



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

**Tesis para la obtención de grado para Maestría en
Ciencias en Ingeniería Ambiental**

**Obtención de membrana de grafeno a partir
de *Shewanella oneidensis* para la desalinización
del agua**

Alumna: Lisouli Pérez Torres

Facultad de Ingeniería Química

Directora de tesis: Dra. Georgina Carbajal de la Torre

Co-directora: Dra. María de Lourdes Ballesteros Almanza

Facultad de Ingeniería Química

Facultad de Biología

Facultad de Ingeniería Civil



Morelia, Michoacán

Enero 2022

RESUMEN	6
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUCCIÓN	8
2. MARCO TEÓRICO	10
2.1 ÓXIDO DE GRAFENO	10
2.2 GRAFENO	11
2.2.1 PROPIEDADES DEL GRAFENO	12
2.2.1.1 PROPIEDADES ELECTRÓNICAS.....	12
2.2.1.2 PROPIEDADES MECÁNICAS	13
2.2.1.3 PROPIEDADES QUÍMICAS.....	13
2.2.1.4 PROPIEDADES ÓPTICAS	13
2.3 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN.....	14
2.3.1. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	14
2.3.2 DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX).....	15
2.3.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)	16
2.4 SHEWANELLA ONEIDENSIS	17
2.5 DESALINIZACIÓN	19
2.5.1 SISTEMAS POR MEMBRANAS.....	20
2.5.2 OSMOSIS INVERSA.....	20
2.5.2.1 MEMBRANAS	21
3. ANTECEDENTES	23
4. JUSTIFICACIÓN.....	24
5. HIPÓTESIS	25
6. OBJETIVOS.....	25
6.1 OBJETIVO GENERAL:	25
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	25
7. METODOLOGÍA	26

7.1	ÓXIDO DE GRAFENO	27
7.2	CARACTERIZACIÓN DE OG	31
7.2.1	<i>ESPECTROSCOPIA FT-IR</i>	31
7.2.2	<i>DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX)</i>	31
7.2.3	<i>MICROSCOPIA DE BARRIDO (SEM)</i>	32
7.3	CULTIVO DE <i>SHEWANELLA ONEIDENSIS</i>	33
7.4	REDUCCIÓN DE ÓXIDO DE GRAFENO.....	36
7.5	MEMBRANA DE GRAFENO	37
7.6	CARACTERIZACIÓN DEL rOG	37
7.6.1	<i>FTIR</i>	37
7.6.2	<i>DRX</i>	37
7.6.3	<i>SEM</i>	37
8.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	38
8.1	SÍNTESIS DE ÓXIDO DE GRAFENO	38
8.1.1	<i>FT-IR DEL OG</i>	38
8.1.2	<i>DRX DEL OG</i>	40
8.1.3	<i>SEM DEL OG</i>	41
8.2	CULTIVO DE <i>SHEWANELLA ONEIDENSIS</i>	44
8.3	REDUCCIÓN DE OG	47
8.3.1	<i>FT-IR DEL rOG</i>	50
8.3.2	<i>DRX DEL rOG</i>	52
8.3.3	<i>SEM DEL rOG</i>	53
8.4	MEMBRANA	60
9.	CONCLUSIONES	61
10.	BIBLIOGRAFÍA	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de una membrana de óxido de grafeno apilado	8
Figura 2. Grafeno en la estructura gráfica de panal de abeja	10
Figura 3. Espectrómetro FT-IR Bruker	13
Figura 4. Microscopio de barrido electrónico	14
Figura 5. <i>Shewanella oneidensis</i>	16
Figura 6. Clasificación de los procesos de desalinización	18
Figura 7. Esquema general de una planta de ósmosis inversa	19
Figura 8. Funcionamiento de la membrana.	20
Figura 9. Diagrama de flujo general de la metodología	24
Figura 10. Diagrama para la síntesis de OG	25
Figura 11. Síntesis de grafito en tina de ultrasonido	26
Figura 12. Solución de óxido de grafeno antes de los lavados	26
Figura 13. Lavado de la solución de óxido de grafeno	27
Figura 14. Solución de óxido de grafeno a centrifugar	27
Figura 15. Óxido de grafeno después del secado en horno	28
Figura 16. Óxido de grafeno en polvo	29
Figura 17. Espectrómetro de infrarrojo	29
Figura 18. Sistema de difracción de rayos X modelo D8 ADVANCE DAVINCI	30
Figura 19. Microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-IT300	31
Figura 20. Cepa de <i>Shewanella oneidensis</i>	32
Figura 21. Cultivo de <i>Shewanella oneidensis</i>	33
Figura 22. Cultivo de <i>Shewanella oneidensis</i> en cajas Petri	34
Figura 23. Incubadora con agitación marca N-BIOTEK	34
Figura 24. Cultivo de <i>Shewanella oneidensis</i> en frascos Schott	35
Figura 25. Espectrofotómetro UV/BIS	35
Figura 26. DENTOM VACUUM para preparación de muestras Desk V	37
Figura 27. Espectro FT-IR de la muestra de óxido de grafeno.	38
Figura 28. Patrón de Difracción de rayos X de óxido de grafeno.	40
Figura 29. Elementos encontrados en la muestra de OG	41
Figura 30. Micrografías SEM de la muestra de OG	43

Figura 31. Cultivo de <i>Shewanella oneidensis</i> , en agua de peptona tamponada	43
Figura 32. Tinción de <i>Shewanella oneidensis</i>	44
Figura 33. Material resultante de la síntesis de grafito.	47
Figura 34. Disolución de OG en agua destilada en la tina Branson 1510 de ultrasonido	47
Figura 35. Solución de OG con cultivo de <i>Shewanella oneidensis</i> de 12 horas	48
Figura 36. Espectro FT-IR de la muestra de óxido de grafeno reducido.	50
Figura 37. Patrón de difracción DRX del rOG.	51
Figura 38. Micrografías del testigo.	53
Figura 39. Espectro EDS del testigo	53
Figura 40. Elementos encontrados en la muestra de rOG	55
Figura 41. Micrografías de la muestras en microscopio de barrido electrónico de rOG.	57
Figura 42. Micrografías de OG y rOG	58
Figura 43. Sedimento de rOG	59
Figura 44. Material rOG para la membrana	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Elementos del espectro de OG	41
Tabla 2. Mediciones de absorbancia de los frascos de cultivo con OG	48
Tabla 3. Datos de los picos del espectro DRX para el rOG	51
Tabla 4. Elementos del espectro de OG con medio de cultivo MacConkey.	54
Tabla 5. Elementos del espectro de OG	55

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Curva McFarland	45
----------------------------	----

RESUMEN

En los últimos años se ha experimentado con el grafeno. Material derivado del carbono, con estructura 2D, que ofrece la posibilidad de fabricar una membrana mediante la superposición de nano-láminas de grafeno. Una aplicación para la membrana es en la desalinización de agua. El grafeno tiene características físicas y químicas adecuadas para la desalinización. La síntesis del grafeno genera vapores altamente tóxicos. En este trabajo se demostró la obtención de grafeno a partir de *Shewanella oneidensis*. Fue realizada la caracterización del material final usando tres técnicas, FT-IR, DRX y SEM. El espectro FT-IR del rOG muestra presencia de grupos carboxílicos, alcanos, alquinos y enlaces conjugados. El espectro DRX muestran una distancia interplanar de 6.3066 Å que demuestra la presencia de la estructura de grafeno. Las fotomicrografías SEM revelaron láminas, superficies lisas, bacterias y partículas de material, comprobando que *S. oneidensis* puede reducir el OG para obtener grafeno. Esto hace posible la obtención de grafeno de manera sustentable en mayor escala para la fabricación de membranas. Con el grafeno obtenido no es posible utilizarlo directamente para una membrana de osmosis inversa, debe combinarse con alguna poliamida para que tenga el tamaño de poro necesario para la desalinización de agua.

Palabras clave: Sustentabilidad, nanomateriales, tratamiento de agua, grafeno, bacteria.

ABSTRACT

In recent years, graphene has been experimented with. Material derived from carbon, with a 2D structure, which offers the possibility of manufacturing a membrane by superimposing nano-sheets of graphene. One application for the membrane is in water desalination. Graphene has physical and chemical characteristics suitable for desalination. The synthesis of graphene generates highly toxic vapors. In this work the obtaining of graphene from *Shewanella oneidensis* was demonstrated. The characterization of the final material was carried out using three techniques, FT-IR, XDR and SEM. The FT-IR spectrum of rGO shows the presence of carboxylic groups, alkanes, alkynes and conjugated bonds. The XRD spectrum shows an interplanar distance of 6.3066 Å which demonstrates the presence of the graphene structure. SEM micrographs revealed sheets, smooth surfaces, bacteria and material particles, proving that *S. oneidensis* can reduce GO to obtain graphene. This makes it possible to obtain graphene in a sustainable way on a larger scale for the manufacture of membranes. With the graphene obtained, it is not possible to use it directly for a reverse osmosis membrane, it must be combined with some polyamide so that it has the necessary pore size for water desalination.

1. INTRODUCCIÓN

El agua es una necesidad básica para el ser humano, la contaminación, el crecimiento de la población, la expansión de las actividades urbanas, de producción y agrícolas han reducido significativamente este recurso El 96,5 por ciento del agua se encuentra en los océanos, no es potable y está saturada de sal (Sarvestani *et al.*, 2021). Varios países han buscado nuevas fuentes de obtención de agua, una de estas es la desalinización de agua salobre (Guerrero, 2016).

Los métodos de desinfección de agua, descontaminación y desalinización son generalmente químicos y energéticamente intensivos, por lo que se requiere de fuertes inversiones y expertos en ingeniería (Chávez-Lizárraga, 2018).

Estudios recientes han demostrado que los procesos de desalinización energéticamente eficientes se pueden lograr a través de materiales avanzados, como membranas de materiales de baja dimensión, los nano materiales basados en carbono, como nanotubos de carbono y grafeno, y sus derivados son los más conocidos, han sido encontrados como adsorbentes efectivos Las membranas basadas en grafeno (ver figura 1) han sido promocionadas como el material de membrana de próxima generación debido a su alta rigidez y espesor de un solo átomo. Los diseños de membranas de grafeno propuestos incluyen la membrana de grafeno nanoporosa, la membrana de grafeno con hendiduras y la membrana de grafeno multicapa, por nombrar algunos y además son funcionales en grandes superficies y en diferentes sitios (Toh *et al.*, 2020)

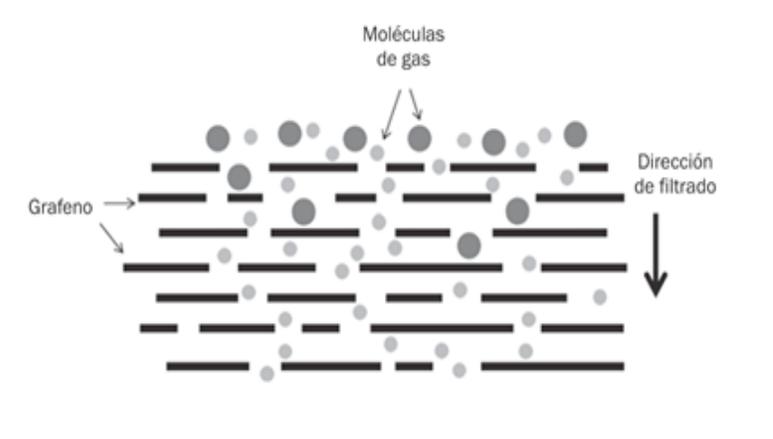


Figura 1. Esquema de una membrana de óxido de grafeno apilado (Menéndez, R., & Blanco, C., 2014)

El grafeno es uno de los materiales derivados del carbono, gracias a su estructura 2D, se comporta como una barrera perfecta frente a la difusión de gases y líquidos. Las monocapas del grafeno son completamente impermeables, sin embargo, las grandes dificultades asociadas a la creación de monocapas de grafeno de suficiente tamaño y regularidad, libres de defectos, han hecho que los estudios se hayan dirigido al uso de los óxidos de grafeno (OG), más fáciles de obtener y depositar sobre membranas poliméricas convencionales. La estructura bidimensional, unida al control de la funcionalidad de los óxidos de grafeno, ofrece una extraordinaria posibilidad de fabricar una nueva clase de membranas mediante superposición de las nano-láminas. Además, el OG puede dispersarse fácilmente en disolventes comunes, entre ellos el agua (Menéndez, R., y Blanco, C, 2014).

Hay dos métodos predominantes para producir grafeno: la deposición química de vapor o CVD (por sus siglas en inglés Chemical Vapor Deposition) y la exfoliación del grafito. Los mayores inconvenientes son la limitada superficie de área del sustrato, la necesidad de una atmósfera especializada para el crecimiento de grafeno, y dificultades en la remoción del grafeno crecido del sustrato. Las metodologías para la exfoliación del grafeno son diversas, pero la más prometedora para la producción a escala es la oxidación y exfoliación de grafito a óxido de grafeno.

En la última década se han buscado distintas alternativas para la reducción del óxido de grafeno, estas alternativas incluyen ácidos orgánicos, extractos de plantas, microorganismos, azúcares, antioxidantes, aminoácidos, proteínas, etc. Todos estos reductores se conocen como “agentes reductores verdes” ya que son una alternativa ecológica y no tóxicos (De Silva, Huang, Joshi, y Yoshimura, 2017).

Recientemente se ha practicado la reducción del óxido de grafeno mediante microorganismos, como bacterias y levaduras; un ejemplo es la *escherichia coli* (*E. coli*) que es una bacteria comúnmente conocida presente en el tracto digestivo humano y algunas cepas pueden causar enfermedades graves. Se descubrió que la reducción se debe a la actividad metabólica de las bacterias y el óxido de grafeno reducido bacterianamente puede inhibir la proliferación de las bacterias supervivientes. Otro microorganismo es *Shewanella*, una bacteria reductora de metales, es ubicua y se conoce que ha reducido óxido de grafeno en ambientes anaeróbicos y aeróbicos. Los electrones generados metabólicamente desde *Shewanella* se transfieren a un aceptor de electrones externo directamente desde la superficie celular o usando mediadores de electrones auto-secretados (De Silva *et al.*, 2017).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 ÓXIDO DE GRAFENO

El óxido de grafeno (OG) es un material a base de carbono, es la forma oxidada del grafito que se puede producir a partir de polvo o escamas de grafito mediante el uso de un método químico de solución de oxidación oxidante fuerte. En la estructura del OG están presentes una serie de funcionalidades que contienen oxígeno tales como carboxílico, fenólico, carbonilo y epóxido, contiene átomos de carbono hibridados sp^2 en su estructura, lo que lo hace no conductor de la electricidad. La deformación de la estructura y la presencia de grupos funcionales que contienen oxígeno unidos covalentemente hacen que el OG sea atómicamente rugoso (Boveri, 2014).

El OG ha recibido una atención considerable por parte de la comunidad científica durante los últimos años. Fue identificado como un material precursor de bajo costo para la síntesis de plaquetas de OG reducido (rOG), un material similar al grafeno, a través de la reducción de sus grupos funcionales que contienen oxígeno por métodos químicos o recocido térmico. Es bien sabido que el número y la naturaleza de los grupos funcionales que contienen oxígeno determinan las propiedades eléctricas y ópticas del OG. Además, el OG completamente oxidado es soluble en agua, altamente hidrofílico, mientras que la eliminación de los grupos funcionales que contienen oxígeno resulta en la formación de materiales hidrófobos similares al grafeno (Mishra y Pathania, 2018).

2.2 GRAFENO

El grafeno es la forma reducida de óxido de grafeno (Boveri, 2014). La IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada), define el grafeno como “una lámina única de carbono con estructura gráfrica y de naturaleza análoga a un hidrocarburo aromático policíclico” (Mayora-Curzio, Cremades-Oliver, y Cusidó-Fàbregas, 2015).

El grafeno se ha definido como un hidrocarburo aromático policíclico infinitamente alternadamente de anillos de solo seis átomos de carbono. Sin embargo, el término grafeno actualmente se puede aplicar para hacer referencia a agrupaciones de varias láminas de grafeno, generalmente usando los términos grafeno mono-, bi-, y multi-capa (<10), ya que sus propiedades son diferentes. (Menéndez, R., y Blanco, C, 2014).

El grafeno es una estructura de carbono bidimensional constituida por una sola capa de átomos de carbono en hibridación sp^2 en una red hexagonal. El carbono se distingue de otros elementos por su flexibilidad al formar enlaces químicos. Dependiendo de los orbitales del carbono implicados existen dos tipos de hibridación posibles. En la hibridación sp^3 o tetragonal, cuatro orbitales híbridos se

disponen en el espacio formando un tetraedro para minimizar la repulsión. La hibridación sp^2 o trigonal involucra la formación de tres orbitales híbridos con un ángulo de separación entre ellos de 120° formando un plano. Esta estructura proporciona la típica estructura gráfica de panal de abeja, como se muestra en la figura 2 (Colom *et al.*, 2020).

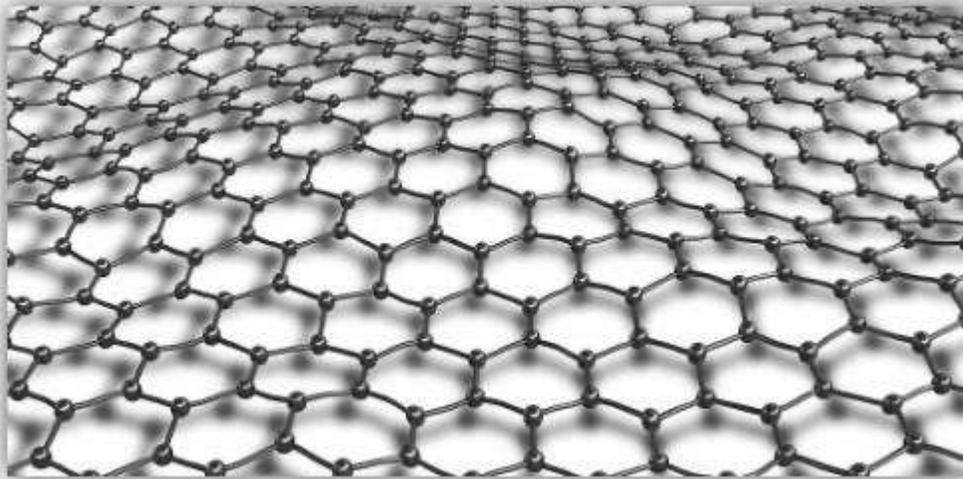


Figura 2. Grafeno en la estructura gráfica de panal de abeja (Tomada de nusgrem.es).

2.2.1 PROPIEDADES DEL GRAFENO

2.2.1.1 PROPIEDADES ELECTRÓNICAS

El grafeno ha demostrado una variedad de propiedades intrigantes entre las más interesantes se encuentra su alta movilidad de electrones a temperatura ambiente ($250,000 \text{ cm}^2 / \text{Vs}$), conductividad térmica excepcional ($5000 \text{ Wm}^{-1} \text{ K}^{-1}$) y propiedades mecánicas superiores con Módulo de Young de 1 TPa. (Singh *et al.*, 2011).

La hibridación sp^2 entre los átomos de carbono del grafeno forman una estructura trigonal plana en la que cada átomo se encuentra enlazado covalentemente por enlaces σ con otros tres átomos, dejando un orbital molecular π deslocalizado perpendicular al plano basal. Estos electrones deslocalizados se encuentran débilmente ligados, por lo que son capaces de pasar de un orbital a otro, formando

una distribución continua arriba y abajo del plano basal. Esta característica es la responsable de la alta movilidad de sus portadores de carga (Singh *et al.*, 2011). En los últimos años, el grafeno ha generado grandes expectativas debido a sus excelentes propiedades mecánicas, eléctricas, ópticas y térmicas. Entre éstas, cabe destacar que el grafeno absorbe fotones en el rango del visible al infrarrojo con una rápida transición inter-bandas que permite obtener una eficaz respuesta eléctrica (Aguirre, 2015).

2.2.1.2 PROPIEDADES MECÁNICAS

En el grafeno, el módulo de Young que se ha reportado alrededor de los TPa, haciendo que sea capaz de soportar tensiones muy elevadas sin deformación o ruptura del material. No obstante, el grafeno presenta simultáneamente alta flexibilidad, hecho reflejado en la formación de pliegues y arrugas en sus hojas. Además, la conductividad térmica en el grafeno se ha reportado con un valor de 5000 W mK a temperatura ambiente, superando por casi el doble al valor reportado para nanotubos de carbono (López-Polín, 2016).

2.2.1.3 PROPIEDADES QUÍMICAS

Debido a la forma anisotrópica del grafeno y su alta capacidad para enlazarse con otros átomos, la funcionalización de las redes gráficas por ambos lados de las hojas hace posible la síntesis de nuevas moléculas con características únicas, permitiendo el desarrollo de estructuras para diferentes aplicaciones (Arenas, 2017).

Si el material presenta una superposición máxima de diez capas es considerado grafeno. En función de la cantidad de capas que presente se clasifica como grafeno monocapa, bicapa, tricapa y así sucesivamente (Aguirre, 2015).

2.2.1.4 PROPIEDADES ÓPTICAS

Entre sus propiedades ópticas cabe destacar que el grafeno absorbe fotones en el rango del visible al infrarrojo con una rápida transición inter-bandas lo cuál permite

obtener una eficaz respuesta eléctrica. Esta característica hace que el grafeno sea muy atractivo para aplicaciones fotovoltaicas, siendo además un material ideal para sistemas de almacenamiento de energía electroquímica, debido a su elevada conductividad eléctrica, su gran superficie específica y su estabilidad química (Colom *et al.*, 2020).

2.3 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

2.3.1. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

La espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés) representa la Transformada de Fourier del espectro infrarrojo y es el método preferido en espectroscopia infrarroja. En esta técnica, la radiación IR atraviesa la muestra y parte de la radiación infrarroja es absorbida por la muestra y otra fracción atraviesa a muestra (transmisión). El espectro resultante representa la absorción molecular y transmisión, creando una huella dactilar de la muestra. La espectroscopia FTIR (ver figura 3) se emplea como una herramienta poderosa para caracterizar cambios químicos y, en particular, determinar grupos funcionales en sustancias irradiadas por lo que es una técnica única (Hosseini *et al.*, 2020).



Figura 3. Espectrómetro FT-IR Bruker (Tomado de bruker.com)

2.3.2 DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX)

La difracción de rayos X es una técnica utilizada para el análisis estructural de materiales cristalinos, siempre y cuando se tengan las siguientes consideraciones:

- i) que el haz de rayos X sea monocromático, es decir, de una misma longitud de onda (λ)
- ii) que la longitud de onda empleada sea de un orden similar al espaciamiento atómico del material a investigar (Petrick y Castillo, 2004).

Este tipo de caracterización arroja información del ordenamiento y espaciado entre planos cristalográficos, permitiendo determinar propiedades físicas de un material. Su estudio se basa en la redistribución de la energía de la onda electromagnética a medida que el haz atraviesa los planos atómicos del cristal, fenómeno conocido como difracción, el cual es producto de la interferencia constructiva y destructiva de la radiación. La longitud de onda del haz utilizada en este método se encuentra en la región de los rayos X, cuyo intervalo está entre los 10-25 nm. De forma cuantitativa, el espaciado entre planos cristalográficos se calcula a partir de la conocida condición de Bragg:

$$2d \sin(\theta) = n\lambda \quad (1)$$

Donde:

d = es la distancia entre planos cristalográficos,

θ = es el ángulo entre el haz y la normal al plano

cristalográfico, n = es un entero y λ es la longitud de onda del haz.

Esta expresión permite predecir los ángulos en los que el haz difractado por los planos atómicos de un cristal periódico producen interferencia constructiva. En la práctica, los difractogramas consisten en picos bien definidos, cuya forma y anchura

dependen del tamaño promedio de las partículas que conforman el cristal y de las imperfecciones que éste presente.

2.3.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

La microscopía electrónica de barrido (SEM) es una de las técnicas que más se utilizan para el análisis morfológico y topográfico de sólidos (ver figura 4). Esta técnica proporciona imágenes en alta resolución de las superficies de materiales orgánicos e inorgánicos, permitiendo así su caracterización (Arenas, 2017).



Figura 4. Microscopio de barrido electrónico (Tomada de cimav.edu.mx).

En términos generales, un equipo de SEM es capaz de tomar una imagen de la muestra aunque realmente lo que se detecta es la respuesta del material al impacto de un haz de electrones (electrones llamados primarios), en vez de registrar fotones propiamente dichos (como en la microscopía óptica). Al ser impactada por el haz de electrones de alta energía, la muestra produce una serie de señales que son registradas con los diferentes detectores del SEM, dichas señales cada una ofrece información independiente con respecto a la topografía, composición y en algunos equipos hasta conductividad eléctrica de la muestra. Por supuesto, para adquirir la

imagen se hace mover el haz en el plano xy (con sistemas ópticos, antes de impactar la muestra) de forma que recorra el área deseada o planificada. La resolución que puede alcanzarse; es decir, la capacidad de distinguir en la imagen

entre dos puntos diferentes pero próximos entre sí, en la superficie del material, puede ser tan alta como 2 nm (Clavijo, 2013).

SEM es un instrumento de microscopía avanzado en la caracterización de materiales micro y nanoestructurados. Junto con su alto poder para ofrecer un análisis 2D de aspectos sustanciales de la muestra, SEM también puede proporcionar información y datos cualitativos variados sobre varias propiedades físicas como rugosidad, morfología, consistencia de la superficie, tamaño y estructura química de los materiales (Ibrahim *et al.*, 2021).

2.4 SHEWANELLA ONEIDENSIS

Su nombre proviene del lugar del que fue aislada: Lago Oneida, en New York (Estados Unidos).

Taxonomía:

- Filo: *Proteobacteria*
- Clase: *γ-Proteobacteria*
- Orden: *Alteromonadae*
- Familia: *Shewanellaceae*
- Género: *Shewanella*
- Especie: *Shewanella oneidensis*

En el año 1988 Myers y Nealson demostraron la producción de energía y el crecimiento acoplado a la reducción del hierro y de óxidos de manganeso en la especie denominada *Shewanella sp.* MR-1 ('metal-reducing').

Esta cepa MR-1 fue, entonces, identificada como *Shewanella putrefaciens*. En un trabajo publicado en el año 1999 por Katsthuri Venkateswaran y colaboradores se realiza una reorganización del género *Shewanella* mediante el empleo de la reasociación ADN, sondas moleculares, perfiles de ácidos grasos y quinonas y pruebas fisiológicas clásicas, llegando a la reasignación de la cepa *Shewanella*

putrefaciens MR-1 como *Shewanella oneidensis* MR-1 (ver figura 5). La cepa tipo posee una morfología bacilar con un tamaño aproximado de entre 2 y 3 μm de longitud y 0,5-0,6 μm de diámetro. Se trata de una bacteria Gram-negativa, anaerobia facultativa con flagelo polar. No forma ni endosporas ni cápsulas. Las colonias que aparecen cuando se cultiva en distintos tipos de agar mientras sean para bacterias Gram-negativa, son circulares, lisas y convexas y coloración desde beige a ligeramente rosadas.

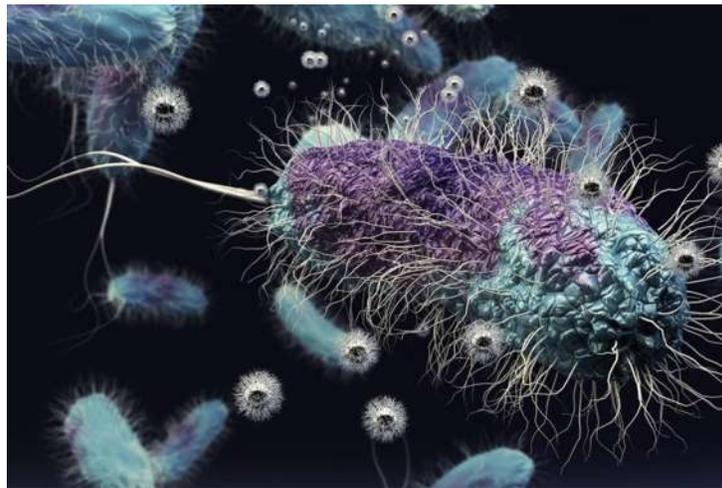


Figura 5. *Shewanella oneidensis* (Tomada por Ella Marushchenko/Universidad de Minnesota).

No requiere de sodio para su crecimiento, a temperaturas mesófilas, situándose su óptimo de crecimiento en 30 °C. Posee la capacidad de reducir nitrato a nitrito así como de oxidar nitrito a nitrato. Muestra actividad citocromo oxidasa, catalasa y gelatinasa y produce H_2S a partir de tiosulfato. A través de la cadena respiratoria, *Shewanella oneidensis* MR-1 entrega electrones de los donantes electrónicos (por ejemplo, lactato, ácido acético y fumárico) al aceptor electrónico (metal pesado). *S. oneidensis* MR-1 codifica dos enzimas para el piruvato oxidación, piruvato deshidrogenasa (PDH) que produce acetil coenzima A y CO_2 y piruvato formiato-liasa (PflB) que produce acetil coenzima A y formato. No hemoliza eritrocitos y muestra un débil crecimiento a una concentración de NaCl de aproximadamente un 3 %. Utiliza lactato, succinato y fumarato como única fuente de carbono, reduce los óxidos de metales de transición (Fe, Mn, U) y el sulfuro elemental (García, 2014; Yu *et al*, 2020; Xiong *et al*, 2020).

Shewanella oneidensis ha evolucionado para utilizar materiales inorgánicos como aceptor de electrones durante la respiración anaeróbica. *S. oneidensis* puede entregar electrones a materiales aceptores inorgánicos tanto mediante lanzaderas de electrones como a través del contacto directo de superficie a superficie mediado por su vía respiratoria Mtr, que consta de múltiples proteínas diferentes que pasan electrones desde el citoplasma bacteriano, a través de las membranas celulares, y hasta la superficie de la bacteria. Cuando se proporciona óxido de grafeno, los electrones de *S. oneidensis* reaccionan con los grupos de oxígeno del óxido de grafeno, lo que lleva a una restauración de los orbitales sp^2 que forman la red hexagonal característica del grafeno. El óxido de grafeno contiene grupos epoxilo, carboxilo e hidroxilo tanto en la superficie superior como en la inferior de las escamas. Estos grupos tienen diferentes energías de unión, y aún no se sabe cuál de esos grupos puede ser reducido por *Shewanella oneidensis* (Lehner *et al.*, 2019).

2.5 DESALINIZACIÓN

La desalinización consiste en un proceso de separación de sales disueltas de aguas salobres o de mar para convertirlas en aguas adecuadas para consumo humano, industrial o de riego. Existen diversas tecnologías desarrolladas en la actualidad para desalinizar el agua de mar (ver figura 6) y aunque tienen características distintas de acuerdo con el tipo de energía, diseño y producción que requiere cada una, todas tienen el mismo objetivo: reducir la concentración de sales disueltas del agua de mar; ello permite distinguir entre los procesos que separan el agua de las sales y los que realmente efectúan la separación de las sales de la solución.

Clase de separación	Energía utilizada	Proceso	Sistema
Agua de sales	Térmica	Evaporación	Destilación solar Destilación súbita <i>flash</i> Destilación multiefecto Termocompresión de vapor
	Frío	Cristalización	Formación de hidratos Congelación
	Mecánica	Evaporación Filtración	Compresión mecánica de vapor Ósmosis inversa
Sales del agua	Eléctrica Química	Filtración selectiva Intercambio	Electrodialisis Intercambio iónico

Figura 6. Clasificación de los procesos de desalinización (Tomada de Dévora-Isiordia, González-Enríquez, & Ruiz-Cruz, 2013)

2.5.1 SISTEMAS POR MEMBRANAS.

La desalinización de agua de mar por medio de membranas es un proceso que separa el agua salina en dos vertientes: una corriente de agua potable con baja concentración de sales disueltas y una corriente de salmuera concentrada. Los sistemas más utilizados son ósmosis inversa y electrodiálisis (Dévora-Isiordia, González-Enríquez, y Ruiz-Cruz, 2013).

2.5.2 OSMOSIS INVERSA

El proceso de ósmosis inversa es quizá el método más sencillo para desalar, y el que parece acercarse a los mejores rendimientos energéticos. El sistema toma su nombre por realizarse el paso de las soluciones en forma contraria a los procesos osmóticos normales. Es decir, las soluciones menos concentradas se desplazan, por diferencia de energía potencial, hacia las más concentradas a través de una membrana semipermeable sin necesidad de aplicar ninguna fuerza externa. El proceso de ósmosis inversa (ver figura 7) se basa en las propiedades de las membranas semipermeables de dejar pasar con más facilidad el agua dulce que la salada, creándose así una diferencia de potencial hidráulico entre esos dos líquidos cuando cada uno se sitúa a un lado de la membrana. Aumentando convenientemente la presión en el lado del agua salada se puede hacer pasar al compartimento menos salino, dejando atrás parte de las sales. El problema principal

reside en la obtención de membranas baratas y resistentes a la presión diferencial, campo en el cual se está realizando un gran esfuerzo y en el que ya se han obtenido logros importantes. Las membranas pierden permeabilidad si el agua original lleva un exceso de sílice, hierro o materia orgánica. El agua de alimentación debe tener una turbidez y contenido de materias en suspensión muy bajo. Típicamente, una membrana de ósmosis inversa procesa un agua de mar de ppm de sólidos disueltos totales, SDT, y la convierte en agua dulce con una salinidad inferior a ppm SDT (Cortes y Dominguez, 2000).

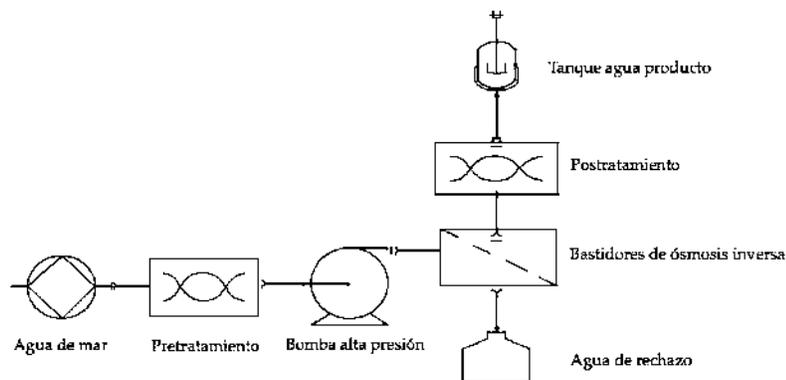


Figura 7. Esquema general de una planta de ósmosis inversa (Dévora-Isiordia et al., 2013).

2.5.2.1 MEMBRANAS

Una membrana es una barrera permeo selectiva entre dos medios que permite la transferencia, desde un medio a otro y a través de ella, de ciertos componentes, al mismo tiempo. Mientras que detiene o restringe el paso de ciertos componentes. En la figura 8 se muestra el funcionamiento de la membrana mediante un flujo (Gozálvez y Lora, 1998).

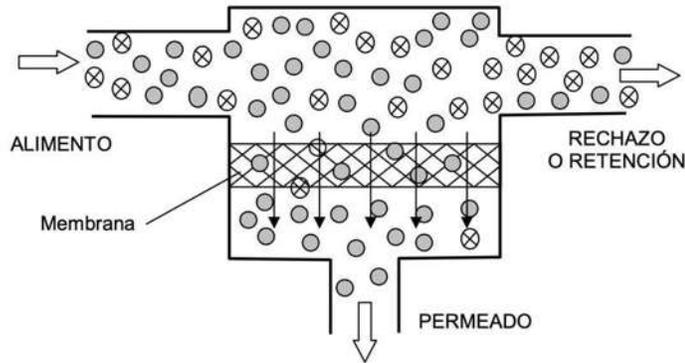


Figura 8. Funcionamiento de la membrana (Gozálvez y Lora, 1998).

- ◇ Alimento. Es la disolución por tratar.
- ◇ Permeado. Constituido por las cantidades que han pasado a través de la membrana y por tanto, es más rico en las sustancias con mayor tendencia a pasar.
- ◇ Rechazo o retención. Es el resultado de la pérdida por parte de la disolución, alimento de las cantidades que constituyen el permeado. Y por tanto estará enriquecido en las sustancias que permean en menor grado (Gozálvez y Lora, 1998).

Las membranas de ósmosis inversa tienen distintas aplicaciones, entre algunas de estas son: la purificación de metales preciosos, recuperación de desperdicios nucleares, procesamiento de alimentos, purificación de agua de laboratorio, potabilización de agua, entre otros. Las membranas que se utilizan tienen una gran cantidad de poros superficiales y microporos, debido a la interacción fisicoquímica entre la solución y la membrana, la mayoría de las sales no pueden pasar por los poros, son rechazadas y solo el agua de baja concentración iónica pasa a través de la membrana. La mayoría de los componentes orgánicos son removidos, dependiendo de su masa molecular (Dominighini *et al*, 2012).

La resistencia de la membrana depende de varios factores como el tamaño, la forma y la porosidad de los nanoporos. Sin embargo, el módulo de tensión efectivo de la membrana solo se puede determinar considerando solo la porosidad de los nanoporos. Deben crearse poros con un tamaño exacto entre 0,8 y 1,6 nm para permitir que la membrana de grafeno filtre el agua mientras detiene el paso de las moléculas de sal. La geometría de los nanoporos, la presión aplicada sobre el sistema, los grupos funcionales químicos y la concentración de sal son algunos factores que pueden tener una influencia sustancial en la funcionalidad de las membranas de grafeno nanoporoso (Sarvestani *et al.*, 2021).

Las características para una membrana de ósmosis inversa dependen del tipo de equipo de ósmosis inversa (longitud, el tamaño y superficie de la membrana) (Sagle & Freeman, 2004.; Tolba & Mohamed, 1999.; Xu *et al.*, 2007). Algunas características generales son:

- Presión de 10-100 bar
- Tamaño de poro (dependiendo de las características del agua) 4.0 Å
- Esfuerzo de Tensión (Modulo de Young) 0.86GPa
- Tamaños estandar 40in
- Temperatura de 25°C
-

3. ANTECEDENTES

Algunos de los trabajos que se han llevado a cabo con respecto al tema mencionan que el grafeno tiene muchas propiedades ventajosas, la investigación actual sobre sus aplicaciones medioambientales se ha centrado principalmente en la fabricación de materiales y sorción química. Un ejemplo es la preparación de una membrana de nanofiltración de óxido de grafeno reducida ultradelgada mediante filtración al vacío y mostró una alta sorción de colorantes orgánicos y una retención moderada de sales iónicas (Liu *et al.*, 2014).

Wei y sus colaboradores mencionan que las membranas de grafeno se pueden usar para ablandar el agua, decoloración, eliminación de materia orgánica natural, eliminación de metales pesados y separación de solventes orgánicos, utilizar para la desalinización del agua mediante técnicas mecánicas. Se han fabricado membranas positivas, que tienen un mayor flujo y rechazo (nitrato de plomo) que las membranas de quitosano y las membranas de poliamida.

Por otra parte, Guerrero (2006), realizó su tesis “Desalinización de agua por membranas de grafeno nanoporoso: Cálculos de primeros principios”, en la cual obtuvo resultados positivos donde las membranas de grafeno muestran una rápida permeación y selectividad de órdenes de magnitud mayores a la tecnología actual.

Otra investigación que se llevó a cabo fue la realizado por Cristina y Valeria (2017), del “Estudio del consumo de energía en el proceso de ósmosis inversa utilizando un filtro de membrana de grafeno para la desalinización del agua del mar”; en el cual se concluyó que el consumo de energía mediante la utilización de una membrana de óxido de grafeno es menor al de una membrana comercial, lo cual reduce costos y hace el proceso de desalinización más eficaz.

4. JUSTIFICACIÓN

Actualmente se llevan a cabo investigaciones para producir grafeno de una forma más sustentable, rápida y económica. Existen diversas técnicas para la reducción del óxido de grafeno dentro de las cuales tienen algunos inconvenientes, generan vapores altamente tóxicos y son procesos complejos, estos métodos pueden causar problemas ambientales o económicos cuando se trata de una producción a gran escala (Tanizawa *et al.*, 2012).

La contaminación del agua ha generado que en más de la mitad de las camas de los hospitales que están siendo usadas por personas, sus enfermedades están relacionadas con agua contaminada. Está estimado que el 80 % del agua residual

es regresada al ambiente sin un tratamiento adecuado (Casiano *et al.*, 2019), esto es debido al tratamiento inadecuado del agua residual y a la escasez del agua potable limpia. Este problema ha llevado a buscar soluciones, una de estas es la desalinización del agua.

Es por esto que se presenta el siguiente proyecto de investigación: obtención de grafeno a partir de *Shewanella oneidensis* para la desalinización del agua, con el fin de disminuir los riesgos a la salud al realizar la síntesis de grafeno mediante un método sustentable para la potabilización del agua utilizando una membrana de grafeno.

5. HIPÓTESIS

La bacteria *Shewanella oneidensis* será capaz de reducir el óxido de grafeno. El grafeno obtenido se podrá utilizar para desarrollar una membrana para la desalinización de agua. Mediante el uso de *Shewanella oneidensis* para la reducción del óxido de grafeno se obtendrá grafeno de forma sostenible.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL:

Obtener una membrana de grafeno a partir de *Shewanella oneidensis* para la desalinización del agua.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Encontrar las condiciones de síntesis adecuadas para desarrollar *Shewanella oneidensis* en laboratorio
2. Estudiar y controlar las variables que intervienen en la síntesis de óxido de grafeno mediante *Shewanella oneidensis*
3. Realizar un prototipo de membrana a partir del grafeno sintetizado.

7. METODOLOGÍA

A continuación, se presenta un diagrama general (ver figura 9) que representa la metodología para este trabajo.

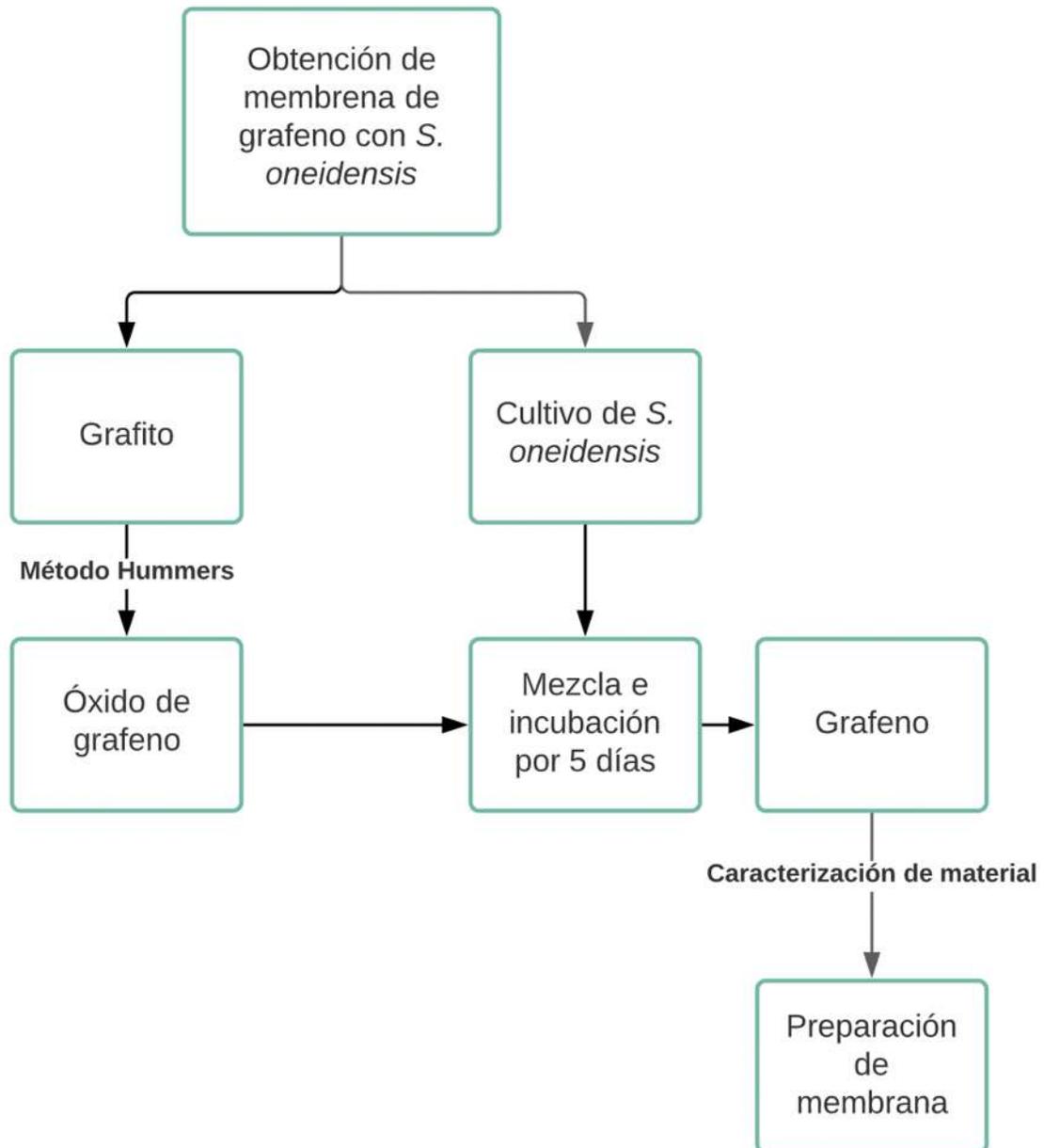


Figura 9. Diagrama de flujo general de la metodología

7.1 ÓXIDO DE GRAFENO

Diagrama del proceso de la síntesis del óxido de grafeno por método Hummers modificado (ver figura 10).



Figura 10. Diagrama para la síntesis de OG

- La síntesis de óxido de grafeno fue realizada mediante el método Hummers. Para esto fue necesario realizar una mezcla con 1 g de grafito (99%, Sigma-Aldrich, 325 mesh) en polvo, con 0.5 g de NaNO₃ (Meyer).
- En una tina de ultrasonido (Branson 1510) (ver figura 11) la mezcla fue agregada a una solución de 24ml de H₂SO₄ concentrado (Jalmek) en baño de hielo. Los componentes fueron mezclados en la tina de ultrasonido por 5 minutos hasta homogeneizar, el rango de temperatura osciló entre 0 y 10 °C.

- c) A la suspensión homogénea se agregaron 3 g de KMnO_4 (cuidando la velocidad de adición y manteniendo una temperatura de $5 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$).
- d) Lentamente fueron agregados 3 g de KMnO_3 y 46 mL de agua desionizada a la pasta para elevar la temperatura a $98 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. La solución fue mantenida a esta temperatura por 30 minutos en agitación.
- e) Fueron agregados 140ml de agua desionizada a una temperatura de $70 \pm 10 \text{ }^\circ\text{C}$ y 3.5 mL de H_2O_2 al 30 %, resultando con una mezcla de color café oscuro (ver figura 12).



Figura 11. Síntesis de grafito en tina de ultrasonido



Figura 12. Solución de óxido de grafeno antes de los lavados

- f) La suspensión resultante fue sometida a un proceso de lavado con agua desionizada a una temperatura de $75 \pm 10 \text{ }^\circ\text{C}$ (ver figura 13), en este primer

lavado se adicionaron 100 mL de HCl al 5 % para lograr eliminar la mayor parte de residuos del permanganato.



Figura 13. Lavado de la solución de óxido de grafeno

g) La solución fue decantada y centrifugada (ver figura 14) a 6500 rpm por 8 minutos en una centrífuga marca Bunsen, Modelo Histam Plus.



Figura 14. Solución de óxido de grafeno a centrifugar

Los lavados fueron realizados con el fin de neutralizar el pH de la solución de OG y eliminar compuestos secundarios residuales que pudieron haberse formado en la reacción química.

- h) Varios lavados fueron llevados a cabo hasta que el pH neutro fue alcanzado, el pH obtenido de la solución de OG fue de 7.56.
- i) La solución fue llevada al horno a 70 °C por 3 días para evaporar el agua (ver figura 15).



Figura 15. Óxido de grafeno después del secado en horno

- j) La muestra extraída del horno fue pulverizada y pesada. Se obtuvieron 1.3 g de la muestra en polvo (ver figura 16).



Figura 16. Óxido de grafeno en polvo

Una vez que se obtuvo la solución de OG se realizaron lavados hasta que alcanzó un pH neutro, se secó en el horno hasta que se evaporará el agua totalmente.

7.2 CARACTERIZACIÓN DE OG

7.2.1 ESPECTROSCOPIA FT-IR

El análisis se llevó a cabo en el laboratorio de análisis químico en el Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Las características del equipo son: Modelo: tensor 27, Marca: Bruker, Rango: 4000 a 400 cm^{-1} Resolución: 1 (ver figura 17).



Figura 17. Espectrómetro de infrarrojo (tomada de www.iim.umich.mx)

7.2.2 DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX)

El análisis se llevó a cabo en el laboratorio de Rayos X en el Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales de la UMSNH. Para esta caracterización se utilizó el equipo “Sistema de difracción de rayos X modelo D8 ADVANCE DAVINCI”. usando un ánodo de cobre con radiación $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1.54$ nm). Para el análisis se molieron los polvos; se colocó en el portamuestras y se incidió el haz de luz con las siguientes condiciones: comprendió un intervalo de 10-60 °, a 40 KeV y una corriente de 30 mA (ver figura 18).



Figura 18. Sistema de difracción de rayos X modelo D8 ADVANCE DAVINCI (tomada de www.iim.umich.mx)

7.2.3 MICROSCOPIA DE BARRIDO (SEM)

El análisis se llevó a cabo en el laboratorio de microscopía de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Campus Morelia, en el Microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-IT300 (ver figura 19).



Figura 19. Microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-IT300 (Tomada de enesmorelia.unam.mx)

Las características del equipo son:

- Doble detector EDS a 35° opuestos 180°.

- Platina motorizada en los 5 ejes con movimiento eucéntrico a cualquier distancia de trabajo.
- Lentes tipo Zoom: foco y área de interés siempre óptimos al variar cualquier parámetro.
- Navegación de la muestra con imagen en colores.
- Cámara de observación y porta-muestras grandes. Pueden introducirse muestras grandes y pesadas, 200 mm de ancho x 80mm de alto, con capacidad de soporte de hasta de 2 kg.
- Presión extendida. Intervalo de presión extendida (hasta 650 Pa). En el modo de bajo vacío, esta propiedad incrementa la capacidad de observación para muestras húmedas, que liberen gases en exceso o muestras no conductoras sin recubrimiento.

7.3 CULTIVO DE SHEWANELLA ONEIDENSIS

- a) La bacteria *Shewanella oneidensis* se encontraba liofilizada (Número ATCC 700550, lote 61771725, ver figura 20). Se preparó agua de peptona tamponada siguiendo las indicaciones del fabricante. Después de una esterilización previa en la autoclave, se dejó enfriar a temperatura ambiente, de forma estéril, bajo campana con flujo laminar. Se agregaron 10 mL de caldo en un tubo de ensayo con tapa rosca en condiciones antisépticas. Se realizó la activación del conglomerado bacteriano (ver figura 21).



Figura 20. Cepa de *Shewanella oneidensis*



Figura 21. Cultivo de *Shewanella oneidensis*, en tubos con agua de peptona tamponada

- b) Ya con crecimiento bacteriano, se realizó el cultivo en cajas Petri con agar MacConkey (ver figura 22) con temperatura de 30 °C a 120 rpm, en una incubadora con agitación marca N-BIOTEK modelo NB-T205 (ver imagen 23). El agar MacConkey se preparó según las indicaciones del fabricante. Después de esterilizarse, se dejó enfriar en un medio estéril bajo campana de flujo laminar con luz ultravioleta. Se vierten 10 ml de los preparados en cajas Petri, con un espesor uniforme de 5 mm. Las placas se dejan solidificar a temperatura ambiente, evitando la acumulación de gotas de condensación en la tapa. Se guardan en plástico para aumentar su tiempo de vida en un refrigerador a 4°C.

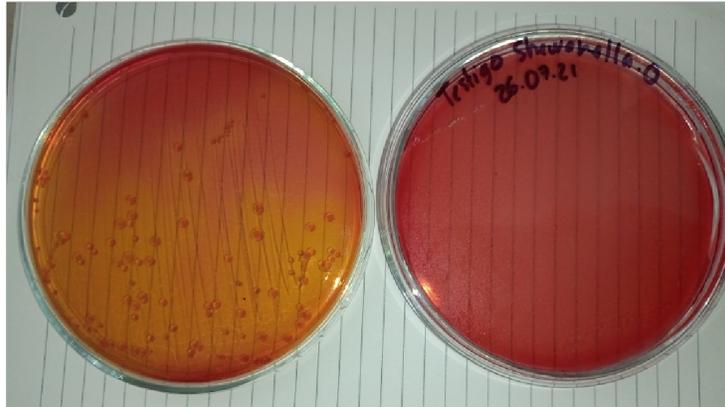


Figura 22. Cultivo de *Shewanella oneidensis* en cajas Petri (izquierda cultivo por asado, derecha testigo).



Figura 23. Incubadora con agitación marca N-BIOTEK (Tomada de labnet.es)

- c) Se realizó tinción Gram para observar que el crecimiento fuera puro y se observó la bacteria *Shewanella oneidensis* bajo el microscopio óptico.
- d) Comprobado el cultivo puro de la bacteria *S. oneidensis*, se realizó el cultivo en frascos Schott con caldo MacConkey a una escala mayor, (ver figura 24) a temperatura de 30 °C, en la incubadora con agitación a 120 rpm



Figura 24. Cultivo de *Shewanella oneidensis* en frascos Schott

- e) Para conocer la concentración de *S. oneidensis*, se realizó la medición de la absorbancia con un espectrofotómetro (UV/BIS) de la marca VELAB (ver figura 25).



Figura 25. Espectrofotómetro UV/BIS

7.4. REDUCCIÓN DE ÓXIDO DE GRAFENO

- a) A las 12 horas de cultivo de *S. oneidensis* se agregó a una solución de OG con una concentración de $0.5 \text{ mg}_{\text{OG}}/\text{mL}_{\text{H}_2\text{O}}$ (Lehner *et al*, 2019). La solución se colocó en una incubadora con agitación a $28 \text{ }^\circ\text{C}$, a 120 rpm, por 5 días.
- b) Se centrifugó la solución de OG y *S. oneidensis* y se secó al horno a $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

7.5. MEMBRANA DE GRAFENO

a) Se secó en el horno a 30 °C el material centrifugado para evaporar el líquido restante y preparar una membrana de grafeno.

7.6 CARACTERIZACIÓN DEL rOG

7.6.1 FTIR

El análisis se llevó a cabo en el laboratorio de análisis químico en el Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales de la Universidad Michoacana. Las características del equipo son: Modelo: tensor 27, Marca: Bruker, Rango: 4000 a 400 cm^{-1} Resolución: 1.

7.6.2 DRX

El análisis se llevó en el laboratorio de Rayos X en el Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales de la Universidad Michoacana. Para esta caracterización se utilizó el equipo “Sistema de difracción de rayos X modelo D8 ADVANCE DAVINCI”. usando un ánodo de cobre con radiación $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1.54$ nm). Para el análisis se molieron los polvos; se colocó en el porta muestras y se incidió el haz de luz con las siguientes condiciones: comprendió un intervalo de 10-60 °, a 40 KeV y una corriente de 30 mA.

7.6.3 SEM

El análisis se llevó a cabo en el laboratorio de microscopía de la Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Morelia, en el Microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-IT300.

Para el análisis la muestra se preparó en el sistema DENTOM VACUUM de preparación de muestras Desk V (ver figura 26), equipado tanto para evaporación como para pulverización catódica, es una solución de deposición de película

delgada de alta productividad para evitar que las bacterias se destruyeran durante la observación por el haz de electrones. Las muestras se prepararon en el equipo a 30mA por 60 segundos.

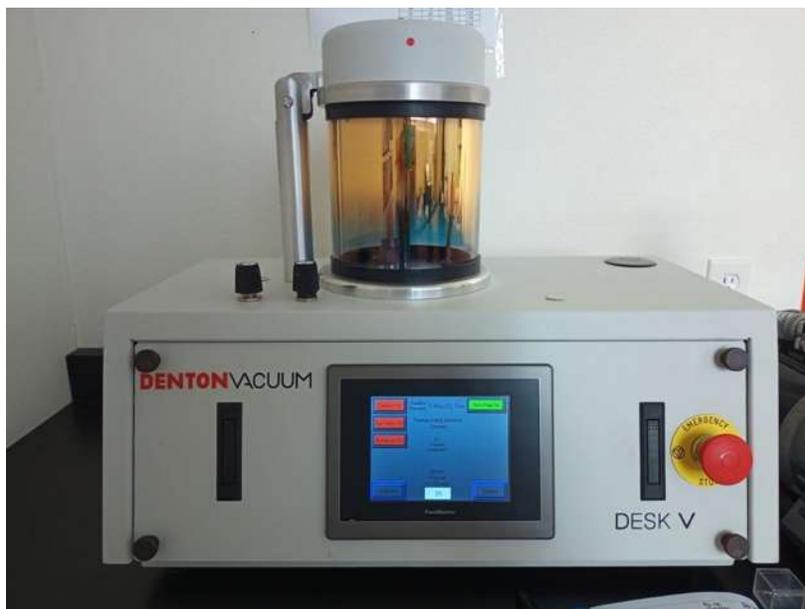


Figura 26. DENTON VACUUM para preparación de muestras Desk V

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS

8.1 SÍNTESIS DE ÓXIDO DE GRAFENO

De la síntesis de óxido de grafeno por método Hummers modificado se obtuvieron 1.3049 gramos de polvo de OG. El polvo obtenido se llevó a caracterización.

8.1.1 FT-IR DEL OG

El primer espectro FTIR (ver figura 27) se registró usando un espectrómetro Bruker en el rango de 4000 a 400 cm^{-1} , debido al hecho de que la vibración molecular de la mayoría de los compuestos orgánicos se ubica en este rango. Con los datos obtenidos se utilizó el software Origin 2019 para realizar observar el espectro infrarrojo en transmitancia que se muestra en la figura 27:

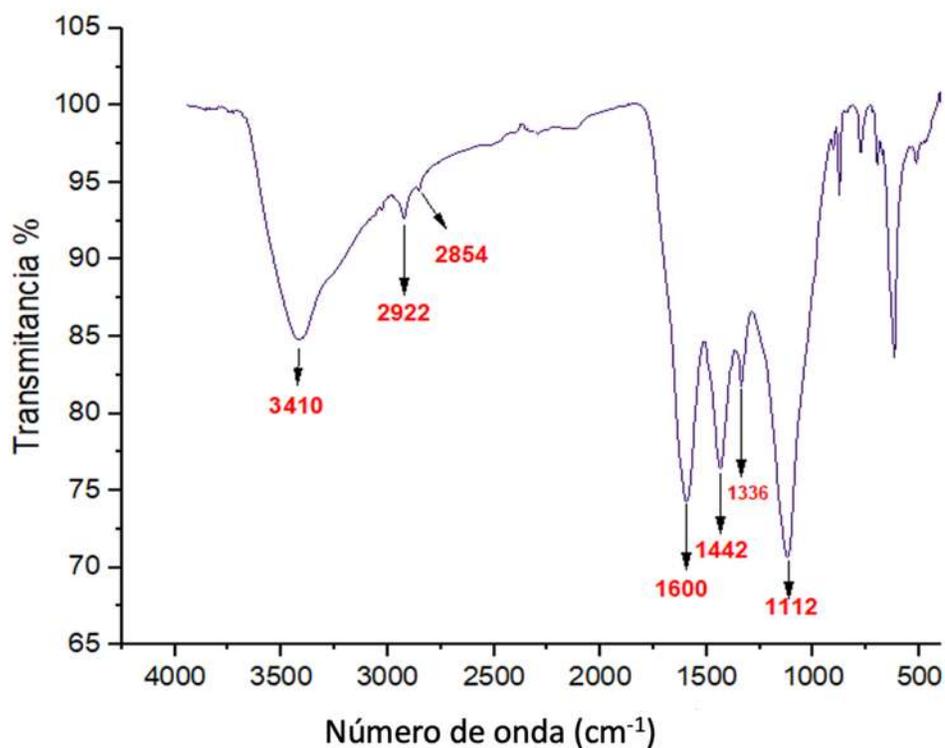


Figura 27. Espectro FT-IR de la muestra de óxido de grafeno.

La región del espectro situada entre 4000 y 1400 cm^{-1} , es de gran utilidad para la identificación de la mayoría de los grupos funcionales presentes en las moléculas orgánicas. Las absorciones que aparecen en esta zona provienen fundamentalmente de las vibraciones de estiramiento. Analizando la gráfica (en el eje de las ordenadas las transmitancia, contra los datos de longitud de onda), se muestran algunas bandas en 3410 cm^{-1} , 2922 cm^{-1} , en 2854 cm^{-1} , 1600 cm^{-1} , 1442 cm^{-1} , 1336 cm^{-1} y 1112 cm^{-1} .

El espectro reveló una banda ancha en 3410 cm^{-1} , que es el resultado de la superposición de dos picos que representan un grupo funcional carboxílico. La banda en 2922 y 2854 cm^{-1} indican presencia de alcanos C-H y OH en agua (Gunasena *et al.*, 2019). Las banda en 1600 cm^{-1} podrían atribuirse a la vibración de flexión del grupo C=O. De 1500-500 cm^{-1} se considera la zona región de la huella dactilar. La zona situada entre 1400 y 600 cm^{-1} , es por lo general, compleja, debido a que en ella aparecen una combinación de vibraciones de alargamiento, así como

de flexión (Mondragon, 2017). Las bandas en 1442 y 1336 pueden ser debido al estiramiento de la vibración del grupo C-O y C-H (Zhang *et al.*, 2019). La banda en 1112 cm^{-1} indica la presencia de C-O y C-C. Estas son las bandas características del óxido de grafeno, es decir, que el material obtenido es óxido de grafeno, por lo que el proceso de síntesis para su obtención fue el adecuado.

8.1.2 DRX DEL OG

La técnica de difracción de rayos X (DRX) se ha utilizado ampliamente en la caracterización estructural de materiales de carbono sp^2 . Los patrones de DRX de grafito y grafeno tienen picos distintos y se pueden usar para diferenciar entre grafito y estructuras de grafeno. La DRX es una herramienta analítica importante para la caracterización de los nanocompuestos intercalados y exfoliados. DRX puede medir con precisión el espaciado entre capas o plano basal, por ejemplo, en el OG, monitorear el intercalado de la red del OG. Mientras que el espaciado entre capas de grafito es 3.35 \AA la síntesis de grafito a OG da como resultado un aumento en este espaciado del plano basal debido a la funcionalización del grafito con grupos que contienen oxígeno (Ibrahim *et al.*, 2021).

La aplicación de difracción de rayos X para la determinación de fase y confirmar la reducción de OG a grafeno es una herramienta muy útil, no es tan poderoso como los otros enfoques (espectroscopia Raman, FT-IR, AFM) debido a la información limitada recopilada. Por tanto, su aplicación siempre va acompañada de otros métodos como FT-IR para aportar más información sobre la estructura del catalizador (Ibrahim *et al.*, 2021).

El patrón de difracción de rayos X de OG (ver figura 28), muestra un pico de difracción prominente en 2θ de 13.16 \AA con distancia interplanar de 6.722 \AA atribuido a los planos (001) y un pico ancho en aproximadamente 42.25 correspondiente al plano (100) indica el orden de rango corto en las nanocapas de grafeno, lo que confirma el éxito de la síntesis del OG a partir del grafito (Sahoo *et*

al., 2021). La distancia interplanar del OG se calcula usando la ley de Bragg: $\lambda = 2d \sin(\theta)$, donde λ es la longitud de onda del haz de rayos X ($\lambda=0.154$ nm), d es el espaciamiento d y θ es el ángulo de difracción de inclinación (Tambe, 2021).

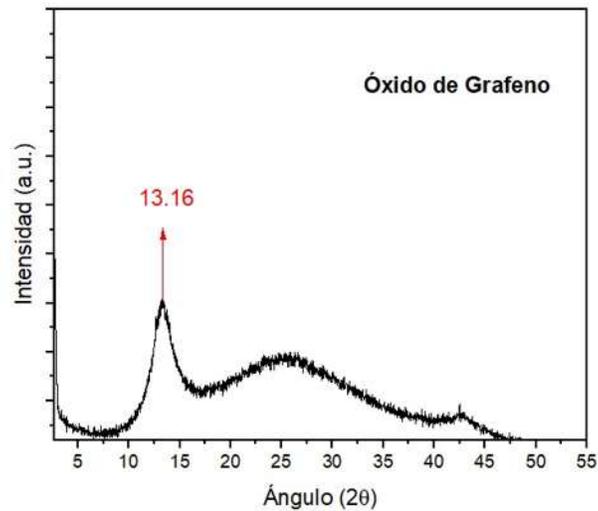


Figura 28. Diffractograma de rayos X de óxido de grafeno.

8.1.3 SEM DEL OG

La microscopía electrónica de barrido es una técnica que resulta muy útil para realizar una aproximación a la calidad de los materiales dentro de la muestra de OG facilitando un visión global de la población, es decir, de la cantidad de material presente de OG. El microscopio de barrido electrónico arroja distintos resultados entre estos un espectro con elementos encontrados dentro de la muestra (ver figura 29).

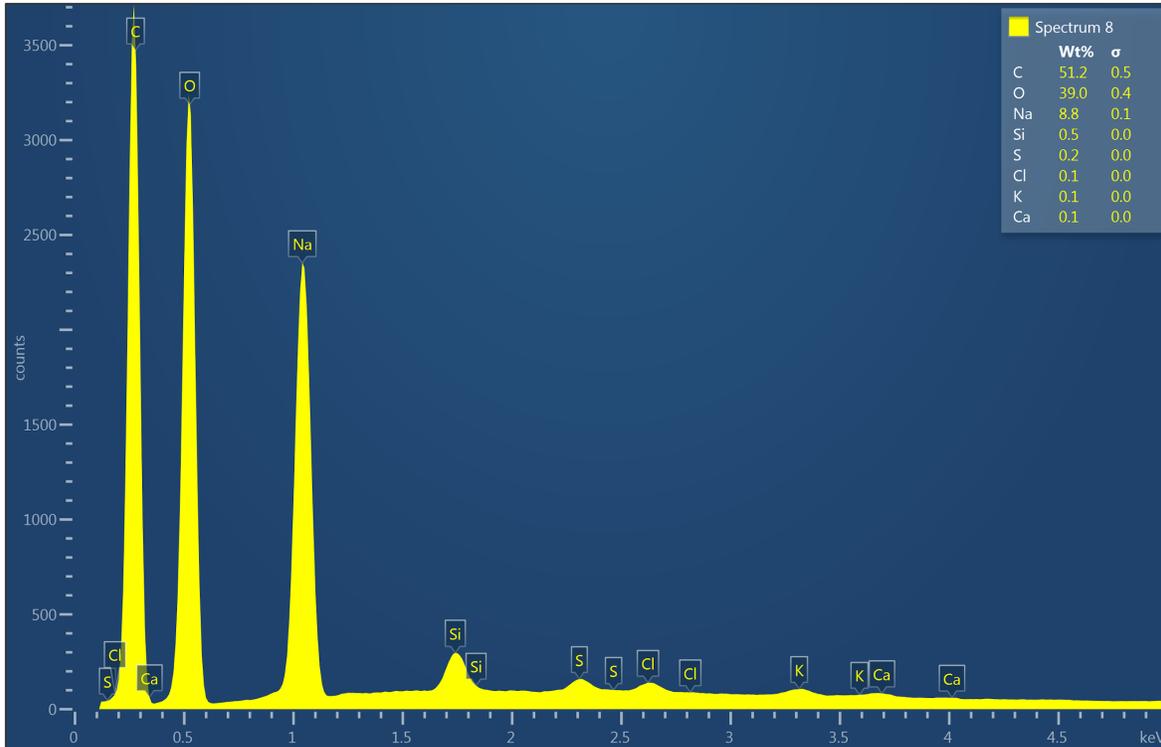


Figura 29. Elementos encontrados en la muestra de OG por la técnica de caracterización EDS. Los elementos principales son el carbono (51.2%) y oxígeno (39%).

Mediante la Espectroscopia de Energía Dispersiva (EDS, por sus siglas en inglés) se puede conocer que tipo de elementos se encuentran en la muestra (ver tabla 1), el porcentaje en peso y el porcentaje atómico en el punto de muestreo seleccionado.

Tabla 1. Elementos del espectro de OG

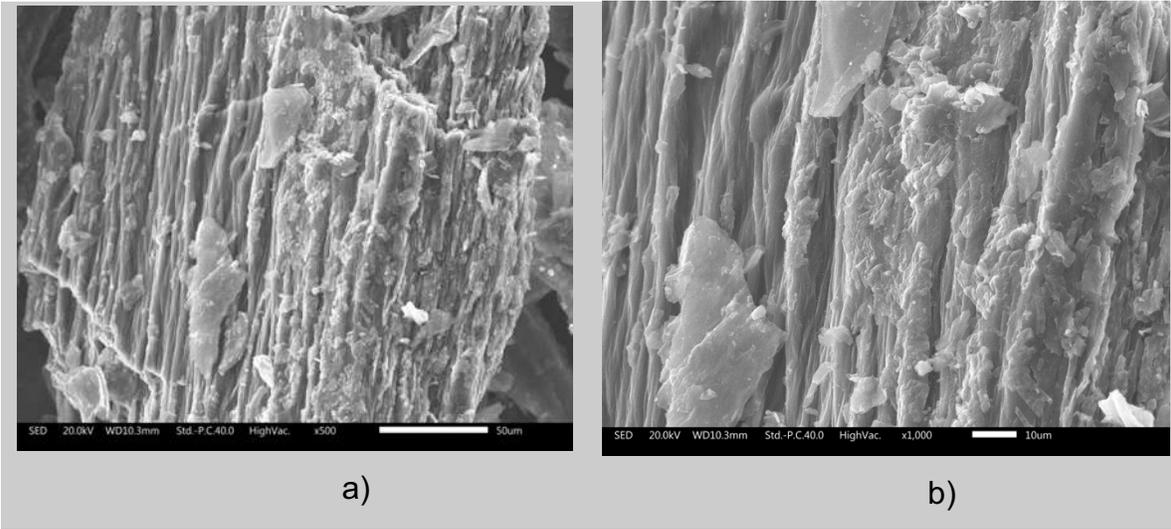
Elemento	Peso%	Atómico %
C	51.21	59.93
O	38.96	34.23
Na	8.80	5.38
Si	0.49	0.24
S	0.17	0.07
Cl	0.15	0.06
K	0.14	0.05
Ca	0.08	0.03

Total:	100.00	100.00
---------------	--------	--------

En la muestra se detectaron mayormente contenidos de carbono, oxígeno y sodio, que concuerdan con el análisis composicional del óxido de grafeno. También hay presencia de silicio, azufre, cloro, potasio y calcio en pocas cantidades, estos elementos pueden ser residuos de la síntesis. Las micrografías SEM de las muestras son de magnificaciones de 500X hasta 5,000X.

Las micrografías SEM de OG para diferentes magnificaciones se muestran en la figura 30, se muestran partículas de forma irregular y de diferentes tamaños. En la figura 30 (a-d) se muestra partículas de distintos tamaños y más delgadas. En las figuras 30a y 30b, la morfología se asemeja a paredes prismáticas con superficie rugosa.

Del análisis se puede observar que la textura de las muestras de OG se caracteriza por partículas irregulares, con textura rugosa y distintos tamaños.



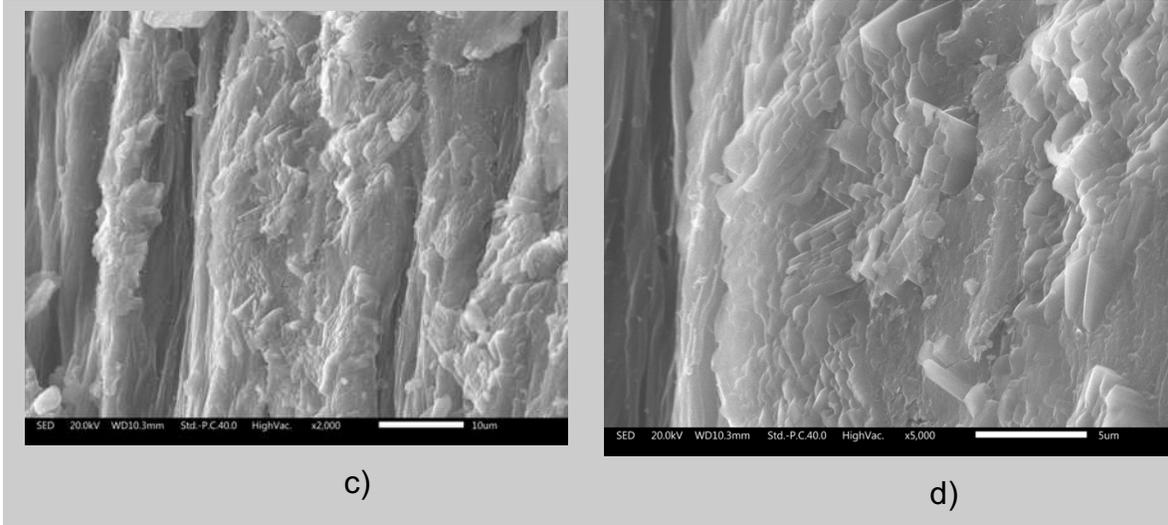


Figura 30. Fotomicrografías SEM de la muestra de OG. La figura 30a se observa a 500X, tiene una textura rugosa, y partículas de diversos tamaños. En la figura 30b se muestra a un acercamiento de 1000x del mismo punto de muestreo. En las figuras 30c y 30d, el acercamiento de 2000x y 5000x respectivamente, se ven los bordes sin forma, no se observa formación de capas.

8.2 CULTIVO DE *SHEWANELLA ONEIDENSIS*

S. oneidensis se activó en el agua peptonada, mostró turbidez en el tubo Hach cultivado.



Figura 31. Cultivo de *Shewanella oneidensis*, en agua de peptona tamponada. El tubo con las siglas S.O. presenta turbidez indicando desarrollo de *S. oneidensis*.

En figura 31, se ve el crecimiento bacteriano, el tubo de la izquierda es el tubo que se cultivó por asada y el tubo de la derecha es el testigo, en el tubo donde se inoculó la bacteria se nota una turbidez característica del crecimiento bacteriano.

Se procedió al cultivo en cajas Petri donde también hubo crecimiento de colonias, de estas se tomó una muestra para realizar tinción Gram y observarlas con el microscopio óptico. En la figura 32 se muestran las bacterias observadas con el lente 100X de un microscopio óptico marca Zeiss. Las bacterias se tiñeron de color rosa-rojo característico de las bacterias Gram negativas, como *S. oneidensis*, las bacterias tienen forma de bacilo y se encuentran en conjuntos. No se observó ningún otro tipo de microorganismo dentro de la muestra.

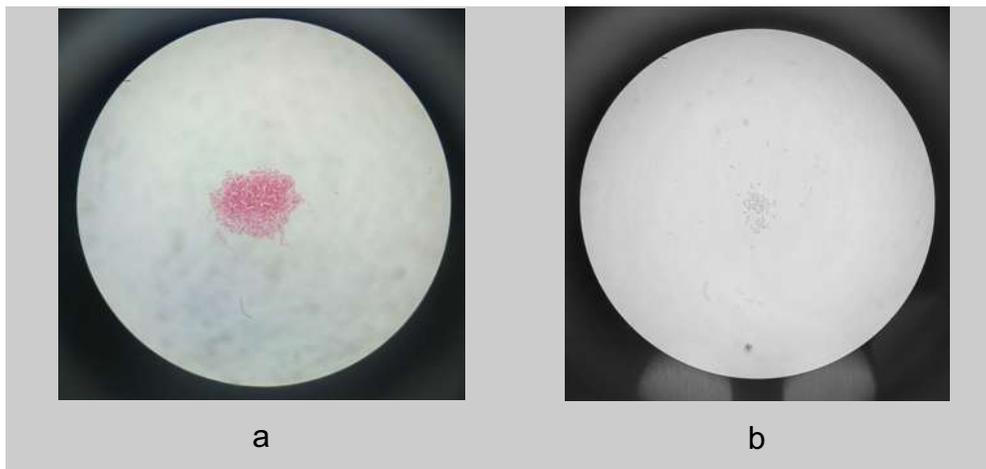
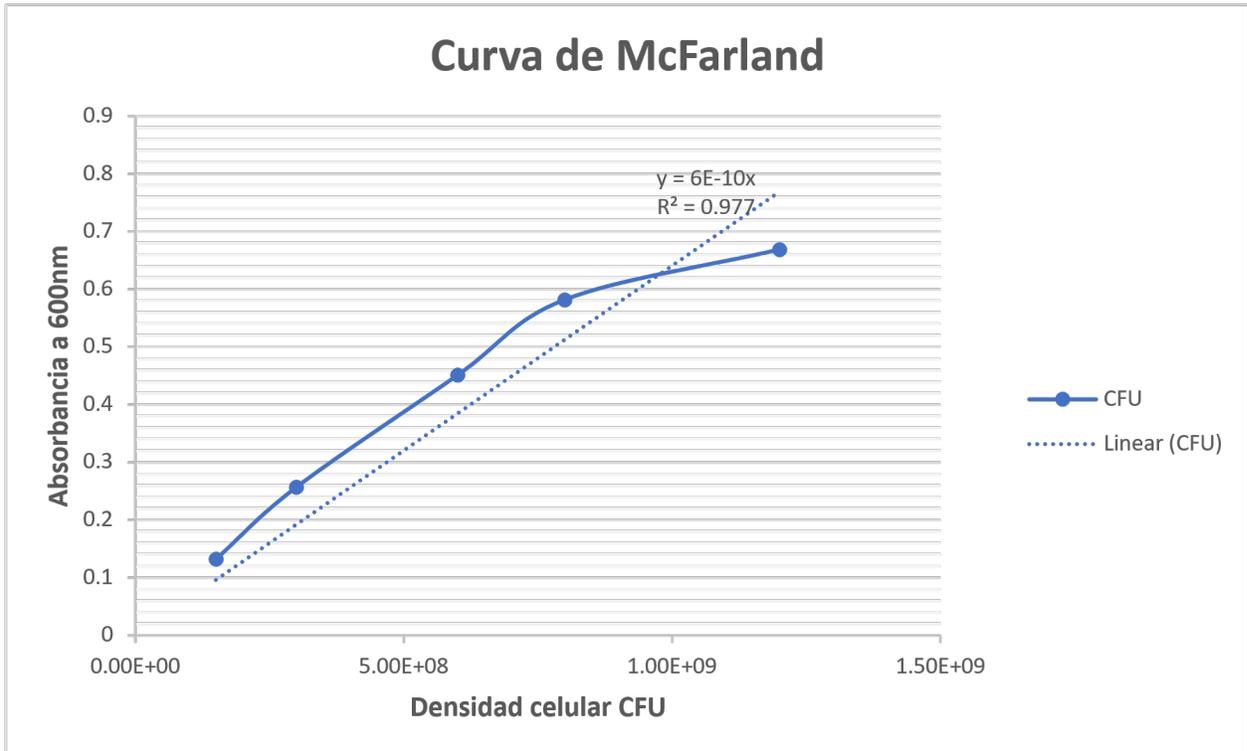


Figura 32. Tinción de *Shewanella oneidensis* vista bajo el objetivo 100x del microscopio óptico. En la figura a se muestra un gran grupo de bacterias pertenecientes a *S. oneidensis*. En la figura b se observa un grupo más pequeño de bacterias pertenecientes a *S. oneidensis*. Ambas figuras a y b son de la misma muestra.

Para el cálculo de poblaciones bacterianas se utilizó la escala McFarland, esta consiste en el uso de una serie de diez tubos estandarizados que contienen una suspensión de un precipitado fino, esta suspensión se utiliza porque es similar a las suspensiones de bacterias en opacidad. Los estándares utilizados son precipitados de Sulfato de bario (BaSO_4) que se obtiene al mezclar Cloruro de Bario (BaCl_2) con Ácido Sulfúrico (H_2SO_4); mezclando distintas cantidades de reactivo se obtiene diez estándares con diferente turbidez. Las suspensiones bacterianas se comparan visualmente con los estándares hasta encontrar al más similar en turbidez y se lo relaciona con el número de células de acuerdo a cada estándar. Al momento de comparar los estándares con una suspensión bacteriana es importante que los tubos sean del mismo diámetro para eliminar los errores (Fiallos y Dugarte, 2017).

Se realizó una curva de calibración utilizando los estándares mencionados anteriormente con el fin de obtener la curva de McFarland (ver gráfica 1) y la ecuación para relacionar la absorbancia medida en el espectrofotómetro con la concentración bacteriana de *Shewanella oneidensis*.



Gráfica 1. Curva McFarland

Con la ecuación $y=6E^{-10}x$, fue posible calcular la densidad celular CFU del cultivo en caldo, para ello se puso en un tubo Hach 10 ml de agua destilada y 100 μ l del cultivo de *Shewanella oneidensis* de 12 horas, se midió la absorbancia que fue de 0,004 nm a una OD₆₀₀, sustituyendo en la ecuación:

$$y = 6E^{-10} * x$$

Sustituyendo el valor de la absorbancia de 0.004 nm

$$y = 6E^{-10} * 0.004 = 2.4 \times 10^8$$

Para el cultivo de 24 horas de *Shewanella oneidensis* la absorbancia fue de 0.009 nm OD₆₀₀.

$$y = 6E^{-10} * x$$

Sustituyendo el valor de la absorbancia de 0.009 nm

$$y = 6E^{-10} * 0.009 = 5.4 \times 10^8$$

Para el experimento y realizar la mezcla de cultivo de *Shewanella oneidensis* y la solución de OG se necesitó que *Shewanella oneidensis* alcanzará una densidad mínima de 5×10^6 CFU (colony forming unit por sus siglas en inglés).

Una vez que se llegó a la densidad bacteriana deseada, se prosiguió a cultivar a *S. oneidensis* a una mayor escala. Se cultivó la bacteria en 3 frascos con 200 ml de caldo MacConkey por 24 horas en una incubadora con agitación a 120 rpm. Después de 24 horas se centrifugó el caldo para obtener una mayor densidad de *S. oneidensis*. También se realizó un testigo con medio de cultivo MacConkey y solución de OG sin bacteria.

8.3 REDUCCIÓN DE OG

Con el fin de reducir el óxido de grafeno, se debe añadir 100 ml de cultivo de *S. oneidensis* y 50 ml solución de OG. La solución de OG debe tener una concentración de 0.5 mg/mL para reducirlo mediante *Shewanella oneidensis*.

Para preparar la solución de OG, se utilizó agua destilada y óxido de grafeno. El OG se encontraba en polvo (ver figura 33), para lograr que se disolviera en agua destilada fue necesario ponerlo en la tina de ultrasonido por dos horas para que las escamas se alcanzaran a disolver totalmente (ver figura 34).



Figura 33. Polvo de OG. Material resultante de la síntesis de grafito.



Figura 34. Disolución de OG en agua destilada en la tina Branson 1510 de ultrasonido

Una vez que se obtuvo la solución de OG, se esterilizó para realizar la solución con el cultivo de *Shewanella oneidensis*. La reducción de OG se realizó mezclando 75 ml de solución óxido de grafeno preparada asépticamente con 150 ml de cultivo de 12 h de *Shewanella oneidensis* (ver imagen 35) para tener un total de 225 ml en cada uno de los frascos Schott. La mezcla se dejó en agitación a 120 rpm a

temperatura ambiente (25°C) por 5 días. Los cultivos se realizaron de forma anaeróbica por triplicado.



Figura 35. Solución de OG con cultivo de *Shewanella oneidensis* de 12 horas

A cada uno de los frascos con solución de OG y *S. oneidensis* se le midió la absorbancia cada 12 horas durante los 5 días, para conocer si había crecimiento de *S. oneidensis*. La tabla 2 muestra las mediciones obtenidas en cada uno de los frascos. La observancia del frasco testigo fue de 0.003 (OD₆₀₀).

Tabla 2. Mediciones de absorbancia de los frascos de cultivo con OG

Tiempo (hrs)	Frasco 1 OD600	Frasco 2 OD600	Frasco 3 OD600
0	0.004	0.005	0.004
12	0.015	0.015	0.014
24	0.017	0.016	0.17
36	0.017	0.019	0.018
48	0.019	0.02	0.021
60	0.021	0.022	0.021
72	0.022	0.023	0.023

84	0.023	0.03	0.026
96	0.024	0,03	0.027
108	0.024	0.031	0.027
120	0.024	0.031	0.027

Durante las primeras 12 horas se elevó el valor de la absorbancia, prácticamente se triplicó; esto debido a que las primeras 24 horas es la fase de crecimiento exponencial de *S. oneidensis*, después de las 24 horas el valor de la absorbancia fue subiendo lentamente, hasta la hora 108 mostró el último cambio en la absorbancia de la muestra del frasco 2, los demás frascos ya no cambiaron el valor de absorbancia después de la hora 96.

Se centrifugaron las muestras de los frascos y un 10 % del sedimento se puso a secar en el horno a 30 °C para obtener el polvo y caracterizarlo. El otro 90% del sedimento se colocó en una charola para secarlo en el horno y poder realizar una membrana para desalinización de agua por osmosis inversa.

8.3.1 FT-IR DEL rOG

El espectro FT-IR para la muestra de OG reducido se registró usando un espectrómetro Bruker en el rango de 4000 a 400 cm^{-1} , debido al hecho de que la vibración molecular de la mayoría de los compuestos orgánicos se colocó en este rango. Con los datos obtenidos se utilizó el software Origin 2019 para obtener el espectro FT-IR (ver figura 36) de un espectro infrarrojo en transmitancia que se muestra a continuación:

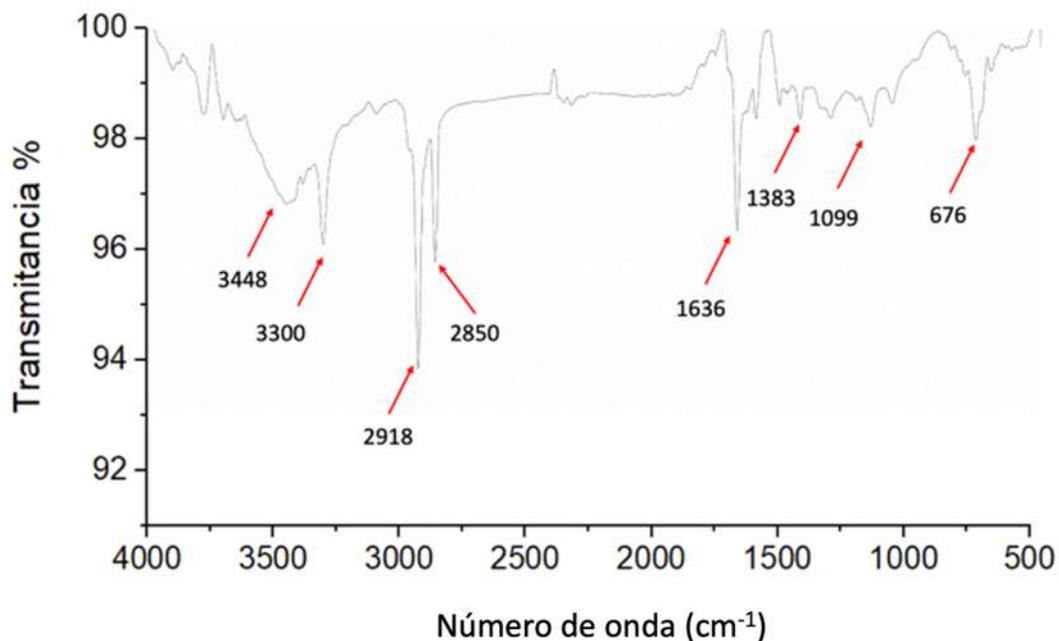


Figura 36. Espectro FT-IR de la muestra de óxido de grafeno reducido.

Las bandas más relevantes del espectro FT-IR del rOG mostradas en la gráfica 2 están en 3448 cm^{-1} , 3300 cm^{-1} , en 2918 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} , 1636 cm^{-1} , 1383 cm^{-1} , 1099 cm^{-1} y 676 cm^{-1} . En la banda en 3448 cm^{-1} es bastante ancho, indica la presencia de ácidos carboxílicos al igual que la banda de 3300 cm^{-1} , las bandas en 2918 cm^{-1} y 2850 cm^{-1} indican presencia de alcanos C-H, en 1636 cm^{-1} hay una presencia de dobles enlaces conjugados C=C (Colom *et al.*, 2020), en la zona de la huella dactilar las bandas de 1383 cm^{-1} y 1099 cm^{-1} no son muy amplias ni intensas y pertenecen al grupo carbonilo, la banda en 676 cm^{-1} indica la presencia de alquinos.

Si se comparan los espectro FTIR del OG y del rOG por la bacteria *S. oneidensis*, las intensidades de las bandas que corresponden a los grupos funcionales que contienen oxígeno disminuyeron en comparación con las intensidades de las bandas del OG. Esto demuestra que la bacteria *S. oneidensis* redujo el OG, obteniendo un material más puro “el grafeno”.

8.3.2 DRX DEL rOG

El patrón de difracción de rayos X (DRX) se realizó para confirmar la reducción del OG. Los picos más intensos se encuentran de el intervalo de 10–35 °. En el difractograma (ver figura 37), se ve un pico intenso de reflexión que corresponde a los planos (001) a 14 °, revelando una distancia interplanar de 6.3066 Å que demuestra la presencia de la estructura de grafeno (Gunasena *et al.*, 2019).

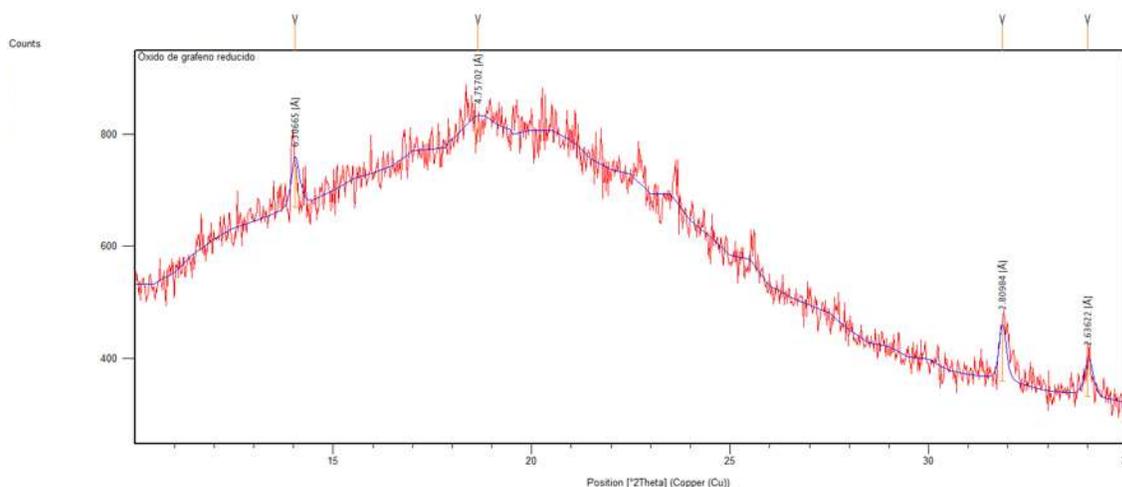


Figura 37. Difractograma de rayos X del rOG. El valor de longitud de onda fue 1.5406 Å (Cu)

En la tabla 3 se muestran los picos con mayor intensidad. Hay otros 3 picos, uno bastante pequeño a aproximadamente 18.6° con una distancia interplanar de 4.757 Å, que puede atribuirse a trazas de material de partida sin reaccionar, es decir, grafito y la existencia de moléculas de CO_{2(s)}, (Gunasena *et al.*, 2019).

Los otros dos picos son en 31.849 ° y 34.008 ° con una distancia interplanar de 2.809 Å y 2.636 Å respectivamente. El difractograma se obtuvo utilizando el software Xpert High Score Plus. Todas las cifras de distancia interplanar se determinaron utilizando la ley de Bragg, en Xpert.

Tabla 3. Datos de los picos del patrón de difracción de rayos X para el rOG

Posición [°2Th.]	Altura [conteos]	d-interplanar [Å]
14.0430	81.73	6.30664
18.6533	41.05	4.75702
31.8490	101.77	2.80984
34.0083	66.12	2.63622

8.3.3 SEM DEL rOG

El grafeno fabricado mediante diferentes técnicas contiene muchos defectos que dependen del proceso. Los defectos en el grafeno tienen impactos negativos en la alta movilidad y otras propiedades físicas y mecánicas del grafeno. En consecuencia, es esencial caracterizar estos defectos mediante SEM u otras técnicas avanzadas de microscopía. Las características de nanoescala del grafeno, incluidas las arrugas, las formas de los granos y las líneas de plegado, se pueden caracterizar específicamente utilizando el SEM (Ibrahim *et al.*, 2021).

La figura 38 (a-d) son las fotomicrografías del testigo, la solución de OG con el medio de cultivo, es decir, con la finalidad de observar que no hubo bacterias de *S. oneidensis* presentes. Las micrografías de esta muestra se observan a continuación:

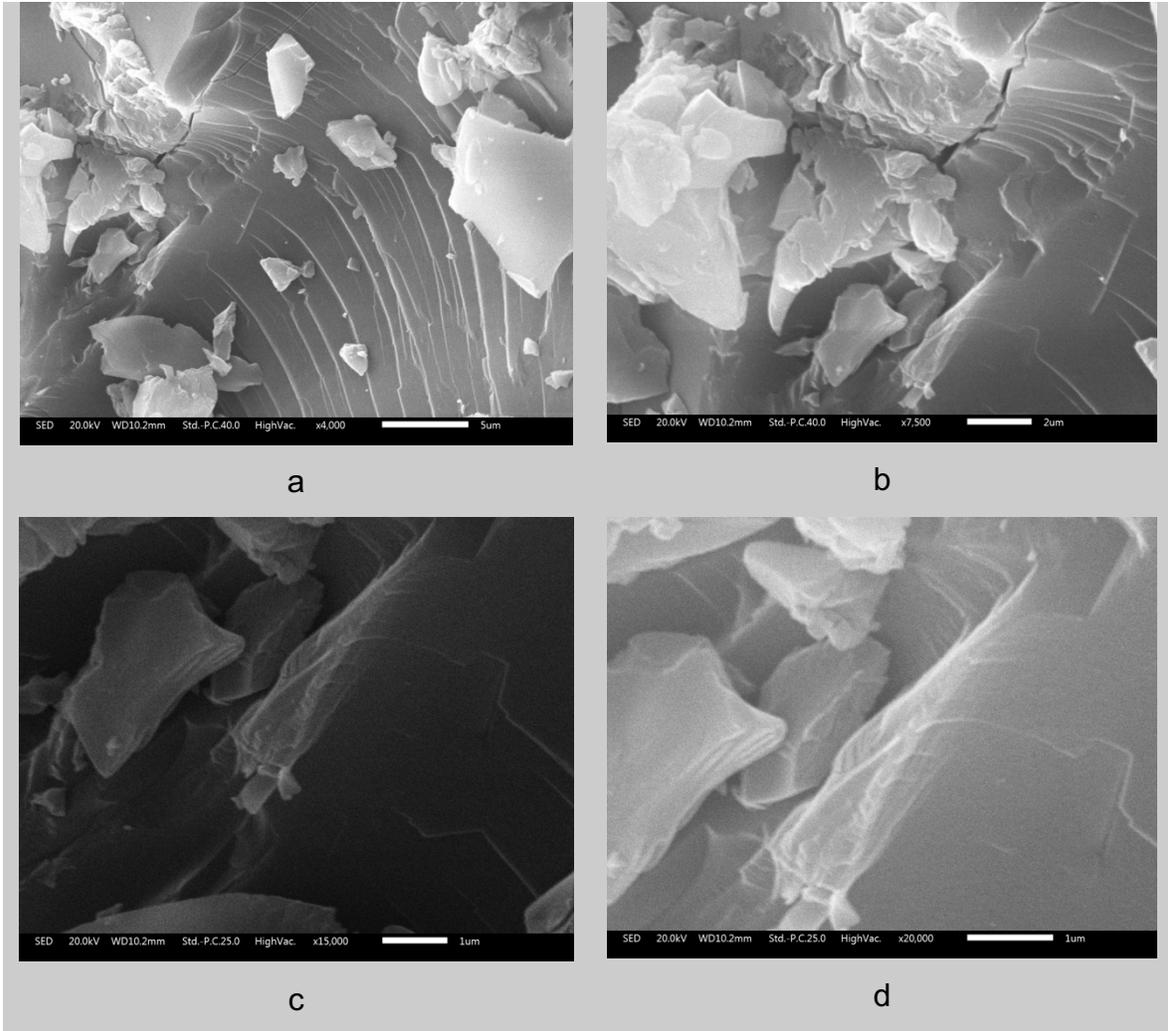


Figura 38. Micrografías del testigo (solución de OG con el medio de cultivo MacConckey). Las micrografías correspondientes a las figuras 38a y 38b, son del mismo punto a una magnificación de 4,000X y 7,500X respectivamente. Las micrografías correspondientes a las figuras 38c y 38d son de un punto distinto observadas con una magnificación de 15,000X y 20,000X respectivamente. En todas las micrografías se observa un material rugoso, óxido de grafeno.

En la figura 38a no se observan capas definidas, hay presencia de partículas de distintos tamaños, de formas irregulares, con textura rugosa.

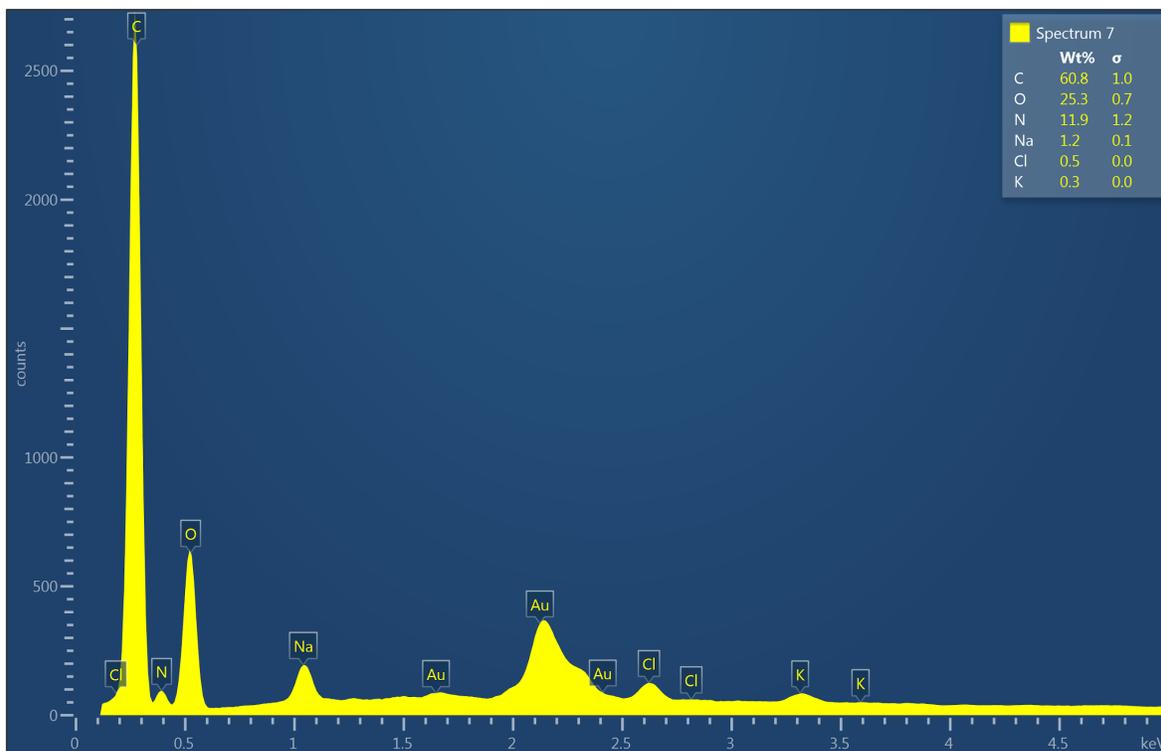


Figura 39. Espectro EDS del testigo (solución de grafeno con medio de cultivo MacConkey). Los elementos principales son el carbono (60.8%) y oxígeno (25.3%).

En la figura 39, se redujo el porcentaje de oxígeno en un 13.7% comparado con la muestra de OG que presenta un 39%. El contenido de Nitrógeno se debe a los ingredientes del caldo de cultivo MacConkey, en específico al digerido pancreático que contiene N en su fórmula. En la tabla 4 se muestran los elementos del espectro de OG con medio de cultivo MacConkey. La reducción del porcentaje de oxígeno es probable que se deba a que la solución de OG se mezcló con el medio de cultivo MacConkey.

Tabla 4. Elementos del espectro de OG con medio de cultivo MacConkey.

Elemento	Peso %	Atómico %
C	60.83	66.91
N	11.94	11.26
O	25.29	20.88
Na	1.16	0.67
Cl	0.47	0.17
K	0.31	0.11

Total:	100.00	100.00
---------------	--------	--------

A continuación, se muestra el espectro de la muestra de OG reducido por *S. oneidensis* (ver figura 40). Mediante el EDS se conoce que la muestra contiene: carbono, oxígeno en mayor parte; otros elementos en menores cantidades son: nitrógeno, sodio, azufre, cloro y potasio, que probablemente son residuos del medio de cultivo MacConkey.

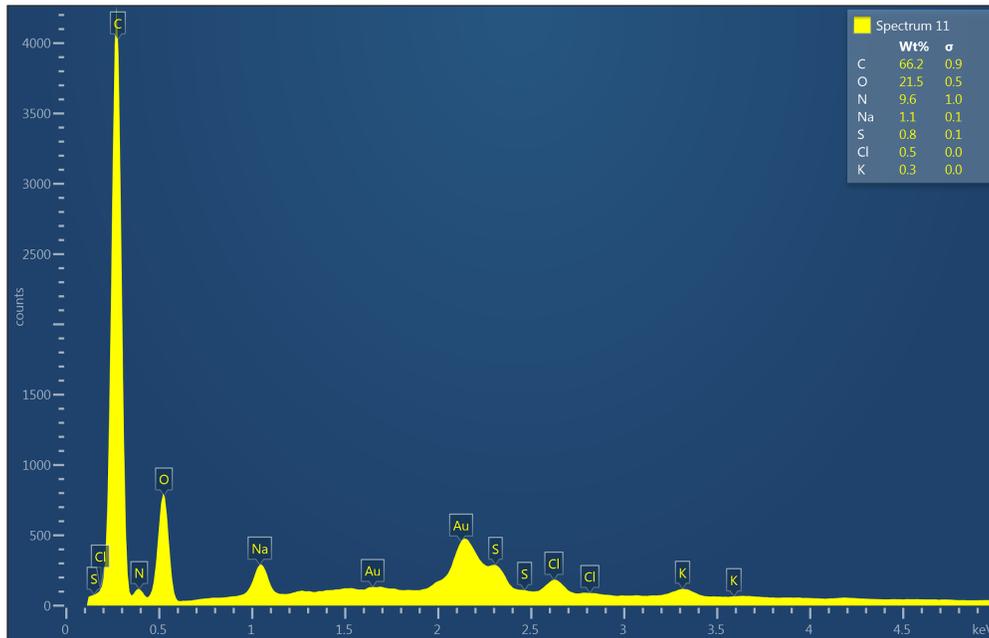


Figura 40. Elementos encontrados en la muestra de rOG por la técnica de caracterización EDS, . Los elementos principales son el carbono (66.2%) y oxígeno (21.5%).

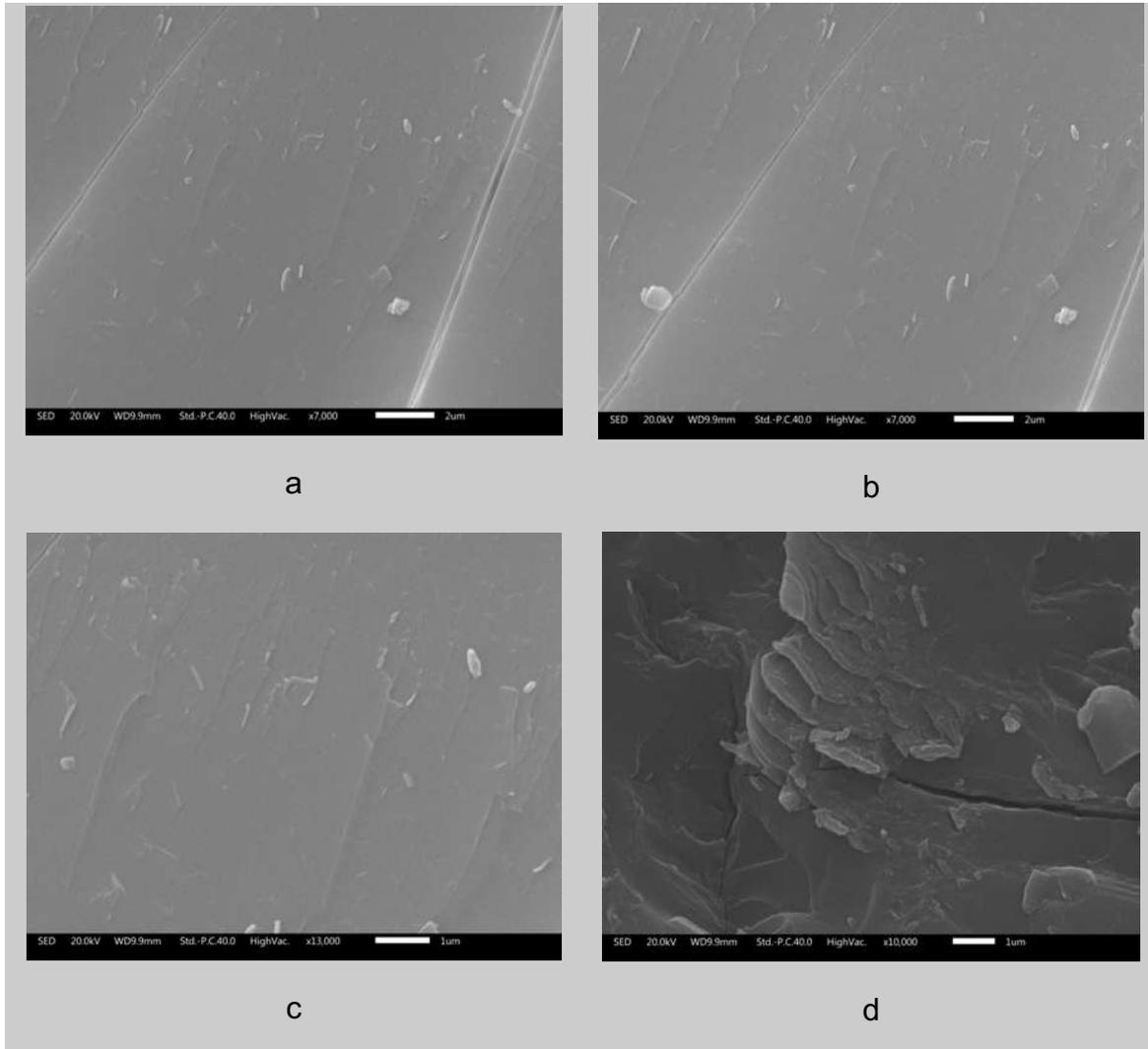
El porcentaje del oxígeno (21,5) en la muestra de rOG disminuyó considerablemente a diferencia del OG (O=39%). El porcentaje de carbono es de 66.2% en el rOG a diferencia del 51.2% en el OG. Ésta es una prueba de que la bacteria redujo el OG.

Tabla 5. Elementos del espectro de OG

Elemento	Peso%	Atómico %
C	66.22	72.19
N	9.59	8.97
O	21.55	17.63
Na	1.12	0.64
S	0.77	0.31

Cl	0.46	0.17
K	0.30	0.10
Total:	100.00	100.00

La segunda muestra a la solución de OG y *S. oneidensis*. Las micrografías de esta muestra se observan a continuación.



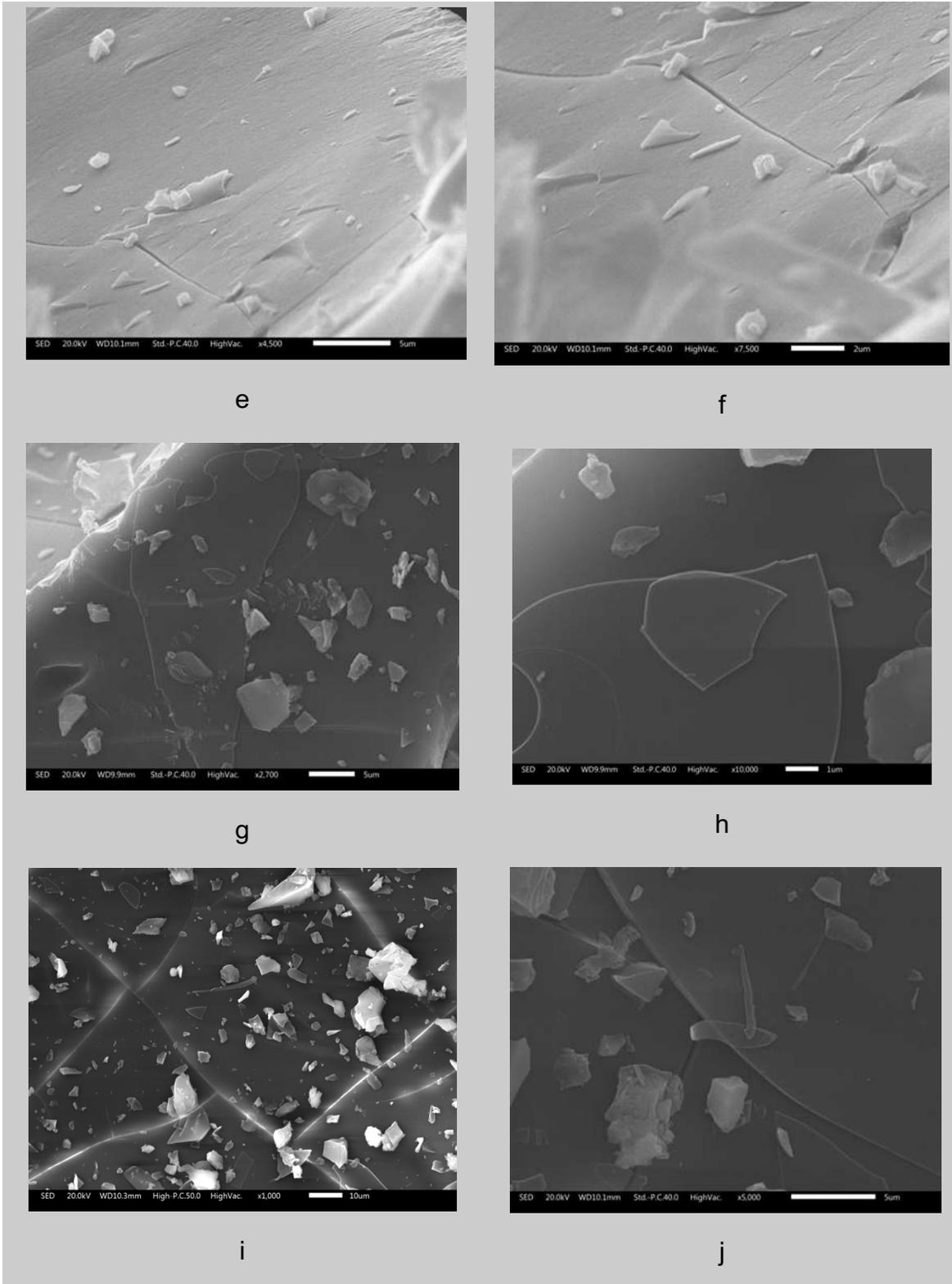


Figura 41. Micrografías de la muestras en microscopio de barrido electrónico de rOG. Las micrografías 41a y 41b son casi del mismo punto, a una magnificación de 7,000X en esta imagen se observan algunas bacterias (*S. oneidensis*) sobre una capa de rOG. En la figura 41c a 13,000X se observa con una textura poco rugosa. Se observan algunas partículas que pudieran ser bacterias deformadas. En la figura 41d a 10,00X se observa la textura más rugosa. Las figuras 41e y 41f son del mismo punto a distintas magnificaciones, se observan

claramente dos bacterias y la superficie lisa, con algunos bordes. La figura 41h (10,000X) está a una magnificación mayor que la 41g (2,700X), se observan claramente las láminas formadas de grafeno y una superficie lisa. La figura 41j (1,000) está a una mayor magnificación que la 41i (5,000), se observa una superficie lisa, las capas del grafeno y una bacteria, se observan partículas de material amorfas.

La Figura 41 muestra imágenes SEM de láminas formadas de grafeno. Las fotomicrografías SEM revelaron láminas, superficies lisas, bacterias y partículas de material.

En la figura 42, la primer micrografía pertenece al OG y la segunda al rOG, ambas están a la misma magnificación de 5,000X, la morfología del material es distinto, el OG es rugoso, con muchos bordes y partículas de material a diferencia del rOG, el cual se observa con una superficie lisa y pocos bordes y partículas menos amorfas.

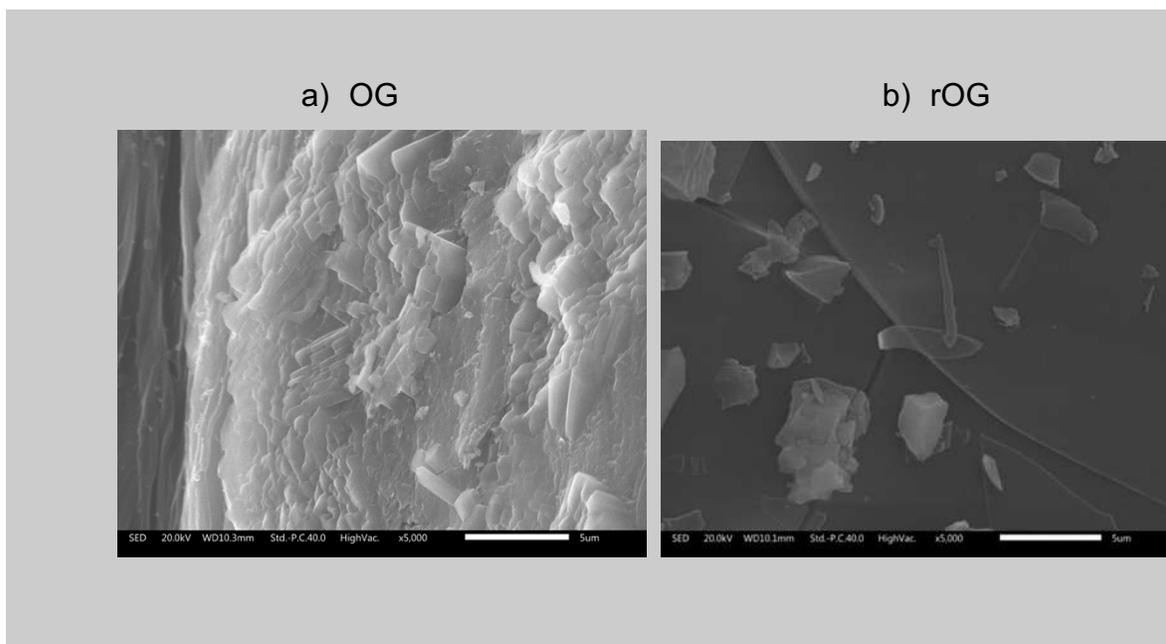


Figura 42. Micrografías de OG y rOG

En este estudio, el óxido de grafeno se sintetizó mediante un método de Hummers modificado y se redujo mediante un método biológico con la bacteria Gram negativo *S. oneidensis*. La calidad del material depende mucho del proceso de síntesis del óxido de grafeno.

8.4. MEMBRANA

El material resultante de la solución de OG y *S. oneidensis* fue centrifugado, el sedimento aún con bastante humedad se colocó en un recipiente de silicón (ver figura 43) en el horno a 30 °C para secar y poder preparar una membrana de grafeno.



Figura 43. Sedimento de rOG

El material tardó dos días en secarse en el horno, una vez seco se desprendió fácilmente del recipiente quedando una textura porosa (ver figura 44) en forma de placa.



Figura 44. Material rOG para la membrana

El material obtenido no es útil para su uso directo como membrana de ósmosis inversa, por lo cual no fue posible desarrollar el prototipo de membrana. El grafeno de una sola capa no puede proporcionar la formación de una membrana selectiva, para ello se debe utilizar una membrana compuesta, Vivas (2021) sugiere utilizar una poliamida o un sustrato poroso en el que se traspase la capa de grafeno. Posteriormente, llevar a cabo un tratamiento para la formación de poros con diámetro y distribución controlados con el objetivo de una red cristalina sin defectos

y, por tanto, impermeable con nanoporos de 0,4-1.0 nm adecuados para una membrana de desalinización. Las moléculas de NaCl llegan a medir hasta 0.9 nm. Las características de una membrana para osmosis inversa se encuentran en el apartado 2.5.2.1.

9. CONCLUSIONES

Con respecto a la hipótesis. La bacteria *Shewanella oneidensis* fue capaz de reducir el óxido de grafeno. El grafeno obtenido se puede utilizar para desarrollar una membrana, pero es necesario el uso de un segundo material para la fabricación. El uso de *S. oneidensis* es una forma de obtener grafeno evitando el uso de químicos y procesos que generan contaminantes.

El cultivo de *S. oneidensis* se desarrolló en caldo de cultivo MacConkey a diferencia de las recomendaciones en la literatura que se ha cultivado con Caldo de Lisogenia (LB).

Es posible obtener grafeno mediante la reducción de OG con la bacteria *S. oneidensis*. A partir del espectro FT-IR, DRX y las imágenes SEM se verificó que el material final es grafeno, se redujo la cantidad de oxígeno después de ser incubado con cultivo de *S. oneidensis*.

El grafeno obtenido puede ser utilizado para elaborar una membrana para desalinización del agua mediante ósmosis inversa, pero no de manera directa, se debe procesar con algún otro material para obtener las características de una membrana selectiva.

Con este trabajo se da a conocer la viabilidad de un método de biosíntesis mediante la bacteria *S. oneidensis* MR-1 para la obtención de grafeno, sin utilizar agentes adicionales.

Este tipo de biosíntesis verde proporciona implicaciones de un método prometedor que podría extenderse a la fabricación de distintos materiales que incluyen el rGO.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Arenas, A. (2017). *Obtención de membranas a partir de óxido de grafeno para la desalinización de agua de producción*. Universidad Industrial de Santander.
- Aguirre, F. González, J. (2015). *Síntesis y caracterización de capas conductoras de Oxido de grafeno (GO): propiedades vibracionales bajo condiciones extremas de presión y temperatura*. Grupo de Altas presiones y espectroscopía (CITIMAC). Facultad de Ciencias de la Universidad de Cantabria. Universidad del País Vasco.
- Boveri, R. (2014). *Óxido de grafeno: síntesis, propiedades mecánicas y aplicaciones*. Nova Science Publishers, Inc.
- Casiano, C., Özerol, G., Bressers, H., Kuks, S., Edelenbos, J., & Gleason, A. (2019). *The state as a stimulator of wastewater treatment policy: a comparative assessment of three subnational cases in central Mexico*. *Journal of Environmental Policy and Planning*, 21(2), 134–152. <https://doi.org/10.1080/1523908X.2019.1566060>
- Chávez-Lizárraga, G. A. (2018). *Nanotecnología una alternativa para el tratamiento de aguas residuales: Avances, Ventajas y Desventajas*. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 9(1), 52–61.
- Clavijo, J. (2013). *Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM)*. *Revista elementos*. 3(3), 133-146. ISSN-e 2248-5252
- Colom, X., Cañavate, J., Lis, M. J., & Sanjuan, G. (2020). *Análisis estructural de Óxidos de Grafeno (GO) y Óxidos de Grafeno reducidos (rGO)*. 77,(591), 167-174.
- Cortes, F. I. A., & Dominguez, A. M. (2000). *Desalinización del agua*. *Ingeniería Hidráulica En Mexico*, 15(1), 27–49.
- Cristina, F. T. T., & Valeria, P. L. C. (2017). *Estudio Del Consumo De Energía En El Proceso De Osmosis Inversa Utilizando Un Filtro De Membrana De Grafeno Para La Desalinización Del Agua Del Mar*. Universidad Central Del Ecuador.

- De Silva, K. K. H., Huang, H. H., Joshi, R. K., & Yoshimura, M. (2017). Chemical reduction of graphene oxide using green reductants. *Carbon*, 119, 190–199. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2017.04.025>
- Dévora-Isiordia, G. E., González-Enríquez, R., & Ruiz-Cruz, S. (2013). Evaluación de procesos de desalinización y su desarrollo en México. *Tecnología y Ciencias Del Agua*, 4(3), 27–46.
- Dominighini, C. , Cataldi, Z., Olivero, M. , Armas, A., Scurati, C., Gottardo, M. , Muscia, L. y Damiano P. (2012). *Análisis de Membranas de Osmosis Inversa para aguas con alto contenido de Arsénico*. XII Safety, Health and Environment World Congress
- Fiallos, J. y Dugarte, Y. (2017). *Determinación de la correlación entre Métodos Visuales, Ópticos y Difusión en placa en el Crecimiento de Escherichia coli*. Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos Carrera de Ingeniería Bioquímica.
- García, L. (2014). *Mecanismos moleculares de adaptación a los cambios de temperatura en la bacteria antártica Shewanella frigidimarina*.
- Gozálvez, J.M., Lora, J. (1998). Fabricación de membranas de acetato de celulosa para ósmosis inversa y nanofiltración mediante el método de inversión de fase. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Ingeniería Química y Nuclear.
- Guerrero, I. (2016). *Desalinización de agua por membranas de grafeno nanoporoso : Cálculos de primeros principios* (Universidad Andres Bello). DOI: 10.13140/RG.2.2.17063.96167
- Gunasena, R. G. S. P., Deemantha, M. B. A., Amarasinghe, D. A. S., & Attygalle, D. (2019). Development of Graphene Oxide Based Capacitive Gas Sensor for Selective Detection of NO₂. *2019 Moratuwa Engineering Research Conference (MERCon)*, 594–598. <https://doi.org/10.1109/MERCon.2019.8818849>
- Hosseini, M. A., Malekie, S., & Ebrahimi, N. (2020). The analysis of linear dose-responses in gamma-irradiated graphene oxide: Can FTIR analysis be considered a novel approach to examining the linear dose-responses in

- carbon nanostructures? *Radiation Physics and Chemistry*, 176, 109067. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2020.109067>
- Ibrahim, A., Klopocinska, A., Horvat, K., & Abdel Hamid, Z. (2021). Graphene-Based Nanocomposites: Synthesis, Mechanical Properties, and Characterizations. *Polymers*, 13(17), 2869. <https://doi.org/10.3390/polym13172869>
- Lehner, B. A. E., Janssen, V. A. E. C., Spiesz, E. M., Benz, D, Brouns, S. J. J., Meyer, A. S., & van der Zant, H. S. J. (2019). Creation of Conductive Graphene Materials by Bacterial Reduction Using *Shewanella Oneidensis*. *ChemistryOpen*, 8(7), 888–895. <https://doi.org/10.1002/open.201900186>.
- López-Polín, G. y Gómez-Navarro, C. (2016). *Propiedades mecánicas de membranas de grafeno: consecuencias de la inducción controlada de defectos*. Departamento de Física de la Materia Condensada. Universidad Autónoma de Madrid.
- Liu, Y., Dustin Lee, J. H., Xia, Q., Ma, Y., Yu, Y., Lanry Yung, L. Y., ... Zhou, Z. (2014). A graphene-based electrochemical filter for water purification. *Journal of Materials Chemistry A*, 2(39), 16554–16562. <https://doi.org/10.1039/c4ta04006f>
- Marquina, J.; Power, Ch. y González, J. (2010). *Espectroscopia Raman del grafeno monocapa y el grafito: acoplamiento electrón fonón y efectos no adiabáticos*. Revista Tumbaga (2010), 5, 183-194
- Mayora-Curzio, C. A., Cremades-Oliver, L. V., & Cusidó-Fàbregas, J. A. (2015). El grafeno. parte i: estructura, propiedades y aplicaciones. *Dyna (Spain)*, 90(3), 232– 235. <https://doi.org/10.6036/7205>
- Mishra, A. K. y Pathania, D. (2018). Óxido de grafeno: avances en investigación y aplicaciones. Estrella nueva.
- Mondragon, P. (2017). *Espectroscopia de infrarrojo para todos ...y 51 espectros de alimentos consumidos en México*. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C. (CIATEJ). ISBN 978-607-9754846

- Petrick, S., Castillo, R. (2004). Método de Rietveld para el estudio de estructuras cristalinas. Laboratorio de Datación, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería.
- Sagle, Alyson & Freeman, Benny. (2004). Fundamentals of Membranes for Water Treatment. The Future of Desalination in Texas. 2.
- Sahoo, P., Shubhadarshinee, L., Jali, B. R., Mohapatra, P., & Barick, A. K. (2021). Synthesis and characterization of graphene oxide and graphene from coal. *Materials Today: Proceedings*, S2214785321056443. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.08.206>
- Sarvestani, A. B., Chogani, A., Shariat, M., Moosavi, A., & Kariminasab, H. (2021). The effect of nanopores geometry on desalination of single-layer graphene-based membranes: A molecular dynamics study. *Journal of Molecular Liquids*, 339, 116749. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116749>
- Singh, V., Joung, D., Zhai, L., Das, S., Khondaker, S. I., & Seal, S. (2011). Graphene based materials: Past, present, and future. *Progress in Materials Science*, 56(8), 1178–1271. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2011.03.003>
- Tambe, P. (2021). Synthesis and characterization of acid treated reduced graphene oxide. *Materials Today: Proceedings*, S2214785321047751. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.06.381>
- Tanizawa, Y., Okamoto, Y., Tsuzuki, K., Nagao, Y., Yoshida, N., Tero, R., ... Sandhu, A. (2012). Microorganism mediated synthesis of reduced graphene oxide films. *Journal of Physics: Conference Series*, 352(1). <https://doi.org/10.1088/17426596/352/1/012011>
- Toh, W., Ang, E. Y. M., Ng, T. Y., Lin, R., & Liu, Z. (2020). An investigation on the effects of nanoplastic particles on nanoporous graphene membrane desalination. *Desalination*, 496, 114765. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2020.114765>

- Tolba, A. M., & Mohamed, R. A. (1999). Performance and characteristics of reverse osmosis membranes. In *Proc 4th International Water Technology Conference* (pp. 171-81)
- Villanueva-Luna, A., Castro-Ramos, J. y Ortiz-Lima, C. (2013). Raman spectroscopy and its applications. *Optica Pura y Aplicada*. 46. 10.7149/OPA.46.1.83.
- Vivas, V. H., da Cunha, T. H. R., Ferlauto, A. S., & de Souza Figueiredo, K. C. (2021). Process of production of CVD graphene membrane for desalination and water treatment: A review of experimental research results. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 38(3), 423–434. <https://doi.org/10.1007/s43153-021-00119-0>
- Wang, G., Qian, F., Saltikov, C. W., Jiao, Y., & Li, Y. (2011). Microbial reduction of graphene oxide by *Shewanella*. *Nano Research*, 4(6), 563–570. <https://doi.org/10.1007/s12274-011-0112-2>
- Xiong, J., Chan, D., Guo, X., Chang, F., Chen, M., Wang, Q., Song, X., & Wu, C. (2020). Hydrogen production driven by formate oxidation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 104(12), 5579–5591. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10608-w>
- Xu, J., Ruan, G., Chu, X., Yao, Y., Su, B., & Gao, C. (2007). A pilot study of UF pretreatment without any chemicals for SWRO desalination in China. *Desalination*, 207(1–3), 216–226. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2006.08.006>
- Yang, Z., Yan, H., Yang, H., Li, H., Li, A., & Cheng, R. (2013). Flocculation performance and mechanism of graphene oxide for removal of various contaminants from water. *Water Research*, 47(9), 3037–3046. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.03.027>
- Yu, C., Zhang, Y., Fang, Y., Tan, Y., Dai, K., Liu, S., & Huang, Q. (2020). *Shewanella oneidensis* MR-1 impregnated Ca-alginate capsule for efficient Cr(VI) reduction and Cr(III) adsorption. *Environmental Science & Pollution Research*, 27(14), 16745–16753. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06832-1>

- Zaaba, N. I., Foo, K. L., Hashim, U., Tan, S. J., Liu, W. W., & Voon, C. H. (2017). Synthesis of Graphene Oxide using Modified Hummers Method: Solvent Influence. *Procedia Engineering*, 184, 469–477.
<https://doi.org/10.1016/j.proeng.2017.04.118>
- Zhang, L., Li, Y., Guo, H., Zhang, H., Zhang, N., Hayat, T., & Sun, Y. (2019). Decontamination of U(VI) on graphene oxide/Al₂O₃ composites investigated by XRD, FT-IR and XPS techniques. *Environmental Pollution*, 248, 332–338.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.126>