicos, ton/año.

Elemento	Combustibles, Ing. Eléctrica, Metalurgia	Agricultura	Industria Química, Metalurgia	Tratamientos de aguas residuales
Arsénico	49,952	7,730	7,550	13,635
Cadmio	16,444	3,666	2,450	25,466
Cromo	344,853	92,680	50,610	81,629
Cobre	26,953	411	33,740	68,875
Mercurio	6,879	5,245	1,145	2,018
Níquel	239,901	60,246	7,440	60,969
Plomo	325,884	192	9,300	58,570
Selenio	70,335	6,566	4,250	6,252
Zinc	162,871	824,935	85,015	168,815

Zabochnika-Świątek M., 2014

3.2 Zinc

El Zn es uno de los elementos más comunes en la corteza terrestre. Está presente de forma natural en las rocas, el suelo, el agua y el aire. Es esencial para la salud y el bienestar tanto del ser humano como de animales y cultivos. Debido a que es un material extremadamente versátil, se sabe que una de las principales aplicaciones del Zn se basa en proteger el acero frente a la corrosión, por lo cual se puede alargar el tiempo de vida de dicho producto. Además, menor corrosión significa también menores costos y menor impacto ambiental derivados del mantenimiento. Cabe destacar que después de terminar su función, los productos derivados del zinc llegan a reutilizarse y el metal que contenían puede ser recuperado sin ninguna pérdida de calidad o propiedades.

A nivel mundial se producen anualmente más de 11 millones de toneladas de Zn. Existen numerosas actividades industriales que implican a este metal, por lo que hay gran cantidad de descargas de efluentes industriales de él al medio ambiente. De ellas, casi el 50% se utiliza para el galvanizado de acero. Alrededor del 17% se utiliza para producir latón y otro 17% para la producción de aleaciones de base Zn, principalmente en el sector de moldeado por presión. Por último, también se utiliza en cantidades significativas en compuestos como óxidos de zinc y sulfato de zinc. Las operaciones de fundición afectan a un área más grande con sus descargas durante un periodo de muchos años (Volesky 1990).

La existencia de niveles elevados de zinc en el medio ambiente se debe a varias actividades humanas; entre las fuentes de emisiones se incluyen: efluentes municipales e industriales, combustión de carbón y residuos geológicos, actividades mineras y procesado del acero. (International Zinc, 2010,). La producción mundial de zinc está todavía creciendo, esto significa básicamente que más y más zinc termina en el ambiente.

El agua es contaminada con este ion metálico, debido a las descargas de efluentes residuales provenientes de plantas industriales que no son depuradas satisfactoriamente. Una de las consecuencias es que en las orillas de los ríos se están depositando fango contaminado con zinc, el cual puede también incrementar la acidez de los cuerpos de agua.

Los efectos nocivos se manifiestan a niveles que están de 10 a 15 veces por encima de los necesarios para la salud humana. La ingestión en grandes cantidades causa calambres, náuseas y vómitos. Si se ingieren magnas proporciones de zinc durante un período de tiempo prolongado, puede manifestarse anemia y disminución en los niveles de colesterol beneficioso (Martínez, 2015). La Tabla III-2 señala las concentraciones máximas permisibles para los metales pesados según la NOM-001-SEMARNAT-1996 y NOM-001-ECOL-1996.

Tabla III-2. Límites máximos permisibles de metales pesados

Parámetro (mg/L)	Ríos uso en riego agrícola		Ríos uso público urbano		Aguas Naturales (EPA 1986)	Riego agrícola (SEDUE 1989)	Fuente de abastecimiento de agua potable (SEDUE 1989)
	Promedio mensual	Promedio diario	Promedio mensual	Promedio diario			
Arsénico	0.2	0.4	0.1	0.2	0.05	0.1	-
Cadmio	0.2	0.4	0.1	0.2	0.01	0.01	0.001
Cobre	4	6	4	6	1.5	0.2	0.1
Cromo	1	1.5	0.5	1	0.1	1	0.1
Mercurio	0.001	0.02	0.01	0.01	0.002	-	-
Níquel	2	4	2	4	0.632	0.2	-
Plomo	0.5	1	0.2	0.4	0.0015	5	0.1
Zinc	10	20	10	20	5	2	-

NOM-001-SEMARNAT-1996; NOM-001-ECOL-1996

Debido a la presencia de este ion en los mantos acuíferos, se puede presentar el proceso de bioacumulación en algunas especies, este elemento entra en los cuerpos de algunos peces y es capaz de biomagnificarse en la cadena alimentaria.

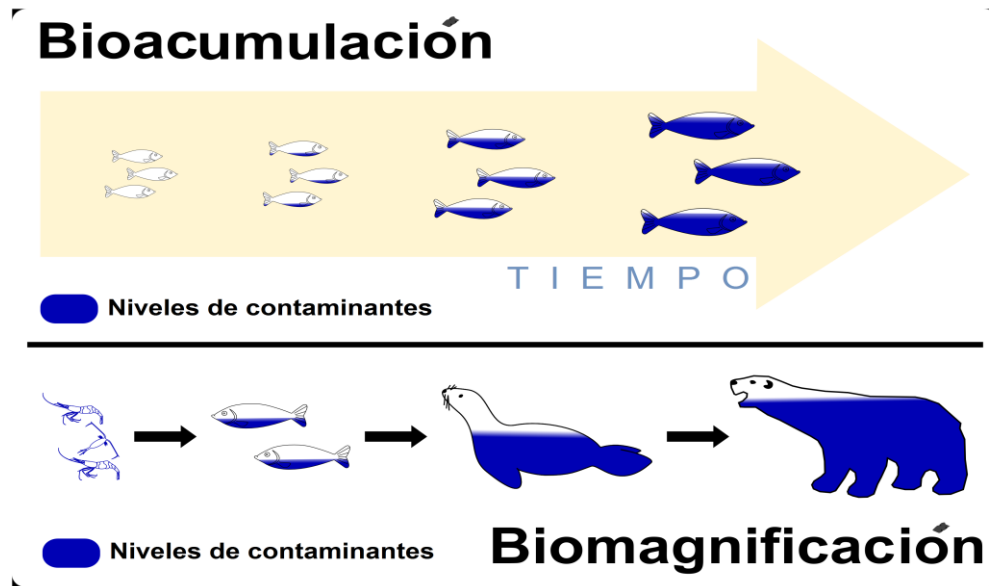


Figura III-1- Representación esquemática de los procesos de bioacumulación y biomagnificación en las especies de la cadena trófica marina.

Además, por su acumulación en el suelo, solamente un número limitado de plantas tiene la capacidad de sobrevivir. Esta es la razón por la cual cerca de la industria de explotación de zinc, no hay gran diversidad de vegetación. Asimismo, el zinc puede interrumpir la actividad en los suelos, con influencias negativas en el desarrollo de microorganismos (Lenntech, 2014). Por esta razón, cada vez son más numerosos los estudios que ponen de manifiesto su elevada concentración en aguas subterráneas y de superficie (Blanco *et al.*, 2006). Debido a esto se han propuesto diversos métodos para la remoción de los elementos potencialmente tóxicos.

3.3 Métodos para la Remoción de Contaminantes

Los procesos convencionales para el tratamiento de aguas residuales con metales incluyen: precipitación, oxidación, reducción, intercambio iónico, filtración, tratamiento electroquímico, tecnologías de membrana y recuperación por evaporación resultan costosas y en ciertos casos ineficientes. Cuando se emplean procesos químicos para tratar cuerpos de agua contaminados crean como producto final un lodo de alta concentración de metales, lo que llega a dificultar su eliminación (Hijosa-Valsero *et al.*, 2013).

3.1 Métodos Físico-Químicos

3.1.1 Ósmosis inversa

Es un proceso en donde se ponen en contacto dos efluentes con diferente concentración de sólidos, los cuales se separan por una membrana semi-permeable (Figura III- 2), aplicando una presión mayor a la presión osmótica se logra pasar el solvente hacia un lado de la membrana, y concentrar los solutos del otro lado. De esta forma se separa la mayor cantidad de sólidos disueltos de en aguas residuales (Rao 2011). La principal desventaja de este método es su alto costo.

3.1.2 Electrodialisis

Se trata de un proceso de separación de membrana, donde los iones metálicos son impulsados mediante membranas de iones selectivas, bajo la influencia de un campo eléctrico (Figura III-3). Entre los dos electrodos se produce una transferencia de cationes y aniones hacia los electrodos concernientes. Su desventaja es la formación de hidróxidos de metal que obstruyen la membrana (Silva *et al.*, 2013).

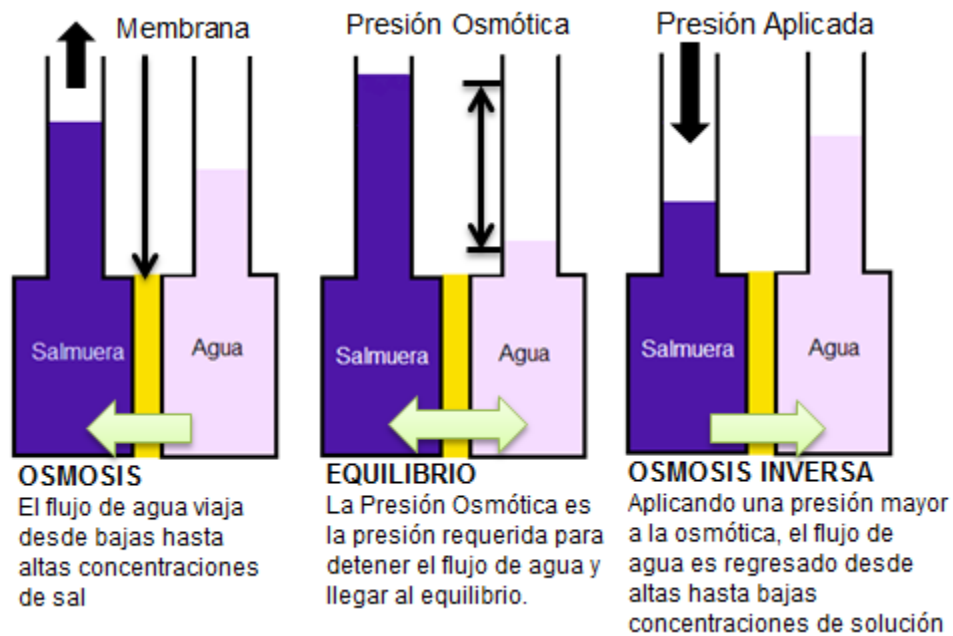


Figura III-2. Efecto de la Presión Osmótica

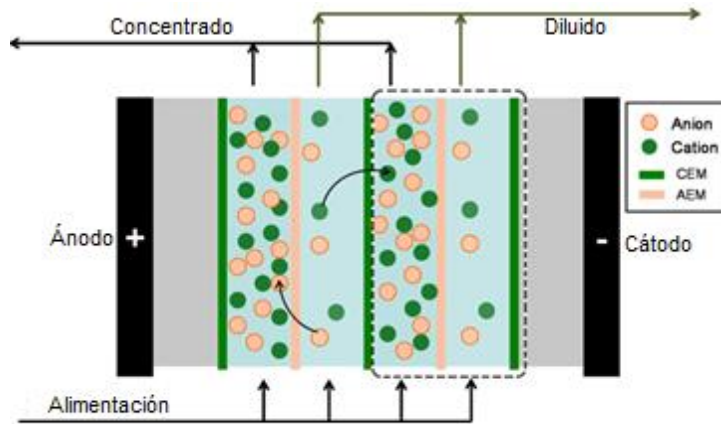


Figura III-3. Representación Esquemática del Proceso de Electrodiálisis

3.1.3 Ultrafiltración

En este proceso se utilizan membranas permeables con un tamaño de poro de 5-2 nm, el cual permite el paso del agua y solutos de bajo peso molecular (Figura III-4). Debido a la alta densidad de empaquetamiento de las membranas, sus requerimientos de espacio son pequeños, pero su rendimiento

se ve afectado por presiones elevadas y disminución en los flujos de agua. Su desventaja es la formación de lodos, los taponamientos de membrana y altos costos de operación (Figuroa, 2013).

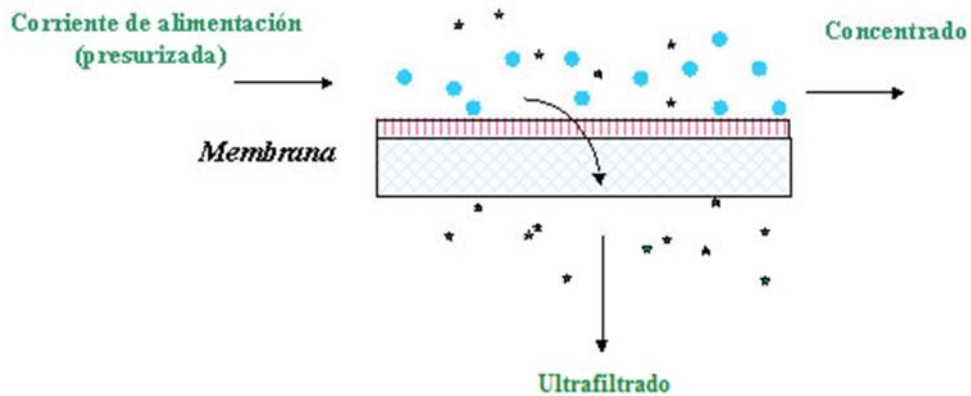


Figura III-4. Representación esquemática del proceso de ultrafiltración

3.1.4 Intercambio iónico

Proceso por el cual los iones metálicos de las soluciones diluidas se intercambian con los iones por fuerzas electrostáticas de la resina (Figura III- 5). Sus principales desventajas son el alto costo, la eliminación parcial de iones y el uso de agua para lavar la columna empacada (Yoshinobu, 2012).

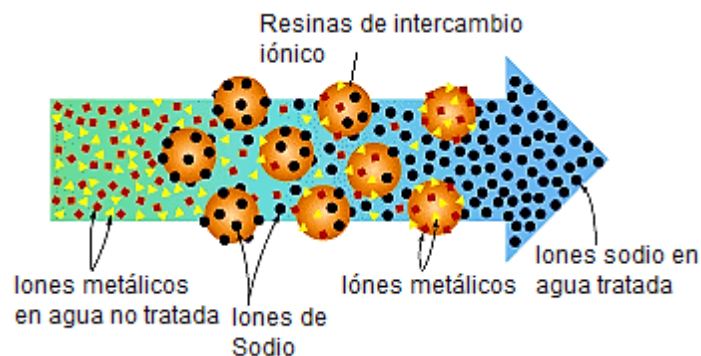


Figura III-5. Representación del proceso de intercambio iónico.

3.1.5 Precipitación química

La precipitación de los metales se logra mediante la añadidura de coagulantes como alumbre, sales de calcio, hierro y otros polímeros orgánicos, cuya función es precipitar los materiales metálicos (Figura III-6). La desventaja de este proceso es la gran cantidad de lodos que contienen los compuestos tóxicos (Barakat 2011).

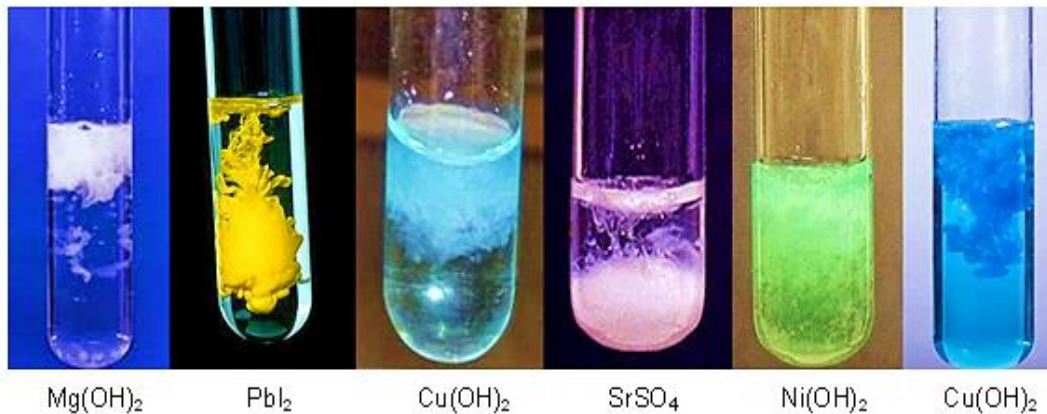


Figura III-6. Ejemplos a nivel laboratorio de la precipitación química

Por lo tanto, las desventajas como la eliminación parcial de los metales, alto consumo de reactivos y energía, generación de lodos tóxicos y otros productos de desechos que requieren eliminación cuidadosa ha hecho imprescindible el uso de un tratamiento costo-efectivo que sea capaz de eliminar los metales pesados de efluentes acuosos (Ahalya *et al.*, 2003).

IV. MÉTODOS BIOLÓGICOS

Diferentes tipos de sistemas de tratamiento biológicos son usados en el campo de la ingeniería ambiental. Tal es el caso del empleo de plantas naturales y el uso de microorganismos, cuya función es absorber el agente contaminante para adecuar, ya sea cuerpo de agua o suelo que requiera ser purificado. Entre

estos métodos se encuentra la fitorremediación y la biorremediación microbiana.

4.1.1 Fitorremediación

El proceso consiste en utilizar ciertas plantas para limpiar suelos, sedimentos y aguas contaminadas con metales pesados. Particularmente, las plantas acuáticas son empleadas en la desinfección de tales efluentes gracias a que usan la energía solar como mayor fuente nutrimental. Por lo tanto, al ser sistemas simples y sin un alto grado de complejidad, el consumo energético empleado es bajo (Martelo y Borrero, 2008). Hidalgo cita que, algunos investigadores afirman que algunas plantas acuáticas remueven sustancias orgánicas así como también metales pesados e inclusive son capaces de absorber sustancias radioactivas, donde acumulan en sus raíces grandes cantidades de uranio (Hidalgo, 2005).

4.1.2 Biorremediación microbiana

Se puede definir biorremediación como la respuesta biológica al abuso ambiental. Es un proceso natural en el que los diferentes organismos son capaces de eliminar contaminantes orgánicos e inorgánicos en un ambiente dado. En un ambiente no contaminado, las bacterias, los hongos, los protistas y otros microorganismos heterotróficos degradan constantemente la materia orgánica disponible para obtener energía (Cortón y Viale 2006, Monge *et al.*, 2008)

La búsqueda de nuevas tecnologías que permitan la eliminación eficaz de metales tóxicos de las aguas residuales ha dirigido la atención a técnicas amigables al ambiente como la biorremediación, la cual trabaja proveyendo a estos microorganismos de nutrientes, oxígeno y otras condiciones que favorezcan su rápido crecimiento y reproducción, acondicionándolos de tal manera para poder degradar el agente contaminante orgánico a una velocidad

mayor, y proporcionando una técnica para eliminar la contaminación, realiza los mismos procesos de biodregradación que ocurren naturalmente en el medio ambiente (Cortón y Viale 2006).

La biosorción es un método eficiente, amigable al ambiente y sobre todo no es una metodología costosa en comparación con las técnicas convencionales. Es un proceso de biorremediación que depende de la absorción de los iones metálicos mediante biomasa activada, por lo tanto el uso de esta no involucra la generación de lodos secundarios (Cazón *et al.*, 2013, Mishra 2014).

4.2 Biosorción

La biosorción ha sido definida como la propiedad de ciertas biomoléculas (o tipos de biomasa) para unir y concentrar determinados iones a otras moléculas, a partir de soluciones acuosas. Este fenómeno está basado en la afinidad entre el biosorbente que vemos en fase sólida, y el sorbato que es el que será removido, el cual se encuentra en la fase líquida (Volesky 2007, Figueroa-Torres *et al.*, 2014). En la Figura IV-1 se representa el método biológico que es realizado por los microorganismos para la remoción de contaminantes.

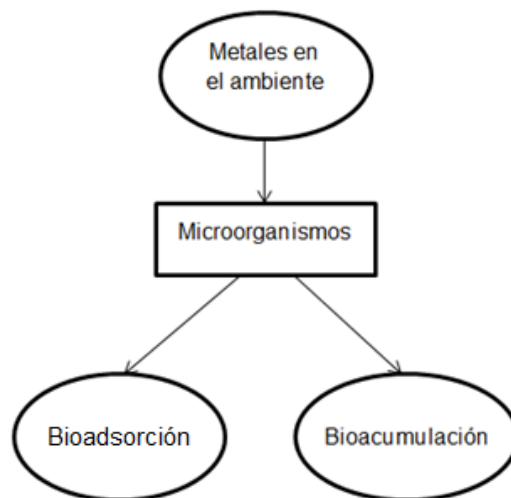


Figura IV-1. Métodos biológicos para la remoción de metales pesados

4.2.1 Bioacumulación

Este mecanismo presenta una incorporación del ion metálico dentro de la membrana celular. La actividad biológica es esencial para que la biomasa pueda llevar a cabo este proceso, ya que los metales son absorbidos durante la función del proceso metabólico, por lo que es necesario controlar constantemente las condiciones de operación (Chojnacka, 2010).

4.2.1 Bioadsorción

Dentro de la biorremediación de elementos potencialmente tóxicos como el cadmio, cromo, plomo, níquel, cobre y zinc, la biosorción es un fenómeno que ha sido estudiado ampliamente debido a que los microorganismos que se utilizan como biosorbentes logran captar rápidamente los contaminantes con los que son expuestos. La biomasa participante en este proceso, es fácilmente extraíble de diversos efluentes, lo que hace que sea una remediación rentable (McEldowney, 2000).

Para una mejor optimización del proceso, es importante entender que durante la biosorción, y debido a la complejidad de los materiales biológicos, es posible que diferentes mecanismos puedan ocurrir en el transcurso del mismo (Chojnacka 2010). La técnica de biosorción cubre los siguientes mecanismos:

- *Intercambio iónico.*- es una reacción química reversible donde se intercambian iones móviles por otros iones de la misma carga, que ocurre en sólidos que contienen un número relevante de grupos funcionales.
- *Complejación de especies metálicas.*- Los iones se unen a grupos funcionales presentes en las membranas de las células
- *Adsorción física.*- este es provocado por la interacción molecular (fuerzas de Van der Waals). En caso de una fisorción, no se produce una unión química.

La mayor ventaja de la biosorción es que los metales pesados son vinculados a células que no muestran una larga actividad metabólica. Esto permite eliminar los contaminantes por medio de organismos muertos (Zabochnicka, 2014).

Las membranas celulares juegan un rol importante en este proceso, ya que todos los iones metálicos antes de entrar a la membrana y al citoplasma atraviesan la pared celular, la cual está compuesta de polisacáridos y proteínas, por lo tanto existen muchos puntos de unión para las especies metálicas. Para poder detectar y cuantificar microorganismos, se disponen de técnicas que ayudan a llevar acabo esta clasificación, por ejemplo, métodos basados en criterios morfológicos, en tinción diferencial, pruebas bioquímicas, puede ser por tipificación de fagos, otra alternativa es con pruebas serológicas o mediante la detección o conteo celular.

Numerosos estudios revelan que la biomasa proveniente de especies de bacterias, algas y levaduras, son capaces de captar concentraciones de iones metálicos en su estructura. De esta manera, los sorbentes de origen biológico o biosorbentes, constituyen una alternativa eficiente y económica, para regenerar entornos contaminados, comparados con métodos cuyos precios son más elevados (Donghee, 2010).

4.2.3 Biomasa

La mayor parte de los materiales biológicos tienen afinidad por los metales, debido a ello, la selección de la biomasa como biosorbente potencial es uno de los pasos más importantes en el proceso de biosorción. Generalmente, se pretende seleccionar una biomasa asociada a un buen precio y disponibilidad (Park *et al.*, 2010).

Debe tomarse en cuenta que la capacidad de biosorción de cualquier biosorbente depende de sus métodos de tratamiento, así como, de las condiciones experimentales, principalmente pH y temperatura. Este biomaterial puede provenir de desechos industriales, los cuales deben de estar libres de

carga, esto es, organismos que se puedan obtener en grandes cantidades de la naturaleza, y que puedan cultivarse o propagarse rápidamente con fines de biosorción (Park *et al.*,2010). En la Tabla IV-1 se muestran los tipos de biomasa utilizados como biosorbentes.

Tabla IV-1. Tipos de biomasa utilizada como biosorbentes

Categoría	Ejemplos
Bacterias	Gram positivas (<i>Bacillus sp.</i> , <i>Corynebacterium sp.</i>) Gram negativas (<i>Escherichia sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i>) Cianobacterias
Hongos y levaduras	Hongos (<i>Aspergillus sp.</i> , <i>Rhizopus sp.</i> , <i>Agaricus sp.</i> , <i>Trichaptum sp.</i>) Levaduras (<i>Saccharomyces sp.</i> , <i>Candida sp.</i>)
Algas	Microalgas (<i>Clorella sp.</i> , <i>Chlamydomonas sp.</i>) Macroalgas (<i>Enteromorpha sp.</i> , <i>Codium sp.</i>)
Desechos industriales	Desechos de fermentaciones, alimentos, bebidas, lodos activados, lodos anaerobios.
Desechos agrícolas	Desechos alimenticios (arroz, frutas, trigo)
Residuos naturales	Plantas, cortezas, hierbas.

Figueroa, 2013

Para ello, estos microorganismos dependen de nutrientes que se componen de una fuente de carbono, fuente de energía, nitrógeno, agua y una fuente mineral. Con base a los requerimientos nutricionales de los organismos es común clasificarlos como autótrofos y heterótrofos. La Tabla IV-2 indica los nutrientes necesarios para la existencia de cada organismo.

organismos facultativos anaerobios son aquellos microorganismos que pueden sobrevivir en ausencia de oxígeno.

4.3 Digestión aerobia

La digestión aerobia es un proceso biológico implementado a las aguas residuales que tiene el fin de remover aquellos compuestos orgánicos en suspensión o en solución que se encuentran en el agua, los cuales al ser degradados por los microorganismos, imponen una demanda de oxígeno sobre el cuerpo de agua receptor.

4.4 Digestión anaerobia

El proceso de digestión anaerobia se caracteriza por llevarse a cabo en ausencia de oxígeno gracias a consorcios microbianos heterotróficos, que en un proceso de dos etapas (licuefacción-gasificación), convierten la materia orgánica en un 90% en componentes de bajo peso molecular (biometano, dióxido de carbono, agua y amoníaco) (Monge *et al*, 2013; Mudhoo 2013). Primeramente, los materiales orgánicos del sustrato como la celulosa, hemicelulosa y la lignina se licuan por enzimas extracelulares. Este paso inicial se debe a la velocidad de la hidrólisis, la cual a su vez depende del pH, temperatura, concentración y composición de los componentes iniciales de la materia prima (Figura IV-2). Los componentes orgánicos solubles incluyendo los productos de la hidrólisis se convierten en ácidos orgánicos, alcoholes, hidrógeno y dióxido de carbono por agentes acidogénicos durante la fase de acidogénesis. A su vez los productos de acidogénesis se convierten luego en ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono (Mudhoo, 2013).

4.4.1 Hidrólisis.

En este proceso la materia compleja, como los carbohidratos, proteínas y grasas, es degradada en compuestos de bajo peso molecular como glucosa, aminoácidos y ácidos grasos (AGV's), respectivamente. Este paso de

descomposición ocurre a través de la actividad de enzimas extracelulares, secretadas por la bacteria hidrolítica unida a un sustrato polimérico. Este proceso puede tener una velocidad limitada para la velocidad total de la digestión anaeróbica. En particular la rapidez de conversión de los lípidos sucede por debajo de los 18°C (Manyi, 2013; Monge *et al.*, 2013).

4.4.2 Acidogénesis.

Los compuestos generados en la etapa de hidrólisis, son llevadas dentro de las células de la bacteria fermentativa, para ser transformadas en componentes orgánicos simples, como los conocidos ácidos grasos, alcoholes y compuestos minerales como dióxido de carbono, hidrógeno, amonio, ácido sulfhídrico, etc. La fermentación acidogénica es llevada a cabo por diversos grupos de bacterias, las cuales son obligatoriamente anaeróbicas. Generalmente se cree que los agentes acidogénicos son más resistentes a la toxicidad de los metales pesados que la metalogénesis (Mudhoo y Kumar, 2013).

4.4.3 Acetogénesis.

Esta etapa es conocida también como acidogénesis intermediaria, ya que los productos provenientes de la fermentación son convertidos en acetato, hidrógeno y dióxido de carbono por la acción de un grupo de bacterias conocidas como “productoras obligadas de hidrógeno” (BPOH). La singularidad de este proceso radica en la inhibición de las BPOH, debido a que el hidrógeno que están produciendo es consumido por la interacción con microorganismos metanógenos-hidrogenofílicos, de esta manera se mantiene un nivel adecuado de hidrógeno para que pueda darse termodinámicamente la conversión de los ácidos grasos volátiles (AGV's) a acetato e hidrógeno. Esta cooperación es conocida como “relación sintrófica” o “transferencia interespecífica de hidrógeno” (Monge *et al.*, 2013).

4.4.4 Metanogénesis

La metanogénesis es la etapa final de la digestión anaerobia, consiste en dos vías principales: la acetoclástica e hidrotrofica. Ambos tipos de metanógenos, acetoclásticos e hidrogenotróficos son esenciales para la conversión entre materia orgánica y metano, sin embargo utilizan un número limitado de sustratos para formar CH_4 . Estos microorganismos utilizan principalmente H_2 , dióxido de carbono y ácido acético para formar metano (CH_4). En la Figura IV-2 se representa el diagrama esquemático de las etapas de la digestión anaerobia

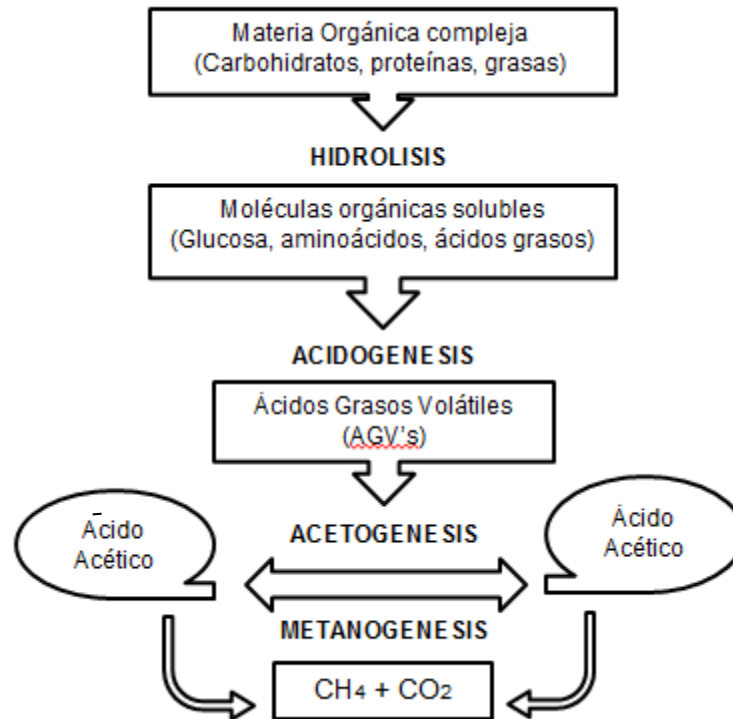


Figura IV-2. Representación de las etapas de la digestión anaerobia

Las bacterias metanogénicas pertenecen al grupo de las *Archaeas*, son anaerobias estrictas y producen metano como producto principal del metabolismo energético. Los metanógenos se encuentran en casi todos los ambientes anaerobios concebibles. El 70% de metano es producido por vía acetoclástica y el 30% restante por vía hidrogenofílica. En la etapa final de la

digestión anaerobia, las reacciones se llevan a cabo a pH cercano a neutro para poder obtener una mayor producción de metano. En la Tabla IV-3 se muestran las reacciones bioquímicas que se llevan a cabo durante el proceso de digestión anaerobia.

Tabla IV-3. Reacciones bioquímicas en las etapas de la digestión anaerobia.

ETAPA	REACCIÓN
Hidrólisis	$Glucosa + 4H_2O \rightarrow CH_3COO^- + 4H^+ + 4H_2$
	$Glucosa + 2H_2O \rightarrow C_4H_7O_2 + 2HCO_3^- + 3H^+ + H_2$
Acidogénesis	$Butirato + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + H^+ + H_2$
	$Propionato + 3H_2 \rightarrow CH_3COO^- + HCO_3^- + H^+ + H_2$
Acetogénesis	$HCO_3^- + H^+ + 4H_2 \rightarrow CH_3COO^- + 2H_2O$
Metanogénesis	$HCO_3^- + 4H_2 \rightarrow CH_4 + 3H_2O$
	$Acetato + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^- + H^+$

V. CITOMETRÍA DE FLUJO

Es preciso disponer de métodos que clasifiquen las etapas en las que se encuentran los microorganismos a utilizar. Hoy en día existe un interés creciente en el desarrollo de métodos más rápidos y eficientes que evalúen la presencia de microorganismos, la rápida detección de éstos es una de las cuestiones claves para la obtención de datos en tiempo real que ayuden a desarrollar programas más precisos de control de calidad de bioprocesos. Del mismo modo, la evaluación de la viabilidad celular constituye un tema de gran importancia en microbiología industrial; la actividad industrial implica la toma de decisiones de alto impacto económico, que se determina normalmente por los resultados obtenidos de las pruebas de viabilidad celular (Díaz *et al.*, 2010).

Existen circunstancias donde es requerido determinar el número y la viabilidad de cultivos microbianos mixtos, conocer las propiedades de la población que se

tiene presente, y confirmar el estado de algún microorganismo después de haber sido sometido a un proceso o tratamiento para comprobar la existencia de alguna bacteria, levadura, o algún microorganismo que pueda ser reutilizable. Es aquí donde la citometría de flujo entra en juego, ya que ofrece una perspectiva en tiempo real del análisis individual de microorganismos, sin dependencia del cultivo microbiano (Winson y Davey 2000).

Se han desarrollado un gran número de metodologías y reactivos que permiten la detección y medición de moléculas de superficie e intracelulares, estado de membranas, pruebas de actividad enzimática y de iones (González 2012). Pero gracias a que la citometría de flujo es una tecnología capaz de etiquetar selectivamente especies definidas, permite conocer la composición de la población, el estado de división, los marcadores que la identifican y definen funcionalmente, e incluso se puede conocer la respuesta metabólica a estímulos determinados. La esencia de la citometría de flujo radica en la posibilidad de medir la luz procedente de células individuales que pasan por la luz emanada de un láser, a una velocidad de miles de células por segundo (Barrera Ramírez *et al.*, 2004).

La esencia de esta técnica radica en la caracterización de poblaciones de células basándose en la medición de luz dispersada hacia adelante (forward scattered light FCC) y luz dispersada lateral (side-scattered light SSC) las cuales registran las células teñidas con colorantes que tienen sitios de unión intracelulares específicos (Vicente 2011, Díaz y Mantos 2011).

La función del colorante es marcar las células no viables, o células que no están metabólicamente activas, de esta manera las señales de dispersión se relacionan con la naturaleza y propiedades celulares, tanto características superficiales de refracción como de su estructura interna. Es por esto que principalmente los parámetros que registra la dispersión de luz son: el tamaño de la célula, la complejidad de la membrana celular, entre otros.

En este trabajo se utilizó yoduro de propidio (IP) para medir la viabilidad de la población. Dicho componente tiñe los ácidos nucleicos de doble cadena de las células muertas, por lo que la fluorescencia de las células teñidas muestra el porcentaje de viabilidad celular (Cid Blanco *et al.*, 1999).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Caracterización Física de la Biomasa

La biomasa utilizada en este trabajo se obtuvo de la planta de tratamiento de aguas residuales de la industria cervecera Corona, ubicada en Ciudad Obregón, Sonora. A los cuales se les determinó:

6.1.1 Sólidos totales (ST)

El término sólido hace referencia a la materia orgánica en suspensión o disuelta en aguas residuales. Los sólidos pueden alterar negativamente la calidad de un cuerpo de agua, y, en casos donde exista un alto contenido de sólidos disueltos, pueden inducir una reacción nociva para el organismo humano (APHA 1998).

Los sólidos totales son los materiales retenidos, de una muestra acuosa, cuando ésta se seca alrededor de una temperatura de 103 – 105°C (Chiruchi, 1996; APHA 1998). Mediante la Ec.1 se puede calcular el contenido de sólidos suspendidos totales:

$$\frac{\text{Peso a } 100^{\circ}\text{C} - \text{Peso del crisol}}{\text{Volumen de muestra}} = \frac{gST}{L} \quad \text{Ec(1)}$$

6.1.2 Sólidos fijos (SF)

Los sólidos suspendidos fijos son los residuos resultantes luego de calcinar a 550°C la muestra retenida (Chiruchi, 1996; APHA 1998). Para determinar la cantidad de sólidos fijos se utiliza la Ec.2:

$$\frac{\text{Peso a } 550^{\circ}\text{C} - \text{Peso crisol}}{\text{Volumen de muestra}} = \frac{gF}{L} \quad \text{Ec (2)}$$

6.1.3 Sólidos suspendidos volátiles (SSV).

Los sólidos suspendidos volátiles son una manera indirecta de determinar la cantidad de biomasa. Se determinan por diferencia de peso entre (ST) y (SF) (Chiruchi, 1996; APHA 1998), tal y como se muestra en la Ec.3:

$$ST - SF = \frac{gSSV}{L} \quad \text{Ec. (3)}$$

Se colocaron filtros de papel en una mufla a 550°C durante media hora, después se les hizo pasar a un desecador, donde se dejó enfriar para posteriormente capturar su peso vacío. Se agregó 10 mL de muestra de la biomasa anaerobia acidogénica (BAA). Para eliminar la mayor cantidad de agua posible, se filtró la muestra con ayuda de una bomba al vacío. Una vez removido la mayor parte de líquido, la muestra se pasó a un horno a 100°C por 4 horas. Transcurrido este tiempo, se colocó el crisol en el desecador para dejar enfriar y capturar su peso. A continuación, se calcinó la muestra a 550°C durante 1 hora. Después de este período, se volvió a colocar el crisol en el desecador para dejar enfriar y poder capturar su peso a 550°. De esta forma se pueden realizar el cálculo de los SSV.

6.2 Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀)

La CI₅₀ es el valor requerido para obtener el 50% de inhibición metabólica (Polo Cerón, 2010). Se calculó la dextrosa contenida por la BAA mediante el método del ácido dinitrosalicílico (DNS), el cual se basa en la reducción del DNS por la glucosa a 100°C, esto para determinar la cantidad de fuente de carbono consumida por el lodo anaerobio.

Los estudios se llevaron a cabo en botellas serológicas con un volumen total de 150mL, las cuales fueron inoculadas con 1g/L SSV de BAA y alimentadas con medio mineral (Anexo A), conteniendo 5g de dextrosa. Los inóculos se pusieron en contacto con concentraciones variantes de Zn: 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 mg/L, las cuales se prepararon mediante una matriz de 500 ppm de sulfato de

Zn. El volumen de operación de la cinética fue de 100mL. Se incubaron durante 48 horas a 36°C. Se tomó 1 mL de muestra, la cual se centrifugó a 3500 rpm durante cinco minutos, y se puso en contacto con 1 mL de DNS (ácido dinitrosalicílico). Para determinar la actividad metabólica se leyeron las muestras en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-VIS) a 570 nm. El cálculo del porcentaje de actividad metabólica esta descrito por la siguiente ecuación 4.

$$\% A = \frac{DO\delta - DO\delta_{24}}{DO\alpha - DO\alpha_{24}} \times 100 \quad \text{Ec(4)}$$

Dónde

% A: es el porcentaje de actividad,

DO δ : es la densidad óptica de la muestra,

DO δ_{24} : es la densidad óptica de la muestra transcurrida 24 horas,

DO α : es la densidad óptica del control y,

DO α_{24} : es la densidad óptica del control transcurrida 24 horas.

6.3 Cinética de Biosorción

El proceso de biosorción da pie a la unión de metales tóxicos, o sustancias orgánicas la cual absorbe los contaminantes a través de funciones metabólicas (Zabochnicka, 2014). Con el fin de conocer el porcentaje de Zn biosorbido por la biomasa anaerobia acidogénica, se llevó a cabo la cinética de biosorción. En botellas serológicas se agregaron 2.6 mL de BAA (cantidad que corresponde a 1 g/L de SSV), se añadieron concentraciones determinadas de 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 ppm de Zn, más un control. Se tomaron 4 mL de muestra, cada 15 minutos, en un rango de 90 minutos. Así como a las 24, 48 y 72 horas. Las muestras se centrifugaron por 10 minutos a 3500 rpm, se filtraron a un tamaño de poro de 0.2 μ . Se analizaron las disoluciones en un espectrofotómetro de

absorción atómica marca PerkinElmer modelo Analyst 400, para conocer la cantidad de Zn biosorbido.

6.4 Citometría de Flujo

La citometría de flujo se basa en el criterio más importante para distinguir entre células viables e irreversiblemente dañadas, esto mediante la interacción de fluorescencia en la membrana. Las células vivas con membranas intactas son capaces de excluir a los tintes que penetran fácilmente a las células muertas o dañadas (Kramer *et al.* 2009).

6.4.1 Suspensión de control bacteriano y levadura

Para poder determinar de manera adecuada la viabilidad de la BAA, y conociendo que está conformada por un consorcio microbiano, se dispusieron controles de bacterias y levaduras mediante caldo nutritivo y medio YPD, para *Escherichia coli* y *Candida glabrata*, respectivamente. Las cuales se incubaron por un periodo de 24 horas a 36°C, para obtener la suspensión y utilizarlas como controles.

6.4.2 Adquisición de la biomasa anaerobia acidogénica

Para llevar a cabo los estudios de citometría de flujo, se preparó un control negativo de la BAA, sin concentración de metal. El cual se obtuvo mediante la suspensión del botón celular del control de las pruebas de biosorción, este botón celular se lavó con 5 mL de buffer de fosfatos (PBS) pH7, y se eliminó el sobrenadante en una placa de calentamiento hasta evaporar el líquido excedente. La muestra seca se suspendió en 1 mL de PBS para centrifugarse a 15000 rpm, durante 5 minutos.

El botón celular de las pruebas de la cinética de biosorción, se tiñeron con 1µL de yoduro de propidio (PI), se incubaron a 15 minutos en la obscuridad, posteriormente, estas muestras se lavaron con PBS se centrifugaron a 15000

rpm por 5 minutos. Esta operación se repitió dos veces. Los botones celulares resultantes fueron suspendidos en 1 mL de PBS, y finalmente filtrados a tubos FACS para su adquisición. Este procedimiento se reiteró a las 24, 48 y 72 horas. Se determinó la viabilidad del consorcio microbiano en un citómetro de flujo (FACS Canto II; BD systems).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Caracterización Física de la Biomasa

De los resultados de la caracterización de la BAA se obtuvieron 3.95 g/L de ST, los cuales son los materiales retenidos en una muestra acuosa. Para la materia calcinada el valor fue de 0.6 g/L de SF, y la cantidad de biomasa resultante de la diferencia entre lo ST y SF fue de 3.34 g/L SSV. Las cantidades iniciales para los SSV provenientes de plantas de tratamientos de cervecería contienen de 0.26 a 0.67 g/L (Castro-González, 2001). Debido al acondicionamiento de la BAA con medio mineral, se logra incrementar.

7.2 Concentración Inhibitoria Media (CI_{50})

La concentración inhibitoria media es la concentración de metal que causa una disminución del 50 % de la actividad metabólica de los microorganismos. En la Figura VII-1 los resultados analizados muestran una respuesta metabólica de la BAA, donde se observa que fue inhibida al 50% cuando se tiene una concentración de 22 mg/L, en 48 horas.

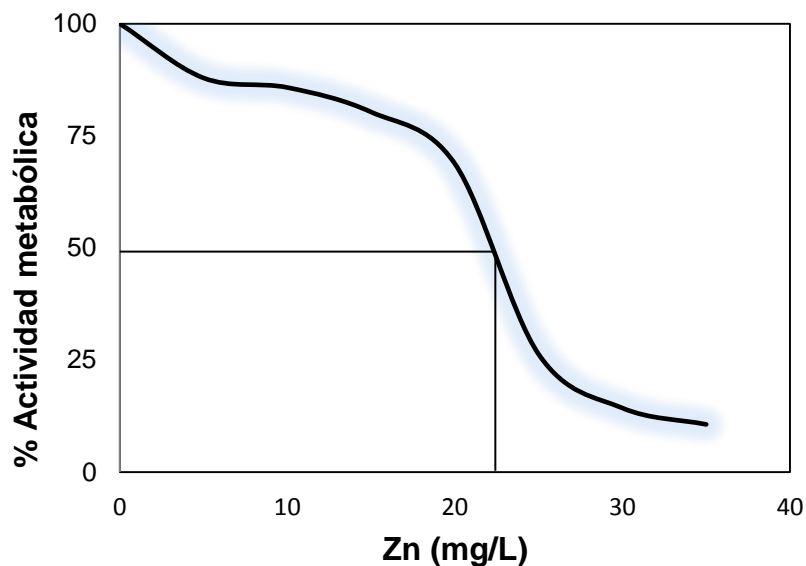


Figura VII-1. Concentración inhibitoria media

(Zayed and Winter 2000) utilizaron suero láctico como sustrato, y reportan un 50% de inhibición durante la etapa de metanización del suero, indican que la toxicidad disminuyó en el orden de cobre > zinc > níquel. Con concentraciones mayores de 40 mg/L de Zn se presenta la CI_{50} .

7.3 Cinética de Biosorción

Los resultados obtenidos de la cinética de biosorción se pueden observar en las Figuras VII-2, VII-3 y VII-4, donde se obtuvo un porcentaje aproximado, e incluso en ciertos casos, por encima del 50% de biosorción de Zn a los 90 minutos. Los resultados del estudio de biosorción a las 24 y 48 horas, muestran que con una concentración de 20 mg/L de Zn se obtiene una capacidad de biosorción de 2.927 mgZn/gSSV (Tabla B-3), y un porcentaje de biosorción mayor al 78% (Tabla B-4). Estos resultados coinciden con lo reportado por Luna, 2010, en donde se utilizó un alga *Sargassum filipendula* como bisorbente de cadmio y zinc.

Por otro lado Španělová *et al.*, 2003, reportan la biosorción para cadmio y plomo con una biomasa pre tratada, del hongo *Aspergillus niger*, en este trabajo la biomasa no tuvo ningún pre tratamiento.

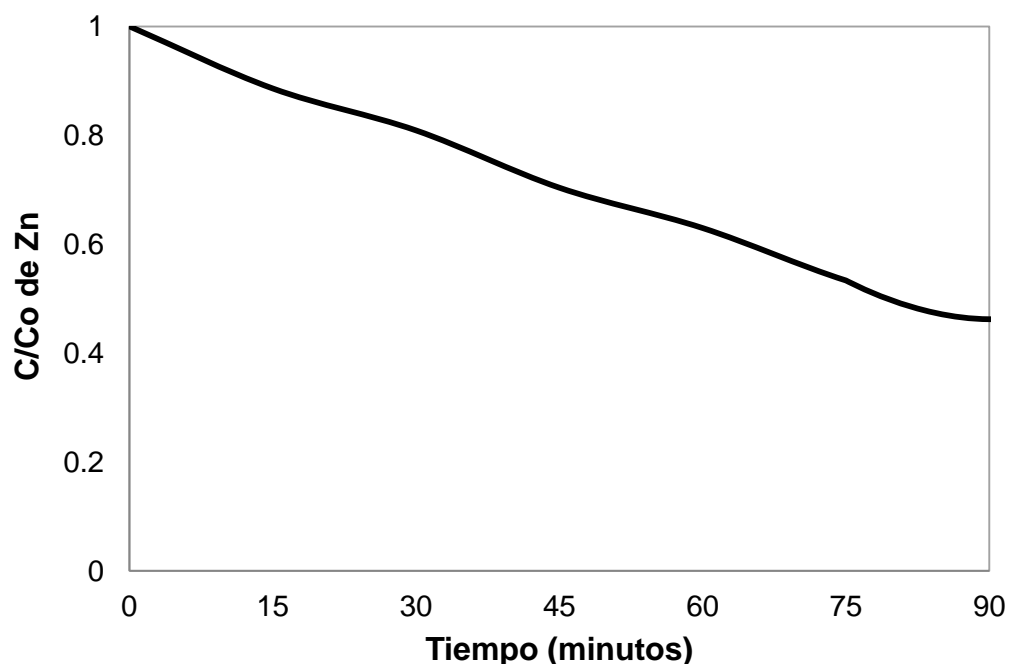


Figura VII-2. Cinética de biosorción de 5 mg/L de Zn, en 90 minutos

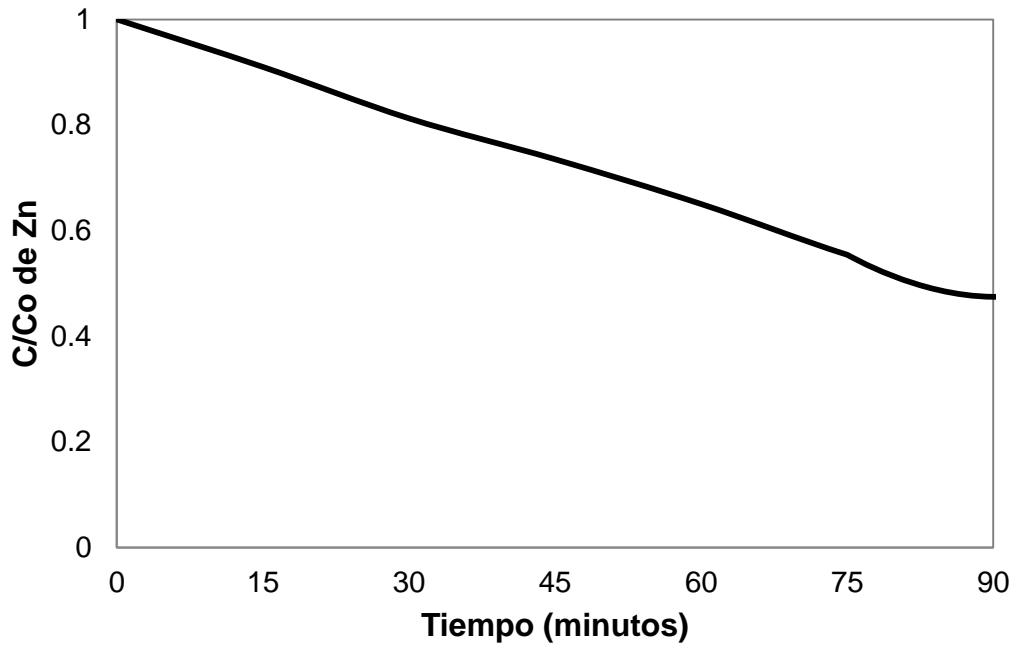


Figura VII-3. Cinética de biosorción de 20 mg/L Zn, en 90 min.

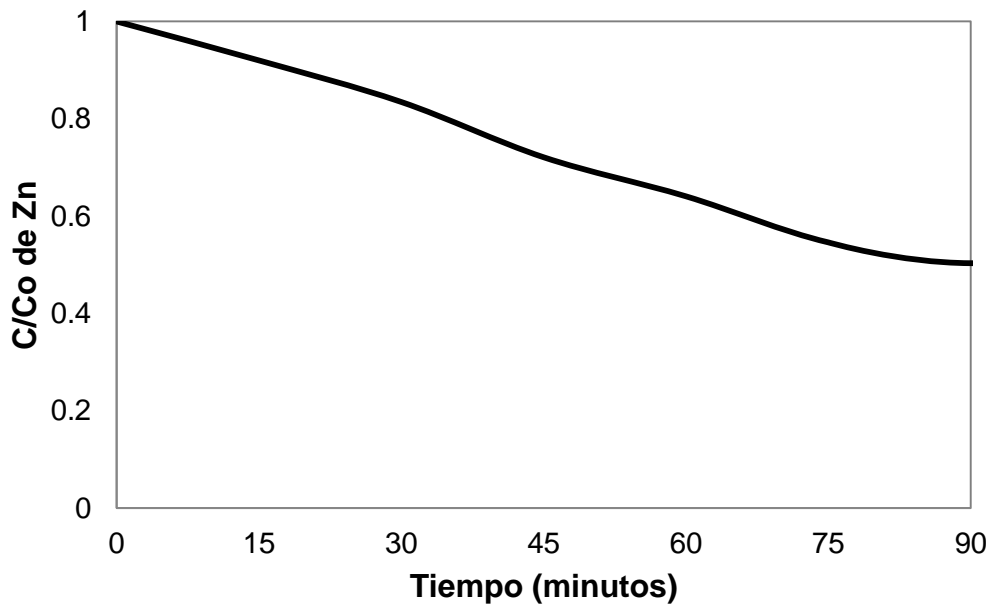


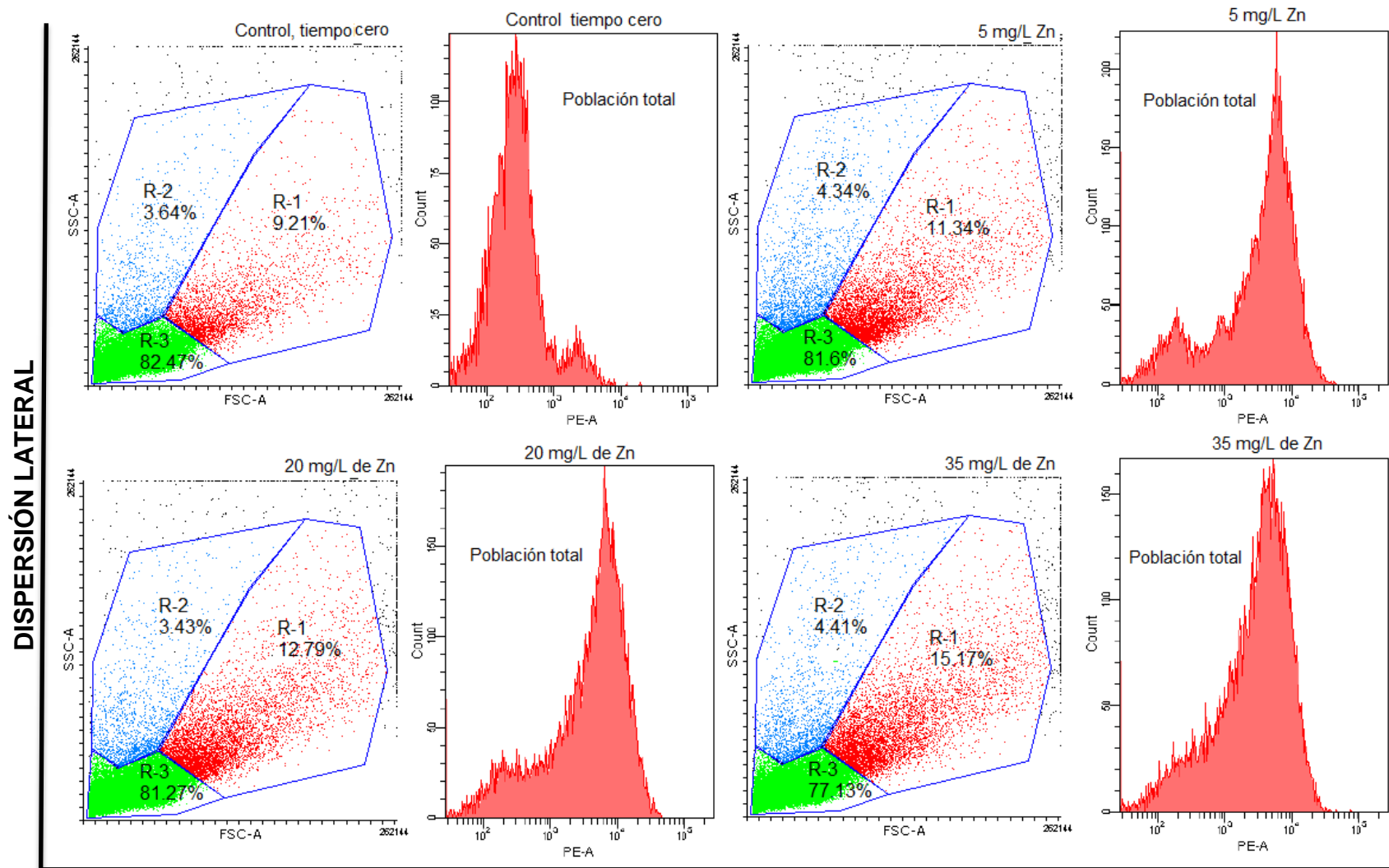
Figura VII-4. Cinética de biosorción de 35 mg/L de Zn, en 90 minutos.

7.4 Citometría de Flujo

La función del colorante yoduro de propidio (IP), es marcar células no viables resultantes de la cinética de biosorción, por lo que las células viables no son detectadas por la fluorescencia del citómetro. Es por esto, que el análisis por citometría de flujo muestra al inicio de la biosorción que existe una baja en la población microbiana.

Los resultados obtenidos para determinar la viabilidad de la BAA a tiempo cero, se muestran en las Figuras VII-5, donde se observa la fluorescencia de tres poblaciones microbianas, levaduras (R-1), bacterias (R-2) y detritos celulares (R-3). El comportamiento del consorcio microbiano en contacto con las distintas concentraciones del ion metálico es similar a tiempo cero, pero existe una variación considerable respecto a la población a las 24 y a las 48 horas (Figura VII-5, VII-6 y VII-7) con las diferentes concentraciones de ion metálico respectivamente.

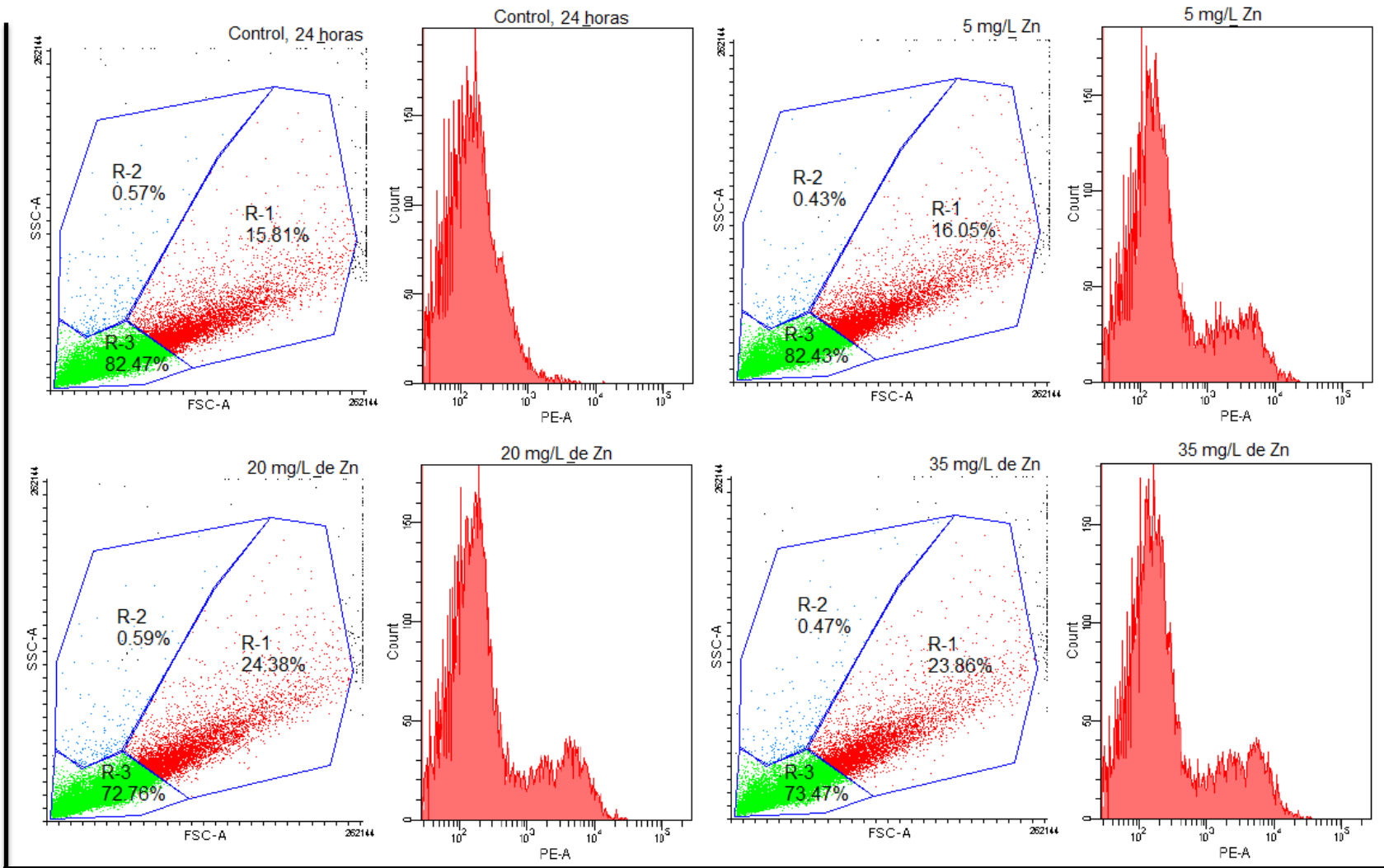
Como se puede observar el porcentaje de las células no viables disminuyó considerablemente en la región R-2, ya que no se aprecia la misma cantidad de células marcadas con el colorante IP, por lo tanto la población microbiana viable se ve favorecida con un incremento. Sin embargo, en la región R-1 se observa un porcentaje mayor de células marcadas, lo que implica que hay un efecto negativo del Zn sobre esa población. Este resultado es similar para los tiempos de 24 y 48, ya que no hay una diferencia significativa en los porcentajes de viabilidad.



DISPERSIÓN FRONTAL

Figura VII-5. Evaluación de la viabilidad a tiempo cero de operación, con concentraciones de 5, 20 y 35 mg/L Zn.

DISPERSIÓN LATERAL



DISPERSIÓN FRONTAL

Figura VII-6. Evaluación de la viabilidad de la BAA a 24 horas de exposición entre el biosorbente y el ion metálico, con concentraciones de 5, 20, 35 mg/L Zn.

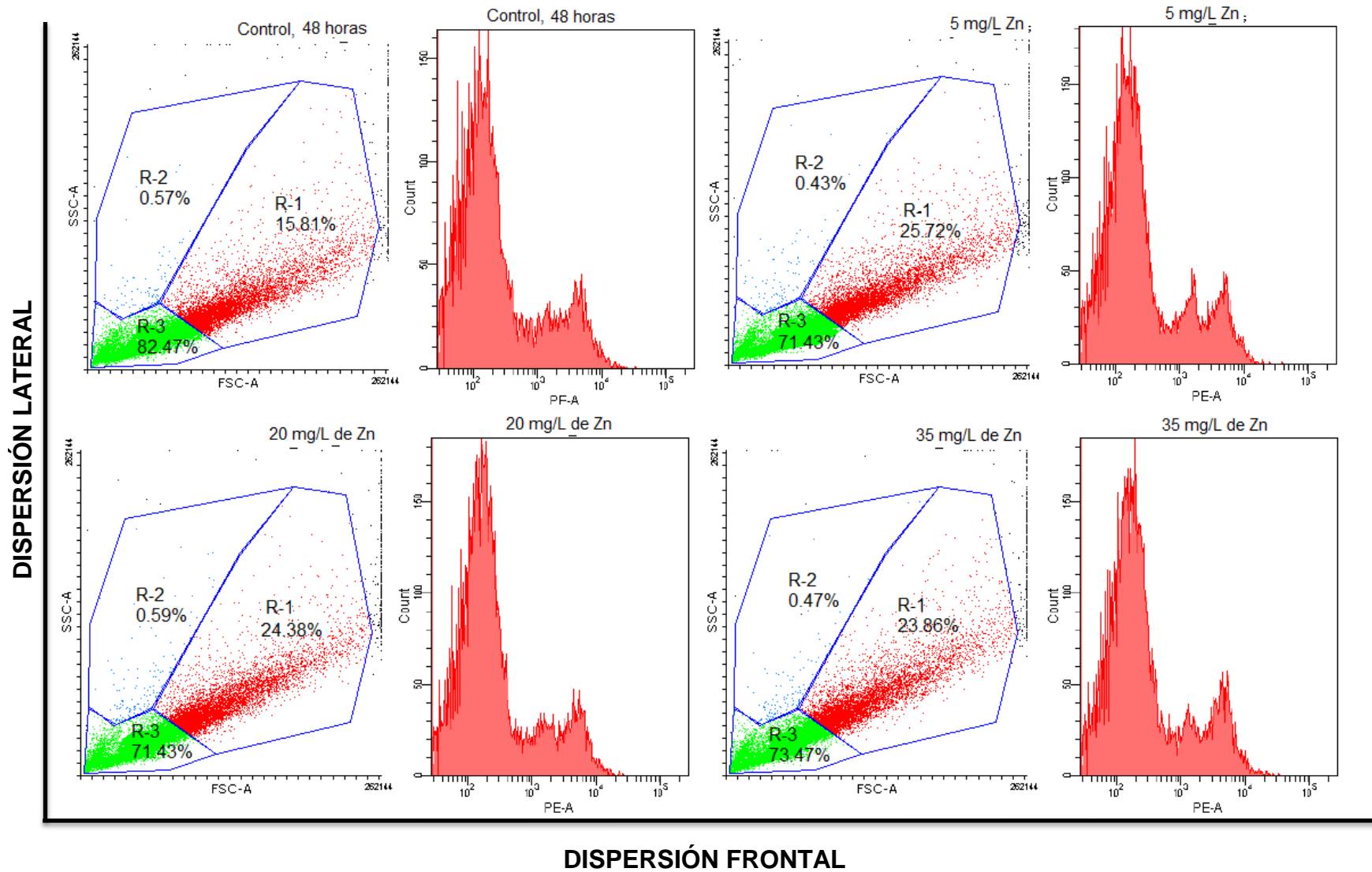


Figura VII-7. Evaluación de la viabilidad de la BAA a 48 horas de contacto con 5, 20 y 35 mg/L de Zn

VIII. CONCLUSIONES

Del análisis obtenido de la concentración inhibitoria media y del análisis de citometría, se puede concluir que la célula se adapta y se reproduce en presencia del zinc, inclusive a concentraciones que rebasan la CI_{50} . Además se concluye que la citometría de flujo es una herramienta capaz de analizar íntegramente la viabilidad y el desarrollo celular en el proceso de biosorción. Gracias a esto se pudo conocer la baja poblacional microbiana que existe al inicio de la biosorción, y de su desarrollo dentro de las primeras 48 horas.

Se logró demostrar que la biomasa anaerobia acidogénica metabólicamente activa biosorbe por encima del 50% de zinc en los primeros 90 minutos de operación, inclusive a tiempos de 24 a 48 horas se obtuvo un porcentaje de biosorción aproximadamente del 60 y 80% respectivamente.

Es importante mencionar que, la citometría de flujo es una técnica eficaz para dar seguimiento al desarrollo poblacional durante el proceso de biosorción.

Anexos

Anexo A

Tabla A-1. Composición del medio mineral

Compuesto	g/L
Dextrosa	5
NH ₄ Cl	1.044
KCl	0.270
KH ₂ PO ₄	0.169
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.150
CaCl ₂ ·H ₂ O	0.050
Extracto de Levadura	0.018

Anexo B

Curva de calibración de la dextrosa

Se prepararon soluciones de 0 a 40 mM de dextrosa, las cuales se analizaron por el método de ácido dinitrosalicílico (DNS). Las muestras se leyeron en un espectrofómeto a una longitud de onda de 570 nm.

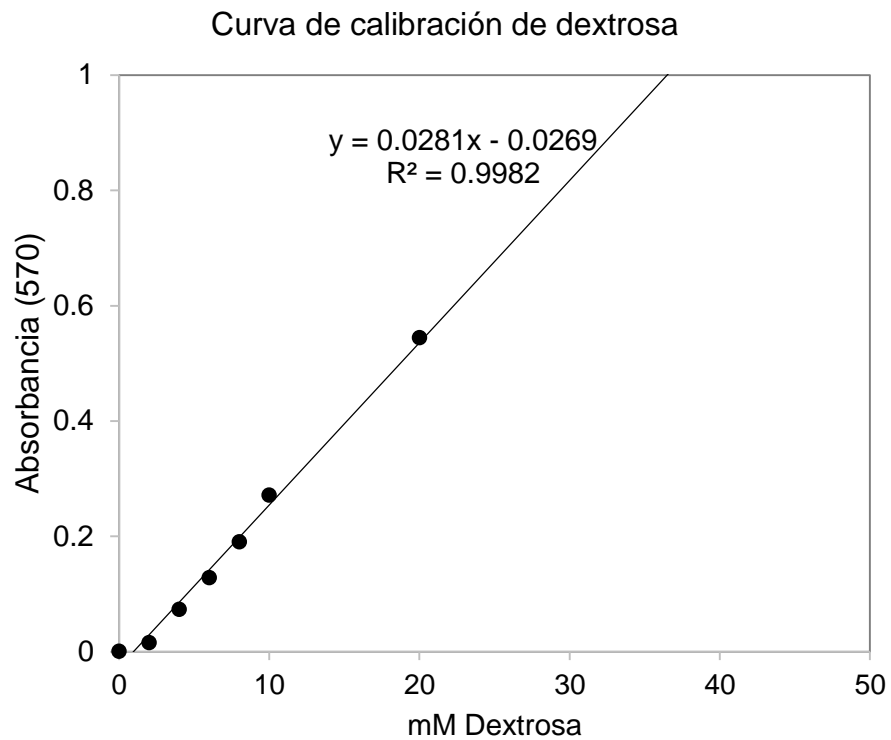


Figura B-0-1. Curva de calibración de la dextrosa

Porcentaje de biosorción

En la Tabla B-2 se muestran los resultados del estudio de biosorción.

Tabla B-2. Resultados obtenidos en la cinética de biosorción a los 90 minutos

Tiempo (min)	5 mg/L Zn		10 mg/L Zn		15 mg/L Zn	
	C	C/Co	C	C/Co	C	C/Co
0	6.75	1	12.50	1	17.50	1
15	5.98	0.89	10.81	0.86	15.87	0.91
30	5.46	0.81	9.87	0.79	14.91	0.85
45	4.75	0.70	8.74	0.70	12.92	0.74
60	4.25	0.63	7.74	0.62	11.39	0.65
75	3.60	0.53	6.75	0.54	9.75	0.56
90	3.12	0.46	5.85	0.47	8.32	0.48

Continuación Tabla B-2

Tiempo (min)	20 mg/L Zn		25 mg/L Zn		30 mg/L Zn		35 mg/L	
	C	C/Co	C	C/Co	C	C/Co	C	C/Co
0	23	1	25.90	1	33.75	1	33.75	1
15	20.93	0.91	23.78	0.92	30.82	0.91	30.82	0.91
30	18.69	0.81	21.63	0.84	27.72	0.82	27.72	0.82
45	16.91	0.74	19.27	0.74	24.70	0.73	24.7	0.73
60	14.96	0.65	17.19	0.66	22.78	0.67	22.78	0.67
75	12.75	0.55	15.15	0.58	19.20	0.57	19.2	0.57
90	10.92	0.47	13	0.50	16.38	0.49	16.38	0.49

En la Tabla B-3, se presenta la capacidad de biosorción de la biomasa anaerobia acidogénica.

Tabla B-3 Resultados de la capacidad de biosorción.

Concentración Zn (mg/L)	q (mg de Zn/g SSV)
5	0.528
10	0.963
15	1.337
20	1.796
25	2.009
30	2.5
35	2.927

Tabla B-4. Porcentaje de Zn biosorbido por la biomasa anaerobia acidogénica

Tiempo (h)	5 mg/L Zn	10 mg/L Zn	15 mg/L Zn	20 mg/L Zn	25 mg/L Zn	30 mg/L Zn	35 mg/L Zn
	%	%	%	%	%	%	%
0	0	0	0	0	0	0	0
3.75	53.78	53.20	52.46	52.52	49.81	51.47	49.67
24	62.52	61.28	60.40	63.65	57.95	59.59	59.95
48	70.67	68.68	68.63	70.26	69.77	66.93	67.69
72	78.22	77.04	76.40	78.09	77.57	74.07	75.05

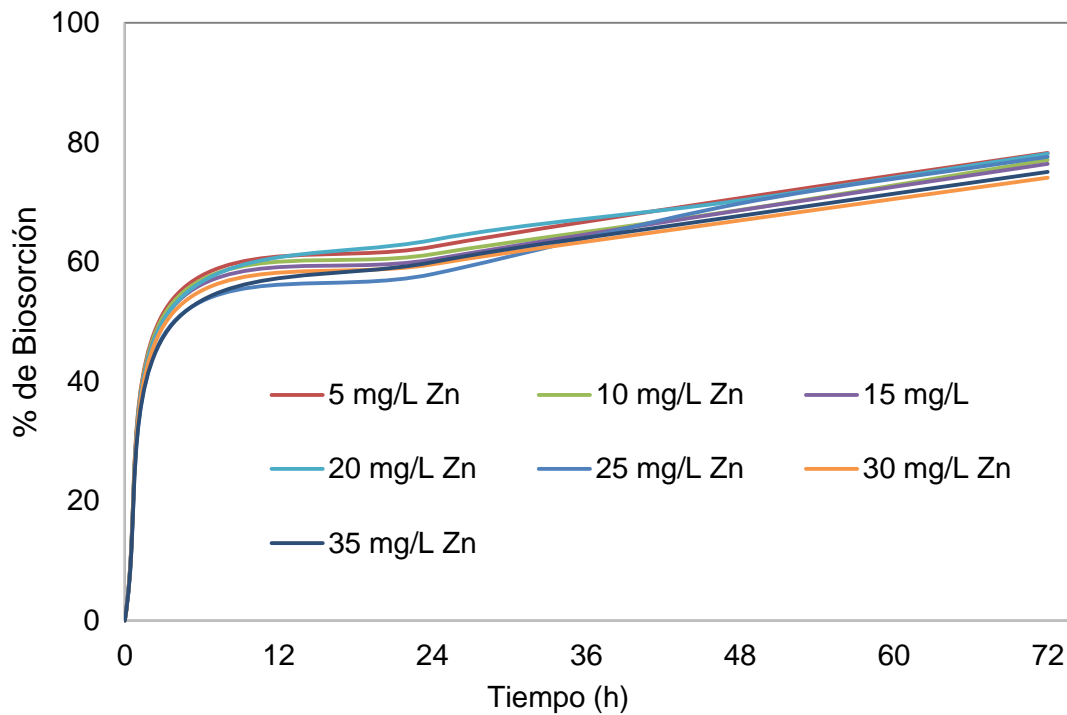


Figura B-0-2. Porcentaje de Zn biosorbido por la biomasa después de la cinética de biosorción.

BIBLIOGRAFÍA

- APHA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1998, Washington D.C. USA: American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environmental Federation
- Barakat, M. A. 2011a. "New trends in removing heavy metals from industrial wastewater." *Arabian Journal of Chemistry* no. 4 (4):361-377.
- Barrera Ramírez, Lourdes María, Ma Elisa Drago Serrano, Julia Pérez Ramos, Teresa Del Rosario Sainz Espuñes, Ana Cecilia Zamora, Fabiola Gómez Arroyo, and Felipe Mendoza Pérez. 2004. "Citometría de Flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica." *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias* no. 17:42-55.
- Bicen, Pelin. 2015. "Consumer Perceptions of Quality, Risk, and Value: A Conceptual Framework." In *Revolution in Marketing: Market Driving Changes*, edited by Harlan E. Spotts, 1-1. Springer International Publishing.
- Blanco Hernández, Angel Luis, Dionisio Alonso Gutiérrez, Oroncio Jiménez de Blas, Margarita Santiago Guervós, and Benito de Miguel Manzano. 1998. "Estudio de los niveles de plomo, cadmio, zinc y arsénico, en aguas de la provincia de Salamanca." *Revista Española de Salud Pública* no. 72:53-65.
- Cazón, J. Plaza, M. Viera, E. Donati, and E. Guibal. 2013. "Zinc and cadmium removal by biosorption on *Undaria pinnatifida* in batch and continuous processes." *Journal of environmental management* no. 129:423-434.
- Certucha Barragán, María Teresa, Evelia Acedo-Félix, Onofre Monge-Amaya, Jesús Leobardo Valenzuela-Garcíab, Francisco Javier Almendariz-Tapia, and Ana Lilia Leal-Cruz. 2009. "Copper bioaccumulation in an upflow anaerobic sludge blanket reactor." *Chemical Speciation & Bioavailability* no. 21 (3):161-164.

- Certucha Barragán, M. T., E. Acedo-Félix, F. J. Almendariz Tapia, A. L. Leal Cruz, R. Pérez-Moreno, J. L. Valenzuela García, O. Monge-Amaya. 2010. "Iron Influence on copper biosorption using anaerobic sludge and its microstructural characterization." *Mineral Processing & Extractive Metallurgy Review* no. 32 (1):60-67.
- Certucha Barragán, María Teresa, Glenda Duarte-Rodríguez, Evelia Acedo-Félix, F. Javier Almendariz-Tapia, Onofre Monge-Amaya, Jesús L. Valenzuela-García, and A. L. Leal-Cruz. 2010. "Bioadsorción de cobre utilizando lodo anaerobio acidogénico." *Revista internacional de contaminación ambiental* no. 26 (2):101-108.
- Chen, Ye, Jay J. Cheng, and Kurt S. Creamer. 2008. "Inhibition of anaerobic digestion process: A review." *Bioresource Technology* no. 99 (10):4044-4064. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.057>.
- Chojnacka, Katarzyna. 2010. "Biosorption and bioaccumulation—the prospects for practical applications." *Environment International* no. 36 (3):299-307.
- Cid Blanco, Ángeles, Dolores Franqueira, Miguel Orosa García, and Enrique Torres. 1999. "La citometría de flujo como herramienta para el estudio del efecto tóxico de diferentes contaminantes sobre microalgas."
- Cortón, Eduardo, and Alberto Viale. 2006. "Solucionando grandes problemas ambientales con la ayuda de pequeños amigos: las técnicas de biorremediación." *Revista Ecosistemas* no. 15 (3).
- Czechowska, Kamila, David R. Johnson, and Jan Roelof van der Meer. 2008. "Use of flow cytometric methods for single-cell analysis in environmental microbiology." *Current Opinion in Microbiology* no. 11 (3):205-212. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2008.04.006>.
- Das, Nilanjana, R. Vimala, and P. Karthika. 2008. "Biosorption of heavy metals—an overview." *Indian journal of Biotechnology* no. 7 (2):159-169.
- Dotto, Guilherme Luiz, Jorge Alberto Vieira Costa, and Luiz Antonio de Almeida Pinto. 2013. "Kinetic studies on the biosorption of phenol by nanoparticles from *Spirulina* sp. LEB 18." *Journal of Environmental Chemical*

- Engineering* no. 1 (4):1137-1143.
- Díaz, Mario, Mónica Herrero, Luis A. García, and Covadonga Quirós. 2010. "Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses." *Biochemical Engineering Journal* no. 48 (3):385-407. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2009.07.013>.
- Díaz Martínez, Vicente., and Mari Carmen Mantos. 2011. *Citometría de Flujo: Midiendo Células*. Biotech Spain.
- Estevez, M. Carmen, Marinus A. Otte, Borja Sepulveda, and Laura M. Lechuga. 2014. "Trends and challenges of refractometric nanoplasmonic biosensors: A review." *Analytica chimica acta* no. 806:55-73.
- Figueroa Torres, Gonzalo M., Maria T. Certucha Barragán, Francisco J. Almendariz Tapia, Onofre Monge Amaya, Evelia Acedo Félix, Martín I. Pech Canul, Ana L. Leal-Cruz, and Carlos I. VillaVelázquez-Mendoza. 2014. "Effect of Copper and Iron on Acidogenic Biomass in an Anaerobic Packed Bed Reactor." *Advances in Bioscience and Biotechnology* no. 5 (06):564.
- Foladori, P., L. Bruni, S. Tamburini, and G. Ziglio. 2010. "Direct quantification of bacterial biomass in influent, effluent and activated sludge of wastewater treatment plants by using flow cytometry." *Water research* no. 44 (13):3807-3818.
- Gasca Estefanía, Luis Antonio. 2013. *Evaluación de la Citometría de Flujo como una Herramienta para Analizar el Efecto del Manganeseo en una Biomasa Anaerobia Acidogénica*. Universidad de Sonora.
- González, John Mario. 2012. "IV Congreso Internacional de Aplicaciones en Citometría de flujo: presente y futuro del análisis celular." *Biomédica* no. 30:9-10.
- Gómez, Ángela María Carvajal, Leidy Johana Jiménez Coqueco, Vladimir Arias Ramírez, Hoover Albeiro Valencia Hoover Albeiro Valencia, and Hoover Albeiro Valencia. 2013. "Evaluación de la degradación por Fotocatálisis heterogénea del Ácido 3, 5-dinitrosalicílico." *Scientia et Technica* no. 18

(1):206-212.

- Halaimi, F. Z., Y. Kellali, M. Couderchet, and S. Semsari. 2014. "Comparison of biosorption and phytoremediation of cadmium and methyl parathion, a case-study with live *Lemna gibba* and *Lemna gibba* powder." *Ecotoxicology and Environmental Safety* no. 105 (0):112-120. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.02.002>.
- Hammes, Frederik, Michael Berney, Yingying Wang, Marius Vital, Oliver Köster, and Thomas Egli. 2008. "Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes." *Water Research* no. 42 (1–2):269-277. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2007.07.009>.
- Hernández Mata, Karla Miriam, Onofre Monge Amaya, María Teresa Certucha Barragán, Francisco Javier Almendariz Tapia, and Evelia Acedo Félix. 2013. "Metallic Biosorption Using Yeasts in Continuous Systems." *International Journal of Photoenergy*:1-4. doi: 10.1155/2013/578729.
- Hidalgo, José Celis, Julio Junod Montano, and Marco Sandoval Estrada. 2005. "Recientes Aplicaciones De La Depuración De Aguas Residuales Con Plantas Acuáticas, no. 14 (1):17-25.
- Hijosa Valsero, María, Ricardo Molina, Hendrik Schikora, Michael Müller, and Josep M. Bayona. 2013. "Removal of cyanide from water by means of plasma discharge technology." *Water Research* no. 47 (4):1701-1707. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.01.001>.
- Hoefel, Daniel, Warwick L. Grooby, Paul T. Monis, Stuart Andrews, and Christopher P. Saint. 2003. "Enumeration of water-borne bacteria using viability assays and flow cytometry: a comparison to culture-based techniques." *Journal of Microbiological Methods* no. 55 (3):585-597. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00201-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00201-X).
- Hosseini, Sara, Mohamad Rasool Malekbala, Soraya Hosseini, Farahnaz Eghbali Babadi, Sepideh Keshan Balavandy, and Mohammad Amin Shavandi. 2013. "Biosorption of azoimide on almond integument:

- Kinetics, isotherm and thermodynamics studies." *Journal of Environmental Chemical Engineering* no. 1 (4):696-702.
- Jadeja, Ravindra. 2012. "A study of anaerobic organisms in clinically suspected cases of anaerobic infections."
- Kaushik, Garima. 2015. "Bioremediation of Industrial Effluents: Distillery Effluent." In *Applied Environmental Biotechnology: Present Scenario and Future Trends*, edited by Garima Kaushik, 19-32. Springer India.
- Kramer, Mateja, Nataša Obermajer, Bojana Bogovič Matijašić, Irena Rogelj, and Vojko Kmetec. 2009. "Quantification of live and dead probiotic bacteria in lyophilised product by real-time PCR and by flow cytometry." *Applied Microbiology and Biotechnology* no. 84 (6):1137-1147. doi: 10.1007/s00253-009-2068-7.
- Li, Qiurong, Hongxiao Lu, Haiyan Xiao, Kaisha Gao, and Mengmeng Diao. 2013. "Adsorption capacity of superabsorbent resin composite enhanced by non-thermal plasma and its adsorption kinetics and isotherms to lead ion in water." *Journal of Environmental Chemical Engineering* no. 1 (4):996-1003.
- Luna, Aderval S., André L. H. Costa, Antonio Carlos A. da Costa, and Cristiane A. Henriques. 2010. "Competitive biosorption of cadmium (II) and zinc (II) ions from binary systems by *Sargassum filipendula*." *Bioresource Technology* no. 101 (14):5104-5111.
- Madigan, M.T., Martinko, J y Parker, J., 2003, BROCK *Biología de los microorganismos*, Madrid, Pearson Educación.
- Manyi-Loh, Christy E., Sampson N. Mamphweli, Edson L. Meyer, Anthony I. Okoh, Golden Makaka, and Michael Simon. 2013. "Microbial anaerobic digestion (bio-digesters) as an approach to the decontamination of animal wastes in pollution control and the generation of renewable energy." *International journal of environmental research and public health* no. 10 (9):4390-4417.

- Martelo, Jorge, and Jaime A. Lara Borrero. "Macrófitas flotantes en el tratamiento de aguas residuales: una revisión del estado del arte."
- McEldowney, Sharron. 2000. "The impact of surface attachment on cadmium accumulation by *Pseudomonas fluorescens* H2." *FEMS microbiology ecology* no. 33 (2):121-128.
- Mishra, Vishal. 2014a. "Biosorption of zinc ion: a deep comprehension." *Applied Water Science*:1-22.
- Mohee, Romeela, and Nuhaa Soobhany. 2014. "Comparison of heavy metals content in compost against vermicompost of organic solid waste: Past and present." *Resources, Conservation and Recycling* no. 92 (0):206-213. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resconrec.2014.07.004>.
- Monge-Amaya, Onofre, Jesús L. Valenzuela-García, Evelia Acedo-Félix, María T. Certucha-Barragán, and Francisco J. AlmendáRiz-Tapia. 2008. "Biosorción de cobre en sistema por lote y continuo con bacterias aerobias inmovilizadas en zeolita natural (clinoptilolita)." *Revista internacional de contaminación ambiental* no. 24 (3):107-115.
- Monge Amaya, O., Certucha Barragán M. T., Almendariz Tapia, F. J. 2013. *Microbial Biomass in Batch and Continuous System*. Intech.
- Mudhoo, A., and S. Kumar. 2013. "Effects of heavy metals as stress factors on anaerobic digestion processes and biogas production from biomass." *International Journal of Environmental Science and Technology* no. 10 (6):1383-1398.
- Méndez Novelo, Roger Iván, Elba René Castillo Borges, María Rosa Sauri Riancho, Carlos Alberto Quintal Franco, Germán Giácoman Vallejos, and Blanca Jiménez Cisneros. 2009. "Comparación de cuatro tratamientos fisicoquímicos de lixiviados." *Revista internacional de contaminación ambiental* no. 25 (3):133-145.
- Nguyen, Thai Anh, and Ruey-Shin Juang. 2013. "Treatment of waters and wastewaters containing sulfur dyes: A review." *Chemical Engineering Journal* no. 219:109-117.

- Oncel, M. S., A. Muhcu, E. Demirbas, and M. Kobya. 2013. "A comparative study of chemical precipitation and electrocoagulation for treatment of coal acid drainage wastewater." *Journal of Environmental Chemical Engineering* no. 1 (4):989-995.
- Park, Donghee, Yeoung-Sang Yun, and Jong Moon Park. 2010. "The past, present, and future trends of biosorption." *Biotechnology and Bioprocess Engineering* no. 15 (1):86-102.
- Quesada, Jorge, Laura Faba, Eva Díaz, and Salvador Ordóñez García. 2014. "La biomasa como alternativa al petróleo para la obtención de productos químicos: acetona y etanol como moléculas plataforma." *Avances en Ciencias e Ingeniería* no. 5 (2):31-49.
- Rao, Sudhakar M. 2011. "Reverse Osmosis." *Resonance* no. 16 (12):1333-1336. doi: 10.1007/s12045-011-0151-8.
- Santos Romo Alvaro, Sau Acosta Nancy Janeth, Certucha Barragán María Teresa, Almendáriz Tapia Francisco Javier, Monge Amaya Onofre, Hernández López Jorge, and Zepeda Ibarra Joel. 2014. "Microbiological Identification of Atmospheric Particles in Hermosillo, Sonora, México." *Journal of Environmental Protection* no. 2014.
- Schiewer, Silke, and Santosh B. Patil. 2008. "Pectin-rich fruit wastes as biosorbents for heavy metal removal: equilibrium and kinetics." *Bioresource Technology* no. 99 (6):1896-1903.
- Silva, Verónica veronicasv gmail com, Edwin Poiesz, and Peter Heijden. 2013. "Industrial wastewater desalination using electrodialysis: evaluation and plant design." *Journal of Applied Electrochemistry* no. 43 (11):1057-1067. doi: 10.1007/s10800-013-0551-4.
- Španělová, M., V. Machovič, and M. Březina. 2003. "Characterization and sorption properties of *Aspergillus niger* waste biomass." *Central European Journal of Chemistry* no. 1 (3):192-200. doi: 10.2478/BF02476223.
- Tracy, Bryan P., Stefan M. Gaida, and Eleftherios T. Papoutsakis. 2010. "Flow

- cytometry for bacteria: enabling metabolic engineering, synthetic biology and the elucidation of complex phenotypes." *Current Opinion in Biotechnology* no. 21 (1):85-99. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2010.02.006>.
- Valdivia, Raphael H., and Stanley Falkow. 1998. "Flow cytometry and bacterial pathogenesis." *Current Opinion in Microbiology* no. 1 (3):359-363. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5274\(98\)80042-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5274(98)80042-8).
- Vicente, Díaz Martínez. 2011. Citometría de Flujo: Midiendo Células. In *Analysis of cellular DNA content by flow and lase scanning cytometry* edited by Martos Mari Carmen.
- Volesky, Bohumil, and Z. R. Holan. 1995. "Biosorption of heavy metals." *Biotechnology progress* no. 11 (3):235-250.
- Volesky, Bohumil. 2007. "Biosorption and me." *Water research* no. 41 (18):4017-4029.
- Winson, Michael K., and Hazel M. Davey. 2000. "Flow Cytometric Analysis of Microorganisms." *Methods* no. 21 (3):231-240. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2000.1003>.
- Zabochnicka-Świątek, Magdalena, and Małgorzata Krzywonos. 2014. "Potentials of Biosorption and Bioaccumulation Processes for Heavy Metal Removal." *Mercury* no. 6 (5,245):1-145.
- Zayed, G., and J. Winter. 2000. "Inhibition of methane production from whey by heavy metals – protective effect of sulfide." *Applied Microbiology and Biotechnology* no. 53 (6):726-731. doi: 10.1007/s002530000336.