

*Efecto de los metales pesados cadmio y níquel sobre la producción de metano de un lodo anaerobio a escala de laboratorio**

Recibido para evaluación: 19 de Septiembre de 2005
Aceptación: 24 de Noviembre de 2005
Recibido versión final: 09 de Diciembre de 2005

Beatriz Amparo Wills¹
Camilo Castro²
James Londoño²
Felipe Morales²

RESUMEN

El objetivo principal de la investigación fue encontrar las concentraciones efectivas de cadmio y níquel que inhibieran en un 50% la producción de metano de un lodo anaerobio. El experimento consistió en someter el lodo al efecto de 10 concentraciones de cada metal, escogidas a partir de una serie geométrica aplicada a un intervalo de concentraciones obtenidas en ensayos preliminares; simultáneamente por cada metal se evaluó un control. Para el cálculo de las concentraciones efectivas se utilizó el método probit modificado. La concentración efectiva encontrada para el níquel fue de 526.8 mg/l en un intervalo de 403.8 mg/L a 690.6 mg/L y para el cadmio fue de 54.2 mg/l en un intervalo de 47.7 mg/L a 60.9 mg/L. Con base en resultados anteriores se puede concluir que el cadmio es más tóxico que el níquel, lo que se corrobora con los resultados que a concentraciones de níquel menores a 20 mg/L, se presentó un efecto estimulante sobre la producción de metano durante todo el tiempo del ensayo.

PALABRAS CLAVE: Toxicidad; Metales Pesados, Inhibición, Metanización, Digestión Anaerobia, Tratamiento Biológico del Agua.

ABSTRACT

The purpose of this research was to find the effective concentrations of cadmium and Nickel that inhibited the methane production of an anaerobic mud to a 50% (fifty percent). The experiment was to subject the mud to the effect of ten concentrations of each metal selected from a geometrical series applied to an interval of concentrations obtained from preliminary tests, simultaneously for the metal a control was evaluated. To calculate the effective concentrations, the modified probit method was used. The effective concentration for Nickel was 526.8 mg/l in an interval of 403.8 mg/l to 690.6 mg/l and the concentration for cadmium was 54.2 mg/l in an interval of 47.7 mg/l to 60.9 mg/l. Based on the previous results it is possible to infer that cadmium is more toxic than nickel. This can be proved with the obtained results that in nickel concentrations smaller than 20 mg/l, a stimulating effect on the methane production occurred during the testing time.

KEY WORDS: Toxicity, Heavy Metals, Inhibition, Methanisation, Anaerobic Digestion, Biological Waste Treatment.

** Investigación realizada por el Grupo de Ingeniería y Gestión Ambiental GIGA de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Antioquia, en el marco del proyecto de sostenibilidad aprobado por la Vicerrectoría de Investigaciones en el año 2004*

1. MSc. Ingeniería Ambiental, Profesora, Universidad de Antioquia - Colombia. bwills@udea.edu.co

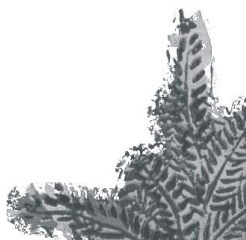
2. Ingenieros Sanitarios, Universidad de Antioquia - Colombia.

1. INTRODUCCIÓN

Los sistemas de tratamiento biológicos anaerobios se consideran frente a los sistemas aerobios una mejor alternativa para resolver de manera adecuada el problema de la gestión de aguas residuales toda vez que cuenta con ventajas comparativas tales como: baja generación de biomasa (lodos), 5 a 10 veces menos; bajo requerimiento de área; tolerancia de altas cargas orgánicas; bajos requerimiento de nutrientes; aptitud para el tratamiento intermitente e incluso estacional. Sin embargo, desventajas como la alta susceptibilidad a la inhibición bacteriana por un gran número de compuestos, son una interferencia que es necesario evaluar cuidadosamente para tomar una decisión al respecto. Un caso particular de estas interferencias lo constituyen los metales pesados adsorbidos sobre la materia orgánica en forma de: iones solubles, complejos orgánicos o precipitados que pueden interferir los grupos tróficos bacterianos con un consecuente bloqueo o muerte de los mismos.

Con base en una amplia revisión sobre el tema de la interferencia de los metales pesados en el tratamiento biológico anaerobio de aguas residuales, en el año 2000, el Grupo de Ingeniería y Gestión Ambiental -GIGA- de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Antioquia, en su laboratorio de biotecnología ambiental, emprendió el estudio del efecto tóxico de metales pesados sobre el metabolismo bacteriano anaerobio. Con el fin de materializar el propósito se realizaron simultáneamente dos estudios en los cuales se evaluaron el cadmio y níquel en un sistema continuo y el cromo y plomo en un sistema estático. Una vez terminados los estudios y evaluadas las metodologías, se concluyó que con el sistema estático se pueden obtener resultados comparables y reproducibles; en consecuencia se tomó la decisión de realizar nuevamente la investigación del efecto tóxico del cadmio y níquel sobre la producción de metano de un lodo anaerobio utilizando este método.

Las concentraciones efectivas que inhibieron en un 50% la producción de metano de un lodo anaerobio fueron: 526.8 mg/l para níquel en un intervalo de 403.8 mg/L a 690.6 mg/L y 54.2 mg/l para cadmio en un intervalo de 47.7 mg/L a 60.9 mg/L; y se encontró que para concentraciones menores a 20 mg/l de níquel se presentó un efecto estimulante sobre el sistema. Estos resultados permiten concluir que el cadmio es más tóxico que el níquel y se verificó el supuesto teórico de que para un adecuado metabolismo bacteriano se requiere la presencia de cantidades micro de metales pesados.



2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

El inóculo para los ensayos de toxicidad se tomó de tres reactores anaerobios de flujo ascendente y manto de lodos (UASB), (ver Figura 1), operados a escala de laboratorio, previamente estabilizados y funcionando bajo las mismas condiciones de la investigación de Wills y Naranjo, 2003: demanda química de oxígeno (DQO) del afluente 1200 mg.L⁻¹; remoción 84 %; tiempo de retención hidráulica (TRH) 16 h; velocidad ascensional 0.11 m.h⁻¹ y carga orgánica volumétrica (COV) 1.84 Kg DQO.m⁻³.d⁻¹.

En los ensayos de actividad metanogénica específica (AME), biodegradabilidad del sustrato y ensayo de toxicidad se utilizaron botellas serológicas de 60 mL, como las ilustradas en la Figura 2. Las botellas simulaban reactores UASB, pero en condiciones estáticas de operación y selladas herméticamente para poder cuantificar el metano producido.

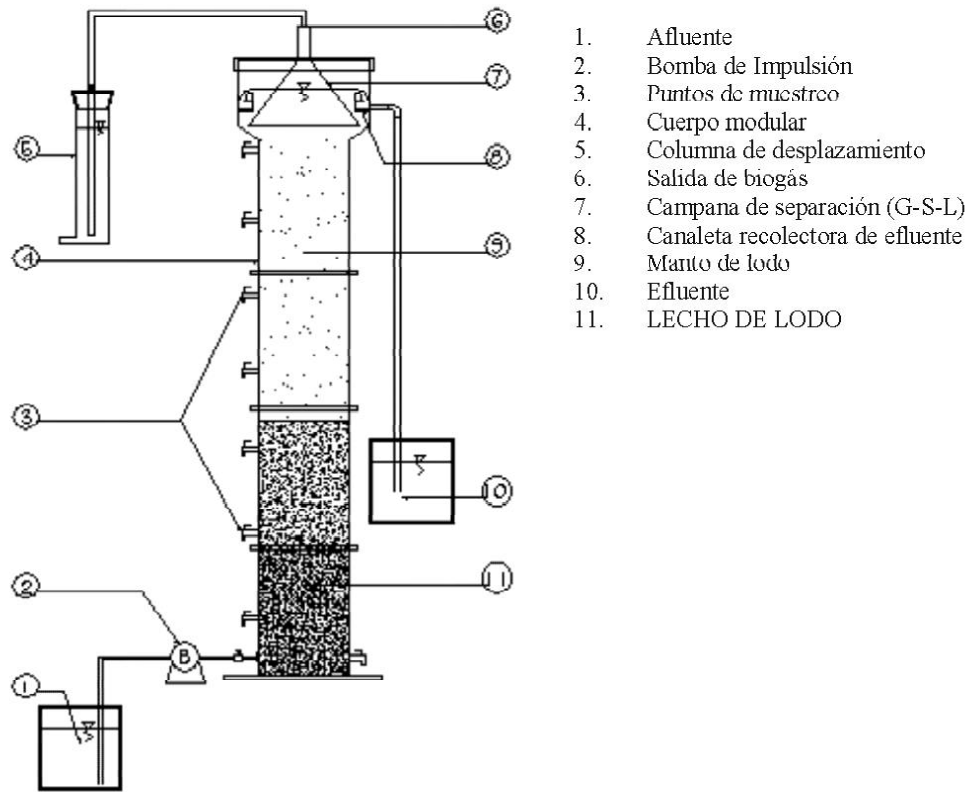


Figura 1.
Esquema de un reactor UASB a escala de laboratorio



Figura 2.
Unidad Experimental

2.2. Métodos

2.2.1. Ensayo de degradabilidad del sustrato.

Se realizó un ensayo preliminar de degradabilidad para definir el tiempo de contacto necesario para evaluar la toxicidad de los metales; se utilizó como sustrato una solución de ácido acético Merck grado analítico de 100% de pureza, con una demanda química de oxígeno de 4.0 g L⁻¹. El montaje utilizado se ilustra en la Figura 3, y es similar al realizado para el ensayo de actividad metanogénica específica (AME) propuesto por Díaz B., 1997, pero a temperatura ambiente (24 - 26 °C), y con un volumen de 30 mL en cada botella, volumen que incluía el sustrato (ácido acético), los nutrientes inorgánicos referidos en la Tabla 1, el inoculo (lodo anaerobio proveniente de los reactores UASB estabilizados) y agua destilada; el resto de volumen sirvió para la acumulación del metano. El ensayo se hizo por duplicado y a cada muestra le correspondía un control, el cual sólo contenía lodo y agua destilada.

Para garantizar las condiciones anaerobias dentro de las botellas serológicas, se realizó un intercambio de gases (se desplazaba el oxígeno por una mezcla de nitrógeno y dióxido de carbono).

Tabla 1.
Nutrientes inorgánicos
adicionados al sustrato.

Compuesto*	mg.L ⁻¹	Compuesto*	mg.L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	35.52	MnSO ₄ .4H ₂ O	1.80
KH ₂ PO ₄	21.60	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.60
NH ₄ Cl	81.60	FeSO ₄ .7H ₂ O	2.40
MgSO ₄ .7H ₂ O	10.80	NiSO ₄ .6H ₂ O	0.29
CaCl ₂ .2H ₂ O	7.20	Na ₂ MoO ₄	0.14
CoCl ₂ .H ₂ O	2.16		

*Marca Merck grado analítico o reactivo

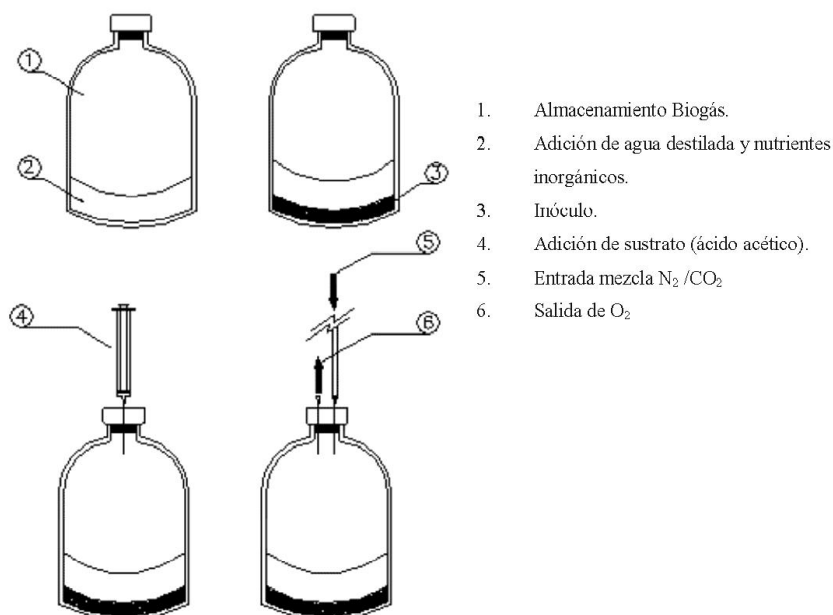


Figura 3.
Montaje utilizado en el ensayo
de degradabilidad

La degradación del ácido acético se evaluó indirectamente a partir de su conversión a metano y su producción se cuantificó por cromatografía de gases (cromatógrafo Hewlett Packard 6890 equipado con detector de ionización de llama, ver Figura 4.). Se calculó la tasa de producción de metano y el ensayo se detuvo cuando dicha tasa presentó una tendencia a disminuir.

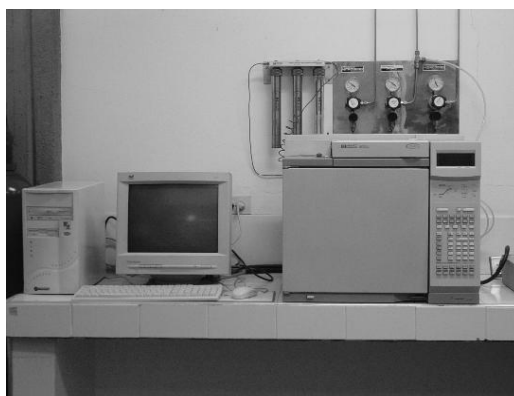


Figura 4.
Cromatógrafo Hewlett Packard 6890 equipado con detector de ionización de llama

2.2.2. Ensayo de toxicidad

Para cada metal, cadmio y níquel, se evaluaron diez concentraciones, sin incluir el control, escogidas a partir de una serie geométrica aplicada a un intervalo de concentraciones obtenido en los ensayos preliminares. En este intervalo el límite inferior correspondió a una concentración de metal que producía una inhibición en la producción de metano entre 0% y 10%, mientras que el límite superior correspondió a una concentración de metal que producía una inhibición entre 90% y 100%.

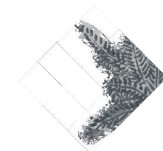
El ensayo de toxicidad se realizó en botellas serológicas de 60 ml, los cationes metálicos Ni^{2+} y Cd^{2+} se aplicaron a partir de cloruro de níquel hexahidratado ($\text{Cl}_2\text{Ni}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y cloruro de cadmio 2,5 aguas ($\text{Cl}_2\text{Cd}\cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$). El montaje experimental es igual al del ensayo de biodegradabilidad, con la diferencia que a los tratamientos se les agregaba Ni^{2+} ó Cd^{2+} en la concentración previamente definida, pero manteniendo siempre un volumen final de 30 mL.

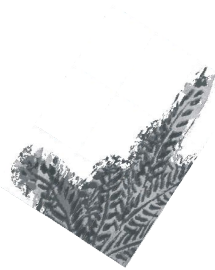
La inhibición se estimó comparando la producción de metano del control con la de los tratamientos; El tiempo total del ensayo, 96 horas, fue el obtenido en el ensayo de degradabilidad del sustrato. A partir de las cero horas y cada 24 horas se midió la producción de metano durante todo el periodo del ensayo.

2.2.3. Método estadístico para el cálculo de la CE_{50}

Para la determinación de la CE_{50} se utilizó el método Probit (Finney, 1952), debido a que éste es ampliamente usado en la determinación de toxicidad aguda (CL_{50}) de sustancias químicas, y adicionalmente este método permite estimar concentraciones efectivas (CE_{50}) a través de los efectos inhibitorios de dichas sustancias. El método Probit consiste en una serie de procedimientos estadísticos para analizar datos de experimentos de toxicidad aguda y se fundamenta en una distribución normal alrededor de los porcentajes de mortalidad. Este método proporciona una estimación de la CL_{50} de una sustancia tóxica y permite probar la precisión de esta estimación, pero como se mencionó anteriormente en esta investigación se utilizó para determinar la CE_{50} ya que la respuesta a la toxicidad no se cuantificó con base en la mortalidad de los microorganismos, sino que se evaluó indirectamente a través de la inhibición en la producción de metano.

Antes de desarrollar este método se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) para comparar los efectos de las diferentes concentraciones evaluadas y la similitud en los resultados para las repeticiones; este análisis se basa en la aplicación del modelo lineal aditivo que representa las diferentes fuentes de variación de los datos. Las consideraciones propuestas en el análisis de varianza son las descritas por Díaz, 1999: (a) los errores φ_{ij} deben ser independientes; (b) los errores φ_{ij} deben tener distribución normal $N(0, \sigma^2)$ y (c) cada concentración (tratamiento) define





una subpoblación con distribución normal $N(\mu_i, \sigma^2)$. La varianza es constante e igual para todos los tratamientos, es decir se requieren varianzas homogéneas. En este análisis se plantean las siguientes hipótesis:

H_0 = Los efectos de cada concentración (tratamiento) son iguales a cero.

H_1 = Al menos el efecto de una concentración (tratamiento) es diferente de cero.

Al representar gráficamente los porcentajes de mortalidad acumulados, que para esta prueba de toxicidad corresponden al porcentaje de inhibición en la producción de metano, en función de las concentraciones de la sustancia tóxica, se obtiene una curva sigmoideal (función matemática que representa una variable que se incrementa primero lentamente luego se acelera y finalmente se desacelera, eventualmente crece muy poco o declina). En el análisis con el método Probit los porcentajes de inhibición son convertidos a Probits (Unidades de probabilidad o desviaciones equivalentes normales) y las concentraciones del tóxico son convertidas a logaritmos. De esta manera, al graficar los resultados se obtiene una línea recta en lugar de una curva sigmoideal, a partir de la cual se puede estimar la CE_{50} y su precisión. El cálculo de las transformaciones Probit se hace a partir de la integral de la distribución acumulada.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante la etapa de experimentación se realizaron los ensayos descritos en la metodología iniciando con el ensayo de degradabilidad del sustrato y ensayos preliminares de toxicidad para finalmente realizar los ensayos definitivos de toxicidad a partir de los cuales se determinaron las concentraciones efectivas de Cadmio y Níquel que inhibían en un 50 % la producción de metano del lodo anaerobio evaluado; los resultados obtenidos durante esta etapa se mencionan a continuación.

3.1. Ensayo de degradabilidad del sustrato

La degradabilidad del sustrato se completó prácticamente a las 96 horas, como se puede apreciar en la Figura 5, y a partir de este tiempo la tasa de producción de metano disminuyó considerablemente, tal como se aprecia en la pendiente de la curva, la cual pasó de 0,343 a 0,033 y en la producción de metano hasta ese momento, 34 mL, correspondiente al 65.3 % de la producción teórica de metano esperada, 52.1 mL, la cual se calculó con base en una demanda química de oxígeno de 4g/L; y un volumen de reactor 0.03L; mL

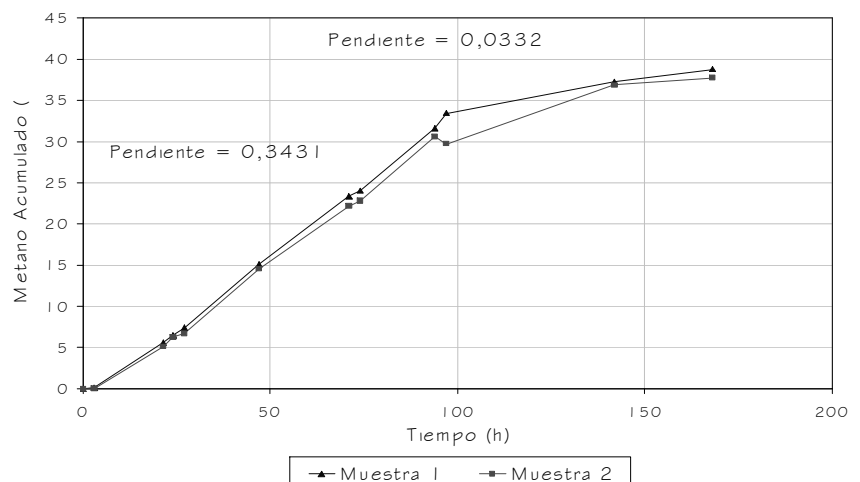


Figura 5.
Degradabilidad del ácido acético

3.2. Ensayo de Toxicidad

Para el níquel a concentraciones menores a 20 mg/L, se observó un efecto estimulante durante todo el tiempo del ensayo, y en algunas de las otras concentraciones únicamente en el tiempo cero. Con respecto al cadmio, en ninguna de las concentraciones, se presentó estimulación a partir de las 24 horas de contacto; sin embargo en el tiempo cero ocurrió lo mismo que con el níquel. Algunas concentraciones produjeron estimulaciones considerables, como la de 44 mg Ni²⁺/L a las cero horas (104.6 % de estimulación).

Las Figuras 6 y 7 muestran la variación en la producción de metano para las concentraciones de níquel y cadmio respectivamente. Como era de esperarse la producción de metano aumentó a medida que transcurrió el tiempo, mientras que a mayor concentración de metal la producción disminuyó, siendo más notorio este descenso en las primeras concentraciones (hasta 43 mg/L para Cd²⁺ y hasta 410 mg/L para Ni²⁺). Sin embargo las dos primeras concentraciones de Ni²⁺ (10 y 21 mg/L) presentaron una producción de metano mayor que el control (estimulación) durante la mayor parte del tiempo; esta estimulación se presentó posiblemente porque el níquel a concentraciones bajas es un micronutriente esencial para las células.

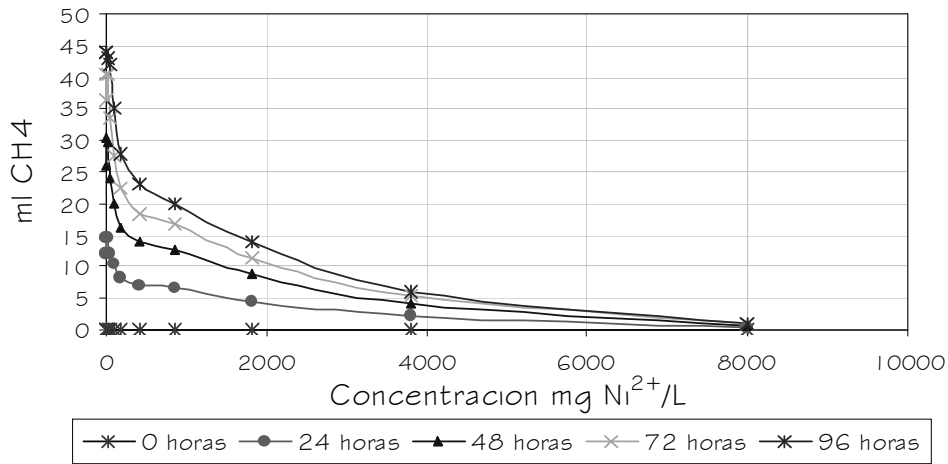


Figura 6. Variación en el tiempo de la producción de CH₄ para diferentes concentraciones de Ni²⁺

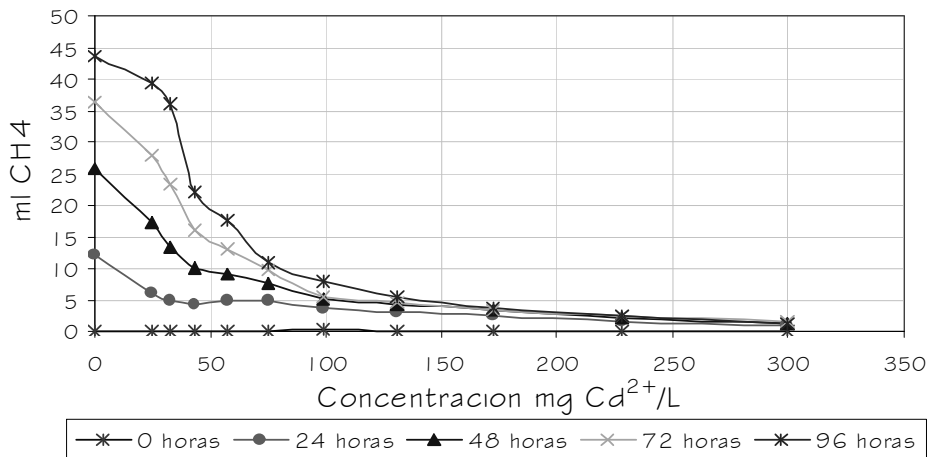


Figura 7. Variación en el tiempo de la producción de CH₄ para diferentes concentraciones de Cd²⁺

La inhibición en la producción de metano para las diferentes concentraciones de níquel y cadmio se muestra en las Figuras 8 y 9. En ellas se evidenció el efecto que tiene el incremento en la concentración del metal adicionado sobre la inhibición en la producción de metano; hasta 410 mg Ni²⁺/L el porcentaje de inhibición aumentó drásticamente y a partir de allí un aumento considerable en la concentración no produjo notables incrementos en la inhibición, como ocurrió con las concentraciones iniciales. Este mismo comportamiento se observó con el incremento de las concentraciones de cadmio que hasta 43 mg Cd²⁺/L produjeron un aumento fuerte de la inhibición.

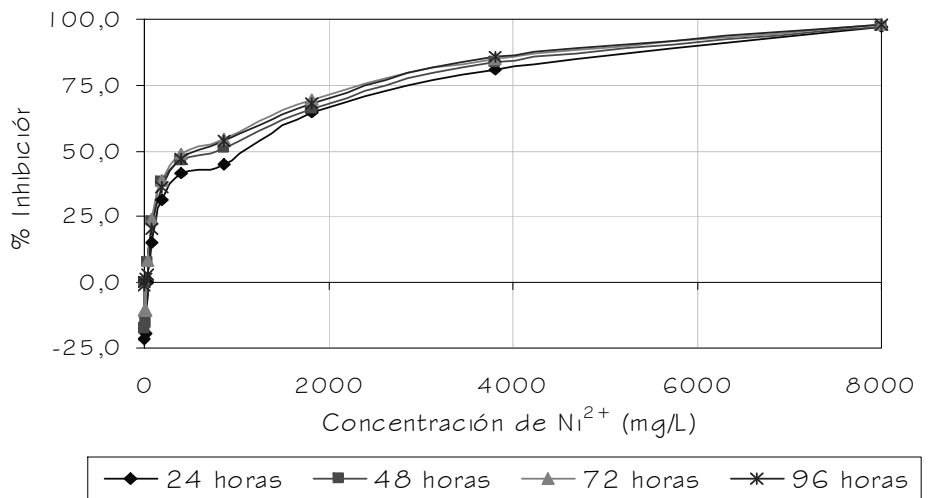


Figura 8.
Inhibición en la producción de metano para Ni²⁺.

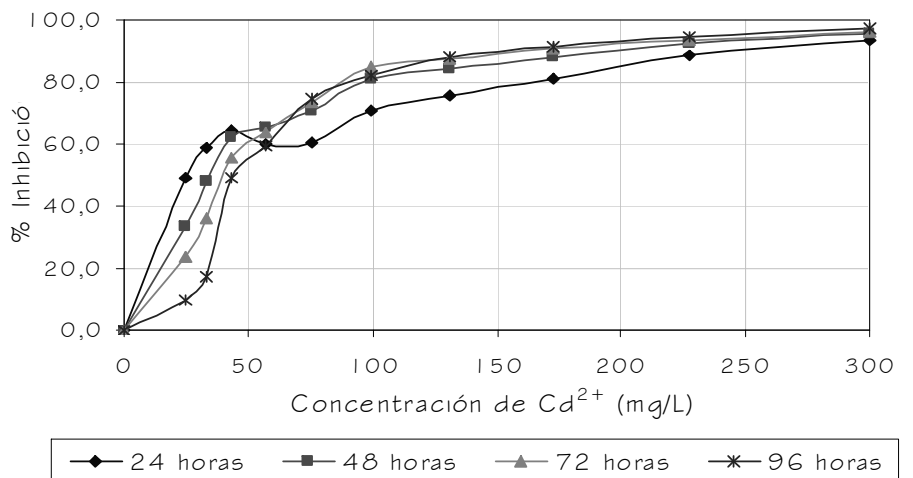


Figura 9.
Inhibición en la producción de metano para Cd²⁺.

En las Figuras 10 para níquel y 11 para cadmio, se presenta el comportamiento del potencial redox para cuatro de las 10 concentraciones ensayadas y sus respectivos controles. En el caso del níquel, a pesar de que el potencial redox en el control presentó una tendencia creciente de -300 mV a valores cercanos a los -200 mV, siempre se mantuvo dentro de los límites para esta variable en los procesos de digestión anaerobia. Para las concentraciones de 10 mg/L, 93 mg/L y 862 mg/L el comportamiento fue similar, sólo que los valores de potencial redox fueron mayores a medida que aumentó la concentración como se muestra en la figura 10; con la concentración 8000 mg/L el efecto sobre el sistema fue más notorio ya que la mayor parte del tiempo el potencial redox fue positivo; sin embargo, a las 72 horas el sistema intentó recuperarse.

Los valores del potencial redox medidos a las cero horas, para todas las concentraciones de cadmio y níquel, fueron mayores a los del control, lo que era de esperarse ya que el sistema se tornó oxidativo. Sin embargo, a partir de las 40 horas para todas las concentraciones de níquel se observó una tendencia a la recuperación del sistema a diferencia del cadmio donde la recuperación fue evidente únicamente para las concentraciones de 25 mg/L, 57 mg/L y 131 mg/L.

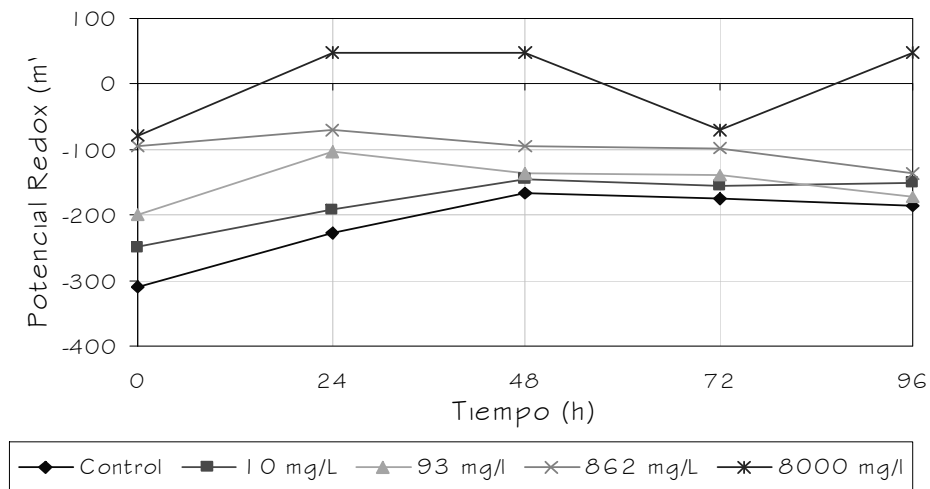


Figura 10. Potencial redox para algunas concentraciones de Ni²⁺

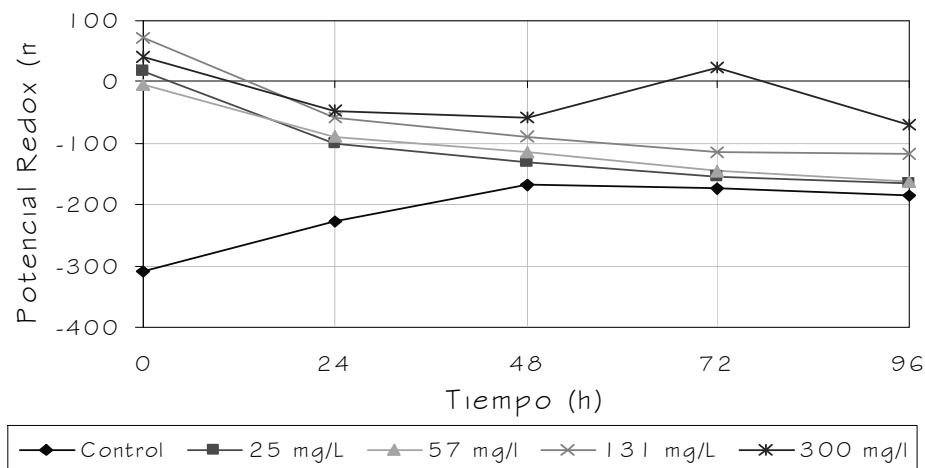


Figura 11. Potencial redox para algunas concentraciones de Cd²⁺

En la Tabla 2 se presentan los resultados del análisis de varianza para el ensayo de toxicidad de cadmio y níquel; comparando el factor F de la distribución de Fisher (1176,895 para níquel y 299.765 para cadmio) obtenido para las concentraciones con $f_{0,05,10,40}$ (2.08 para níquel y 2.12 para cadmio) se concluye que debe rechazarse la hipótesis nula (H_0) y por lo tanto existe diferencia entre los efectos ocasionados por las diferentes concentraciones (tratamientos) tanto de cadmio como de níquel. Lo anterior permitió tomar los valores promedio de producción de metano para cada concentración y aplicar el método Probit para obtener la CE_{50} .

Tabla 2.
ANOVA para el ensayo de toxicidad a las 96 horas.

ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)				
RESULTADOS NÍQUEL				
Fuente de Variación	SC	GL	MC	F
Concentración (Tratamiento)	60416,51	10	6041,651	1176,895
Error	205,34	40	5,134	-
Total	60621,85	50	-	-
RESULTADOS CADMIO				
Fuente de Variación	SC	GL	MC	F
Concentración (Tratamiento)	60163,28	10	6016,328	299,765
Error	722,52	36	20,070	-
Total	60885,80	46	-	-

El método Probit es usado para el cálculo de concentraciones letales sobre individuos de algunas especies. Es importante destacar que para la aplicación del método en esta investigación se hicieron varias analogías o relaciones entre variables, las cuales se describen en la tabla 3. Según estas relaciones no se obtuvo una concentración letal (CL) sino una concentración efectiva (CE), ya que se evaluó la toxicidad sobre la población metanogénica de forma indirecta a través del proceso de conversión de ácidos grasos volátiles a metano, el cual es llevado a cabo por dicha población.

Tabla 3.
Relación entre variables del método Probit.

	Variables Probit Original	Variables Probit Modificado*
1	Numero de ejemplares (N)	mL de CH ₄ producidos por el control a las 96 horas.
2	Mortalidad observada (r)	mL de CH ₄ que dejaron de ser producidos por efecto de las concentraciones de cada metal con base en la producción del control.
3	Porcentaje de mortalidad (P)	Porcentaje de inhibición en la producción de metano.

* Variables calculadas a partir de promedios y con los resultados obtenidos a las 96 horas.

Las concentraciones efectivas de Ni²⁺ y Cd²⁺ que inhibieron la producción de metano en un 50% (CE_{50}) a las 96 horas y sus respectivos intervalos de confianza, confiabilidad del 95 %, se muestran en la Tabla 4.

Tóxico	CE ₅₀	Intervalo 95% confianza	
Níquel (mg Ni ²⁺ /L)	526,8	403,8	690,6
Cadmio (mg Cd ²⁺ /L)	54,2	47,7	60,9

Tabla 4.
Concentración efectiva de níquel y cadmio a las 96 horas.

Comparando las CE₅₀ obtenidas para cadmio y níquel se observó que la toxicidad relativa fue Cd²⁺>Ni²⁺, similar a lo obtenido por Lin y Chen, 1999 quienes evaluaron la toxicidad de varios metales pesados a las 30 horas y obtuvieron C₅₀ de 2000 mg/L para níquel y 450 mg/L para Cadmio, usando una mezcla de ácido acético, propiónico y butírico como sustrato. Forero y Sierra, 2003 evaluaron la toxicidad del cadmio y el níquel en la remoción de carga orgánica y producción de ácidos grasos volátiles en reactores UASB, pero aplicando la dosis de los metales directamente a los reactores en estudio, también encontraron que el cadmio es más tóxico que el níquel.

4. CONCLUSIONES

La inhibición de la producción de metano por el efecto de los metales pesados evaluados en esta investigación está relacionada únicamente con la población metanogénica ya que se utilizó como sustrato ácido acético y por lo tanto la metanogénización es la única etapa de la digestión anaerobia faltante.

Si se desea evaluar el efecto de los metales pesados sobre las demás etapas involucradas en la digestión anaerobia se debe utilizar un sustrato no acidificado, que genere todas las etapas, y medir conjuntamente producción de metano con producción de AGV's.

A partir de 48 horas la inhibición generada por el cadmio y el níquel sobre la producción de metano es independiente del período adicional en el que se evalúe. Es decir, la CE₅₀ calculada a las 48, 72 y 96 horas es prácticamente igual y este hecho es más evidente para el níquel ya que las curvas de porcentaje de inhibición correspondientes a las 48, 72 y 96 horas de exposición como se observó en la Figura 7, se superponen.

La concentración efectiva CE₅₀ a las 96 horas encontrada para cadmio y níquel fue, respectivamente, 54.2 mg Cd²⁺/L y 526,8 mg Ni²⁺/L, lo que indica que el efecto tóxico del cadmio sobre la población metanogénica es mayor que el del níquel. Estas concentraciones pueden variar dependiendo de las condiciones de operación del reactor, de las condiciones ambientales y de la calidad del lodo, entre otros.

Según la estimulación en la producción de metano obtenida con bajas concentraciones de níquel, se concluye que es posible la aplicación de tratamientos biológicos anaerobios a efluentes industriales con contenidos bajos de níquel sin que la población metanogénica sea afectada negativamente.

El método probit arrojó resultados satisfactorios al calcular la CE₅₀ tanto para cadmio como para níquel a pesar de la necesidad de realizar analogías entre variables para la posible aplicación del método.

Es probable que la presencia de metales pesados como el cadmio y el níquel afecte otros procesos y reacciones de la digestión anaerobia, como lo sugiere la disminución de la capacidad reductora del sistema medido a través del potencial redox.

Para efectos de comparación con resultados de futuras investigaciones sobre este tema, es recomendable estandarizar la metodología para la determinación de la toxicidad de metales pesados en reactores UASB.

Con esta investigación, como se esperaba, se obtuvieron resultados que pueden ser comparables y reproducibles según el análisis estadístico aplicado y las concentraciones efectivas que inhibieron en un 50% la producción de metano de un lodo anaerobio para níquel (526.8 mg/L) y para cadmio (54.2 mg/L). Los valores de las concentraciones obtenidas son superiores a las concentraciones comúnmente reportadas para estos metales en la mayoría de los vertimientos



industriales. Esto permite concluir que es posible tratar efluentes industriales que contengan cadmio y níquel en concentraciones menores a las encontradas en este estudio mediante procesos biológicos anaerobios para remoción de carga orgánica sin que se vea afectada significativamente la población metanogénica involucrada en este proceso; incluso para aguas con concentraciones menores a 20 mg/l de níquel se puede obtener un efecto estimulante que aumentaría la producción de metano del sistema.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Díaz, A., 1999. Diseño Estadístico de Experimentos. Primera Edición. Medellín: Universidad de Antioquia..
- Díaz-B., M. C., 1997. Microbiología de la digestión anaerobia y caracterización de lodos anaerobios. En: Curso microbiología de la digestión anaerobia y caracterización de lodos anaerobios. Medellín. Universidad de Antioquia, pp. 17-18,.
- Finney, D.J., 1992. Probit analysis, a statistical treatment of the sigmoid response curve. 2nd ed. Cambridge: University Press. P 318. Citado por: Henao M., Beatriz H. Determinación de la Toxicidad Letal del Clorpirifos sobre la Mojarra Plateada *Oreochromis niloticus*. Medellín, 39 p.
- Forero, L. E., Sierra, J. H., 2004. Efecto de dos metales pesados, cadmio y níquel, sobre la eficiencia de remoción de carga orgánica de un reactor UASB a escala de laboratorio; Revista Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia, Medellín Colombia, No 31.
- Chiu-Yue, L, y Chin-Chao, C., 1999. Effect of heavy metals on the methanogenic UASB granule. En: Water Research. Vol 33 No. 2. pp 409-416.
- Wills, B. A., Naranjo, F., 2004. Evaluación del efecto toxico del acetato de plomo y del cloruro de cromo sobre el metabolismo bacterial anaerobio; Revista Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia, Medellín Colombia, No 32, pp 17-25.

