

BIOMACHINING OF OXYGEN-FREE COPPER:
DEVELOPMENT OF A CONTINUOUS PROCESS FOR
INDUSTRIAL APPLICATION

ESTIBALIZ DIAZ TENA

ENERO 2016

Departamento de Ingeniería Química y del Medio Ambiente

Departamento de Ingeniería Mecánica



Ingeniaritza Goi Eskola Teknikoa
Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Bilbao



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

NAZIOARTEKO
BIKAINASUN
CAMPUSA
CAMPUS DE
EXCELENCIA
INTERNACIONAL

BIOMACHINING OF OXYGEN-FREE COPPER:

**DEVELOPMENT OF A CONTINUOUS PROCESS FOR
INDUSTRIAL APPLICATION**

ESTIBALIZ DIAZ TENA

Directores de la tesis

Dra. Ana Elías Sáenz

Departamento de Ingeniería Química y del Medio Ambiente

Dr. Luis Norberto López de Lacalle

Departamento de Ingeniería Mecánica

Escuela Técnica Superior de Ingeniería de Bilbao

Universidad del País Vasco (UPV/EHU)



AGRADECIMIENTOS



AGRADECIMIENTOS

Quién me iba a decir que estaría escribiendo este apartado de mi tesis esperando a un avión con destino a casa en un aeropuerto de Argentina. Y es que estos cuatro años han dado para mucho.

Todo investigador sabe que durante el doctorado uno pasa por momentos buenos y momentos en los que crees querer dejar todo de lado. Por suerte para mí, han prevalecido los buenos, o mejor dicho... ¡rebuenos! Como dirían mis compañeros argentinos.

Todo lo que he conseguido en este tiempo no ha sido sólo gracias a mí, sino en gran parte a toda la maravillosa gente que me ha acompañado en este largo, pero fructífero, camino. Es por eso por lo que me gustaría dedicarles unas palabras. Si bien, desde ya, digo que no podré expresar con ellas todo lo que les debo, ni tampoco todo lo que estas personas han significado para mí, pues necesitaría cada página de esta tesis para poder hacerlo, o incluso más, muchas más.

Si se me permite, comenzaré con mi familia. Mis *aitaxos* Miren y Andoni, mi *txitxis* Itziar, mis *abuelitos* Pepita y Vale (estés donde estés abuelito), mis tíos y primos, mi *amore* Rubén y mis *suegris* Feli y Txema. Una vez leí que la familia son las personas en tu vida que te quieren en la suya y aquellos que harían cualquier cosa por verte sonreír. Así que indudablemente, dentro de mi familia están también mis amig@s: mi cuadrilla de toda la vida, la gente a la que he conocido gracias a mi chico y mis amigos del gimnasio, en especial, mis divinas, Sandra, Vir y June.

Todos ellos, sin excepción alguna, han sido mis mejores confidentes. Nunca han querido perderse la ocasión de poder celebrar mis logros, que por muy pequeños que fueran, los hemos celebrado como si no se pudiera conseguir nada más alto en este mundo. Han sido el eco de mis risas y el pañuelo que ha secado mis lágrimas cuando las cosas se han complicado. Han dejado todo de lado para escucharme y/o ayudarme cada vez que lo he necesitado.

A algunos de ellos tengo que agradecerles algo por separado, puesto que han sido los que más directamente han vivido esta etapa junto a mí. A mis aitas y a mi hermana, la paciencia que han tenido durante mis estudios, guardando silencio en casa cada vez que lo he necesitado y aguantando mi mal humor cuando el estrés me ha apretado. Si no lo hacían, ya sabían que aparecía la *aspersores*, pues así me llamaban, para mandarles callar. A mis abuelos agradecerles que todos los días del año hayan tenido una vela encendida, pidiendo porque todos nosotros consigamos nuestros objetivos y todo nos vaya bien. Quizá sea algo psicológico, pero el saber que esa vela ha estado ahí, me ha dado fuerzas. A Rubén, que el pobrecito mío se ha tenido que adaptar a mi horario y a mi escaso tiempo de ocio; pero que ha sabido siempre como ayudarme a desconectar. Y a mis amig@s, por ser tan comprensiv@s y entender que por diversas razones me haya tenido que perder algunos planes y que a veces, en realidad más de lo que me hubiera gustado, mi respuesta haya sido un '*no puedo*'. Desde estas líneas, también me gustaría pedirles perdón a todos los que he mencionado, porque quizá no haya podido dedicarles el tiempo suficiente, pero decirles, que sin duda alguna, pienso recuperar lo perdido.

A alguien a quien también debo mucho es a Luis Norberto López de Lacalle, *Berti*. Él fue quien me introdujo en el fantástico mundo de la investigación. Con él y con el apoyo del gran grupo de investigación que forman Amaia, Izaro, Adrián, Asier, Silvia, Ivan y otros muchos más, he aprendido lo valioso que es tener un equipo de trabajo altamente cualificado a tu lado que te permita formarte de manera única. En especial debo agradecer a Adrián todo el tiempo que ha invertido en mí, que aun estando muy atareado siempre me ha ayudado en cuanto le he necesitado y eso no lo hace cualquiera.

Gracias a Berti, conocí el que sería mi actual tema de tesis. Todavía recuerdo como si fuera ayer cuando nos vino comentando que había visto en un congreso a unos *chinos* que trabajaban con unos *bichos* que *comían* cobre. Y sin dudarle, nos animó a lanzarnos a la piscina y a comenzar a indagar en el tema.

Fue entonces cuando conocí a la que durante este tiempo ha sido mi segunda familia: Ana, Koldo, Astrid, Gorka y Naiara. Tengo tanto que decir de ellos que no sé ni por dónde empezar, porque las ideas me vienen todas a la vez y me cuesta encontrar las palabras adecuadas para poder hacerlo. Desde el primer momento que pasé a formar parte de su grupo, me han hecho sentir como una más, haciéndome partícipe de todo cuanto han organizado y depositando toda su confianza en mí. En cada duda que me ha surgido, ellos han estado ahí; cada vez que he necesitado consejo, ellos han estado ahí. Han apostado por mí incluso en las ocasiones que ni yo misma lo he hecho. Hemos tenido un final de tesis agónico, pero he podido contar con ellos en todo momento, de día, de noche, por email o por teléfono. Es por ello por lo que les estaré eternamente agradecida. Sólo espero poder seguir trabajando a su lado por mucho más tiempo, para poder recompensarles por todo lo que me han ayudado, afrontando nuevos retos y ofreciéndoles todo mi trabajo, esfuerzo y dedicación.

Ahora bien, con el permiso de Astrid, Gorka y Naiara, me gustaría dedicarles unas palabras a Ana y a Koldo.

En un principio en este apartado de agradecimientos no había hecho ninguna mención especial a mi querida Ana, pero no me encontraba agusto. Algo dentro de mí me decía que al menos unas líneas tenía que dedicar a la persona gracias a la cual hoy estoy escribiendo esta tesis. Algunos me tacharán de *pelota*, pero solo voy a decir lo que en verdad pienso.

A mi parecer, una de las cosas más importantes en el doctorado es tener a un buen director de tesis y yo he tenido la suerte de tener a mi lado a una directora excepcional. No dudó en ayudarme a buscar una solución en uno de los momentos más difíciles de mi carrera, probando varias opciones, hasta dar con la adecuada. Por muchas que fueran las cosas que Ana tuviera pendientes, me ha hecho sentir como su prioridad, intentando, ante todo, buscar lo mejor para mí. Ana ha sido directora las 24 horas del día, los 365 días del año. Ha estado siempre disponible, ya fuera en un día festivo o incluso la necesitara un día a deshoras. Ha tenido detalles conmigo que nunca los olvidaré. Por todo ello y mucho más, gracias compañera, GRACIAS.

En cuanto a Koldo, él ha sido mi *gran compañero* en esta investigación. Hemos trabajado codo con codo muchas horas y durante largos días en el laboratorio. Él ha tenido la suma paciencia de enseñarme todo desde cero. Siempre ha estado dispuesto a realizar cualquier trabajo que yo le he propuesto, sin importarle cual sería la carga de trabajo que eso supondría. ¡Si hasta estando jubilado le he seguido dando guerra! Juntos hemos hecho del trabajo de laboratorio algo agradable, contando nuestras

historietas, chistes, haciéndonos pequeñas bromas o incluso apostándonos un café a ver quién es capaz de adivinar el valor del parámetro que estábamos analizando. Todo ello, ha hecho sin duda alguna de esta tesis una etapa excepcional de mi vida.

También me gustaría agradecer a Martín Ramírez de la Universidad de Cádiz por suministrarnos la materia prima de esta investigación, mis queridas amigas *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Gracias al Departamento de Ingeniería Química y del Medio Ambiente de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería de Bilbao por prestarme el equipamiento necesario para poder llevar a cabo toda mi investigación y a Alberto Bergareche por su ayuda técnica.

Finalmente, me queda por mencionar a la gente que me ha acompañado en la última etapa de mi doctorado en Argentina. Antes de comenzar mi viaje, me dijeron que los paisajes de Argentina me enamorarían. Y estaban en lo cierto, aunque me llevo algo más que los paisajes grabados en mi retina: su gente en mi corazón.

Inevitable es el miedo que se siente al dejar tu casa, tu familia y amigos atrás e irte a un nuevo destino, sin saber qué te deparará. Sin embargo, yo he tenido la suerte de encontrarme con gente extraordinaria. El Doctor Edgardo Rubén Donati me ha abierto las puertas de su laboratorio y me ha brindado la oportunidad de ampliar mis conocimientos en materia de microorganismos, estando siempre arropada por los mejores compañeros que he podido tener a este lado del charco: Marcela, Alejandra, Graciana, Camila, Cecilia, Ana, Josefina, Leonardo, Cristian y Francisco. Gracias a ellos, la experiencia, si bien corta, ha sido muy valiosa y gratificante.

En especial Marcela, mi gran ángel de la guarda del laboratorio. Ni sé las preguntas que le habré hecho y ni sé las horas que ella habrá dedicado a enseñarme lo necesario para desarrollar mi trabajo allí. Siempre con su sonrisa y su alegría dispuesta a ayudarme en todo lo que he necesitado. También siento la necesidad de hacer una mención especial a mi querida amiga Alejandra. Hemos pasado muchas horas juntas, tanto dentro como fuera del laboratorio y siento que me llevo más que una compañera de trabajo, me llevo a una gran amiga a la que espero volver a ver muy pronto. Gracias a ella he conocido a la buena gente tucumana (Toppo, Belén, José, Sole y muchos más) con los que he podido compartir fantásticos días de asado, música y risas.

Creo que con esto termino mi apartado de agradecimientos. He intentado ser breve, pero mirando a mi alrededor y viendo la cantidad de hojas escritas que están extendidas en el suelo de este aeropuerto, creo que no lo he conseguido. Para qué engañarme, sabía desde el principio que siendo como soy, este apartado corto, lo que se dice corto, no iba a ser. Me resulta muy difícil reducir en unas pocas líneas todo lo que el doctorado ha significado para mí.

Sé que me dejo a gente por nombrar en el camino, como a mis compañeros de los potes de los viernes del departamento, o mis grandes amigos del máster, que tantas horas de clase y tantos viajes a Santander hemos compartido. Pero el siguiente capítulo de mi tesis ya me está pidiendo paso, así que se lo recompensaré con un potecillo, que sé que les gustará más.

A todos los que he nombrado y a todos los que no, de nuevo y de todo corazón...

MILA ESKER! ¡GRACIAS!

¡Va por vosotros!



INDICE

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	1
INDICE	7
RESUMEN	15
ALCANCE Y OBJETIVOS.....	21
CAPITULO 1: CONTEXTO DEL TEMA DE INVESTIGACION.....	23
1.1. Fabricación de piezas mediante mecanizado. Mecanizado convencional y micro-mecanizado	24
1.2. Apostando por una fabricación <i>Green</i>	29
1.3. Cobre y sus aleaciones	30
1.4. La biotecnología ambiental	33
1.5. La bacteria <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	39
1.6. Referencias	41
CAPITULO 2: ESTADO DEL ARTE DEL BIOMECANIZADO	49
2.1. Introduction	50
2.2. Biomachining principles.....	52
2.3. Microorganisms and culture medium	54
2.4. Material removal rate	57
2.5. Roughness and surface finish	59
2.6. Control parameters.....	60
2.6.1. Cell concentration	60
2.6.2. Machining temperature and shaking rate	61
2.6.3. pH and iron concentration evolution.....	62
2.7. Biomachining a particular geometry.....	64
2.8. Biomachining versus chemical machining	67
2.9. Solutions and advances	68

2.10. Conclusions.....	69
2.11. References.....	70
CAPITULO 3: MATERIALES Y METODOS	75
3.1. Materiales.....	76
3.1.1. Probetas de OFE	76
3.1.2. Cepa de <i>A. ferrooxidans</i>	77
3.1.3. Cepa de <i>S. thermosulfidooxidans</i>	78
3.1.4. Cepa de <i>L. ferrooxidans</i>	78
3.2. Métodos	79
3.2.1. Crecimiento de bacterias	79
3.2.1.1. Crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i> en medio 9K	79
3.2.1.2. Crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i> y <i>S. thermosulfidooxidans</i> en medio Mackintosh.....	81
3.2.2. Caracterización de la comunidad microbiana mediante hibridación fluorescente in situ.....	83
3.2.3. Determinación de la concentración de bacterias.....	87
3.2.3.1. Número más probable	87
3.2.3.2. Conteo en cámara de Neubauer	89
3.2.3.3. Conteo en DAPI.....	91
3.2.4. Determinación de especies en disolución	92
3.2.4.1. Determinación del hierro ferroso y hierro total por reacción con dipiridilo y clorhidrato de hidroxilamida en espectrofotómetro de absorción	92
3.2.4.2. Determinación del hierro ferroso por reacción con ortofenantrolina en espectrofotómetro de absorción	95
3.2.4.3. Determinación de hierro total y cobre divalente por espectrofotómetro de absorción atómica	97
3.2.5. Etapa de biomecanizado	97
3.2.6. Determinación de la tasa de remoción.....	99

3.2.7.	Análisis superficial	99
3.2.8.	Otras determinaciones.....	100
3.3.	Referencias	100
CAPITULO 4: ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACION.....		105
4.1	Introduction	106
4.2	First experiments based on nature examples	106
4.2.1	Experimental set-up.....	106
4.2.2	Results and discussion	107
4.3	Experiments under chemical conditions.....	108
4.3.1	Experimental set-up.....	108
4.3.2	Results and discussion	109
4.4	Conclusions.....	112
4.5	References.....	112
CAPITULO 5: BIOMECANIZADO EN MEDIO 9K		115
5.1	Introduction	116
5.2	Parameters affecting growth period of <i>A. ferrooxidans</i>	118
5.2.1	Effect of different initial <i>A. ferrooxidans</i> concentration.....	118
5.2.1.1	Experimental set-up.....	118
5.2.1.2	Results and discussion	119
5.2.2	Effect of divalent copper concentration	120
5.2.2.1	Experimental set-up.....	120
5.2.2.2	Results and discussion	122
5.2.3	Effect of jarosite formation	123
5.2.3.1	Experimental set-up.....	123
5.2.3.2	Results and discussion	123
5.3	Biomachining in 9K medium	125
5.3.1	Indirect biomachining mechanism	125

5.3.1.1	Experimental set-up.....	125
5.3.1.2	Results and discussion	126
5.3.2	Influence of some parameters during biomachining	129
5.3.2.1	Ferric iron concentration	129
5.3.2.1.1	Experimental set-up.....	129
5.3.2.1.2	Results and discussion.....	130
5.3.2.2	Workpiece dimensions.....	132
5.3.2.2.1	Experimental set-up.....	132
5.3.2.2.2	Results and discussion.....	133
5.4	Biomachining a definite geometry.....	134
5.4.1	Experimental set-up.....	134
5.4.2	Results and discussion	136
5.5	Biomachining liquid residue treatment	137
5.5.1	Experimental set-up.....	137
5.5.2	Results and discussion	140
5.6	Conclusions.....	142
5.7	References.....	144
CAPITULO 6: BIOMECHANIZADO EN MEDIO MAC		147
6.1	Introducción.....	148
6.2	Optimización del crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i>	149
6.2.1	Desarrollo experimental	149
6.2.2	Resultados y discusión	151
6.3	Optimización del crecimiento de <i>S. thermosulfidooxidans</i>	157
6.3.1	Desarrollo experimental.....	157
6.3.2	Resultados y discusión	159
6.4	Biomecanizado en medio MAC.....	165
6.4.1	Desarrollo experimental.....	165

6.4.2	Resultados y discusión	165
6.5	Conclusiones.....	167
6.6	Referencias	168
CAPITULO 7: BIOMECANIZADO EN CONTINUO		171
7.1	Introducción.....	172
7.2	Opción 1: Eliminación de cobre divalente	175
7.2.1	Desarrollo experimental	175
7.2.2	Resultados y discusión	176
7.3	Opción 2: Biomecanizado durante el crecimiento de las bacterias	177
7.3.1	Desarrollo experimental	177
7.3.2	Resultados y discusión	178
7.4	Opción 3: Actuación durante la etapa de biomecanizado	184
7.4.1	Desarrollo experimental	184
7.4.2	Resultados y discusión	186
7.5	Opción 4: Periodo de regeneración	187
7.5.1	Regeneración en medio 9K con <i>A. ferrooxidans</i>	187
7.5.1.1	Desarrollo experimental	187
7.5.1.2	Resultados y discusión	187
7.5.2	Regeneración en medio MAC con <i>A. ferrooxidans</i> y <i>S. thermosulfidooxidans</i>	189
7.5.2.1	Desarrollo experimental	189
7.5.2.2	Resultados y discusión	190
7.6	Optimización de la regeneración en medio MAC para <i>A. ferrooxidans</i>	193
7.6.1	Desarrollo experimental	193
7.6.2	Resultados y discusión	194
7.7	Propuesta de reactor de operación en continuo	196
7.8	Conclusiones.....	197
7.9	Referencias	199

CAPITULO 8: PRESERVACIÓN DE <i>A. ferrooxidans</i>.....	201
8.1 Introduction	202
8.2 Culture medium for cell viability	204
8.2.1 Experimental set-up.....	204
8.2.2 Results and discussion	205
8.3 Cell preservation	206
8.3.1 Freeze drying.....	206
8.3.1.1 Experimental set-up	206
8.3.1.2 Results and discussion	209
8.3.2 Freezing.....	211
8.3.2.1 Experimental set-up	211
8.3.2.2 Results and discussion	213
8.3.3 Drying.....	215
8.3.3.1 Experimental set-up	215
8.3.3.2 Results and discussion	216
8.4 Conclusions.....	216
8.5 References.....	217
SOLICITUD DE PATENTE	219
CONCLUSIONES	225
LISTA DE FIGURAS.....	229
LISTA DE TABLAS	235
LISTA DE ABREVIATURAS.....	239



RESUMEN

RESUMEN

Propiedades como la resistencia mecánica, la conductividad eléctrica, la resistencia a la corrosión, la maquinabilidad y la ductilidad hacen del cobre uno de los materiales más versátiles de uso en la industria. La variedad en sus composiciones, así como en métodos de fabricación, contribuyen a que el cobre sea la primera opción para una gran variedad de productos y una amplia gama de aplicaciones. A medida que aumenta la demanda tanto del cobre como de sus aleaciones, entre las que hoy en día destaca el OFC, se necesita realizar más I+D. El OFC es un componente muy importante de los aceleradores de partículas, así como de numerosos equipos de instalaciones científicas. La gran mayoría de estos productos requieren piezas de alta calidad. Así pues, la obtención de piezas de cobre sin daño térmico ni estructural alguno se ha convertido en objetivo básico de los procesos de fabricación.

Hoy en día la sostenibilidad del medio ambiente es uno de los principales objetivos de todas las industrias de fabricación. Indudablemente la contaminación aumenta día a día, por lo que las leyes ambientales son cada vez más estrictas. Eso ha hecho que las empresas hayan tenido que variar la prioridad de sus objetivos. Si bien antes el objetivo principal estaba orientado únicamente a la reducción de costes y a la obtención de un producto con calidad, ahora tendrán que hacer esfuerzos por conseguir dicho objetivo pero en base a una tecnología verde e innovadora.

Para cumplir tanto con el objetivo inicial, como con el nuevo objetivo de alcanzar una imagen más ecológica, las empresas han tenido que transformar y/o adaptar sus procesos de fabricación, migrando desde tecnologías tradicionales, a tecnologías más amigables con el medio ambiente. Han sido muchos los estudios que se han llevado a cabo para la investigación de nuevos procesos de fabricación y muchos también los que avalan sus ventajas. Con ello, se ha logrado que muchos de ellos ya tengan una aplicación industrial, incluso en algunos sectores que en principio se mostraban reticentes al cambio.

Uno de los procesos que está emergiendo favorecido por el impulso ambiental es el biomecanizado o mecanizado biológico, también conocido como mecanizado mediante bacterias.

Este proceso, fundamento de la tesis, se caracteriza por ser más respetuoso con el medio ambiente que otros muchos procesos convencionales de fabricación. Su bajo consumo de energía, bajo coste, eliminación de daño térmico y/o estructural a la pieza y la ausencia de fuerzas que puedan llegar a generar estrés en la pieza hacen del biomecanizado un proceso con una gran proyección. Sin embargo, hasta la fecha sólo se conocen estudios de biomecanizado a escala de laboratorio, sin aplicación industrial.

Como primer acercamiento al proceso de biomecanizado de piezas de OFC, los primeros estudios de la presente tesis se desarrollaron en medio bacteriano natural, concretamente en Río Tinto (Huelva, España). Este ecosistema permitió realizar las primeras experiencias con bacterias extremófilas. Paralelamente, y con el objetivo de realizar un análisis comparativo, en el Departamento de Ingeniería Química y del Medio Ambiente de la UPV/EHU se llevó a cabo el mecanizado en un medio químico (exento de bacterias) Con esta primera toma de contacto se consiguió poder llegar a entender mejor el proceso de biomecanizado y establecer las bases del trabajo posterior.

Los primeros ensayos en el proceso de biomecanizado de piezas de OFC se centraron en dos aspectos. Dado que el conjunto medio-bacterias más empleado en la bibliografía era el medio 9K con bacterias *A. ferrooxidans*, se experimentó el biomecanizado bajo esas condiciones, definiendo aquellos aspectos que podrían ser influyentes tanto en el periodo de crecimiento de las bacterias, como en el proceso de biomecanizado en sí. Posteriormente, se trabajó con un nuevo medio de cultivo denominado MAC para dos tipos de bacterias hierro-oxidantes diferentes: *A. ferrooxidans* y *S. thermosulfidooxidans*. En todos los casos la tasa de remoción presentó un comportamiento análogo al observado en medio químico, con un máximo en la primera hora de ensayo y descendiendo sistemáticamente a lo largo del proceso.

Conocido el proceso, se desarrolló un proceso de biomecanizado de geometrías definidas según un método de cobertura con resina y grabado con láser. Los parámetros de marcado resultaron ser importantes para poder mantener la integridad del material.

Con objeto de que el proceso de biomecanizado no ejerciera efectos perjudiciales derivados del residuo líquido generado, se estableció una metodología de tratamiento físico-químico del mismo en base a dos etapas sucesivas de precipitación del hierro férrico (previa oxidación del hierro ferroso) y cobre divalente con NaOH. Este hecho afianzó el carácter ecológico del biomecanizado, permitiendo, así mismo, recuperar el

hierro y el cobre como compuestos valorizables para la industria y dando finalmente, un efluente líquido de baja toxicidad fácilmente gestionable.

Uno de los principales objetivos de esta tesis fue investigar la forma de llevar a cabo el proceso de biomecanizado en régimen continuo, funcionamiento en el que la tasa de remoción se mantuviera constante con el tiempo y nada publicado al respecto hasta la fecha. Fueron cuatro las opciones probadas, siendo solo una la que aportó resultados satisfactorios. La continuidad de la remoción se alcanzó intercalando entre las etapas de biomecanizado periodos de regeneración. De tal manera que, extrayendo la probeta de la disolución y tras un tiempo, ésta era capaz de volver a su estado inicial, es decir, al estado que tenía previo al biomecanizado.

Finalmente, y en base a los resultados obtenidos a lo largo de todo el estudio, se diseñó un reactor con vistas a la aplicación industrial del proceso de biomecanizado en continuo.

ABSTRACT

Characteristics such as mechanical strength, electrical conductivity, corrosion resistance, machinability and ductility make copper one of the most versatile materials. Because of its variations in composition as well as in manufacturing and machining methods, copper is common in a large number of products and a wide range of applications. More R&D is needed as copper and its alloys become more widely used. Among them, OFC is important as functional material of some components of particle accelerator and other scientific equipment. In these components high quality parts are required. Thus, obtaining copper parts with good surface quality and without any thermal or structural damage is now the driver for many manufacturing processes.

Today, environmental sustainability is one of the main goals of all manufacturing industries. Pollution is increasing day by day and environmental laws are becoming more stringent. Therefore, companies need to transform to meet their traditional objectives of cost reduction and good product quality, but also make efforts to implement a green and innovative set of technologies.

Taking meet all these objectives, industries have to readapt their processes, migrating from less to more green manufacturing technologies. A number of studies report the main advantages of these processes. With this, many of them now have a real industrial application, even in a sector that initially were reticent to a change.

One of the emerging process, not yet implemented in industry, is biological machining or biomachining, also known as machining via bacteria.

Biomachining as well as being more environmental friendly than other methods of metal removal, has advantages like lower power consumption, major energy efficiency, low cost and elimination of thermal damage in the workpiece. Various studies have been conducted to date on this issue, all on laboratory scale.

As a first approach to the biomachining process, the early studies of this thesis were carried out in Rio Tinto (Huelva, Spain), a natural bacterial medium. In parallel, in the Department of Chemical Engineering and Environment of the University of the UPV/EHU chemical machining experiments were done in a chemical medium (in the absence of bacteria) for comparison purposes. This enabled to reach a better understanding of the process and to establish the basis of the further work.

The first studies in the biomachining process on OFC workpieces focused on two aspects. On the one hand, it was studied the biomachining in 9K medium with *A. ferrooxidans* bacteria, as it was the commonly used medium-bacteria in prior studies. It was studied the influence of some parameters affecting both bacteria growth and biomachining process. On the other hand, biomachining experiments were done in a medium which was not used in this process before, so called MAC, for two iron-oxidizing bacteria: *A. ferrooxidans* and *S. thermosulfidooxidans*. In all cases, the removal rate showed a similar behavior that had in chemical medium, with a maximum in the first hour of the experiment and decreasing as time went by.

Likewise, it was possible to define a biomachining process for a definite geometry by means of covering the surface of the workpiece with a resin and laser engraving. It was found important to establish the correct laser parameters in order to not affect the integrity of the material.

Furthermore, a physicochemical method for treating the biomachining liquid residue was completely developed. The treatment was done in two successive stages of precipitation by NaOH, first the ferric iron precipitation (previous ferrous iron oxidation) and second, divalent copper precipitation. Thus the ecological aspect of the process was enhanced, enabling also the reuse of the obtained high purity precipitates.

The principal objective of the thesis was to investigate the possibility of obtaining a continuous biomachining process, where the removal rate would be constant over time. No investigation has been published up to date about this topic. Although four solutions were tested, only one was successful. The continuity was achieved by introducing regeneration periods between successive biomachining stages. In this period, the workpiece was extracted from the solution, permitting to the solution reaching the initial stage.

Finally, and based on the results obtained throughout the study, a reactor was designed, in view of the industrial application of the continuous biomachining.



ALCANCE Y OBJETIVOS

ALCANCE Y OBJETIVOS

La tesis doctoral titulada *Biomachining of Oxygen-Free Copper: Development of a continuous process for industrial application*, se ha basado en el análisis del proceso de biomecanizado de cobre libre de oxígeno desde diversos puntos de vista para poder impulsar su aplicación industrial, centrándose en la idea principal de obtener un proceso continuo, en el que la tasa de remoción se mantenga constante en el tiempo.

Para ello, se definieron los siguientes objetivos parciales:

- ✓ Estudiar el proceso de biomecanizado en medio 9K para definir por un lado los parámetros que pudieran llegar a influir en el periodo de crecimiento de las bacterias *A. ferrooxidans*. Y por otro lado, los parámetros que podrían afectar al proceso en sí en cuanto a la tasa de remoción se refiere.
- ✓ Proponer y optimizar un proceso de biomecanizado capaz de grabar diversas geometrías en piezas metálicas, tanto simples como complejas, en base a las tecnologías más actuales de fabricación, como es la tecnología láser.
- ✓ Establecer una metodología sencilla para el tratamiento del residuo líquido obtenido al final del proceso de biomecanizado, de manera que se redujeran los costes de tratamiento del efluente y se realizara la imagen ecológica de este proceso.
- ✓ Estudiar y valorar la tasa de remoción empleando un medio de cultivo y una bacteria hierro-oxidante no utilizados hasta el momento en el ámbito del biomecanizado con el objetivo de tratar de mejorar las tasas de remoción conseguidas en el proceso de biomecanizado.
- ✓ Proponer alternativas para la obtención de un proceso de biomecanizado en continuo en base a los resultados obtenidos en este estudio y a las aportaciones extraídas de publicaciones anteriores. Optimizar el proceso en continuo en caso de conseguirlo.
- ✓ Estudiar las condiciones que permitan la preservación de las bacterias *A. ferrooxidans* para optimizar el almacenamiento de las mismas y por tanto conseguir abaratar los medios biológicos utilizados en el biomecanizado.
- ✓ Diseñar un reactor que permita operar bajo condiciones de biomecanizado en continuo.

CAPITULO 1

CONTEXTO DEL TEMA DE INVESTIGACION

1. CONTEXTO DEL TEMA DE INVESTIGACION

1.1. Fabricación de piezas mediante mecanizado. Mecanizado convencional y micro-mecanizado

Históricamente, la industria de la fabricación ha constituido una de las mayores fuerzas económicas en prácticamente todos los países desarrollados (Liow, 2009), si bien en los últimos años la tendencia ha sido a la inversa. En España por ejemplo, durante la época de crisis se sufrió un intenso proceso de deslocalización industrial debido a la emergencia de los países asiáticos y el este de Europa, donde era más barato fabricar. Sin embargo, desde hace un tiempo se ha iniciado un camino de vuelta. Es la llamada «relocalización industrial», invocada por las autoridades y los expertos como un factor determinante para salir de la crisis, y que empieza a notarse en algunos sectores.

Tanto el mecanizado por arranque de viruta como las máquinas-herramienta forman el equipo básico de un gran número de sistemas de fabricación, siendo hasta la fecha el proceso de fabricación más antiguo y el más empleado (Mao et al., 2015).

El mecanizado es un proceso de fabricación basado en un conjunto de operaciones de conformación de piezas. Su objetivo se puede definir como la obtención de la forma o medida final requerida arrancando el exceso de material en las etapas de desbaste, semi-acabado y acabado (Lasemi et al., 2010). Dicha remoción de material puede darse en forma de viruta (fresado, torneado, taladrado), bien mediante abrasión (rectificado) o por los denominados métodos no convencionales (láser y electroerosión entre otros). Su elevada flexibilidad viene derivada de la simplicidad de las herramientas de corte empleadas y de la posibilidad de obtener formas variadas con equipos estándar, característica que se ha visto acrecentada por el desarrollo del control numérico I de los últimos años, permitiendo fabricar superficies libres de forma (*freeform surfaces*) con máquinas convencionales (Lasemi et al., 2010; Mao et al., 2015).

Este proceso, en relación a otros procesos de fabricación, presenta un alto coste, por el elevado número de equipamiento necesario como pueden ser: herramientas, máquinas y elementos auxiliares (refrigeración y alimentación de piezas) entre otros. Sin embargo, este alto coste viene avalado por las buenas soluciones obtenidas, puesto que una de las características intrínsecas de este tipo de procesos de

fabricación se encuentra en la obtención de piezas con formas, dimensiones, acabados superficiales y precisión elevados (Lauro et al., 2014).

En los últimos años se está asistiendo a una constante innovación en lo referente a sistemas de producción y dentro de ellos en los procesos de mecanizado, en los que cada vez las aplicaciones requeridas son más, y a su vez, más exigentes (Peng et al., 2014). Tanto el desarrollo del mecanizado por arranque de viruta como el desarrollo de las máquinas-herramienta se puede decir que ha venido determinado por los siguientes factores: desarrollo de materiales empleados para herramientas de corte por arranque de viruta, investigación de los procesos de mecanizado, e investigación y desarrollo de nuevas soluciones y arquitecturas de máquina, de componentes y de sistemas de automatización.

En todo este avance cabe destacar el gran esfuerzo que ha tenido que realizar la industria española, que con casi cien años de retraso, consiguió en 1982 unirse al tren de las nuevas tecnologías en pleno desarrollo. Este sector ha conseguido colocarse en el ámbito competitivo internacional, gracias a la fuerte inversión realizada en I+D y a la creación de centros tecnológicos.

Los autores López de Lacalle et al. (2004) en su libro definen el estado del arte en el mecanizado como un uso obligado por la necesidad de fabricar piezas en un material homogéneo y también necesario para obtener cotas y medidas con gran precisión. Sin embargo, es indudable que el mecanizado es un proceso antieconómico, pues se gasta dinero en arrancar material donde antes se había gastado en ponerlo. Ejemplo de ello son las estructuras monolíticas, en las que partiendo de un bloque prismático en aras de llegar a una pieza muy homogénea de elevadas prestaciones mecánicas, se arranca en forma de viruta un 95% del material de partida (Chantzis et al., 2013).

Por ello, la tendencia general e inexorable es a disminuir su aplicación, mejorando a su vez las técnicas capaces de generar formas en la línea de la fabricación de componentes basados en la técnica industrial denominada *near net shape*. Las piezas que se producen mediante esta técnica, son productos semi-acabados, es decir, productos que ya se encuentran en una forma y contorno casi finales y que por lo tanto la remoción de material es mínima (Cominotti y Gentili, 2008; Mohanty et al., 2013; Löwer et al., 2015). El mecanizado por lo tanto se destinará a ser una de las operaciones últimas, con objetivo de obtener un buen acabado. Por tanto, si bien es cierto que su peso en cuanto a cantidad dentro del ciclo productivo bajará, su valor específico crecerá.

Indudablemente en la actualidad uno de los sectores más potentes y en alza en el ámbito de la fabricación es la industria de la micro-fabricación, ya que la apuesta por productos innovadores de alta funcionalidad y pequeño tamaño es cada vez mayor (Malekian et al., 2009). Según Chae et al. (2006) y Malekian et al. (2009), la miniaturización de componentes de alta precisión juega un papel importante y esencial en el futuro desarrollo de una amplia gama de productos.

Haciéndose eco de las ventajas que la miniaturización conlleva, muchas de las empresas del ámbito de la fabricación de hoy en día se han visto obligadas a tener que adaptarse y abrir sus puertas a la micro-fabricación con objeto de mantenerse alto en el mercado. Delapierre (1989), Dornfeld et al. (2006) y Chae y Park (2007) indican que la micro-fabricación se caracteriza por suponer una reducción de energía y reducción del consumo de materiales durante la fabricación, aportar ligereza y portabilidad, generar dispositivos de gran sensibilidad con funcionamiento más selectivo, conllevar aplicaciones menos invasivas y mejorar la relación coste-funcionalidad.

La micro-fabricación en sus orígenes sólo estaba presente en el ámbito de la electrónica, sin embargo, debido a su demanda, se ha extendido a sectores como medicina (60% del mercado), biotecnología (30% del mercado), telecomunicaciones (5-7% del mercado) y energía. De acuerdo a un estudio de la organización europea *Network of Excellence in Multifunctional Microsystems-NEXUS*, el mercado mundial de microtecnologías está creciendo a un ritmo medio del 11% anual, siendo el sector de las telecomunicaciones el de mayor crecimiento (Gandarias, 2009).

Son varios los procesos existentes para la fabricación de miniaturas y existen también diversas maneras de clasificarlos. Masuzawa (2000) por ejemplo clasificó los procesos según las interacciones que existían en el material y el principio de trabajo del proceso. En el estudio de Madou (2001), las tecnologías eran clasificadas según si pertenecían al grupo de técnicas tradicionales, técnicas no tradicionales con métodos litográficos o las mismas sin métodos litográficos. Sin embargo, la clasificación realizada por Brinksmeier et al. (2001) es hasta la actualidad la que mayor aceptación tiene. Brinksmeier et al. (2001) clasificaron las tecnologías de micro-fabricación en cuatro grupos: (1) procesos de fabricación de sistemas micro-electromecánicos; (2) procesos asistidos por energía, como mecanizado con haz láser y electroerosión; (3)

procesos mecánicos, entre los que se encuentran el micro-fresado y el micro-rectificado; (4) métodos de réplica entre los que cabe destacar la estampación, la inyección y el moldeo.

El rápido crecimiento que la demanda de micro-componentes está teniendo por parte de industrias como el sector médico, el sector electrónico y el sector aeroespacial entre otros, ha contribuido a la mejora de sus procesos de fabricación, entre los que se encuentra el micro-mecanizado (Dornfeld et al., 2006; Liow, 2009; Heamawatanachai y Bamberg, 2010; Chavoshi y Luo, 2015). Si algo hace al proceso de mecanizado versátil es su capacidad de trabajar tanto a escala convencional como a escala micrométrica, siendo capaz de llegar a producir en la actualidad piezas con una dimensión en un rango entre 1 y 100 μm (Kent, 2012) y precisiones en torno a 1 μm (Liow, 2009). En la Figura 1.1 se puede observar la evolución en la precisión de las piezas micromecanizadas en las últimas décadas. Se han adjuntado unas fotos de elementos naturales indicando su tamaño para tener una referencia sobre el tamaño de fabricación.

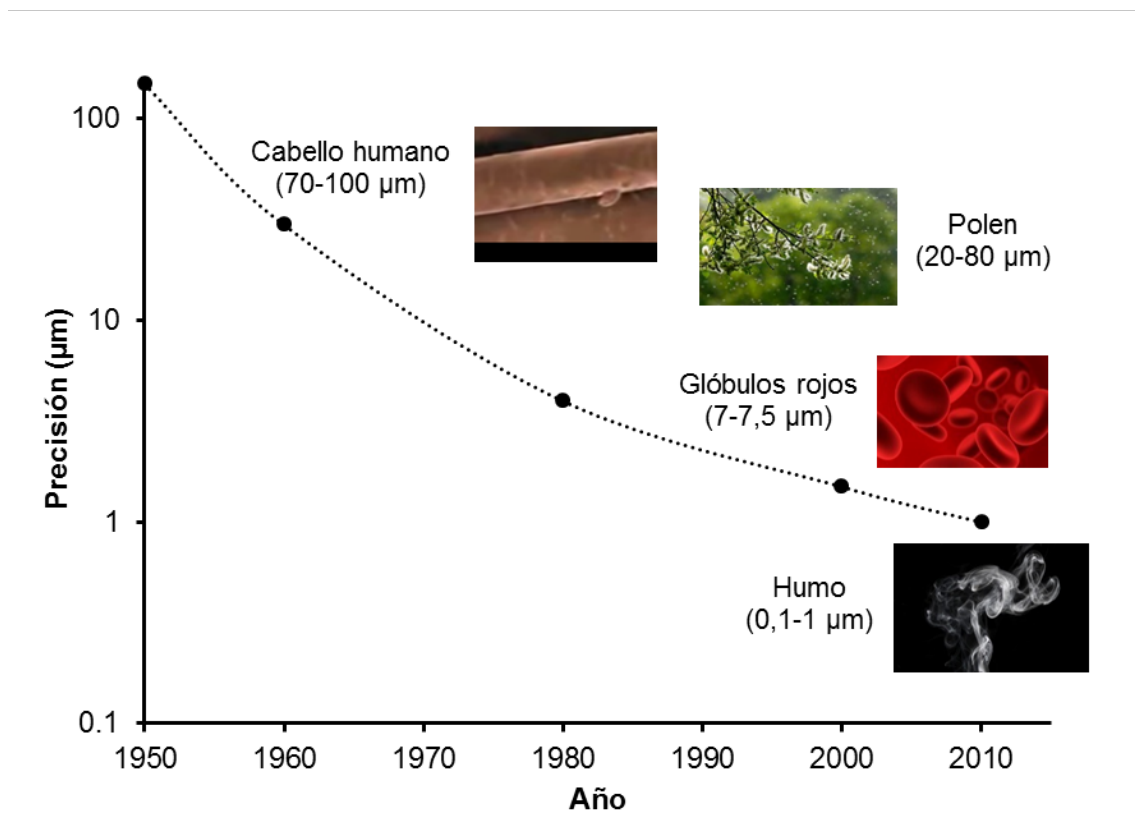


Figura 1.1. Evolución histórica de la precisión en los procesos de micro-mecanizado (adaptada de Dornfeld et al., 2006).

Si bien el micro-mecanizado se basa en los mismos principios que el mecanizado a escala convencional e incorpora algunas características del mismo (Dornfeld et al., 2006; Chae y Park, 2007), existen algunas diferencias que deben ser tenidas en cuenta, por lo que el micro-mecanizado no puede entenderse como una simple reducción de escala (Cámara et al., 2012).

Una de las similitudes, es que en el mecanizado a escala micrométrica suelen aparecer problemas similares a los encontrados en el mecanizado convencional, si bien en el primer caso los problemas pueden llegar a ser más significantes y por tanto se les deberá prestar más atención (Dornfeld et al., 2006). Ahora bien, pueden aparecer otros problemas que a gran escala pasaban desapercibidos y que sin embargo en el micro-mecanizado resultarían críticos si no son controlados debidamente. Por ejemplo, la desviación excéntrica de la herramienta, la deflexión de la herramienta o incluso el efecto tamaño juegan un papel importante, siendo su efecto en escala convencional, generalmente, inapreciable. Por lo general, estos problemas vienen de la miniaturización de las herramientas y componentes del proceso (Chae y Park, 2007).

En cuanto a máquina-herramienta, durante los primeros años del *boom* de la fabricación de micro-componentes era habitual emplear las propias máquinas de mecanizado convencional (Dornfeld et al., 2006). En el año 1970 surgió la idea de comenzar a crear «micro-factorías», ya que los expertos defendían la idea de que las máquinas pequeñas serían más efectivas para mecanizar piezas de reducido tamaño (Mao et al., 2015).

Si bien hay autores que afirman que el empleo de las máquinas convencionales para fines de micro-fabricación es posible, es contraproducente e inefectivo, ya que los requerimientos de los componentes de la maquinaria son diferentes en ambas escalas, quedando la máquina convencional sobre-dimensionada. En el estudio realizado por Liow (2009) se evidenció la clara ventaja de fabricar un micro-producto con una micro-fresadora y una máquina convencional de CNC. El fabricar la pieza con una máquina adecuada a la escala de la pieza, permitió ahorrar energía, así como reducir la emisión de gases de efecto invernadero; mientras que fabricándola en máquina convencional únicamente el 20% de la energía aportada era empleada para la remoción de material, resultando por tanto ineficiente.

Debido a su complejidad el micro-mecanizado, y la micro-fabricación en general, están siendo objeto de estudio desde diversos puntos de vista. Así pues actualmente se está investigando en la mejora de las máquinas de micro-fabricación, buscando una mejor

relación calidad/precio mediante la optimización de tiempos y aumento de precisión entre otros, sin olvidar la posibilidad de emplear nuevas herramientas, nuevos materiales de herramientas o incluso nuevos procesos.

1.2. Apostando por una fabricación *Green*

Sin duda alguna, ligado a la evolución del sector de la fabricación se encuentra la contaminación ambiental. La rápida evolución de los sectores de fabricación ha conllevado un alto impacto ambiental debido, entre otras cosas, a un rápido agotamiento de las fuentes de recursos naturales, una mayor contaminación de suelo, agua y aire y finalmente un aumento en el riesgo para la salud humana (Mittal y Sangwan, 2014; Lv et al., 2015). Esto ha hecho que las prioridades y objetivos de los procesos de fabricación cambien por completo.

Si bien la fabricación tradicional se basaba en la idea de crear para sustituir, a lo largo de los años se ha ido desarrollando nuevos conceptos de fabricación debido a que las empresas se han visto obligadas a apostar por nuevos procesos de fabricación o por la mejora de procesos ya existentes para cumplir con la normativa medioambiental y mantenerse a la vanguardia en la innovación tecnológica (Sezen y Çankaya, 2013; Paul et al., 2014; Masoumik et al., 2015).

Así, de lo tradicional, se pasó a la fabricación <<sin desperdicios>>, tratando de reducir la cantidad de desechos generados. A continuación, vino el concepto de *Green Manufacturing* o fabricación ecológica, donde se buscaba obtener procesos que cumplieran con la regla básica de las 3R, concepto que se originó por Greenpeace con la idea de promocionar el consumo responsable. Las 3R no es más que las tres primeras letras de tres pasos a seguir por orden de importancia para llegar al consumo responsable: Reducir, Reutilizar y Reciclar. La idea más novedosa de la fabricación es la de *Sustainable Manufacturing*, donde la clave del proceso es la innovación según las reglas de las 6R del consumo sostenible: Revalorizar, Reestructurar, Reducir, Reutilizar, Reciclar y Redistribuir.

En los últimos años, el número de empresas que se suman al cuidado del planeta Tierra impulsadas por el afán de reducir el impacto ambiental y ser más sostenibles, va en aumento (Pusavec et al., 2010a; Bhanot et al., 2015). Este hecho implica la

obligación de incorporar e integrar criterios específicos medioambientales en todo el ciclo de vida de un componente: producción, distribución, utilización, reciclaje y tratamiento final, o como se suele decir «desde su cuna a la tumba».

Según los autores Jayal et al. (2010) y Pusabec et al. (2010b), los elementos básicos que todo proceso ambientalmente sostenible debe tener están ligados en su mayoría a cuatro ideas básicas: (1) abaratamiento de los costes del proceso, como lo son el consumo energético y el coste del proceso de fabricación; (2) reducción de los residuos generados y mejora de su tratamiento; (3) mejora de la seguridad laboral y mejora del cuidado de la salud del personal; (4) reducción del impacto ambiental. Este último es uno de los de mayor importancia según los fabricantes, con un peso superior del 30% de entre todos los factores que marcan la sostenibilidad (Jayal et al., 2010).

Por todo ello, en los últimos años los procesos de micro-mecanizado buscan constantemente la innovación, apostando por mejores resultados y ventajas específicas, todas ellas orientadas hacia la sostenibilidad. Hasta ahora, los métodos de mecanizado más utilizados se basaban en técnicas físicas, químicas o incluso físico-químicas. Pero en las ciencias naturales coexisten tres subsistemas: la física, la química y la biología. Entonces, si la biología ya se emplea en otros ámbitos de investigación, ¿por qué no emplear la biología como técnica de mecanizado?.

Muchos procesos tecnológicos ya han apostado por técnicas con base biológica para poder unirse al nuevo movimiento *Green*. En industrias como la fermentación, la medicina y el control de la contaminación, el uso de microorganismos se promovió desde hace tiempo atrás. Sin embargo, en el mundo de la fabricación todavía no se conoce proceso alguno que emplee bacterias. Razones de ello pueden ser por un lado la poca investigación que se ha realizado al respecto y por otro, que probablemente pueda ser la de mayor peso, sea la reticencia que los fabricantes muestran al implementar nuevos procesos como sustitución a los ya consolidados.

1.3. Cobre y sus aleaciones

El cobre fue uno de los primeros metales en ser utilizados por el ser humano en la prehistoria. Desde finales de la Edad de Piedra estuvo presente en inventos y es un elemento clave para el futuro que queda por llegar. Su importancia ha sido tal que incluso los historiadores han llamado Edad del Cobre y Edad del Bronce a dos periodos de antaño. Aunque su uso disminuyó con la evolución de la siderurgia, tras el

descubrimiento en el año 1831 del generador eléctrico por Faraday su uso se incrementó llegando a convertirse en un material estratégico.

Es un material económicamente accesible y sus propiedades físicas hacen que su uso se extienda a varias aplicaciones de diferente índole, siendo el tercer metal más empleado (International Copper Study Group, 2014; Žergav y Milošev, 2015). Hoy en día es apreciado por sus cualidades: excelente conductor de electricidad (el segundo después de la plata), reciclable, fácil de trabajar y antibacteriano entre otros (Hegazy et al., 2015; Seo et al., 2015). La Figura 1.2 muestra los principales usos del cobre en diferentes sectores así como la distribución de su uso según continentes en el año 2013.

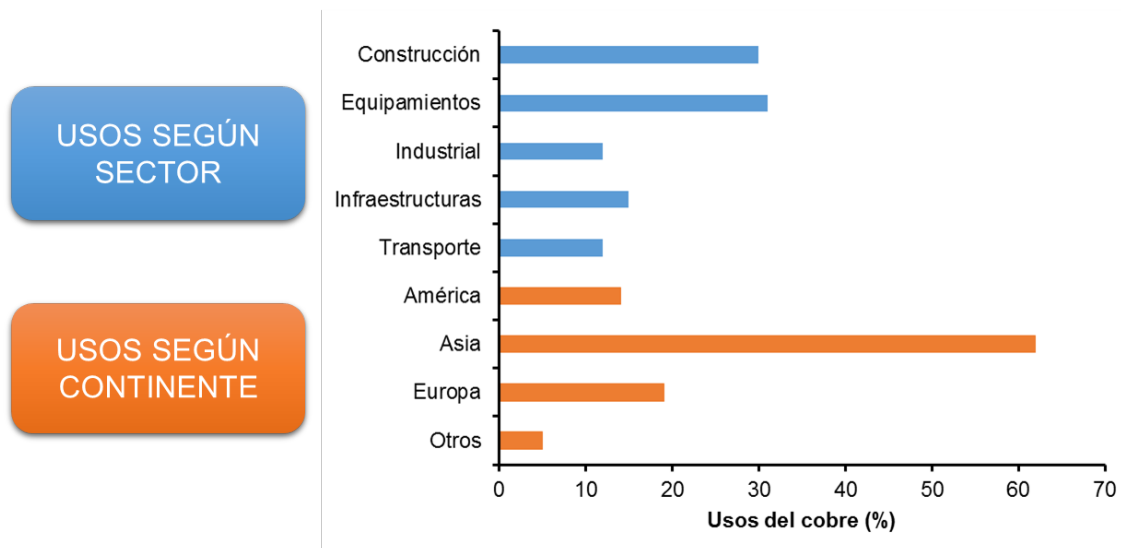


Figura 1.2. Usos del cobre para diferentes continentes y sectores en el año 2013 (adaptado de International Copper Study Group, 2014).

El cobre participa directa e indirectamente en todas las industrias que se vislumbran como líderes del siglo XXI. Es posible decir que la demanda del cobre no sólo crece con el progreso, sino que efectivamente lo hace posible (Correa, 2008). Según Zhang et al. (2015), cuanto mayor sea el desarrollo tecnológico, mayor será el empleo y demanda del cobre. Los países cuyo nivel de industrialización es elevado, con un promedio de 1100 millones de habitantes, presentan un consumo de 10 a 15 kilos de cobre por persona al año. Los países en vías de desarrollo, en cambio, con una población en torno a 4900 millones de habitantes, consumen unos 2 kilos de cobre por persona al año. *U.S. Global Investors* vaticinan que en los próximos 25 años el planeta necesitará producir tanto cobre como se ha producido en toda la historia de la

humanidad. En los últimos años, la demanda del cobre para empleo de equipamientos en temas de I+D, en electrónica y en equipamiento médico se ha visto aumentado, previéndose un crecimiento exponencial en un futuro próximo.

Una clave para entender la vigencia del cobre es la aplicación de sus propiedades a nuevos usos que reflejan el avance de la civilización en áreas como: superconductividad, transmisión de datos a alta velocidad, fabricación de microprocesadores, aceleradores de partículas y energía solar. La alta conductividad del cobre es una cualidad esencial, ya que no sólo influye en la calidad de los productos que lo incorporan, sino que permite un uso más eficiente de la energía. Como en el caso de los motores eléctricos, donde el cobre contribuye al objetivo ecológico de quemar menos combustibles fósiles para hacer frente al cambio climático. Además, las conexiones de transistores hechas de cobre transportan la electricidad hasta un 15% más rápido que otros materiales como el aluminio (Correa, 2008). Así, el cobre tiene extraordinarias propiedades de conducción eléctrica que aumentan los niveles de eficiencia energética de los productos eléctricos.

Gracias a estas nuevas aplicaciones y a su mayor demanda, el cobre se mantendrá alto en el mercado de los metales, tendiendo a sustituir otros materiales con el objetivo de crear nuevos métodos y equipos que consuman menos energía y que produzcan menos contaminación atmosférica generando menos residuos sólidos.

Hoy en día la rápida evolución que se está dando tanto en la electrónica como en la electro-tecnología hace que se tenga que apostar por nuevos materiales con mejores propiedades. Según Knych et al. (2011), las soluciones a estos nuevos materiales se encuentran en el cobre, por lo que las investigaciones de nuevas aplicaciones de este material y sus posibilidades de transformación no cesan.

Los avances en el estudio del cobre han llevado a conocer nuevos materiales como el cobre libre de oxígeno (*Oxygen-Free Copper, OFC*) y sus variedades, como el cobre electrónico libre de oxígeno (*Oxygen-Free Electronic Copper, OFE*). El OFE ha sido el material empleado en este estudio.

Este tipo de cobre se obtiene a partir del cobre electrolítico mediante un proceso denominado refinado electrolítico, donde el cobre se introduce en una solución cargada eléctricamente de sulfato de cobre y ácido sulfúrico. Este proceso, hace que el cobre no adsorba nada de oxígeno, por lo que puede llegar a tener un nivel excepcionalmente bajo de oxígeno e impurezas, a menudo entre 1 ÷ 3 ppm (en peso) y 25 ppm (en peso) respectivamente (Knych et al., 2011).

De entre los usos del OFC resaltan los usos industriales y los usos en sistemas de audio. Para usos industriales, este cobre se valora más por su pureza química que por su conductividad eléctrica. De esta manera, se evita que el desprendimiento del oxígeno (y/o impurezas) causen reacciones químicas indeseables con otros materiales en el ambiente local. Entre sus aplicaciones cabe destacar su uso en elementos aceleradores, en elementos criogénicos (trabajando a bajas temperaturas) y su empleo en componentes de alto voltaje (Kobayashi et al., 1996; Knych et al., 2011).

Proyectos actuales como el acelerador de iones del ESS-Bilbao, cuyos componentes funcionales son mayormente fabricados en cobre, son un ejemplo claro de la necesidad de controlar el mecanizado de cobre, de tal forma que en un futuro cercano será de gran valor el *Know-How* de aquellos centros y empresas que sean capaces de dominar el proceso de mecanizado obteniendo piezas y componentes sin daño térmico ni estructural, así como procesos de elevada precisión. Nótese que en instalaciones de este tipo se requieren precisiones de 5 μm en longitudes superiores a los 10 m.

1.4. La biotecnología ambiental

Hoy en día, dada la necesidad de abordar los problemas medioambientales, los avances en el ámbito de la biotecnología han suscitado una apuesta segura en los procesos basados en el empleo de microorganismos, siendo muchos y variados los procesos existentes y ya en uso. Casualmente, se dice que dos de los tópicos más importantes del Siglo XXI serán el medioambiente y la biotecnología.

En el año 1919 el ingeniero Karl Ereky utilizó por primera vez la palabra biotecnología para dar título a su libro «Biotecnología en la producción cárnica y láctea de una gran explotación agropecuaria», refiriéndose a ella como la técnica basada en la producción de materiales mediante microorganismos vivos. Más recientemente, a

finales del Siglo XX, la Convención de Diversidad Biológica definió la biotecnología como «cualquier aplicación tecnológica que emplea sistemas biológicos, bien sean microorganismos vivos o sus derivados, con el objeto de crear o modificar productos y procesos para un uso específico». Sin embargo, la biotecnología no está anclada a una única definición (Gavrilescu, 2010; de la Vega et al., 2015; Knockaert et al., 2015).

Son muchas las ventajas específicas que los procesos basados en la biotecnología presentan frente a los procesos físicos y químicos tradicionalmente empleados. Entre ellas cabe destacar el evitar el empleo de compuestos químicos peligrosos, operar en condiciones de bajos costes y bajos requerimientos de energía y principalmente su carácter distintivo de «tecnología verde», gracias a su bajo impacto ambiental y a su reducida huella de carbono (Pathak et al., 2009; Asghari et al., 2013; Karwowska et al., 2014; Johnson, 2014; Johnson y du Plessis, 2015).

La introducción de las técnicas de Biología Molecular ha supuesto una revolución en el campo de la biología, permitiendo entender mejor el funcionamiento microbiológico, lo que hasta hace poco era tratado como una caja negra (Brierley y Brierley, 2013; Vallero, 2010). Desde el año 1990 se ha incorporado la manipulación genética a este campo de estudio, permitiendo poder crear cepas específicas de modo que puedan emplearse de una manera más efectiva y cuya adaptación al entorno de trabajo sea también mejor. Si bien se debe tener en consideración la posible modificación genética que este nuevo avance podría conllevar (Wu et al., 2010; Johnson, 2014). Todos estos progresos serán el motor que impulsará nuevas técnicas biológicas en un futuro cercano.

No obstante, como toda tecnología, la biotecnología también tiene sus limitaciones. Se debe tener en cuenta, que tratándose de un proceso potenciado por microorganismos, se tienen cinéticas, generalmente, lentas, lo que resulta en un mayor período de operación (Asghari et al., 2013; Johnson, 2014; Lambert et al., 2015). Además, el desarrollo de nuevas tecnologías biológicas es altamente dependiente del conocimiento de las propiedades de los seres vivos, así como de la caracterización de nuevos microorganismos, que en muchas ocasiones resulta complicado por las limitaciones tecnológicas existentes. A modo de ejemplo, los microorganismos aislados y caracterizados que custodian hoy en día las colecciones de microorganismos representan como máximo el 3% de la biodiversidad del planeta.

La biotecnología tiene diversas aplicaciones en diversos campos, que generalmente se centran en remediar problemas creados por actividades antropogénicas o como métodos alternativos de producción de bienes de consumo más respetuosos con el medio ambiente (Figura 1.3). Entre ellos se encuentra la biotecnología ambiental. Siendo uno de los aspectos más investigados y destacados hoy en día, esta aplicación de la biotecnología se centra en descontaminar o paliar la contaminación, tratar y eliminar residuos tóxicos o incluso detectar posibles fuentes de contaminación (Gonzaga, 2006; Vallero, 2010).

Los primeros usos de microorganismos en procesos ambientales datan del siglo XIX, época en la que se comenzó a entender la biotecnología ambiental como conjunto de técnicas especializadas en la aplicación de los procesos biológicos modernos para la protección y restauración de la calidad del medio ambiente (Gonzaga, 2006). Curiosamente, la evolución de muchas de las tecnologías ambientales así como la creación de nuevas tecnologías ha estado siempre ligada a importantes catástrofes ambientales. Los accidentes ambientales ocurridos en los últimos 30 años han generado un impulso adicional a las investigaciones de este ámbito, lo que ha permitido que la biotecnología ambiental se establezca como una tecnología de gran potencial, pudiendo competir con tecnologías ya consolidadas.

El principio básico de actuación de los métodos biológicos se basa en una degradación de los compuestos orgánicos contaminantes en compuesto inorgánicos, que en los casos ideales resultan ser residuos inocuos como el dióxido de carbono, agua o biomasa celular (Ortiz et al., 2007; Blanch, 2010). De la digestión de las sustancias orgánicas, los microorganismos obtienen la fuente de carbono necesaria para el crecimiento de sus células y una fuente de energía para llevar a cabo todas sus funciones metabólicas.

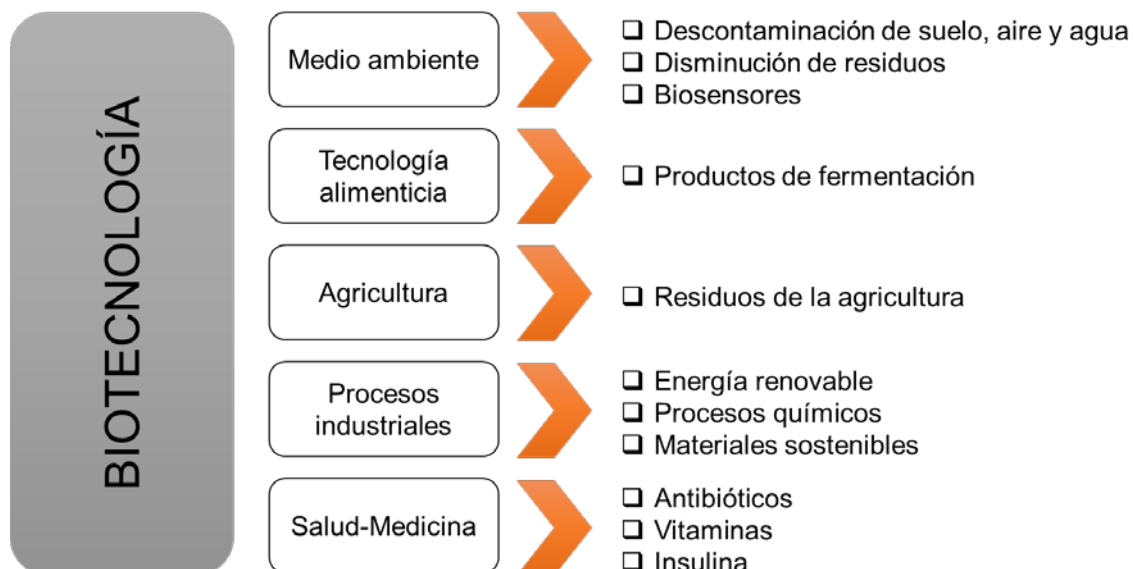


Figura 1.3. Algunas de las aplicaciones de la biotecnología en actividades antropogénicas (adaptado de Gavrilescu, 2010).

Probablemente, una de las primeras aplicaciones de la biotecnología a problemas ambientales fue en la depuración de aguas residuales, extendiéndose rápidamente a la depuración de aire y efluentes gaseosos. En la actualidad sin embargo, las técnicas de biohidrometalurgia basadas en microorganismos han pasado a concentrarse cada vez más en la depuración de residuos sólidos (biolixiviación), efluentes gaseosos y líquidos (biofiltración, bioadsorción y bioacumulación), y suelos (biorremediación) (Gonzaga, 2006).

Un problema importante a la orden del día lo constituye el aumento dramático de metales pesados en el ambiente debido fundamentalmente a las operaciones extractivas en la minería y a los residuos tanto industriales como urbanos generados. La mayor parte de este tipo de actividades producen lixiviados, que por lo general llegan a contaminar los cursos de aguas superficiales y subterráneas, afectando consecuentemente la vida animal, vegetal y humana (Asghari et al., 2013; Akcil et al., 2015).

El estado actual de desarrollo en el que se encuentra la tecnología hace que las empresas de fabricación y/o construcción sean altamente dependientes de los metales, aumentando así su demanda. Teniendo en cuenta que los recursos naturales

del planeta Tierra no son fuentes inagotables, resulta por tanto interesante poder recuperar los metales que puedan quedar atrapados en los residuos provenientes de actividades antropogénicas (Cyraneck y Silva, 2010).

Un ejemplo que puede aunar ambos objetivos de reducir la contaminación generada por desechos sólidos y recuperar metales de los mismos es el proceso de biolixiviación llevado a cabo al final de la vida de muchos Aparatos Eléctricos y Electrónicos (AEE).

En las últimas décadas, debido a la expansión del mercado tecnológico y la reducción de los ciclos de innovación, se están produciendo constantemente productos mejores y más baratos. Este hecho, ha supuesto que la sustitución de los AEE se haya acelerado incluso tres veces más que el resto de residuos, convirtiéndolo rápidamente en residuos, denominados Residuos de Aparatos Eléctricos y Electrónicos (RAEE) (Directiva 2012/19/UE; Karwowska et al., 2014; Yang et al., 2014).

Aún más, los RAEE es con diferencia uno de los tipos de residuos que más crecimiento tiene en la Unión Europea, con un crecimiento anual de 2.5% a 2.7%, alcanzando los 12.3 millones de tona en el año 2020 según el trabajo publicado por BIO Intelligence Service (2013). Se dice que si la cantidad estimada de RAEE generada cada año se pusiera en contenedores sobre un tren, sus vagones rodearían el planeta entero.

En la siguiente Figura 1.4 se puede observar la tendencia de generación de desechos electrónicos en España durante el periodo de 2001-2010, así como también el porcentaje de residuos que ha sido gestionado mediante reciclaje-recuperación o vertido.

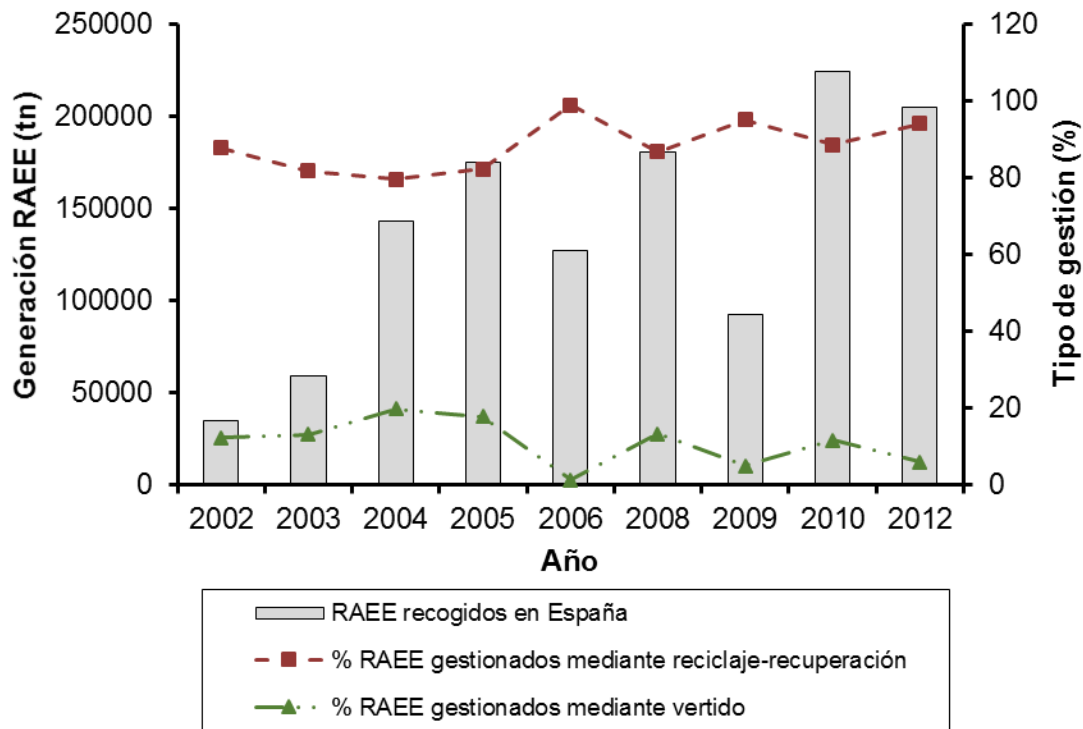


Figura 1.4. Recogida de los equipos electrónicos (electrodomésticos) y componentes de equipos electrónicos desechados en España durante los años 2001-2010 y el porcentaje de gestión mediante reciclaje-recuperación y vertido (elaboración propia a partir de datos del Instituto Nacional de Estadística).

Los RAEE resultan de especial interés por dos razones. La primera es que en su composición albergan elementos tóxicos, por lo que requerirán de un tratamiento específico vías a evitar un impacto ambiental. Pero además, estos aparatos también contienen elementos de valor tales como el cobre, oro y plata, que demandan una recuperación efectiva para poder volver a ser empleados como materia prima. Ahí es donde entra en juego la biotecnología.

Históricamente, los metales se han recuperado de los residuos electrónicos mediante técnicas de hidrometalurgia y pirometalurgia, procesos de alto coste y baja eficiencia, que además llegan a producir contaminaciones secundarias (Karwowska et al., 2014; Yang et al., 2014). Debido a las desventajas que presentan, estos procesos están siendo sustituidos por procesos basados en la biotecnología como la biolixiviación (Karwowska et al., 2014).

Como ya se ha dicho anteriormente, otra de las principales aplicaciones de la biotecnología ambiental es la descontaminación de suelos. Los agentes potencialmente contaminantes del suelo están fundamentalmente asociados a

residuos derivados de actividades industriales, mineras, agrícolas, ganaderas y urbanas (Liu et al., 2015).

Antes de la década de los 70 los objetivos de depuración se centraron en la contaminación del aire y del agua, dejando de lado el tratamiento de los suelos, puesto que se creía que su capacidad de autodepuración era casi infinita. La sensibilidad mundial comienza a cambiar a partir de la declaración de la «Carta Europea de Suelos» desarrollada por la Comunidad Europea en 1972, en la que se indica claramente en su apartado 6 que los suelos deberán ser protegidos contra la contaminación. Desde entonces, se han llevado a cabo diversas actuaciones remediadoras de los suelos, ya que éstos vienen sufriendo durante años y de forma continuada, multitud de formas de contaminación que aunque puedan ser imperceptibles a simple vista, afectan de forma directa a otros ámbitos de nuestro entorno y con ello, a nosotros mismos.

Hoy en día resulta indudable entender el suelo como un elemento frágil del medio ambiente, un recurso natural no renovable puesto que su velocidad de formación y regeneración es muy lenta mientras que los procesos que contribuyen a su degradación, deterioro y destrucción son mucho más rápidos. Si bien el suelo ejerce una labor protectora a través de su poder de amortiguación o capacidad natural de depuración de la contaminación, hay que tener muy presente que el poder de amortiguación de un suelo no es ilimitado y cuando se rebasa, el suelo deja de ser eficaz como sumidero de la contaminación. Incluso puede llegar a invertirse el proceso y a convertirse en una fuente de contaminación para los organismos del suelo y para el medio circundante (Ortiz et al., 2007).

Según el objetivo que se quiera alcanzar a la hora de tratar un suelo contaminado, se puede distinguir entre técnicas de contención, técnicas de confinamiento y técnicas de descontaminación, estando estas últimas orientadas hacia la disminución de la concentración de los contaminantes en el suelo. Entre las técnicas de descontaminación, se encuentran técnicas de origen biológico como biodegradación asistida, biotransformación de metales, biopilas y bioventing entre otros (Ortiz et al., 2007; Zouboulis y Moussas, 2011).

Para que los tratamientos de biorrecuperación de suelos sean efectivos no sólo hay que tener en cuenta factores biológicos, como la existencia de poblaciones

microbianas susceptibles de transformar los contaminantes, la presencia de nutrientes y oxígeno u otros aceptores de electrones alternativos, sino también factores ambientales como el tipo de suelo, la temperatura, los nutrientes y el pH (Cerqueira et al., 2014; Groudev et al., 2014).

Como se ha podido observar, la biotecnología ambiental ha tenido un gran avance y sus aplicaciones son muchas y variadas, todo ello gracias a la investigación que se ha llevado a cabo. No obstante, hay otros aspectos, como la biotecnología industrial, que no han recibido la misma atención y que por tanto su evolución no ha sido tan notable (Knockaert et al., 2015).

Esto ha hecho que el propósito de la biotecnología aplicada a la industria se quede en aplicaciones más limitadas. Por un lado, se emplea para reducir o reemplazar tanto la energía fósil como los materiales en base a hidrocarburo, por fuentes renovables en base a plantas y materiales más sostenibles respectivamente (Knockaert et al., 2015). Por otro lado, las bacterias potencian las propiedades nutritivas y el sabor de los alimentos y resultan de gran importancia en muchas industrias. La capacidad fermentadora de ciertas especies es aprovechada en la producción de queso, yogur, adobos y salazones. También resultan importantes en el curtido de cueros, la producción de tabaco, la conservación del grano, los tejidos, los fármacos, y en la elaboración de varios tipos de enzimas, polisacáridos y detergentes. Mencionar que si bien en un principio, el difícil control de los procesos basados en técnicas biológicas generaron desconfianza en el mundo industrial, actualmente ya están adquiriendo relevancia gracias en parte a los potenciales beneficios que conllevan.

1.5. La bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Como ya se ha visto, la biotecnología lleva años empleándose en ámbitos muy diversos; desde la minería, hasta la extracción de metales de lodos marinos (Pathak et al., 2009; Johnson 2014). En muchas de sus numerosas aplicaciones, la bacteria que más se ha empleado ha sido la bacteria del género *Acidithiobacillus ferrooxidans* (*A. ferrooxidans*). Este hecho se debe a que esta cepa fue una de las primeras en ser aislada, concretamente en el año 1940 (Barron y Lueking, 1990) y que además es una de las más conocidas, resultando ser por tanto la primera opción para muchos estudios (Pathak et al., 2009; Yang et al., 2014; Johnson y du Plessis, 2015; Lambert et al., 2015).

Tanto los organismos como los microorganismos suelen clasificarse atendiendo a la fuente de energía que requieren para su viabilidad y la fuente de carbono utilizada para su nutrición (Uno et al., 1996).

Según si la fuente de carbono empleada es materia orgánica o el carbono dióxido del aire, los organismos se clasifican en organótrofos y litótrofos respectivamente. A su vez, los litótrofos se dividen en fotolitótrofos o quimiolitótrofos, siendo los primeros organismos que emplean luz como fuente de energía y los segundos los que emplean la materia inorgánica. En este grupo es donde se encuentra la bacteria empleada en este trabajo, concretamente la bacteria *A. ferrooxidans* (Figura 1.5).

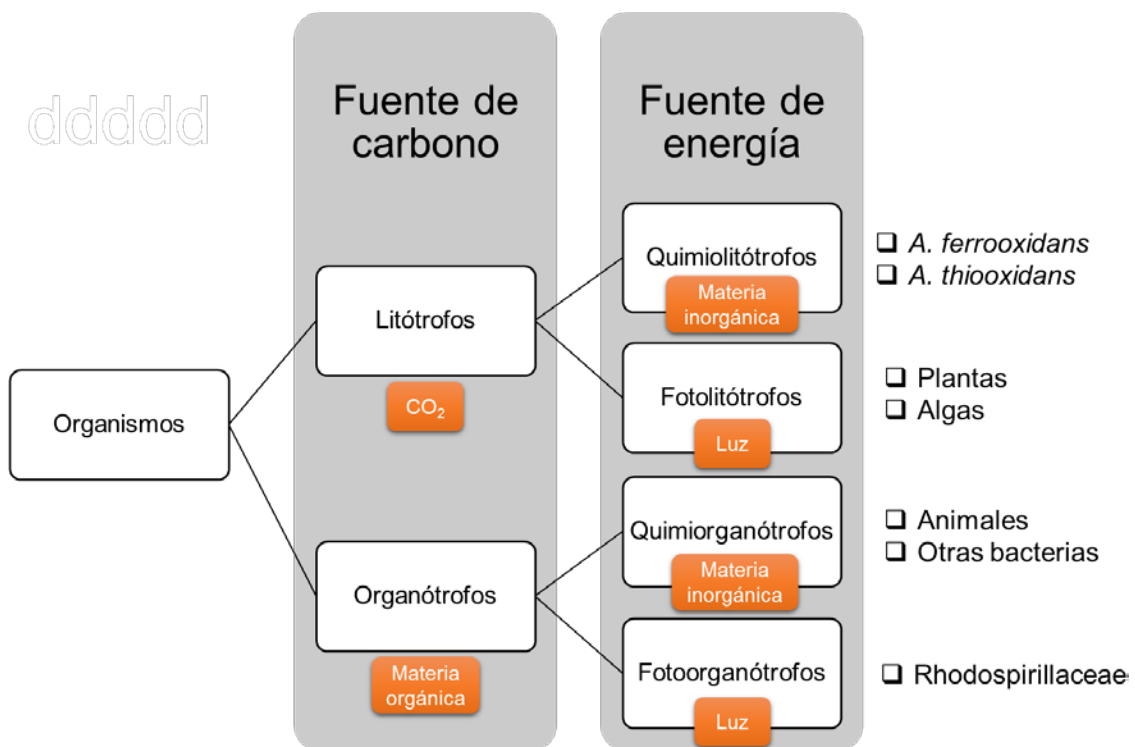


Figura 1.5. Clasificación de los organismos según su fuente de carbono y su fuente de energía (adaptado de Uno et al., 1996).

La bacteria *A. ferrooxidans*, anteriormente conocida como *Thiobacillus ferrooxidans* (Kawabe et al., 2003), se caracteriza por ser una bacteria aerobia, Gram-negativa y γ -proteobacteria (Barron y Lueking, 1990; Kai et al., 2007; Valdés et al., 2008).

Al ser una bacteria quimiolitótrofa, utiliza el dióxido de carbono como fuente de carbono y obtiene su energía de la oxidación del hierro ferroso, del azufre elemental o de compuestos reducidos de azufre, empleado oxígeno como aceptor de electrones final (Nemati et al., 1998; Carbajosa et al., 2010).

Además, se trata de una bacteria extremófila, dado que posee la habilidad de resistir o soportar condiciones ambientales extremas. Los microorganismos extremófilos, se dividen en varias categorías: los que son capaces de resistir altas temperaturas (termófilos), los que son capaces de resistir bajos valores de pH (acidófilos), los que son capaces de resistir altos pH (alcalófilos), los que son capaces de resistir en medios con alta concentración de sales (halófilos) y los que soportan bajas temperaturas (psicrófilos) (Tango and Islam, 2002; Podar and Reysenbach, 2006). Concretamente, la bacteria *A. ferrooxidans* pertenece al grupo de los acidófilos, siendo capaz de vivir bajo condiciones de pH en torno a 2.0 o incluso inferiores (Barron and Lueking, 1990; Ferguson and Ingledew, 2008; Valdés et al., 2008). Según Valdés et al. (2008) el estudio de *A. ferrooxidans* ofrece una oportunidad excepcional de poder probar la existencia de vida en condiciones de extrema acidez, como por ejemplo en el planeta Marte (Gómez et al., 2010; Bauermeister et al, 2014).

En cuanto a sus características físicas, se trata de un microorganismo en forma de varilla, que llega a tener 1 μm de largo y 0.5 μm de ancho (Uno et al., 1996; Johnson et al., 2007), lo cual la hace útil como herramienta de micro-mecanizado. El *Technical Rules for Biological Agents* la clasifica dentro del grupo de riesgo 1, por lo que es improbable que cause alguna enfermedad infecciosa o afecte de alguna manera a la salud de los humanos.

La bacteria *A. ferrooxidans* ha sido el principal microorganismo empleado en el tema de investigación presentado en esta tesis, si bien como podrá observarse en los siguientes capítulos, también se han realizado investigaciones con las bacterias *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans* (*S. thermosulfidooxidans* y *L. ferrooxidans* en adelante respectivamente).

1.6. Referencias

- Akcil, A., Erust, C., Ozdemiroglu, S., Fonti, V., Beolchini, F., 2015. A review of approaches and techniques used in aquatic contaminated sediments: metal removal and stabilization by chemical and biotechnological processes. *Journal of Cleaner Production* 86, 24-36.
- Asghari, I., Mousavi, S.M., Amiri, F., Tavassoli, S., 2013. Bioleaching of spent refinery catalysts: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 19, 1069-1081.

- Barron, J.C., Lueking, D.R., 1990. Growth and maintenance of *Thiobacillus ferrooxidans* cells. *Applied and Environmental Microbiology* 56 (9), 2801-2806.
- Bauermeister, A., Rettberg, P., Flemming, H.C., 2014. Growth of the acidophilic iron-sulfur bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* under Mars-like geochemical conditions. *Planetary and Space Science* 98, 205-215.
- Bhanot, N., Rao, P.V., Deshmukh, S.G., 2015. Sustainable manufacturing: An interaction analysis for machining parameters using graph theory. XVIII Annual International Conference of the Society of Operations Management (SOM-14). *Procedia-Social and Behavioral Sciences* 189, 57-63.
- Blanch, A.R., 2010. Biotecnología ambiental. Aplicaciones biotecnológicas en la mejora del medio ambiente. *Nota d'economia* 97-98, 183-198.
- BIO Intelligence Service, 2013. Equivalent conditions for waste electrical and electronic equipment (WEEE) recycling operations taking place outside the European Union, Final Report prepared for. European Commission – DG Environment.
- Brierley, C.L., Brierley, J.A., 2013. Progress in bioleaching: part B: Applications of microbial processes by the minerals industries. *Application of Microbial Biotechnology* 97, 7543-7552.
- Brinksmeier, E., Riemer, O., Stern, R., 2001. Machining of precision parts and microstructures. *Proceedings 10th International Conference on Precision Engineering (ICPE)*, Japan.
- Câmara, M.A., Campos, J.C., Abrão, A.M., Davim, J.P., 2012. State of the art on micromilling of materials, a review. *Journal of Materials Science and Technology* 28 (8), 673-685.
- Carbajosa, S., [et al.] 2010. Electrochemical growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on a graphite electrode for obtaining a biocathode for direct electrocatalytic reduction of oxygen. *Biosensors and Bioelectronics* 26, 877-880.
- Cerqueira, V.S., Peralba, M.C.R., Camargo, F.A.O., Bento, F.M., 2014. Comparison of bioremediation strategies for soil impacted with petrochemical oily sludge. *International Biodeterioration & Biodegradation* 95, 338-345.
- Chae, J., Park, S.S., Freiheit, T., 2006. Investigation of micro-cutting operations. *International Journal of Machine Tools and Manufacture* 46, 313-332.

- Chae, J., Park, S.S., 2007. High frequency bandwidth measurements of micro cutting forces. *International Journal of Machine tools & Manufacture* 47, 1433-1441.
- Chantzis, D., Van-der-Veen, S., Zettler, J., Sim, W.M., 2013. An industrial workflow to minimise part distortion for machining of large monolithic components in aerospace industry. 14th CIRP Conference on Modeling of Machining Operations. *Procedia CIRP* 8, 281-286.
- Chavoshi, S.Z., Luo, X., 2015. Hybrid micro-machining processes: A review. *Precision Engineering* 41, 1-23.
- Cominotti, R., Gentili, E., 2008. Near net shape technology: An innovative opportunity for the automotive industry. *Robotics and Computer-Integrated Manufacturing* 24, 722-727.
- Correa, D., 2008. The globalisation of copper: geo-political and geo-economic patterns in production and trade in Latin America and the rest of the world. *GCG Georgetown University-Universia* 2 (1), 88-99.
- Cyranek, G., Silva, U., 2010. Los residuos electrónicos: Un desafío para la sociedad del conocimiento en América Latina y el Caribe. Unesco.
- Delapierre, G., 1989. Micromachining: A survey of the most commonly used processes. *Sensors and Actuators* 17, 123-138.
- de la Vega, I., Requena, J., Fernández-Gómez, R., 2015. The colors of biotechnology in Venezuela: A bibliometric analysis. *Technology in Society* 42, 123-134.
- Directiva 2012/19/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 4 de julio de 2012 sobre residuos de aparatos eléctricos y electrónicos (RAEE). Accesible online: www.boe.es. Último acceso diciembre 2015.
- Dornfeld, D., Min, S., Takeuchi, Y., 2006. Recent advances in mechanical micromachining. *Annals of the CIRP* 55 (2), 745-768.
- Ferguson, S.J., Ingledew, W.J., 2008. Energetic problems faced by micro-organisms growing or surviving on parsimonious energy sources and at acidic pH: I. *Acidithiobacillus ferrooxidans* as a paradigm. *Biochimica et Biophysica Acta* 1777, 1471-1479.
- Gandarias, E., 2009. Microtecnologías: Pasado, presente y futuro. Portal del proyecto MicroManufacturing financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación. Adsequible on line en:

<http://www.micromanufacturing.net/didactico/Desarollo/microtechnologies.es>.

Último acceso diciembre 2015.

- Gavrilescu, M., 2010. Environmental biotechnology: Achievements, opportunities and challenges. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology* 4 (1), 1-36.
- Gómez, F., Mateo-Martí, E., Prieto-Ballesteros, O., Martín-Gago, J., Amils, R., 2010. Protection of chemolithoautotrophic bacteria exposed to simulated Mars environmental conditions. *Icarus* 209, 482-487.
- Gonzaga, L., 2006. Perspectivas de la biotecnología en las ecotecnologías. *Scientia et Technica Año XII* 32, 451-456.
- Groudev, S., Georgiev, P., Spasova, I., Nicolova, M., 2014. Decreasing the contamination and toxicity of a heavily contaminated soil by in situ bioremediation. *Journal of Geochemical Exploration* 144, 374-379.
- Heamawatanachai, S., Bamberg, E., 2010. Cutting force model of orbital single-point micromachining tool. *International Journal of Machine tools & Manufacture* 50, 815-823.
- Hegazy, M.A., Nazeer, A.A., Shalabi, K., 2015. Electrochemical studies on the inhibition behavior of copper corrosion in pickling acid using quaternary ammonium salts. *Journal of Molecular Liquids* 209, 419-427.
- International Copper Study Group, 2014. *The World Copper Factbook*. Accesible desde www.icsg.org. Último acceso diciembre 2015.
- Jayal, A.D., Badurneen, F., Dillon Jr., O.W., Jawahir, I.S., 2010. Sustainable manufacturing: Modeling and optimization challenges at the product, process and system levels. *CIRP Journal of Manufacturing Science and Technology* 2, 144-152.
- Johnson, D., Warner, R., Shih, A.J., 2007. Surface roughness and material removal rate in machining using microorganisms. *Journal of Manufacturing Science and Engineering* 123, 223-227.
- Johnson, D.B., 2014. Biomining-Biotechnologies for extracting and recovering metals from ores and waste materials. *Current Opinion in Biotechnology* 30, 24-31.
- Johnson, D.B., du Plessis, C.A., 2015. Biomining in reverse gear: Using bacteria to extract metals from oxidized ores. *Minerals Engineering* 75, 2-5.

- Kai, T., Nagano, T., Fukumoto, T., Nakajima, M., Takahashi, T., 2007. Autotrophic growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* by oxidation of molecular hydrogen using a gas-liquid contactor. *Bioresource Technology* 98, 460-464.
- Karwowska E., [et al.] 2014. Bioleaching of metals from printed circuit boards supported with surfactant-producing bacteria. *Journal of Hazardous Materials* 264, 203-210.
- Kawabe, Y., Inoue, C., Suto, K., Chida, T., 2003. Inhibitory effect of high concentrations of ferric irons on the activity of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 96 (4), 375-379.
- Kent, J.A., 2012. *Handbook of industrial chemistry and biotechnology*. Volume 1 and 2. 12th edition. Springer Science+Business Media. New York. ISBN 978-1-4614-4258-5.
- Knockaert, M., Manigart, S., Cattoir, S., Verstraete, W., 2015. A perspective on the economic valorization of gene manipulated biotechnology: Past and future. *Biotechnology Reports* 6, 56-60.
- Kobayashi, S., Hashimoto, Y., Maeyama, M., Saito, Y., Nagai, Y., 1996. Electrical breakdown strength of oxygen-free copper electrodes under Surface and bulk treatment conditions. *Vacuum* 47 (6-8), 745-747.
- Knych, T., Smyrak, B., Walkowicz, M., 2011. Selected aspects of evolution properties of oxygen free copper for high-advanced electrotechnical application. *Przegląd Elektrotechniczny (Electrical Review)* 87 (9), 285-290.
- Lambert, F., [et al.] 2015. Copper leaching from waste electric cables by biohydrometallurgy. *Minerals Engineering* 76, 38-46.
- Lasemi, A., Xue, D., Gu, P., 2010. Recent development in CNC machining of freeform surfaces: A state-of-the-art review. *Computer-Aided Design* 42, 641-654.
- Lauro, C.H., Brandão, L.C., Baldo, D., Reis, R.A., Davim, J.P., 2014. Monitoring and processing signal applied in machining processes- A review. *Measurement* 58, 73-86.
- Liow, J.L., 2009. Mechanical micromachining: A sustainable micro-device manufacturing approach?. *Journal of Cleaner Production* 17, 662-667.

- Liu, H., [et al.] 2015. Bioremediation of soils co-contaminated with heavy metals and 2,4,5-trichlorophenol by fruiting body of *Clitocybe maxima*. *Journal of Hazardous Materials* 294, 121-127.
- López de Lacalle, L.N., Sánchez, J.A., Lamikiz, A., 2004. Mecanizado de alto rendimiento. Procesos de arranque. Ediciones Técnicas Izaro. Bilbao. ISBN: 84-609-1380-5.
- Löwer, M., [et al.] 2015. Growing near net shape components from renewable materials. 22nd CIRP Conference on Life Cycle Engineering. *Procedia CIRP* 29, 609-614.
- Lv, J., Tang, R., Jia, S., Liu, Y., 2015. Experimental study on energy consumption of computer numerical control machine tools. *Journal of Cleaner Production*. Doi:10.1016/j.jclepro.2015.07.040.
- Madou, M.J., 2001. Fundamentals of Microfabrication. The Science of Miniaturization. Second Edition. CRC Press. ISBN 0-8493-0826-7.
- Malekian, M., Park, S.S., Jun, M.B.G., 2009. Modeling of dynamic micro-milling cutting forces. *International Journal of Machine Tools & Manufacture* 49, 586-598.
- Mao, J., Chen, X., Feng, W., Yuan, S., Du, R., 2015. A precision CNC turn-mill machining center with gear hobbing capability. *Precision Engineering* 41, 126-134.
- Masoumik, S.M., Abdul-Rashid, S.H., Olugu, E.U., 2015. Importance-performance analysis of green strategy adoption within the Malaysian manufacturing industry. 12th Global Conference on Sustainable Manufacturing. *Procedia CIRP* 26, 646-652.
- Masuzawa, T., 2000. State of the art of micromachining. *Annals of CIRP* 49, 473–88.
- Mittal, V.K., Sangwan, K.S., 2014. Prioritizing barriers to green manufacturing: Environmental, social and economic perspectives. *Variety Management in Manufacturing*. Proceedings of the 47th CIRP Conference on Manufacturing Systems. *Procedia CIRP* 17, 559-564.
- Mohanty, S., Rameshbadu, A.P., Mandal, S., Su, B., Dhara, S., 2013. Critical issues in near net shape forming via green machining of ceramics: A case study of alumina dental crown. *Journal of Asian Ceramic Societies* 1, 274-281.

- Nemati, M., Harrison, S.T.L., Hansford, G.S., Webb, C., 1998. Biological oxidation of ferrous sulphate by *Thiobacillus ferrooxidans*: A review on the kinetic aspects. *Biochemical Engineering Journal* 1, 171-190.
- Ortiz, I., Sanz, J., Dorado, M., Villar, S., 2007. Técnicas de recuperación de suelos contaminados. *Elecé Industria Gráfica*. Depósito Legal: M-5.839-2007.
- Pathak, A., Dastidar, M.G., Sreekrishnan, T.R., 2009. Bioleaching of heavy metals from sewage sludge: A review. *Journal of Environmental Management* 90, 2343-2353.
- Paul, I.D., Bhole, G.P., Chaudhari, J.R., 2014. A review on green manufacturing: It's importance, methodology and its application. 3rd International Conference on Materials Processing and Characterisation (ICMPC 2014). *Procedia Materials Science* 6, 1644-1649.
- Peng, T., Xu, X., Wang, L., 2014. A novel energy demand modelling approach for CNC machining based on function blocks. *Journal of Manufacturing Systems* 33, 196-208.
- Podar, M., Reysenbach, A.L., 2006. New opportunities revealed by biotechnological explorations of extremophiles. *Current Opinion in Biotechnology* 17, 250-255.
- Pusavec, F., Krajnc, P., Kopac, J., 2010a. Transitioning to sustainable production-Part I: Application on machining technologies. *Journal of Cleaner Production* 10, 174-184.
- Pusavec, F., Kramar, D., Krajnc, P., Kopac, J., 2010b. Transitioning to sustainable production-Part II: Evaluation of sustainable machining technologies. *Journal of Cleaner Production* 18, 1211-1221.
- Seo, C., Ahn, D., Kim, D., 2015. Removal of oxides from copper Surface using femtosecond and nanosecond pulsed lasers. *Applied Surface Science* 349, 361-367.
- Sezen, B., Çankaya, S.Y., 2013. Effects of green manufacturing and eco-innovation on sustainability performance. 9th International Strategic Management Conference. *Procedia-Social and Behaviour Sciences* 99, 154-163.
- Tango, M.S.A., Islam, M.R., 2002. Potential of extremophiles for biotechnological and petroleum applications. *Energy Sources* 24, 543-559.

- Uno, Y., Kaneeda, T., Yokomizo, S., 1996. Fundamental study on biomachining (Machining of metals by *Thiobacillus ferrooxidans*). International Journal of the Japan Society of Mechanical Engineers, Series C 39 (4), 837-842.
- Vallero, D.A., 2010. Environmental biotechnology. A biosystem approach. Elsevier. ISBN: 978-0-12-375089-1.
- Valdés, J., [et al.] 2008. *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: From genome sequence to industrial applications. BMC Genomics 9-597, 1-24.
- Wu, G., [et al.] 2010. A critical review on the bio-removal of hazardous heavy metals from contaminated soils: Issues, progress, eco-environmental concerns and opportunities. Journal of Hazardous Materials 174, 1-8.
- Yang, Y., [et al.] 2014. Bioleaching waste printed circuit boards by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and its kinetics aspect. Journal of Biotechnology 173, 24-30.
- Žerjav, G., Milošev, I., 2015. Protection of copper against corrosion in simulated urban rain by the combined action of benzotriazole, 2-mercaptobenzimidazole and stearic acid. Corrosion Science 98, 180-191.
- Zhang, L., Cai, Z., Yang, J., Yuan, Z., Chen, Y., 2015. The future of copper in China-A perspective based on analysis of copper flows and stocks. Science of the Total Environment 536, 142-149.
- Zouboulis, A., Moussas, P.A., 2011. Groundwater and soil pollution: Bioremediation. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences, Encyclopedia of Environmental Health, 1037-1044.

CAPITULO 2

ESTADO DEL ARTE DEL BIOMECANIZADO



Biomachining: metal etching via microorganisms

Journal:	<i>Critical Reviews in Biotechnology</i>
Manuscript ID	BBTN-2015-0068.R1
Manuscript Type:	Review Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Díaz-Tena, Estibaliz; University of the Basque Country, Chemical and Environmental Engineering Barona, Astrid; University of the Basque Country, Chemical and Environmental Engineering Gallastegui, Gorka; University of the Basque Country, Chemical and Environmental Engineering Rodríguez, Adrián; Faculty of Engineering University of the Basque Country, Mechanical Engineering López de Lacalle, L. Norberto; Faculty of Engineering University of the Basque Country, Mechanical Engineering Eliás, Ana; University of the Basque Country, Chemical and Environmental Engineering
Keywords:	biomachining, micromachining, green manufacturing, microorganisms, metal removal

2. ESTADO DEL ARTE DEL BIOMECANIZADO

2.1. Introduction

Micro-components are crucial parts of the devices used today in electronics, optics, aerospace and other technologies (Chavoshi and Luo, 2012). Besides its high sensitivity and compactness, the manufacturing process involving micro-components requires lower energy consumption and smaller amounts of raw materials than conventional production.

As far as microtechnologies are concerned, micromachining is used particularly to produce three-dimensional structures, components and devices with overall dimensions of a few or a few hundred micrometers. As a result of the high demand for micro-components worldwide, micromachining technology is in constant development (Chang et al., 2008; Hocheng et al., 2012a).

Machining can be used to add, remove or shape the material on workpieces. Depending on the kind of energy used, machining processes for material removal can be classified into the following categories: physical, chemical, and biological (Uno et al., 1996a). The physical processes include milling, turning, drilling and grinding, although several non-conventional methods (such as laser or electrical discharge machining) have also been used. The chemical processes include photo etching and chemical milling, where baths of temperature-regulated chemicals such as strong acids are used. Conversely, biological processes or biomachining processes rely on the activity of microorganisms for selective metal removal.

Based on recent advances in biotechnology, biomachining is now a controlled microbiological process for selectively forming microstructures on a workpiece by metal removal or dissolution (Ting et al., 2000; Hocheng and Jadhav, 2015). Biomachining is characterized by machining micro-components with minimum stress and without exerting any cutting force during the process (Shikata et al., 2009). Additionally, it ensures precision, high quality, and avoids any distorting or damaging of the workpiece (Liu et al., 2009). In contrast to well-established chemical and physical processes, microbial activity does not produce much heat or residual stress, and material removal is performed slowly and uniformly (Eskandarian et al., 2013).

The use of microorganisms to extract metals from their respective ores (biomining) has its roots far back in antiquity, although early miners did not know that microbes were involved. Biomachining is based on the same natural processes, and is gaining importance due to its wide range of commercial applications. Unlike conventional hydro- and pyrometallurgical processes, it is free from environmental concerns (Johson and Du Plessis, 2015). Additionally, the environmental benefit of biomachining is a valuable issue in current industrial policy, as many industries focus their efforts not only on improving productivity, but also on complying with environmental regulations (and additionally on promoting an eco-efficient and eco-friendly image) (Mital and Sangwan, 2014; Paul et al., 2014; Masoumik et al., 2015). The microorganisms used in biomachining processes replace the chemical compounds (such as FeCl_3) employed in chemical processing (Johson et al., 2007). Energy consumption is low, with the subsequent cost saving in the manufacturing of high quality pieces (Ting et al., 2000; Kurosaki et al., 2003; Hocheng et al., 2012a; Istiyanto et al., 2012).

Consequently, biomachining is classified as a promising option within green manufacturing technologies. Regarding potential industrial applications, this biotechnological alternative may be used successfully for manufacturing semiconductors and for the metal-based microchannel production of heat exchangers (Johnson et al., 2007; Istiyanto et al., 2011; Hocheng et al., 2012b).

As far as the process economy is concerned, physical machining has major advantages but it is intensive in energy, capital and labour. Chemical machining is more economical, but it generates liquid wastes whose proper final disposal is an added expense. Finally, biomachining is the most affordable and sustainable process, but although biological processes will necessarily become integrated into future industrial procedures, large-scale biomachining has yet to be implemented in production, so the real cost estimation of biomachined parts has still to be reported in the literature.

Although this bio-strategy for machining is still in its infancy, and further research is required, biological processes will necessarily become integrated into future industrial procedures (Hocheng and Jadhav, 2015). This chapter provides a review of the particular features and current development of biomachining, with special attention being paid to its advantages and potential applications.

2.2. Biomachining principles

The oxidation-reduction chemical reactions that take part in the biomachining process for metal dissolution have been well documented, and two main mechanisms (direct and indirect pathways) have been discussed in the literature (Chang et al., 2008; Hocheng et al., 2012a, Jadhav et al., 2013). Regarding the direct mechanism, the bacteria and the metal are in contact by means of an extracellular polymeric substance (enzyme) synthesized by the microorganisms (Figure 2.1).

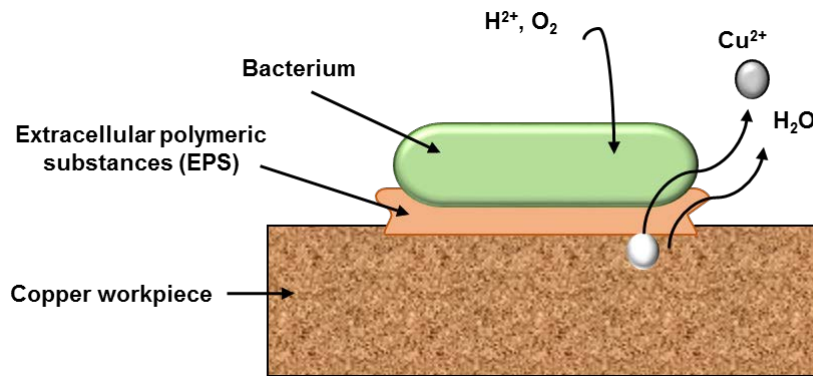
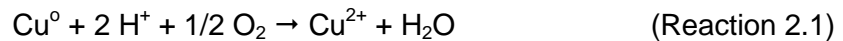


Figure 2.1. Outline of the direct biomachining mechanism on a copper workpiece.

Thus, enzyme activity is responsible for metal oxidation and dissolution. The general reaction (Reaction 2.1) for direct biomachining on copper workpieces can be summarized as follows:



Conversely, the indirect mechanism uses an intermediate redox couple (such as ferrous/ferric iron) to dissolve the metal from the workpiece surface, and no direct contact is established between the bacteria and the metal (Figure 2.2).

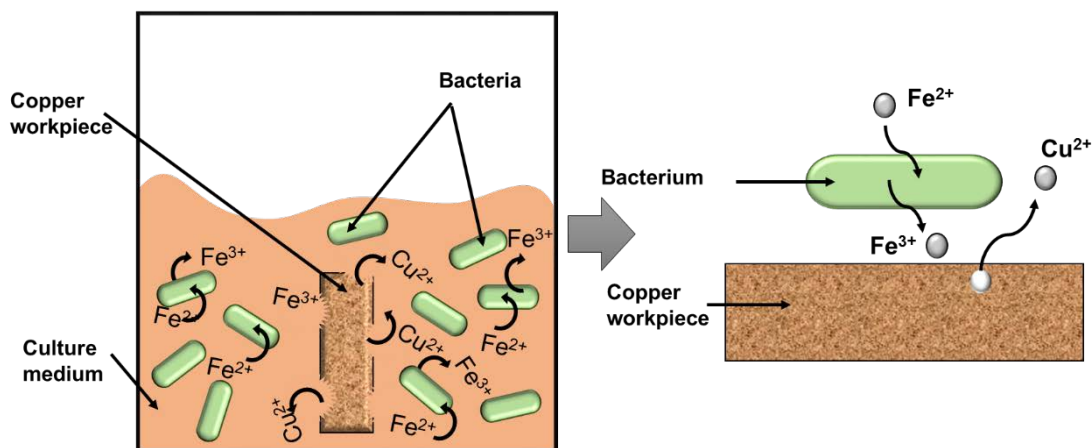
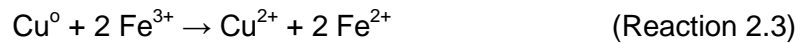
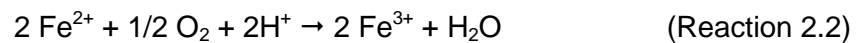


Figure 2.2. Outline of the indirect biomachining mechanism on a copper workpiece.

This indirect process has two steps. In the first step, the ferrous iron (Fe^{2+}) is first oxidized into a ferric iron (Fe^{3+}) by the microorganisms in order to obtain energy for their survival (Reaction 2.2). Subsequently, the ferric iron acts as the oxidizing agent for metal dissolution (Reaction 2.3). Reaction 2.3 renders ferrous iron that is reduced again by the bacteria in the first step. Therefore, the indirect mechanism is a cyclic combination of chemical and microbiological processes, although the different rate of both reactions may cause an ion unbalance in the system over time (Lambert et al., 2015).



Uno et al. (1996a) established that the direct biomachining mechanism prevailed for pure iron, whereas the indirect mechanism was the priority pathway for pure copper. Nevertheless, these authors did not provide any firm evidence to support their conclusion, which was eventually forthcoming when Miyano et al. (2003a) studied *A. ferrooxidans* activity on machined copper pieces. In this particular study, the bacteria were bigger than the controlled surface areas to be machined and, consequently, not enough space was available for direct contact between the metal and the microorganisms. Surprisingly, metal removal was experimentally confirmed, and the explanation was that indirect oxidation was responsible for metal dissolution.

Xenofontos et al. (2015) quantified the amount of copper released by direct biomachining and indirect biomachining when bacteria plus supernatant and only supernatant were used. They concluded that the direct mechanism contributed only the 5% to the biomachining process, whereas, the rest (95%) was due to the indirect mechanism.

As far as kinetic mechanisms are concerned, Lilova et al. (2007) used a custom-built bioreactor to study the bacterial oxidation of pure copper by *A. ferrooxidans* microorganisms. Although they confirmed the occurrence of direct oxidation, it was concluded to be relatively slow, as compared to the indirect mechanism. They also studied the possible reaction products by micro-X-ray diffraction, and they found that the direct biological oxidation of copper produces soluble and insoluble products, such as copper sulfate and piypite, respectively.

2.3. Microorganisms and culture medium

The microbial action on any metal surface can be both detrimental and beneficial, depending on the application pursued. Contrary to the microbially induced (or influenced) corrosion that produces a gradual destruction of the material's surface and properties, the success of many biotechnological processes, such as mining bioleaching and biomachining, relies on the efficient and controlled activity of microorganisms.

Bioleaching and biomachining share many common features, as both use similar microorganisms. The general term "microorganisms" in the biomachining and bioleaching literature is basically associated with bacteria, but not exclusively so. The bioleaching process consists of the metal releasing ores through the action of a widespread variety of chemoorganotrophic and chemolithotrophic bacteria. Particularly, bacteria of the genera *Thiobacillus* are recognized to be amongst the most important microorganisms (Uno et al., 1996a), and the *Thiobacillus* species called *A. ferrooxidans*, is the most widely used bacterium because of its ability to oxidize both soluble and insoluble inorganic substrates (Lilova et al., 2007; Valdés et al., 2008). Similarly, many preliminary studies on biomachining used *A. ferrooxidans* as the target microorganism to machine metals (Istiyanto et al., 2010).

In 1993, Uno et al. (1993) pioneered the use of these bacteria to biomachine pure copper and pure iron. They selected three of the seven known types of *A. ferrooxidans* that are registered by the American Type Culture Collection (ATCC), in particular ATCC 13598, 13661 and 33020 (Uno et al., 1996a). In due course, many other researchers utilized microorganisms from an *A. ferrooxidans* culture to conduct their studies, although the type of strain differed in some cases (Hocheng et al., 2012b; Jadhav et al., 2013). It was not until 2003, however, when a bacterium other than *A. ferrooxidans* was used for biomachining purposes. Miyano et al. (2003b) selected *Bacillus* sp. to investigate the biomachining process, even though these bacteria are responsible for microbially induced corrosion on stainless steel.

Another bacterium of the genus *Acidithiobacillus*, particularly *Acidithiobacillus thiooxidans* (*A. thiooxidans*), was also used in several studies to substitute the more widely used *A. ferrooxidans* (Chang et al., 2008; Hocheng et al., 2012c). The former species are classified as extremely acidophilic bacteria with the extraordinary ability to

grow at very low pH values (1.0 or even lower). Another advantage of *A. thiooxidans* is related to its biomachining operating cost, as it performs sulfur compound oxidation quicker than *A. ferrooxidans*, with the consequent reduction in process time and expense (Hocheng et al., 2012c).

Shikata et al. (2009) used *Staphylococcus sp.* for biomachining experiments. This particular microorganism is a facultative anaerobic bacterium, and it is salt tolerant, as most organisms are killed by high NaCl. It was isolated from corroded copper piping installed in a groundwater environment in Japan.

Eskandarian et al. (2013) proposed a novel enzymatic biomachining method based on the activity of hydrogen peroxide (H_2O_2). The hydrogen peroxide is produced when the glucose's biological oxidation is catalysed by the glucose oxidase type II, which is produced by the fungus *Aspergillus niger* (*A. niger*). A noticeable difference between using bacteria or a fungus is that the latter does not require preliminary growth, thereby making enzymatic machining a simpler process.

Specialized techniques for cell isolation from natural sources are required for obtaining the preliminary inoculum (biomass) for the biomachining system. After isolation, microorganisms are grown in a so-called culture medium, an aqueous solution containing nutrients in which microorganisms are cultivated. Thus, when culturing bacteria (or microorganisms in general) in the laboratory, it is very important for the lab culture medium to provide similar environmental and nutritional conditions to those prevailing in the bacteria's natural habitat. Therefore, a culture medium basically contains water, a source of carbon and energy, a source of nitrogen, trace elements, and some growth factors. Additionally, the pH of the medium must be fixed accordingly.

Table 2.1 summarizes the most common culture medium used in biomachining according to the bacteria to be grown.

Table 2.1. General composition of several culture medium for biomass growth.

Culture medium	Composition (g/L)	Microorganisms	References
9K	0.30 (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.50 K ₂ HPO ₄ 0.50 MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.10 KCl 0.01 Ca(NO ₃) ₂ 30 FeSO ₄ ·7H ₂ O 10 L deionized water	<i>A. ferrooxidans</i>	Miyano et al., 2003a Johson et al., 2007 Lilova et al., 2007 Yang et al., 2009 Istiyanto et al., 2012 Jadhav et al., 2013 Suwandi et al., 2014
Leathen	0.15 (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.05 K ₂ HPO ₄ 0.50 MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.05 KCl 0.01 Ca(NO ₃) ₂ 25.0 FeSO ₄ ·7H ₂ O	<i>A. ferrooxidans</i>	Ballerini et al., 1998 Zhang et al., 1998 Zhang and Li, 1998 Zhang and Li, 1999 Liu et al., 2009 Yang et al., 2009
317	0.3 (NH ₄) ₂ SO ₄ 3.5 K ₂ HPO ₄ 0.5 MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.25 CaCl ₂	<i>A. thiooxidans</i>	Chang et al., 2008 Hocheng et al., 2012c
PYG	5.00 Polypeptone 1.00 Yeast extract 5.00 Glucose	<i>Bacillus sp.</i>	Miyano et al., 2003b
Sucrose	100 Sucrose 1.5 NaNO ₃ 0.5 KH ₂ PO ₄ 0.025 MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.025 KCl 1.6 Yeast extract	<i>Aspergillus niger</i>	Jadhav and Hocheng, 2014

The culture medium (without bacteria) is used as a control for biomachining performance assessment. Istiyanto et al. (2010) reported a copper mass loss lower than 0.0003 g after 6 hours of culture medium immersion, and Johnson et al. (2007) measured a mass loss lower than 0.004 g after 48 hours. In both cases, this loss was attributed to the acidic nature of the medium.

The machining ability of the Leathen medium was also studied by Yang et al. (2009) and Zhang and Li (1998). In both cases, the variation in the machining depth of various metals over time was studied once they had been submerged in the Leathen medium

without bacteria. It was concluded that the mass loss was negligible and, consequently, that the medium itself had no machining ability.

Once the bacteria have been grown in the selected nutrient medium, their efficiency for biomachining purposes relies on the biomass growth phase. Although different growth models have been proposed in the literature, the one most commonly used identifies four metabolic periods: lag phase, exponential growth phase (when peak activity is achieved), stationary phase, and death phase (Yang et al., 2009).

Regarding the particular bacteria used in biomachining processes, Uno et al. (1996a) quantified the variations in the number of *A. ferrooxidans* bacteria along the culture time for three different strains (ATCC 13598, 13661 and 33020). In this study, the number of bacteria started increasing exponentially after 25 culture-hours, whereupon a more gradual increase was recorded, until the stationary phase was reached one week later. Chang et al. (2008) carried out a similar study by using *A. thiooxidans* bacteria. These bacteria maintained an exponential growth phase between days 5 and 15 of the experiment.

Subsequent to the exponential growth phase, bacteria reach the stationary phase where cell density and activity remain high and quasi-constant. Yang et al. (2009) have recommended the stationary phase for biomachining based on their conclusions on the ferrous iron/ferric iron ratio. According to these authors, when ferrous iron was almost depleted in the solution, the biomass reached the stationary phase. As a consequence of ferrous iron depletion, the amount of the strong oxidant ferric iron in the solution was very high, and metal oxidation was therefore easily carried out. Nevertheless, several authors have used biomass in their exponential growth phase when the number of active microorganisms was expected to increase over time (Shikata et al., 2009; Istiyanto et al., 2010; Jadhav and Hocheng, 2014).

2.4. Material removal rate

The parameter called Material Removal Rate (MRR) is used for assessing the performance of all the industrial machining processes, and it is the amount of metal removed per unit of time. The MRR is related to the productivity of the manufacturing method, and it determines both the time required to generate the desired workpiece

and the operating cost of the entire process. In the particular case of the biomachining process, the Specific Metal Removal Rate (SMRR) is also a relevant parameter, as it is calculated by dividing MRR by cell concentration.

MRR values were first published by Johnson et al. (2007) in a study on biomachining pure copper pieces by *A. ferrooxidans*. The MRR was reported to be very low, and although a maximum rate was achieved initially, this parameter decreased over time. The depletion of available oxygen was suggested to be the limiting factor for the low MRR, as oxygen is required in metabolic oxidation processes.

Similar experiments were performed by Istiyanto et al. (2010; 2012) and Jadhav et al. (2013). These authors found that the MRR was inversely proportional to machining time, and that it decreased quickly after peaking. Conversely to Johnson et al. (2007), Istiyanto et al. (2010) demonstrated that the decrease in the MRR was not merely caused by the depletion of oxygen, because the MRR decreased from 2.2 mg/h to 1.2 mg/h in 6 hours, even when additional oxygen was supplied to the system. Several factors were concluded to have an impact on the MRR, such as the decrease in ferrous sulfate concentration, the increase in divalent copper (Cu^{2+}) concentration, and the hydrolysis phenomena. Kumada et al. (2001a) suggested that the machining rate could be controlled by adjusting the ferric iron concentration in the medium. Chang et al. (2008) reported that the microbial stress exposure should be minimized for a high MRR.

Other parameters that give similar information to the MRR were variations in groove depth and the mass amount removed during machining.

Uno et al. (1996a) and Zhang and Li (1999) used *A. ferrooxidans* for the biomachining of pure copper and pure iron pieces. In both studies, the groove depth (and consequently the amount of metal removed) increased linearly with machining time. The mass amount of copper removed was higher than the amount of iron (200 μm for copper and 150 μm for iron).

Hocheng et al. (2012a) and Hocheng and Jadhav (2011) utilized a culture supernatant resulting from filtering a three-day incubated *A. ferrooxidans* culture through a 0.22 μm filter. They sought to prove the indirect mechanism for metal removal, that is, the potential use of bacterial culture supernatant for the biomachining of metals. The metal pieces studied recorded different MRRs after exposure to a bacterial culture supernatant, with copper and nickel being the ones with the higher MRR (22.0 mg/h

and 17.0 mg/h, respectively). These results are comparable with those reported by Ting et al. (2000), whose study did not use a filtered bacteria culture.

Similar studies were carried out by Hocheng et al. (2012b) and Jadhav et al. (2013), although they compared the MRR by using both *A. ferrooxidans* bacteria cells and an *A. ferrooxidans* culture supernatant. In the first case, they stated that biomachining with a culture supernatant allows removing a large amount of metal in a short period of time, thus improving process performance. The second case also reached the same conclusion, as a higher MRR was obtained using a culture supernatant instead of bacteria cells.

2.5. Roughness and surface finish

The increasing complexity and quality requirements of mechanical products have reinforced the need for accurately producing and controlling the surface finish of manufactured pieces. Slight variations in the surface texture can influence the performance characteristics that may ultimately determine the final use, integrity and service life of the workpiece (Díaz-Tena et al., 2014).

Many researchers have shown that microbial machining has an unfavourable effect on the roughness of machined surfaces, and that surface morphology severely changes throughout the process (Kumada et al., 2001a; Kumada et al., 2001b; Lilova et al., 2007; Shikata et al., 2009; Jadhav et al., 2013; Saragih and Jo Ko, 2013; Xenofontos et al., 2015). The final surface condition of a biomachined piece is evaluated by measuring the surface roughness with Scanning Electron Microscopy (SEM). The experiments carried out by Yang et al. (2009) used the *A. ferrooxidans* bacteria on copper, brass and steel workpieces after three-hour exposure in a 9K medium and a Leathen medium. They found that surface roughness in the three materials increased rapidly and linearly throughout time, reaching the highest roughness value after two hours of exposure (2 μm in brass, 1.2 μm in copper, and 2 μm in steel in the 9K medium). Thereafter, the roughness no longer increased significantly.

Johnson et al. (2007) studied the changes in surface roughness in copper blocks after submerging them for 24 and 48 hours in a 9K culture medium enriched with *A. ferrooxidans*. These authors concluded that the surface deteriorated in all bacteria

machining experiments, and that the initial roughness value did not have a significant effect on the change in surface quality. Based on SEM micrographs, the bacterially machined surface grooves from polishing disappeared and grain boundaries were visible.

Eskandarian et al. (2013) performed a comparative surface roughness analysis after a 24 hour process of material removal by different methods. They reported that the surface roughness of enzymatic biomachined copper workpieces recorded a lower roughness value ($2.5 \mu\text{m}$) than the pieces machined in acidic environments when using *A. ferrooxidans* ($6.7 \mu\text{m}$).

Xenofontos et al. (2015) attributed the surface roughness increase in the biomachined copper workpieces to the formation of exopolysaccharide between the microorganisms and the workpiece (even though the contribution of direct biomachining is relatively low).

2.6. Control parameters

The MRR value and final finish of the workpiece are dependent upon a variety of experimental parameters that should be effectively controlled for achieving successful manufacturing. Bearing in mind the biological basis of this micromachining process, the most relevant parameters to be described in detail in this section are cell concentration, temperature, shaking rate, pH, and ion concentration in the machining solution.

2.6.1. Cell concentration

Cell concentration or density plays a key role in the biomachining process, as stated in the earliest studies (Zhang et al., 1998; Zhang and Li, 1999). A high bacterial concentration may result in a high metabolic activity in the culture medium, and in the case of indirect biomachining it implies a high concentration of the oxidant ion (Kumada et al., 2001a).

Chang et al. (2008) studied the influence of *A. thiooxidans* bacterial concentration on the MRR, and they found that the biomachining of aluminium and nickel was promoted by a high cell concentration. Conversely, the MRR achieved for copper was higher at $1.0 \cdot 10^8$ cells/mL concentration than at $2.0 \cdot 10^8$ cells/mL. Nevertheless, a cell density higher than $2.0 \cdot 10^8$ cells/mL had a negative impact on the total copper removal rate.

Regarding *A. ferrooxidans* cell concentration, similar experiments were carried out by Hocheng et al. (2012b). They studied the effect of cell concentration on the biomachining of copper, nickel and aluminium, concluding that the optimal cell concentration should be established on a case by case basis. These authors concluded that the cell concentration of $5.0 \cdot 10^8$ cells/mL for copper, $2 \cdot 10^8$ cells/mL for nickel and $1 \cdot 10^8$ cells/mL for aluminium were optimal for oxidizing ferrous iron into ferric iron in indirect biomachining. Kumada et al. (2001a) reported that a high *A. ferrooxidans* bacteria population would mean a high ferric iron concentration available in the culture medium, due to the metabolic action of the iron-oxidizing bacteria. Thus, a high concentration of ferric iron in the solution would render a high removal rate.

Consequently, a fixed cell concentration in the culture is recommended in order to avoid a decreasing removal rate and ensure an optimal metal removal process. Miyano et al. (2003a) proposed keeping a minimum amount of active bacteria by continuous culturing in the laboratory, and Yang et al. (2009) stated that the bacteria culture should be grown until a stationary phase was reached.

2.6.2. Machining temperature and shaking rate

All biological systems are affected by temperature, so there is a need to control temperature to keep microorganism activity at its optimum. Additionally, an adequate shaking rate provides an efficient contact between the workpiece and the biological medium, and the removal rate achieved by shaking has, in fact, been reported to be about three times higher (Xenofontos et al., 2015).

The effect of both machining temperature and shaking rate on the MRR efficiency via *A. ferrooxidans* was studied by Uno et al. (1996a), Ting et al. (2000), Jadhav et al. (2013) and by Xenofontos et al. (2015). In all cases, a moderate increase in the shaking rate and/or machining temperature positively influenced the removal rate. Nevertheless, Uno et al. (1996a) found that the MRR reached a constant value at an increasing shaking rate until 160 rpm. Machining temperatures ranging from 18 °C to 43 °C were applied in order to complete the effect of this parameter. Although the MRR

increased with temperature, the MRR for iron peaked at 40 °C, whereas the maximum value for copper was at 30 °C.

Jadhav et al. (2013) reported that an increase in the shaking rate promoted a better mixing, resulting in an increase in the MRR. Nevertheless, the positive effect of the temperature on the MRR reported by other authors was not confirmed in this study. Regarding the influence of the shaking rate and temperature on surface roughness, it was found to increase with the shaking rate, but not with temperature. Regarding the oxidation of FeSO₄, it increased up to 30 °C, and thereafter decreased, with 150 rpm being the optimum shaking rate for ferrous iron oxidation. Jadhav and Hocheng (2014) also reported similar results on the biomachining of tin removal by *A. niger*.

As far as biomachining with glucose oxidase is concerned, the enzymatic production rate of hydrogen peroxide increased when improving mixing because oxygen was more easily available, and the number of ferric iron collisions increased (Eskandarian et al., 2013). Therefore, the MRR was also increased by a higher shaking rate. When the influence of temperature was studied, the MRR was found to increase until 45 °C, but the MRR then decreased due to enzyme inactivation.

2.6.3. pH and iron concentration evolution

The pH value is a crucial parameter for microorganism growth and survival. The bacterial tolerance to sharp changes in the pH is somewhat limited, as this may lead to activity inhibition and biomass death. As a decisive parameter in biomachining, the optimal pH range and its influence on other control parameters have been reported in the literature.

pH changes in the culture medium during biomachining obviously have an impact on the overall process and, consequently, acidity adjustment is essential. In order to maintain a suitable pH range to guarantee the success of the process, the most commonly used option is to increase the acidity of the medium by adding sulfuric acid (Zhang and Li, 1998; Yang et al., 2009; Chang et al., 2008; Istiyanto et al., 2011). In their study on the indirect biomachining of pure copper by *A. ferrooxidans*, Zhang et al. (1998) and Zhang and Li (1999) concluded that the rate of H⁺ generation due to the hydrolysis of ferric iron was lower than the rate of H⁺ consumption due to the oxidation

of ferrous iron. Therefore, pH was gradually increased during the process. They also stated that the pH should be adjusted to about 2, otherwise bacterial growth would be seriously compromised.

The effect of enzymatic machining performance under different pH values was analysed by Eskandarian et al. (2013). In this study, the experimental pH was within the 3.0-7.0 range, and the lower the pH value, the higher the MRR. As an example, the amount of mass removed from copper pieces after 3 hours of exposure was 0.02 mg at pH 7.0 and 0.04 mg at pH 4.0.

Biological activity for biomachining purposes requires acid pH values. Nevertheless, some studies have pointed out that biomachining at very low pH values poses obvious disadvantages, because a highly acidic environment may have a negative impact on process efficiency when corrosion or an acid attack caused by the low pH overwhelms microbial activity (Shikata et al., 2009; Eskandarian et al., 2013). Shikata et al. (2009) resolved this issue by using *Staphylococcus sp.* isolated from a corroded copper pipe. This is a facultative anaerobic bacterium with the ability to machine metal surfaces by using the ammonia produced as a result of protein conversion. As it can grow in a neutral pH environment, the problems derived from the acidic medium are consequently avoided. Kumada et al. (2001a) concluded that the best pH value should be established on a case by case basis.

Despite its relevance, the influence of the concentration of the ions involved in the oxidation has only been investigated in a few studies (Zhang and Li, 1998; Hocheng et al., 2012b). Hocheng et al. (2012b) monitored the evolution of ferric iron and ferrous iron during both the growth of *A. ferrooxidans* in the basal 510 medium and during the indirect biomachining of copper. The concentration of ferrous ion during the growth period obviously decreased as a consequence of its oxidation, while the concentration of ferric iron increased. Conversely, the ratio between ferric iron and ferrous iron concentrations was unbalanced during the indirect biomachining process because the rate of Reaction 2.3 ($r_{3\text{metal}}$) was obviously higher than the rate of Reaction 2.2 ($r_{2\text{bacteria}}$) (Table 2.2).

Table 2.2. Qualitative evolution of ferrous iron and ferric iron concentration according to the reaction rate for indirect biomachining.

Period	Reactions Involved	Reaction rate relationship	Evolution of concentration
Bacteria growth	Reaction 2 $2 \text{Fe}^{2+} + 1/2 \text{O}_2 + 2 \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}$	$r_{2\text{bacteria}}$ $r_{3\text{ metal}} = 0$	$[\text{Fe}^{2+}] \downarrow$ $[\text{Fe}^{3+}] \uparrow$
Indirect biomachining	Reaction 2 $2 \text{Fe}^{2+} + 1/2 \text{O}_2 + 2 \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}$ Reaction 3 $\text{Cu}^0 + 2 \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Cu}^{2+} + 2 \text{Fe}^{2+}$	$r_{2\text{ bacteria}} \ll r_{3\text{ metal}}$	$[\text{Fe}^{2+}] \uparrow$ $[\text{Fe}^{3+}] \downarrow$

The machining time is another parameter to be controlled, as the roughness, width and depth of the groove or etching depend on an appropriate machining time. The amount of metal removed (copper, nickel...) from any workpiece increases almost linearly with the machining time in many studies using *A. ferrooxidans* or *A. thiooxidans* (Ting et al., 2000; Miyano et al., 2003a; Chang et al., 2008). Nevertheless, the MRR value was found to remain fairly constant under enzymatic machining conditions, which is a clear advantage over bacterial machining processes (Eskandarian et al., 2013).

2.7. Biomachining a particular geometry

Biomachining enables metal dissolution according to any kind of geometry in pieces with a different complexity and functionality. One alternative for the selective dissolution of particular areas in a workpiece is to cover certain parts of the metal surface with a protective agent, avoiding the access of the oxidizing agent/bacteria to that particular area, and thus ensuring material is removed only from the exposed areas. The chemical counterpart for selective machining is photolithography, which uses light to transfer a geometric pattern from a photomask to a surface that has been previously covered by a light-sensitive chemical photoresistant resin.

The biomachining masking process starts with the drawing of the desired geometry with Auto-CAD software (Figure 2.3). The graphic data are then loaded into a laser plate-making device to make the photomask. After pasting a photoresist film onto the workpiece, the photomask is placed on the piece and then ultraviolet light is irradiated. The radiation only attacks certain parts of the film, according to the photomask. The next step involves immersing the workpiece in a liquid substance (a developer) to dissolve the parts of the film exposed to the light, rendering the metal surface bare at those parts. After covering the other parts of the workpieces that are not to be treated, the metal is immersed into the bacterial culture for biomachining (Zhang and Li, 1998; Chang et al., 2008; Istiyanto et al, 2011; Hocheng et al., 2012a; Istiyanto et al., 2012).

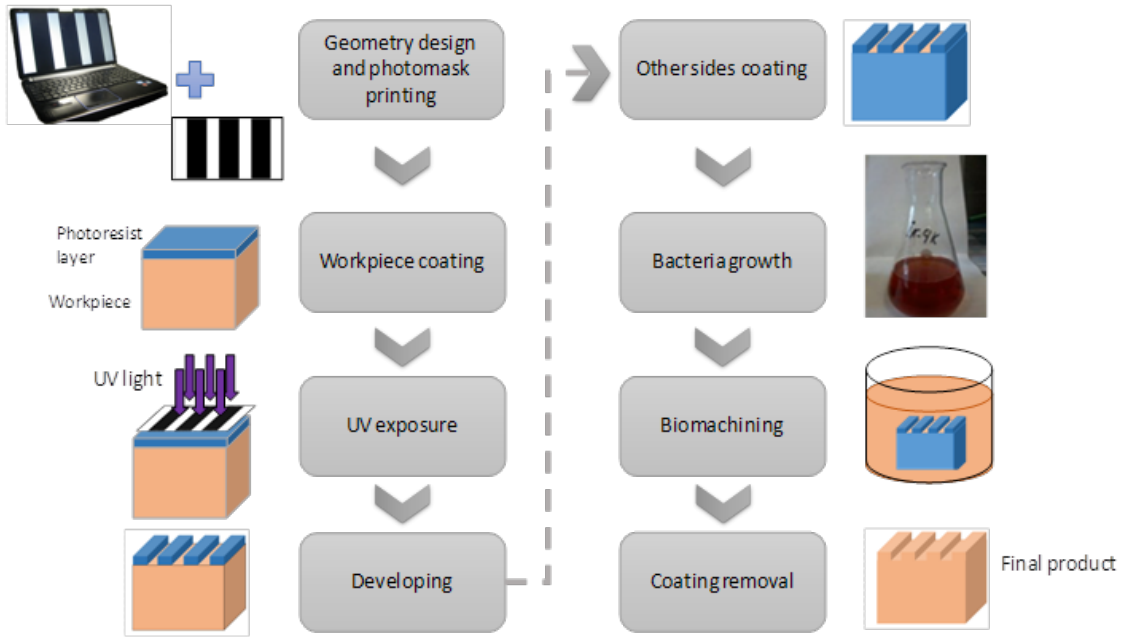


Figure 2.3. Schematic diagram of the biomachining process of coated workpieces (adapted from Istiyanto et al. (2012)).

Lines are some of the most easily printed geometries on biomachined workpieces (Chang et al., 2008; Uno et al., 1996a; Ting et al., 2000; Istiyanto et al., 2011). In addition to lines, simple patterns of linear structures, squares and circles are very common in industrial micro-devices. Thus, Hocheng et al. (2012a) and Hocheng et al. (2012b) machined a series of linear, circular and square micropatterns on different metal surfaces by using *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans*, respectively.

The aspect ratio, defined as the ratio between the machined depth and width, was studied and compared for each geometry and metal. Among the micropatterns obtained by *A. ferrooxidans*, circles and squares have a lower aspect ratio than linear structures. This can be attributed to the narrower space of circular and square patterns that allows ferric iron to work into the opening, while the linear structure has more open space. In contrast, in the study made by Hocheng et al. (2012b), circles and lines recorded a lower aspect ratio than square structures by using a culture supernatant of *A. thiooxidans* for copper biomachining. In comparison to Hocheng et al. (2012a), they found that the overall aspect ratios obtained by using an *A. thiooxidans* culture supernatant were lower than those obtained previously by using an *A. ferrooxidans* culture supernatant.

Complex geometries can also be processed by biomachining. Liu et al. (2009), Zhang et al. (1998) and Zhang and Li (1998) machined a micro-gear on copper workpieces, obtaining a clear profile of a gear, as well as its teeth, whereas Yang et al. (2009)

produced shims. Apart from typical patterns of lines, circles and rectangles, Istiyanto et al. (2012) produced multi-featured pieces, such as a circular-island feature and a gear-shaped feature. They also ascertained the minimum feature size that can be biomachined with the current process. They established a minimum machinable size of about 3 μm on single crystal copper. Finally, using an advanced photolithographic masking method, Saragih and Jo Ko (2013) showed that an array can also be obtained by biomachining.

The similarities and dissimilarities between the final machined profile and the pattern specified by the organic photo-resistive polymer coating are under discussion. Despite there being detractors such as Hocheng et al. (2012a), who stated that the masking method leads to the inaccuracy of the pattern prescribed by the mask, other authors such Ting et al. (2000), Istiyanto et al. (2012) and Zhang and Li (1998) found that the differences between the biomachined geometry and the pattern are negligible.

Uno and Okada (2012) used an agar culture medium to more efficiently control the machining shape. In this method, a cultured medium including bacteria is gelatinized by mixing agar. The hardness of the gelatine culture can be controlled by the amount of agar used, and the resulting mixture is very easy to manipulate and shape by knife cutting. The gelatinized and shaped culture is then placed on the workpiece surface. After a suitable contact time, the geometry of the gelatinized medium is then transferred onto the piece.

Suwandi et al. (2014) combined a modified conventional photolithography method and biomachining. These authors proposed the application of a maskless photolithography, where the profiles were created by computers, and then directly transmitted to the material that had previously been coated with a photoresistant resin through a Digital-Light Processing projector. They combined maskless photolithography and biomachining to create gears, letters and PCB tracks, and thus demonstrate the applications of this new method. This maskless method overcomes the cost and time-saving issues of the conventional method.

2.8. Biomachining versus chemical machining

The chemical methods for metal micromachining have been widely used in industry, although they could impair the metallurgical properties of the workpiece. Nowadays, environmental sustainability is one of the main goals throughout the manufacturing industry, and chemical machining does not comply with this green policy. The alternative of substituting chemical compounds by microorganisms lies at the heart of biological machining or biomachining.

An experimental comparison between biomachining and chemical machining was carried out by Zhang et al. (1998) and Zhang and Li (1999). They compared the biomachining of copper by *A. ferrooxidans* in the Leathen medium and the chemical machining of the same workpiece in a ferric iron solution. In both cases, the initial concentration of ferric ion was around 9.00 g/L, and the final results rendered a higher ferric iron consumption rate during chemical machining.

The comparative MRR achieved in biomachining by *A. ferrooxidans* and chemical machining was reported by Ting et al. (2000) and Istiyanto et al. (2011). They concluded that the MRR of the metal workpiece studied was significantly higher during chemical machining than during the biomachining process. In fact, the MRR for copper recorded a tenfold increase in chemical machining, and a fourfold increase for steel pieces (5). Istiyanto et al. (2011) proved that even though different MRR were recorded in each process, the copper profile obtained under biological reactions was similar to the one obtained by chemical machining where the medium was composed by 30% $FeCl_3$, 3% HCl and H_2O .

Regarding enzymatic biomachining, Eskandarian et al. (2013) found that chemical machining was again the process with the highest MRR, although they stated that the acid penetration on the workpiece surface was difficult to control. They also obtained data from a surface roughness analysis after 24 hours of exposure in chemical, biological, and enzymatic environments, including solutions of sulfuric acid, hydrochloric acid, *A. ferrooxidans* bacteria and enzymes. The pieces exposed to inorganic acidic environments presented a poor quality surface finish.

The lower MRR achieved in biological machining in comparison with chemical machining may be an advantage rather than a drawback. This particular feature makes biomachining an appropriate tool for precision and controlled micro-processing, although not all metals can be biomachined. Thus, Hocheng et al. (2012c) found that when an extracellular supernatant was used, the behaviour of aluminium in micromachining was unsatisfactory, unlike copper and nickel.

2.9. Solutions and advances

The optimal biomachining process should be fast enough to ensure a high production, a smooth, uniform surface finish and, in short, a high quality piece. If the process is fully understood and controlled, biological micro-processing will become a competitive alternative in the next future. Thus, research efforts are being conducted to overcome the technical drawbacks and develop this technology's Know-How.

Regarding the proper selection of the biomachining conditions, the process is highly dependent on the type of metal being removed, and so the operating parameters should be set on a case by case basis, as the MRR is dependent on the biomachined metal under the same experimental conditions (Chang et al., 2008; Yang et al., 2009; Hocheng et al., 2011; Hocheng et al., 2012a; Hocheng et al., 2012b; Jadhav and Hocheng, 2014). Kumada et al. (2001a) found that the biomachining rate under fixed conditions was satisfactory for mild steel but very slow for copper, whereas the surface finish was coarse for a steel piece but smooth for a copper one. These results show that each metal has specific biomachining conditions that have to be established beforehand. Nevertheless, certain metals have a negligible potential for biomachining (Uno et al., 1993; Chang et al., 2008; Hocheng et al., 2012a; Hocheng et al., 2012c).

The presence of metals such as divalent copper that are continuously being produced during the process has been reported to inhibit bacterial metabolism (Lilova et al., 2007). Although further research is required, several authors recommended removing this ion from the *A. ferrooxidans* culture medium to uphold performance (Zhang et al., 1998; Zhang and Li, 1999; Li et al., 2000). Whereas a concentration of about 10-50 ppm of divalent copper has a proven positive effect on the growth of *A. thiooxidans*, a concentration above 300 ppm has been shown to inhibit its growth (Chang et al., 2008).

The undesired adhesion of the bacteria onto the metal can be a serious problem during the biomachining process (Miyano et al., 2003b; Johnson et al., 2007). Kumada et al. (2001a) proposed the injection of an inhibitor, but it might reduce surface roughness.

When a metal workpiece is biomachined with a photoresistant coating in order to obtain a specific geometry, undercutting problems could appear. Undercutting refers to the undesired machining of metals in the region under the protective coating. Ting et al. (2000), Chang et al. (2008) and Istiyanto et al. (2011) encountered this problem; even though the amount of undercut is very small compared to chemically machined pieces, its extent increases with machining time, so it cannot be overlooked.

Uno et al. (1996a, 1996b) proposed the application of an electric field to accelerate the biomachining rate, although these authors stated that there is a need for further research to determine whether there is a maximum voltage of benefit to the process. Regarding copper and iron workpieces, the relationship between the groove depth and different parameters (machining time, applied voltage, and gap distance) was studied in both a sterilized 9K medium and a 9K medium with bacteria. The groove depth in the copper workpiece was about twofold higher than that generated in conventional biomachining. Thus, this process is referred to as “electric-field-assisted biomachining”.

Uno and Okada (2012) proposed a new “jet biomachining” alternative, where a cultured fluid is sprayed from a nozzle onto the workpiece. This enabled increasing the MRR along with an increase in the flow rate.

2.10. Conclusions

Biomachining is a controlled microbiological process for selectively forming microstructures on a workpiece by metal etching or dissolution. It is characterized by machining micro-components with minimum stress and without exerting any cutting force during the process. In contrast to well-established chemical and mechanical processes, microbial activity produces little heat, and material removal is performed slowly and uniformly. Simple and complex geometries can be machined and, additionally, it consumes little energy and raw material. Nevertheless, biomachining conditions have to be controlled for successful results (temperature, shaking rate, pH...), and process performance is highly dependent on the type of metal.

This new biomicromanufacturing method is an appropriate candidate to replace conventional chemical and physical methods. Although it undoubtedly has an

enormous potential, future research is necessary to definitively promote its industrial implementation.

2.11. References

- Ballerini, M., Milani, M., Costato, M., Turcu, I.C.E., Squadrini, F., 1998. Focused Ion Beams and life science applications: cell tomography and biomachining at ultrahigh resolution. Proceedings-Spie The International Society for Optical Engineering 3260, 221-230.
- Chang, J.H., Hocheng, H., Chang, H.Y., Shih, A., 2008. Metal removal rate of *Thiobacillus thiooxidans* without pre-secreted metabolite. Journal of Materials Processing Technology 201, 560-564.
- Chavoshi, S.Z., Luo, X., 2015. Hybrid micro-machining process: A review. Precision Engineering 41, 1-23.
- Eskandarian, M., Karimi, A., Shabgard, M., 2013. Studies on enzymatic biomachining of copper by glucose oxidase. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers 44, 331-335.
- Hocheng, H., Jadhav, U.U., 2011. Novel sustainable metal removal by biologically produced ferric sulphate. Second International Conference on Digital Manufacturing and Automation, 784-787.
- Hocheng, H., Chang, J.H., Jadhav, U.U., 2012a. Micromachining of various metals by using *Acidithiobacillus ferrooxidans* 13820 culture supernatant experiments. Journal of Cleaner Production 20, 180-185.
- Hocheng, H., [et al.] 2012b. Metal removal by *Acidithiobacillus ferrooxidans* though cells and extra-cellular culture supernatant in biomachining. CIRP Journal of Manufacturing Science and Technology 5, 137-141.
- Hocheng, H., Jadhav, U.U., Chang, J.H., 2012c. Biomachining rates of various metals by *Acidithiobacillus thiooxidans*. International Journal Surface Science and Engineering 6, 2012.
- Hocheng, H., Jadhav, U., 2015. Process of biological machining. Handbook of Manufacturing Engineering and Technology. London: Springer-Verlag.

- Istiyanto, J., Jo Ko, T., Yoon, H.-C., 2010. A study on copper micromachining using microorganisms. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing* 11 (5), 659-664.
- Istiyanto, J., Yeop Kim, M., Jo Ko, T., 2011. Profile characteristics of biomachined copper. *Microelectronic Engineering* 88, 2614-2617.
- Istiyanto, J., Saragih, A.S., Jo Ko, T., 2012. Metal based micro-feature fabrication using microorganisms process. *Microelectronic Engineering* 98, 561-565.
- Jadhav, U.U., Hocheng, H., Weng, W.H., 2013. Innovative use of biologically produced ferric sulphate for machining of copper metal and study of specific metal removal rate and roughness during the process. *Journal of Materials Processing Technology* 213, 1509-1515.
- Jadhav, U., Hocheng, H., 2014. Use of *Aspergillus niger* 34770 culture supernatant for tin metal removal. *Corrosion Science* 82, 248-254.
- Johnson, D., Warner, R., Shih, A.J., 2007. Surface roughness and material removal rate in machining using microorganisms. *Journal of Manufacturing Science and Engineering* 123, 223-227.
- Johnson, D.B., Du Plessis, C.A., 2015. Biomining in reverse gear: using bacteria to extract metals from oxidised ores. *Minerals Engineering* 75, 2-5.
- Kumada, M., [et al.] 2001a. Investigation of fine biomachining of metals by means of microbially influenced corrosion: differences between steel and copper in metal biomachining using *Thiobacillus ferrooxidans*. *Corrosion Engineering* 50 (9) 585-596.
- Kumada, M., [et al.] 2011b. Investigation of fine biomachining of metals by means of microbially induced corrosion: electrochemical measurements of mild Steel and copper in 9K medium and cultured *Thiobacillus ferrooxidans* solution, and observation of surface films. *Corrosion Engineering* 50 (9), 597-606.
- Kurosaki, Y., Matsui, M., Nakamura, Y., Murai, K., Kimura, T., 2003. Material processing using microorganisms (an investigation of microbial action on metals). *Corrosion Engineering* 46 (1), 322-330.
- Lambert, F., [et al.] 2015. Copper leaching from waste electric cables by biohydrometallurgy. *Minerals Engineering* 76, 38-46.

- Li, Y., Zhang, D., Wu, Y., 2000. Biomachining of metal copper by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 40 (3), 327-330.
- Lilova, K., Karamanev, D., Flemming, R.L., Karamaneva, T., 2007. Biological oxidation of metallic copper by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnology and Bioengineering* 97 (2), 308-316.
- Liu, Y., Wang, X., Yang, Y., Shi, W., 2009. Processing micro-gear based on bio-etching method. *Applied Mechanics and Materials* 16 (19), 120-123.
- Masoumik, S.M., Abdul-Rashid, S.H., Olugu, E.U., 2015. Importance-performance analysis of green strategy adoption within the malaysian manufacturing industry. *Procedia CIRP* 26, 646-652.
- Mital, V.K., Sangwan, K.S., 2014. Prioritizing barriers to green manufacturing: environmental, social and economic perspectives. *Procedia CIRP* 17, 559-564.
- Miyano, Y., Kamiya, O., Chouanine, L., Kikuchi, Y., 2003a. Fundamental studies on biomachining of carbon steel by iron oxidizing bacteria. *Transactions of JWRI* 32 (1), 239-242.
- Miyano, Y., Tsubonuma, T., Sreekumari, K.R., Omori, A., Kikuchi, Y., 2003b. Biomachining of stainless steel using bacteria. *Transactions of JWRI* 32 (1), 183-187.
- Paul, I.D., Bhole, G.P., Chaudhari, J.R., 2014. A review on green manufacturing: It's important, methodology and its application. *Procedia Materials Science* 6, 1644-1649.
- Saragih, A.S., Jo Ko, T., 2013. Development of digital lithography masking method with focusing mechanism for fabrication of micro-feature on biomachining process. *Journal of Mechanical Science and Technology* 27 (10), 3017-3022.
- Shikata, S., Sreekumari, K.R., Nandakumar, K., Ozawa, M., Kikuchi, Y., 2009. Laboratory studies on biomachining of copper using *Staphylococcus sp.* *Biofouling* 25 (6), 557-562.
- Suwandi, D., Whulanza, Y., Istiyanto, J., 2014. Visible light maskless photolithography for biomachining application. *Applied Mechanics and Materials* 493, 552-557.
- Ting, Y.P., Senthil Kumar, A., Rahman, M., Chia, B.K., 2000. Innovative use of *Thiobacillus ferrooxidans* for the biological machining of metals. *Acta Biotechnology* 20 (2), 87-96.

- Uno, Y., Kaneeda, T., Yokomizo, S., 1993. Bio-machining of metals by bacteria *Thiobacillus ferrooxidans*. International Progress in Precision Engineering, 290-301.
- Uno, Y., Kaneeda, T., Yokomizo, S., 1996a. Fundamental study on biomachining (machining of metals by *Thiobacillus ferrooxidans*). International Journal of the Japan Society of Mechanical Engineers, Series C 39 (4), 837-842.
- Uno, Y., Kaneeda, T., Yokomizo, S., 1996b. Fundamental study on electric field assisted biomachining. Journal of the Japan Society for Precision Engineering 62 (4), 540-543.
- Uno, Y., Okada, A., 2012. Biomachining-Micromachining of metals by bacteria. Hand Met Biotechol: Applications for environmental conservation and sustainability. Hannover: Pan Stanford.
- Valdés, J., [et al.] 2008. *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. BMC Genomics 9, 1-24.
- Xenofontos, E., Feidiou, A., Constantinou, M., Costantinides, G., Vyrides, I., 2015. Copper biomachining mechanisms using the newly isolated *Acidithiobacillus ferrooxidans* B1. Corrosion Science 100, 642-650.
- Yang, Y., Wang, X., Liu, Y., Wang, S., Wen, W., 2009. Techniques for micromachining using *Thiobacillus ferrooxidans* based on different culture medium. Applied Mechanics and Materials 16-19, 153-1057.
- Zhang, D., Li, Y., Chunsheng, W., 1998. Fundamental study on biomachining. Progress on Cutting and Grinding, 303-307.
- Zhang, D., Li, Y., 1998. Possibility of biological micromachining used for metal removal. Science in China, Series C 41 (2), 151-156.
- Zhang, D., Li, Y., 1999. Studies on kinetics and thermodynamics of biomachining pure copper. Science in China, Series C 42 (1), 57-62.
- Zhang, Y., Yang, Y., Liu, J., Qiu, G., 2013. Isolation and characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain QXS-1 capable of unusual ferrous iron and sulfur utilization. Hydrometallurgy 136, 51-57.



CAPITULO 3



MATERIALES Y METODOS

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Probetas de OFE

De entre las aleaciones de cobre que componen el OFC, en este estudio se empleó el OFE, suministrado por la empresa *Gindre Torns S.L.* La composición química, según el fabricante, es la que se indica en la Tabla 3.1, con un porcentaje mínimo de cobre del 99.99% y con un porcentaje máximo de oxígeno del $5.0 \cdot 10^{-4}\%$. En la misma tabla se indican algunas de las impurezas que este material puede contener.

El OFE se especifica típicamente según la base de datos conjunta de *American Society for Testing and Materials-ASTM* y *Unified Numbering Systems-UNS* como C10100 o C10200, presentando un grado mínimo de conductividad del 101% *International Annealed Copper Standard-IACS* (siendo el 100% IACS la conductividad correspondiente al cobre). La especificación de las barras recibidas era ASTM B152-*Standard Specification for Copper Sheet, Strip, Plate, and Rolled Bar* (www.astm.org).

Tabla 3.1. Composición del OFE empleado en este estudio según la empresa Gindre Torns S.L.

Elemento	Porcentaje en peso (%)
Cobre	99.99 (mínimo)
Oxígeno	$5.0 \cdot 10^{-4}$ (máximo)
Fósforo	$3.0 \cdot 10^{-4}$ (máximo)
Plata	$2.5 \cdot 10^{-3}$ (máximo)
Bismuto	$2.0 \cdot 10^{-4}$ (máximo)
Plomo	$5.0 \cdot 10^{-4}$ (máximo)

El primer paso antes de dar comienzo a los ensayos fue determinar las características de las probetas que se iban a utilizar. Mediante la revisión de varios trabajos de biomecanizado, se concluyó que en la mayoría las probetas empleadas para los ensayos eran cuadradas y de pequeño espesor (Johnson et al., 2007; Chang et al., 2008; Istiyanto et al., 2010). Por ello, se decidió diseñar probetas de OFE de 15 mm de longitud, 10 mm de ancho y 2 mm de espesor (Figura 3.1).

Las probetas fueron procesadas en el Departamento de Ingeniería Mecánica de la UPV/EHU, partiendo de bloques de OFE y cortando a las dimensiones deseadas mediante cortadora metalográfica de la marca Remet con discos de corte tipo K (para materiales no féreos). Para algunos ensayos las superficies de las probetas se pulieron en pulidora metalográfica Remet LS1 con el objeto de poder observar el cambio de la calidad superficial.

Para poder suspender las probetas en las disoluciones en cada ensayo, se realizó un orificio en la parte superior mediante taladradora de mano.

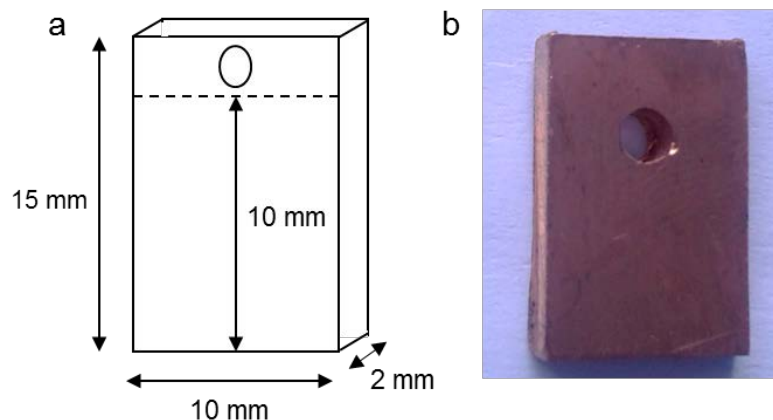


Figura 3.1. a) Diseño de las probetas de OFE, b) Probeta de OFE preparada en el Departamento de Ingeniería Mecánica de la UPV/EHU.

3.1.2. Ceba de *A. ferrooxidans*

La cepa *A. ferrooxidans* ATCC 23270, fue suministrada por el grupo de investigación liderado por el Dr. José Manuel Gómez Montes de Oca del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología de Alimentos en la UCA. Este grupo trabaja en el campo de la biotecnología y está altamente especializado en el empleo de esta bacteria. La cepa provino del *American Type Culture Collection* (ATCC).

Recibida la cepa, se realizó una caracterización molecular de la comunidad microbiana por la técnica de *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE) en las dependencias del *Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries*. De esta manera, se pudo asegurar que el cultivo correspondía a un cultivo puro de *A. ferrooxidans*.

En la Figura 3.2 se puede observar el perfil DGGE de la población microbiana obtenido en el estudio de la caracterización (Figura 3.2a), así como una imagen SEM de la bacteria obtenida microscopía electrónica de barrido Hitachi S4800 de los Servicios Generales de Investigación de la UPV/EHU (SGIker) (Figura 3.2b).

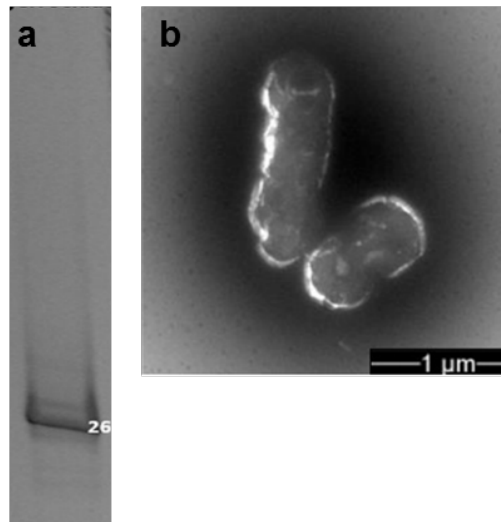


Figura 3.2. a) Perfil DGGE de la población microbiana estudiada, b) SEM de la bacteria *A. ferrooxidans* suministrada por la UCA (foto cedida por SGIker).

3.1.3. Cepa de *S. thermosulfidooxidans*

La bacteria *S. thermosulfidooxidans* (ST-B9) empleada en este estudio provenía del Baño 9 de la región geotermal de Caviahue-Copahue, localizada al noroeste de la provincia de Neuquén (Argentina).

El Baño 9 se encuentra situado en el sector de baños termales de la mayor manifestación termal del campo geotérmico de Copahue, denominada Termas de Copahue. Este espacio es particularmente interesante debido a las particulares características fisicoquímicas que presenta, pudiendo tener un pH de entre 2.0 y 7.0, y una temperatura que puede llegar a alcanzar los 90 °C (Giaveno, 2010).

3.1.4. Cepa de *L. ferrooxidans*

La cepa específica *L. ferrooxidans* ATCC 29047 empleada en algunos ensayos de la tesis, forma parte del cepario de colección del laboratorio de Bioremediación y Biolixiviación del Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI) perteneciente al CONICET-CCT de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata (Argentina). La cepa provino del *American Type Culture Collection* (ATCC).

3.2. Métodos

3.2.1. Crecimiento de bacterias

3.2.1.1. Crecimiento de *A. ferrooxidans* en medio 9K

Para que el biomecanizado sea posible, es necesario un medio líquido adecuado en el que las bacterias puedan habitar y desarrollar su ciclo vital.

En esta tesis, el medio de cultivo principal empleado fue el medio 9K (Silverman and Lundgren, 1959), puesto que dicho medio ha sido el medio de cultivo estándar en las referencias del ámbito del biomecanizado (Istiyanto et al., 2012; Jadhav et al., 2013; Suwandi et al., 2014). Se trata de una disolución acuosa de varias sales inorgánicas que incluyen al sulfato ferroso como fuente de hierro ferroso. Su nombre hace referencia a la concentración final de hierro ferroso en el medio, concretamente 9 gFe²⁺/L.

El medio 9K se empleó como medio de cultivo de las bacterias *A. ferrooxidans*, con la composición que se indica en la Tabla 3.2 según la concentración final de hierro ferroso con la que se quiera trabajar. Los valores se han determinado para un volumen final de 150 mL, debido a que este fue el volumen más comúnmente empleado durante los ensayos.

El medio consiste en dos componentes mayoritarios, las sales basales (referenciada en la Tabla 3.2 como S-1) que ejercen de fuente de nutrientes, y la solución de hierro ferroso (referenciada en la misma tabla como S-2), siendo esta última la fuente de energía.

Las disoluciones S-1 y S-2 se prepararon por separado en vasos de precipitado de 1 L, ajustando su pH con ácido sulfúrico en torno a 1.8. Tras el ajuste, ambas soluciones se mezclaron, volviéndose a ajustar el pH en caso de ser necesario.

El medio de cultivo se preparó según iba a ser empleado, si bien las disoluciones podrían haberse almacenado en nevera en caso de no ser empleadas al instante. Sin embargo, se desaconseja hacerlo, ya que al almacenarse en nevera el hierro ferroso de la solución S-2 podría oxidarse abióticamente a hierro férrico perdiendo así la fuente de energía necesaria para el crecimiento de las bacterias.

Todo el material empleado se esterilizó previo a su uso a 120 °C durante aproximadamente 20 minutos (Orto Alresa Ecoclave).

Tabla 3.2. Composición del medio de cultivo 9K según concentración final de hierro para 150 mL de disolución.

	Reactivos	Concentración final 3 gFe ²⁺ /L	Concentración final 6 gFe ²⁺ /L	Concentración final 9 gFe ²⁺ /L
S-1 Solución basal	(NH ₄) ₂ SO ₄ (mg)	450	450	450
	MgSO ₄ ·7H ₂ O (mg)	75	75	75
	K ₂ HPO ₄ (mg)	75	75	75
	KCl (mg)	15	15	15
	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O (mg)	1.5	1.5	1.5
	Agua desionizada (mL)	105	105	105
S-2 Fuente de Fe ²⁺	FeSO ₄ ·7H ₂ O (g)	2.25	4.50	6.75
	Agua desionizada (mL)	45	45	45

Tras la preparación del medio, se dio paso al periodo de crecimiento de la bacteria *A. ferrooxidans*. Para la obtención del medio biológico utilizado en el biomecanizado, este medio de cultivo se mezcló con un volumen de inóculo de entre el 2% (v/v) y 3% (v/v) del volumen final de la disolución necesaria, basándose en los estudios de Uno et al. (1996), Ting et al. (2000), Kumada et al. (2001) y Yang et al. (2009).

El crecimiento se realizó en condiciones de 150 rpm de agitación y 30 °C de temperatura (Chang et al., 2008; Jadhav et al., 2013) en incubadora Nüve ST30.

La incubación se dio por finalizada cuando el Potencial Redox superó los 600.0 mV, señal de que todo el hierro ferroso había sido oxidado a hierro férrico. Tras el periodo de crecimiento, el pH se ajustó en torno a 1.7-1.8.

El color de la disolución antes y después de la incubación viene ilustrado en la Figura 3.3, junto con una imagen SEM de la concentración final de bacterias obtenida en un microscopio electrónico de barrido Hitachi S4800 de SGIker.

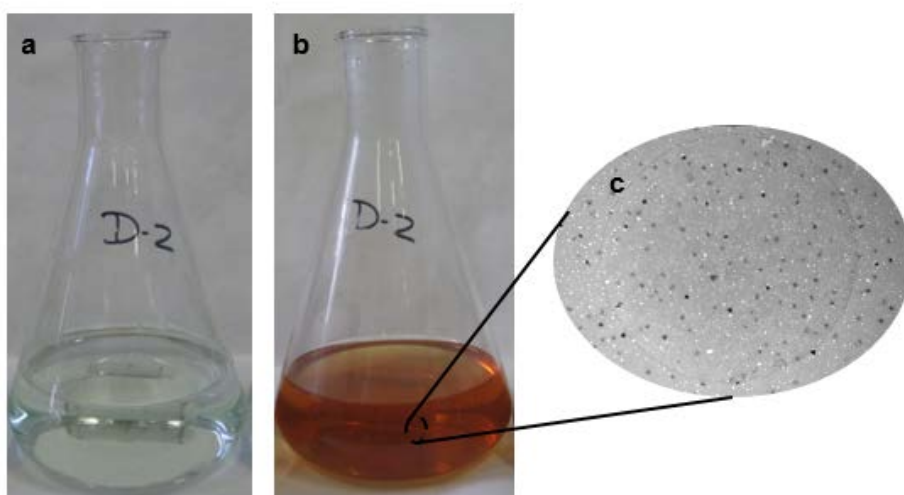


Figura 3.3. a) Medio de cultivo inicial, b) Disolución tras el periodo de crecimiento, c) Imagen SEM de la bacteria *A. ferrooxidans* tras el crecimiento.

3.2.1.2. Crecimiento de *A. ferrooxidans* y *S. thermosulfidooxidans* en medio Mackintosh

El medio Mackintosh (MAC) (Mackintosh, 1978) es un medio compuesto a base de sales inorgánicas entre las que se encuentra el sulfato ferroso, fuente de hierro ferroso requerido por las bacterias para su crecimiento.

La preparación del medio comenzó con la preparación por separado de la solución basal (S-1), la solución que llevaría los elementos traza (S-2) y la fuente de hierro ferroso (S-3). En la Tabla 3.3 vienen determinadas las composiciones de cada solución dependiendo de la concentración final de hierro ferroso que se quiera tener para un volumen final de 150 mL.

Preparadas las disoluciones, el pH de S-1 y S-2 se ajustó a 2 con ácido sulfúrico y ácido clorhídrico respectivamente, sometiendo ambas disoluciones a esterilización, la primera mediante autoclave (Chamberland®) y la segunda por filtración de filtro de membrana de 0.22 μm (Isopore™ GTTP), ya que entre los elementos traza se encontraban compuestos fácilmente oxidables y precipitables en el proceso de esterilización por autoclave.

En cuanto a S-3, su pH se ajustó con ácido sulfúrico a 1.3 y se filtró por filtro de membrana de 0.22 μm (Isopore™ GTTP).

Tabla 3.3. Composición del medio de cultivo MAC según concentración final de hierro para 150 mL de disolución.

		Concentración final 3 gFe ²⁺ /L	Concentración final 6 gFe ²⁺ /L	Concentración final 9 gFe ²⁺ /L
S-1 Solución basal	(NH ₄) ₂ SO ₄ (mg)	19.8	19.8	19.8
	MgSO ₄ ·7H ₂ O (mg)	4.6	4.6	4.6
	CaCl ₂ ·2H ₂ O (mg)	22.1	22.1	22.1
	K ₂ HPO ₄ (mg)	3.3	3.3	3.3
	Agua destilada (mL)	142.0	134.0	125.8
S-2 Elementos traza	MgCl ₂ ·4H ₂ O (mg)	14.9	14.9	14.9
	ZnCl ₂ (mg)	10.2	10.2	10.2
	CoCl ₂ ·6H ₂ O (mg)	15.2	15.2	15.2
	H ₃ BO ₃ (mg)	4.7	4.7	4.7
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O (mg)	1.8	1.8	1.8
	CuCl ₂ ·2H ₂ O (mg)	12.8	12.8	12.8
	Agua destilada (mL)	0.15	0.15	0.15
S-3 Fuente de Fe²⁺	FeSO ₄ (mL)	8.0	16.0	24.2

Finalizada la elaboración del medio, se añadió la cantidad de inóculo correspondiente. El volumen de inóculo añadido era del 10% (v/v) del volumen final de la disolución para el caso de *S. thermosulfidooxidans*, en base a los trabajos de Hocheng et al. (2011) y Hocheng et al. (2012). Sin embargo, para *A. ferrooxidans*, el volumen añadido fue del 7% (v/v). La razón de emplear una cantidad diferente de inóculo para el caso de *A. ferrooxidans* era doble. Por un lado, se partió siempre de un inóculo más concentrado, y por otro lado, se previó que el crecimiento de *A. ferrooxidans* sería más rápido y por tanto si se inoculaba al 10% (v/v) no daría tiempo a tomar las muestras deseadas.

Las condiciones de incubación fueron a 180 rpm de agitación y 30 °C de temperatura en el caso de *A. ferrooxidans* (Vicking ShakerPro 6004) e igual agitación pero a temperatura de 45 °C para *S. thermosulfidooxidans* (Labtech LSI-3016RH). Mencionar que para este último caso, se emplearon Erlenmeyer de cuello fino para poder disminuir la evaporación que pudiera darse en las disoluciones durante el periodo de crecimiento debido a la alta temperatura de trabajo.

Todo el material empleado se esterilizó previo a su uso en cámara de la marca Chamberland® a 120 °C durante aproximadamente 20 minutos.

Al igual que para el caso de crecimiento de *A. ferrooxidans* en medio 9K, la incubación se dio por finalizada cuando el Potencial Redox superó los 600.0 mV, señal de que todo el hierro ferroso había sido oxidado a hierro férrico. Tras el periodo de crecimiento, el pH se ajustó en torno a 1.7-1.8. El color de la disolución antes y después de la incubación fue semejante al ilustrado en la Figura 3.3.

3.2.2. Caracterización de la comunidad microbiana mediante hibridación fluorescente in situ

La técnica de hibridación fluorescente in situ (*Fluorescence In Situ Hybridisation*, FISH), permite identificar, localizar o incluso cuantificar microorganismos por medio de una hibridación específica de una molécula de rRNA marcada con un fluoróforo.

El protocolo de FISH típico incluye cuatro fases (Amann et al., 2001; Zwirgmaier 2015): la fijación y la permeabilización de la muestra de manera que se facilite el acceso de la sonda al ribosoma, hibridación, lavado para eliminar la sonda sobrante y la detección de las células fijadas mediante microscopía. El proceso que a continuación se describe está adaptado del trabajo de Amann (1995).

Las muestras para FISH fueron fijadas en el momento de su recolección, asegurando así que las células conservarían su morfología y contenido ribosómico, evitando variaciones en las poblaciones microbianas. Tan pronto como se tomó la muestra de la disolución objeto de estudio, se observó al microscopio para poder así determinar el volumen con el que se iba a trabajar. En el caso de observarse una concentración de microorganismos baja, se tomaban 1000 µL, mientras que si la cantidad era abundante se trabajó con volúmenes de 500 µL y/o incluso 200 µL. De esta manera, se aseguró que el número de microorganismos era el adecuado, evitando tener muestras con pocas bacterias y que por tanto no hibridaran, o lo contrario, muestras

con una concentración elevada, que podría llegar a interferir en la observación al microscopio.

Colocado el volumen seleccionado en un Eppendorf de 1.5 mL, se añadió paraformaldehído para poder fijar las bacterias, asegurando que tanto su ADN como su RNA se mantendrían invariables durante el proceso. La relación fue de 1 μL de paraformaldehído por cada 10 μL de muestra. Es decir, se añadieron 100 μL , 50 μL o 20 μL de paraformaldehído a la muestra según si el volumen seleccionado fue de 1000 μL , 500 μL o 200 μL respectivamente.

Añadido el fijador, se agitó por inversión y se dejó en el frigorífico entre 2 horas y 16 horas, agitando por inversión cada cierto tiempo. Una vez pasado el tiempo de fijación, la muestra se transvasó a un tubo Falcon de 10 mL, al que se añadieron aproximadamente 10 mL de agua ácida estéril a pH 2.0 con el fin de diluir el paraformaldehído.

A continuación, se colocó un filtro de membrana de 0.22 μm (Isopore™ GTTP) por el lado brillante en un kitasato y mediante conexión a bomba de vacío se filtró todo el contenido del tubo Falcon.

Tras la filtración, las bacterias quedaron en la parte mate de la membrana, y se lavaron con 10 mL de buffer PBS para poder estabilizar el pH de la muestra. La composición del buffer PBS es la que se indica en la siguiente Tabla 3.4, necesitando ser autoclavado y filtrado por filtro de membrana de 0.22 μm (Isopore™ GTTP).

Finalmente, se dejó secar la membrana sobre papel de filtro Wattman. En caso de no poder perseguir con el proceso, la muestra se almacenada en congelador.

Tabla 3.4. Composición del buffer PBS para 1L de disolución.

Compuesto	Peso (g)	Concentración final (mM)
NaCl	7.60	130
KH ₂ PO ₄	0.47	3
K ₂ HPO ₄	3.58	10

Después de la fijación, se comenzó con la etapa de hibridación. Para ello, se prepararon 2 mL del buffer de hibridación según el porcentaje de formamida que requería la sonda, en función de la especificidad de la misma. Para el caso de *A. ferrooxidans* la sonda requirió un 20% de formamida y para *S. thermosulfidooxidans* un 30%, siendo la composición final del buffer de hibridación la indicada en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Composición del buffer de hibridación según el porcentaje de formamida.

Formamida (%)	20	30
NaCl (5M) (μL)	360	360
Tris HCl (1M, pH 8.0) (μL)	40	40
Formamida (μL)	400	600
Agua destilada estéril (μL)	1200	1000
SDS 5% (μL)	4	4

Utilizando pinzas y tijeras de punta muy fina, se cortó un pedacito de la membrana donde se había fijado la muestra previamente, rotulando el lado mate de la membrana para poder distinguir el lado en el que están las muestras y a su vez poder distinguir entre diferentes muestras en caso de estar hibridando más de una a la vez. La manipulación de los pedazos de membrana se realizó sobre placa de Petri estéril.

Marcado y cortado, el pedazo de membrana se colocó sobre un portaobjetos limpio, al cual se le añadieron 8 μL de buffer de hibridación al lado, empapando por capilaridad todo el pedazo de membrana.

Sobre el buffer, se añadió 1 μL de sonda (información en Tabla 3.6), de nuevo asegurando que todo el pedazo quedaba embebido en él. En aquellos casos en los que se tenía que emplear una misma sonda para varias muestras, se preparó una mezcla del buffer de hibridación y de la sonda en un Eppendorf, manteniendo la proporción de 8 μL de buffer de hibridación y 1 μL de sonda por cada muestra. A partir de este punto, el proceso se hizo en oscuridad.

Tabla 3.6. Datos de las sondas empleadas.

Nombre	TF 539
[fluoróforo] secuencia	[Cy-3] 5' CAG ACC TAA CGT ACC GCC 3'
Target	A.ferrooxidans
Nombre	SUL 228
[fluoróforo] secuencia	[Cy-3]
Target	Sulfobacillus

Tras haber añadido el buffer de hibridación y la sonda a la muestra, el resto del buffer de hibridación se volcaba sobre el papel absorbente de la cámara húmeda, consistente en un tubo Falcon de 50 mL con papel absorbente que cubría el largo del tubo, asegurando que todo él quedaba empapado por el líquido.

Se introdujo entonces el portaobjetos que contenía el pedazo de membrana en la cámara húmeda, dejando hibridar en horno (UVP Laboratory Products HL-2000 Hybrilinker) a 46 °C entre 1.5 horas y 2 horas.

Tras el proceso de hibridación, se produjo el lavado para eliminar la sonda sobrante. Para ello, se prepararon 50 mL del buffer de lavado en un tubo Falcon, que al igual que con el buffer de hibridación, dependió del porcentaje de formamida que la sonda requería (Tabla 3.7).

Tabla 3.7. Composición del buffer de lavado según el porcentaje de formamida.

Formamida (%)	20	30
Tris HCl (1M, pH 8.0) (µL)	1000	1000
NaCl (5M) (µL)	2150	1020
EDTA (0.5M, pH 8.0) (µL)	500	500
Agua destilada esteril (mL)	50	47.38
SDS 5% (µL)	100	100

Se introdujo entonces el portaobjetos en el tubo Falcon que contenía el buffer de lavado, dejándolo incubar en horno durante 20 minutos a 48 °C. Transcurrido ese periodo de tiempo el buffer de lavado se volcó en un recipiente limpio para pescar el pedazo de membrana con sumo cuidado.

Tras enjuagar el pedazo en agua fría y secarlo en papel de filtro Wattman sobre placa de Petri, se colocó en un portaobjetos limpio, cubriéndolo con un cubreobjetos.

Finalmente, la muestra se analizó en microscopio de fluorescencia Leica 2500DM, pudiendo captar la imagen por una cámara analógica Leica DFC300FX y reproducida en un monitor mediante el programa Leica Application Suite.

Todo el material empleado se esterilizó previo a su uso en cámara de la marca Chamberland® a 120 °C durante aproximadamente 20 minutos

3.2.3. Determinación de la concentración de bacterias

3.2.3.1. Número más probable

Tratándose de un proceso biológico, el cuantificar la concentración de bacterias es un factor importante en el proceso de biomecanizado, puesto que permite controlar la calidad del proceso y el estado en el que se encuentran los microorganismos.

La técnica del Número Más Probable (NMP) se empleó como técnica de conteo de las bacterias *A. ferrooxidans* en medio 9K en determinados ensayos que más adelante se expondrán.

Tal y como se ha mencionado con anterioridad en el Capítulo 1, una de las características de la bacteria *A. ferrooxidans* es su reducido tamaño, alcanzando los 0.5 μm de ancho. Además, suelen estar agrupadas en binomios o trinomios. Estas dos cualidades, junto con la a veces reducida resolución de los microscopios ópticos a altas magnificaciones/aumentos, hacen que se complique su observación al microscopio. Eso hace que suela recurrirse a la técnica del NMP, tal y como se hizo en los trabajos de Johnson et al. (2007) e Istiyanto et al. (2010).

Bajo el principio de que una única célula viva puede desarrollarse en un medio de cultivo adecuado y que por tanto producirá un cultivo turbio, esta técnica obtiene datos cuantitativos en concentraciones de elementos discretos a partir de datos de incidencia positiva/negativa, o lo que es lo mismo, presencia o ausencia de microorganismos (Harris et al., 1998).

La técnica del NMP se reduce a dos pasos principales. El primero consiste en crear una serie de diluciones del medio de cultivo original ya inoculado. En la segunda etapa, se da paso a incubar cada una de las diluciones, observando el crecimiento que progresivamente se va dando en cada una de ellas. Tras un determinado periodo de tiempo, las diluciones que hayan recibido una o más células microbianas habrán experimentado crecimiento microbiológico, por lo que presentarán turbidez (Thaithongnum et al., 2006). Sin embargo, en aquellas diluciones en las que no haya ni una sola bacteria, el medio seguirá estando transparente. De esta manera, queda determinada la presencia o ausencia de bacterias en las diluciones y por tanto, su concentración en el cultivo original.

Si bien esta técnica no requiere de equipamiento complejo, una de sus desventajas es la intensiva labor que requiere y el alto tiempo que conlleva el llevarla a cabo (Chenu et al., 2013).

En este estudio, para la técnica del NMP se emplearon 11 tubos de vidrio roscados de 10 mL, previamente lavados con agua desionizada y etanol y esterilizados (Orto Alresa Ecoclave). Uno de los tubos se utilizó como control o blanco (B), el resto, fue enumerado de 1 a 10 según la dilución (T-1:T-10) (Tabla 3.8).

Previa preparación del medio 9K (según la metodología descrita en el apartado 3.2.1.1), se les añadió a cada tubo 4.5 mL del mismo, a excepción del blanco, en el que se añadieron 5 mL. A continuación, al T-1 se le adicionaron 0.5 mL del inóculo que contenía *A. ferrooxidans* y cuya concentración se requería conocer. Se mezcló mediante agitador magnético para asegurar la homogeneización de la disolución resultante, quedando 10 veces más diluido que el inóculo original de *A. ferrooxidans*.

Seguidamente, se trasvasaron 0.5 mL del T-1 al T-2, homogeneizándose de igual manera que el anterior y quedando 10 veces más diluida que el T-1, y por tanto, 100 veces más diluida que el inóculo original. Se procedió de la misma manera desde el tubo T-3 hasta el T-10. La composición de cada uno de los tubos viene especificada en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8. Composición de los tubos para el ensayo de NMP.

	Medio 9K (mL)	Inóculo original <i>A. ferrooxidans</i> (mL)	Volumen añadido del tubo anterior	Dilución respecto del tubo anterior	Dilución respecto del inóculo original
B	5	-	-	-	-
T-1	4.5	0.5	-	-	10 ⁻¹
T-2	4.5	-	0.5	10 ⁻¹	10 ⁻²
T-3	4.5	-	0.5	10 ⁻¹	10 ⁻³
T-4	4.5	-	0.5	10 ⁻¹	10 ⁻⁴
T-5	4.5	-	0.5	10 ⁻¹	10 ⁻⁵
T-6	4.5	-	0.5	10 ⁻¹	10 ⁻⁶
T-7	4.5	-	0.5	10 ⁻¹	10 ⁻⁷
T-8	4.5	-	0.5	10 ⁻¹	10 ⁻⁸
T-9	4.5	-	0.5	10 ⁻¹	10 ⁻⁹
T-10	4.5	-	0.5	10 ⁻¹	10 ⁻¹⁰

Una vez realizadas las diluciones, todos los tubos se sometieron al proceso habitual de incubación bajo las condiciones de 150 rpm de agitación y 30 °C de temperatura (Nüve ST30). Periódicamente se fue observando la evolución del aspecto (turbidez) de las diluciones, color que comenzó a aparecer primeramente en T-1, después den T-2 y así sucesivamente. El ensayo se dio por finalizado cuando tras dos días consecutivos el número de disoluciones que presentaban turbidez no varió.

La última dilución que presentó color fue la que indicó la concentración de bacterias. Es decir, si por ejemplo transcurrido el periodo de crecimiento la T-9 fue la última dilución que presentaba turbidez, la concentración de bacterias era del orden de 10^9 bacterias/mL.

3.2.3.2. Conteo en cámara de Neubauer

De entre los métodos de conteo de bacterias basados en la microscopía, el empleo del hemocitómetro es comúnmente conocido y utilizado, debido a su simplicidad.

El hemocitómetro se trata de una cámara de recuento que tiene dos zonas ligeramente deprimidas, en cuyos fondos viene marcada una retícula compuesta por diversos cuadrados de dimensiones diferentes pero conocidas. Su construcción permite conocer el volumen de cualquier líquido colocado sobre él y por debajo de su cubreobjetos.

En la Figura 3.4 se puede observar en detalle la zona o cuadrícula de recuento. La cuadrícula se encuentra compuesta por nueve cuadros de 1 mm^2 cada uno (en amarillo). Los cuatro cuadrados de 1 mm^2 localizados en cada esquina poseen a su vez 16 cuadrados de 0.0625 mm^2 (en verde). El cuadrado central (también de 1 mm^2) se encuentra compuesto por 25 cuadrados de 0.04 mm^2 (en azul). Estos cuadros a su vez se dividen en cuadrados menores de tan solo 0.0025 mm^2 (en rojo).

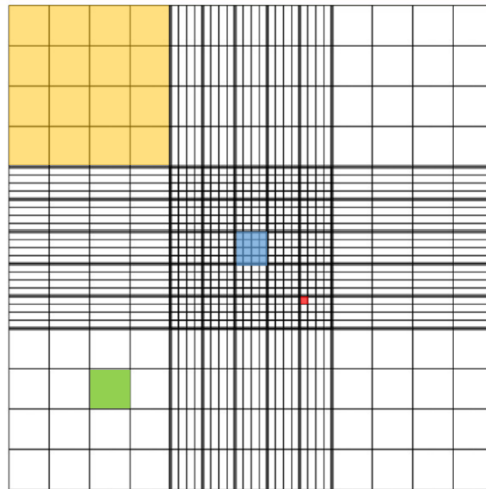


Figura 3.4. Dibujo de la cuadrícula de recuento y la composición de sus cuadrados.

En este estudio, para el recuento de las *A. ferrooxidans* se empleó una cámara de recuento Improved Neubauer® de 0.1 mm de profundidad.

El procedimiento de recuento comenzó con la limpieza de la cámara y el cubreobjetos, primero con agua destilada y posteriormente con etanol, secándose con papel de celulosa para evitar así dejar marcas en ambos elementos. Tras la limpieza, el cubreobjetos se colocó sobre la cámara y se introdujo la muestra a estudiar con una pipeta automática, asegurando una distribución completa y homogénea en las dos zonas deprimidas. El líquido se introdujo por simple capilaridad entre la cámara y el cubreobjetos, quedando este último adherido a la primera por simple tensión superficial. El poder rellenar las dos zonas comprimidas de la cámara a la vez, permitió poder hacer recuentos simultáneamente, mejorando la precisión de los resultados.

Tras la introducción de la muestra líquida, la cámara se observó en un microscopio óptico de contraste de fase de la marca Nikon Labophot con un aumento de x40.

La condición para que el recuento fuese significativo, era que en los cuadrados el número de células óptimo debía estar entre 5 y 12 y a su vez, que en el volumen ocupado por la cámara analógica debía haber al menos 600 bacterias (Ramirez, 2007; Almengló, 2014). En las ocasiones en las que alguna de las condiciones no se cumplía bien debido a que el número de células era reducido o bien a que el número era excesivo, era necesario concentrar la muestra o diluirla respectivamente tantas veces como fuera necesario hasta llegar a cumplir ambas condiciones.

Las estrategias de recuento en este tipo de cámaras son diversas. En este caso, el recuento se hizo siguiendo el procedimiento de Ramirez (2007), para lo que se escogieron 5 de los cuadrados de 0.04 mm² del cuadrado central y los 4 cuadrados de la diagonal de cada uno de ellos (de 0.0025mm²), resultando un total de 20 cuadrados (Figura 3.5). El cálculo de la concentración celular en millones de células por mililitro viene dado por la Ecuación 3.1.

$$\text{Células/mL} = \frac{n^{\circ} \text{ de bacterias contadas} \times \text{factor de dilución} \times 4 \cdot 10^6}{n^{\circ} \text{ de cuadrados contados}} \quad (\text{Ecuación 3.1})$$

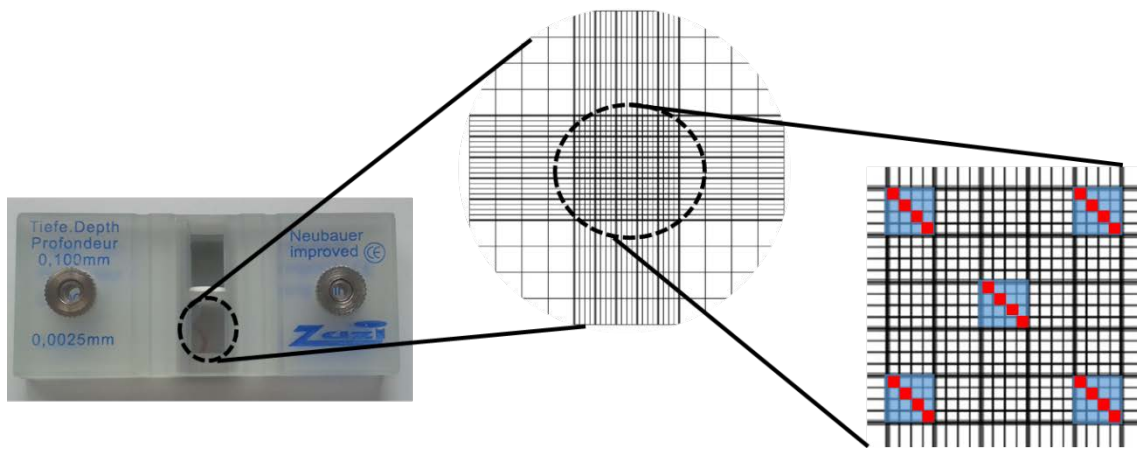


Figura 3.5. Procedimiento de medida en la cámara Improved Neubauer®.

3.2.3.3. Conteo en DAPI

Esta técnica de conteo se basa en emplear el marcador 4',6-diamino-2-fenilindol, comúnmente conocido como DAPI, para teñir células y poder observarlas al microscopio gracias al incremento de fluorescencia que provoca en el DNA de las mismas (Mazzini et al., 1997; Barcellona et al., 2001; Li et al., 2003; Jež et al., 2013).

En este caso, el proceso de tinción con DAPI se realizó seguido de la preparación de las muestras para FISH, realizando todo el proceso en oscuridad. Así pues, se diluyó 1 µg de DAPI en 1 mL de agua destilada estéril y se colocaron 3 µL de dicha dilución en una placa de Petri, colocando el pedazo de membrana previamente hibridado y lavado (apartado 3.2.2) con el lado mate sobre la gota. Se dejó actuar durante 5 minutos en oscuridad.

Tras el tiempo de tinción, se tomó el pedazo de membrana con una pinza y se enjuagó varias veces en etanol (80%, v/v) y en agua destilada, durante un tiempo entre 30 segundos y 2 minutos. Se dejó entonces secar en papel de filtro Wattman y una vez seco, se colocó sobre un portaobjetos limpio, en cuya base se había añadido una gota de *antifading* con el objetivo de hacer perdurar la fluorescencia de la muestra. Es aconsejable colocar la cantidad necesaria y no en exceso, puesto que el exceso puede llegar a interferir en la visualización al microscopio.

Finalmente, se colocó el cubreobjetos en el portaobjetos, secando el exceso del *antifading* y se analizó la muestra en microscopio Leica 2500DM, pudiendo almacenar la muestra en congelador a -20 °C si la observación al microscopio no iba a ser inmediata. La imagen del microscopio fue captada por una cámara analógica Leica DFC300FX y reproducida en un monitor mediante el programa Leica Application Suite.

3.2.4. Determinación de especies en disolución

3.2.4.1. Determinación del hierro ferroso y hierro total por reacción con dipiridilo y clorhidrato de hidroxilamida en espectrofotómetro de absorción

El método de medida espectrofotométrica aquí presentado se diseñó a partir del método 3500-FeB de Standard Methods Online-Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (www.standardmethods.org). Se trata de un método colorimétrico de determinación del hierro total disuelto en medios acuosos ácidos.

Como ya se ha mencionado en el Capítulo 2, durante el proceso de biomecanizado es importante poder determinar la concentración tanto de hierro férrico como ferroso durante el proceso, ya que son indicativos del estado en el que el mismo se encuentra. La posibilidad de poder reducir el hierro férrico a ferroso en un medio acuoso y de hacer reaccionar éste último con un reactivo de manera que se origine un complejo de color, permite poder determinar tanto el hierro total como el hierro ferroso que la disolución contiene. Este es el fundamento del método colorimétrico que a continuación se presenta.

El proceso comenzó con la obtención de la curva de calibración, para posteriormente poder determinar el hierro ferroso y el hierro total de las muestras objeto de estudio mediante el desarrollo de color de las mismas a causa de la reacción del hierro ferroso con el reactivo dipiridilo. Los reactivos empleados así como su función vienen definidos en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9. Reactivos empleados en la colorimetría.

Reactivo	Función	Método de preparación
Agua desionizada	Aforo	-
Tampón de acetato amónico/ácido acético	Mantener estable el pH en torno a 5.5	Disolver 280 g de acetato amónico en 1000 mL de agua desionizada. Utilizando un pH-metro calibrado y verificado, añadir ácido acético glacial poco a poco y con agitación, hasta alcanzar un pH de 5.5 (algo más de 100 ml)
Clorhidrato de hidroxilamina al 10% (p/v)	Reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+}	Disolver 5.0 g de la sal en 50 mL de agua desionizada
Solución 2.2 dipiridilo al 0.5% (p/v)	Reaccionar con el Fe^{2+} dando un complejo de color	Disolver 0.5 g de la sal en 100 mL de etanol al 96% (v/v)
Solución patrón de Fe^{3+} (0.05 g/L)	Obtener curva de calibración	Pipetear 25 mL de una solución patrón madre de 1 g Fe^{3+} /L (certificada) y aforar hasta 500 mL con agua desionizada

Para preparar los patrones de hierro total que darían lugar a la curva de calibrado, primeramente se preparó la disolución patrón de 0.05 g Fe^{3+} /L (Tabla 3.9), pipeteándose a continuación en matraces volumétricos de 50 mL 0, 2, 5 y 10 mL del mismo. De esta manera, se tenía disoluciones de concentraciones 0, 2, 5 y 10 mg Fe^{3+} /L respectivamente. Para asegurar la estabilidad del pH durante el proceso, a cada matraz se le añadió 5 mL de solución tampón.

A continuación, se procedió a realizar la reducción del hierro férrico a hierro ferroso mediante clorhidrato de hidroxilamina, para lo que fue necesario adicionar 2 mL de dicho reactivo a cada matraz, agitándolo simultáneamente. Se esperó un tiempo mínimo de 5 minutos antes de proseguir para asegurar una completa reducción del hierro férrico.

Una vez realizada la reducción, se añadieron 2 mL de la disolución de dipiridilo a cada matraz, desarrollándose inmediatamente color en todas las muestras, color que aumentaba de intensidad cuanto mayor era la concentración de hierro ferroso. Al igual que en el paso anterior, las disoluciones fueron agitadas y se esperó un tiempo de 5 minutos para asegurar una completa reacción.

El siguiente paso, consistió en aforar todos los matraces con agua desionizada hasta una altura de 50 mL, agitándolos vigorosamente para asegurar una concentración homogénea en todo el volumen.

Finalmente, se realizó la medida de la absorbancia mediante espectrofotómetro visible a 520 nm (ThermoScientific Helios Alpha) utilizando una cubeta de plástico de 1 cm de paso de luz.

Obtenidas las absorbancias de cada patrón, en una hoja de cálculo se elaboró una curva de calibrado, representando la absorbancia en el eje Y frente a la concentración de hierro en el eje X. Mediante ajuste por mínimos cuadrados, se obtuvo la curva de calibración del tipo $Y=a \cdot x+b$, que junto con el factor R^2 indicaba su grado de aproximación a una regresión lineal.

Para determinar la concentración de hierro ferroso y hierro férrico en la disolución objeto de estudio, primero fue necesario diluir, puesto que la curva de calibrado era del orden de mg/L y las concentraciones de hierro estaban en el orden de g/L. Así pues, primero, se realizó una dilución de 1:100, añadiendo 1 mL de la disolución objeto de estudio en un matraz volumétrico de 100 mL y aforando con agua desionizada.

Para la determinación del hierro total, se pipetearon 5 mL de la disolución en un matraz de 50 mL y se procedió como con la preparación de los patrones de calibración hasta la medida de la absorbancia.

Para la determinación del hierro ferroso, se pipetearon 5 mL de la disolución en un matraz de 50 mL y se procedió de igual manera a la preparación de los patrones de calibración, pero esta vez sin adicionar el reductor clorhidrato de hidroxilamina, de manera que el hierro férrico no era reducido a ferroso.

Una vez medidas las absorbancias en ambas muestras, mediante la curva de calibración obtenida se obtuvo el valor de la concentración de hierro total y hierro ferroso en cada caso. Teniendo en cuenta el factor de dilución, el valor del hierro total y hierro ferroso en la disolución original venía dado mediante la Ecuación 3.3, siendo Y el valor de la absorbancia, b el punto de corte entre la curva de calibración y el eje vertical y a la pendiente de curva de calibración.

$$\text{Fe}^{\text{total}} \text{ o } \text{Fe}^{2+} = \frac{Y-b}{a} \cdot \frac{50}{5} \cdot \frac{100}{1} \cdot \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \text{ (g/L)} \quad (\text{Ecuación 3.3})$$

El hierro férrico se obtuvo mediante la diferencia entre el hierro total y hierro ferroso.

Mencionar que si las muestras no eran analizadas al momento, éstas eran almacenadas en congelador para paralizar el metabolismo de las bacterias y evitar que la oxidación del hierro ferroso continuara.

3.2.4.2. Determinación del hierro ferroso por reacción con ortofenantrolina en espectrofotómetro de absorción

El método de medida espectrofotométrica aquí presentado se diseñó a partir del método *German standard methods for the examination of water, waste water and sludge* en base a la norma DIN 38406-1. Su principio de funcionamiento está basado en la misma idea que el método para la determinación de hierro ferroso expuesto en el apartado 3.2.4.1.

El procedimiento comenzó con la preparación de la mezcla de reacción para la cantidad de muestras deseadas. Para ello, se prepararon dos disoluciones por separado (S-1 y S-2) según la composición y la metodología de preparación que se indica en la Tabla 3.10.

Tabla 3.10. Composición de la mezcla de reacción por muestra.

Componentes	Función	Método de preparación
S-1: Solución de acetato de amonio	Mantener estable el pH	Pesar 400 g de acetato de amonio y 500 mL de ácido acético glacial y agregar agua destilada hasta completar el volumen de 1L y disolver en agitación calentando suavemente
S-2: Solución de o-fenantrolina	Reaccionar con el Fe ²⁺ dando un complejo de color	Pesar 5 g de 1.10-Cloruro monohidratado de fenantrolina y agregar agua destilada hasta completar el volumen de 1 L y disolver con calor y agitación

El volumen de mezcla de reacción que cada muestra llevaba era de 950 µL, estando compuesto por 40 µL de la S-1, 40 µL de la S-2 y 870 µL de agua destilada. La mezcla

de reacción era preparada al instante de ser utilizada, si bien en ocasiones se preparaba un día antes manteniéndola en nevera y en oscuridad.

En Eppendorfs de 1.5 mL se hicieron alícuotas con 950 μL de la mezcla de reacción y en oscuridad, se agregaron 50 μL de cada muestra, siendo agitadas de seguido e incubadas durante 15 minutos en oscuridad.

Para la obtención de la curva de calibrado, se partió de una solución standard de hierro de 0.8 gFe/L de concentración. Su preparación se basó en disolver 398 g de sulfato de hierro y 10 mL de ácido clorhídrico 1M en 100 mL de agua destilada, almacenándose a 4 $^{\circ}\text{C}$ hasta su uso para evitar la oxidación del hierro.

En total, la curva de calibrado se compuso de 7 puntos, abarcando concentraciones desde los 0.0 mgFe/L (blanco) hasta los 12.0 mgFe/L de hierro, siendo la composición de cada una de las concentraciones la que se indica en la Tabla 3.11.

Tabla 3.11. Preparación de las muestras para la curva de calibrado.

Concentración (mgFe/L)	Mezcla reacción (μL)	Solución Fe standard (μL)	Agua destilada (μL)
0.0	950	0	50
1.6	950	2	48
3.2	950	4	46
4.8	950	6	44
6.4	950	8	42
8.0	950	10	40
12.0	950	15	35

Una vez añadidos la mezcla reacción, la solución de hierro y el agua destilada en Eppendorfs de 1.5 mL para cada punto de calibración, se agitó al igual que se hizo con las muestras y se dejó actuar en oscuridad al menos 15 minutos. En el momento de añadir el patrón de hierro, se debía estar en condiciones de oscuridad.

Transcurrido ese tiempo, se hicieron alícuotas con 250 μL de cada muestra preparada, junto con las muestras de la curva de calibración, en una placa de Elisa, para ser analizadas en el lector de placas BIORAD Benchmark PlusTM. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 492 nm. Del valor de la absorbancia, se obtuvo el valor del hierro ferroso por una ecuación similar a la Ecuación 3.3.

Mencionar que si las muestras no eran analizadas al momento, éstas eran almacenadas en congelador para paralizar el metabolismo de las bacterias y evitar la continuación del proceso de oxidación del hierro ferroso.

3.2.4.3. Determinación de hierro total y cobre divalente por espectrofotómetro de absorción atómica

La determinación de hierro total y cobre divalente en disolución se hizo mediante absorción atómica en el equipo Atomic Absorption Spectrophotometer Shimadzu AA-6650.

Las muestras se filtraron por filtros de acetato de 0.45 μm (Isopore™ GTTP), previa dilución en ácido nítrico 0.14 N (dilución 500).

Para la curva de calibrado del metal correspondiente se empleó un patrón certificado (Tabla 3.12), estando en el rango de concentraciones entre 5 y 50 ppm.

Si bien la medida del hierro ferroso se realizó de manera rutinaria en todos los puntos de análisis determinados en cada ensayo, tanto de crecimiento como de biomecanizado y/o biomecanizado y regeneración; el análisis de hierro total sólo se realizó en determinados instantes, como verificación de la precipitación que pudiera estar ocurriendo en el medio. En cuanto al cobre, éste fue analizado únicamente en las muestras extraídas de las disoluciones en los ensayos de biomecanizado.

Tabla 3.12. Patrones de hierro y cobre certificados.

Patrón	Nombre	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
Patrón de Fe^{total}	Iron standard solution (Spectro ECON)	1000
Patrón de Cu^{2+}	Copper standard solution (Plasma HIQU)	1000

3.2.5. Etapa de biomecanizado

Para el biomecanizado se emplearon bacterias crecidas hasta su estado estacionario, en base a los estudios de Uno et al. (1996) y Yang et al. (2009), asegurando una concentración de bacterias alta y constante en el proceso, así como una oxidación completa del hierro ferroso.

Se realizaron ensayos de biomecanizado de probetas de OFE en medio 9K y medio MAC, siguiendo en ambos casos el mismo procedimiento.

El primer paso lo constituyó la selección de la probeta de OFE preparada según el apartado 3.1.1. Previo lavado, secado y pesaje de la misma, se introdujo en la disolución correspondiente suspendida de un hilo. En el caso de realizar más de un ensayo de biomecanizado simultáneamente, la selección de las probetas se realizó de la manera más exhaustiva posible, asegurando unas características de peso y superficie similares. De esta manera, los resultados serían comparables entre sí y evitando el efecto de la naturaleza superficial del proceso (efecto estudiado en el Capítulo 5).

El biomecanizado se realizó bajo condiciones de 150 rpm de agitación (Nüve ST30 en medio 9K y Vicking ShakerPro 6004 en medio MAC) y 30 °C de temperatura para las probetas introducidas en una disolución que contuviera *A. ferrooxidans* y 150 rpm de agitación (Labtech LSI-3016RH) y 45 °C de temperatura en el caso de que contuviera *S. thermosulfidooxidans*.

La duración total del ensayo fue de 3 horas, estableciéndose el tiempo de análisis en 1 hora (Hocheng et al., 2012; Eskandarian et al., 2013; Jadhav et al., 2013). En cada intervalo (incluido el tiempo inicial) la probeta se extrajo de la muestra y se lavó, secó y pesó (Sartorius Practum 124-1S) para determinar la pérdida de peso y la tasa de remoción según el apartado 3.2.6. Ocasionalmente, se analizó la superficie de la probeta según el apartado 3.2.7.

Adicionalmente, se tomó muestra para posterior análisis de hierro ferroso (según el método establecido en 3.2.4.1 para el caso de realizarse el proceso en medio 9K y según 3.2.4.2 para el caso de realizarse el proceso en medio MAC) y se midieron pH y Potencial Redox (según el apartado 3.2.8), ajustándose el primero con ácido sulfúrico en torno a 1.7-1.8 (Zhang y Li, 1998; Yang et al., 2009; Istiyanto et al., 2011). El ajuste de pH se realizó para evitar la posible precipitación del hierro debido al aumento de pH durante el proceso de biomecanizado (Zhang y Li, 1999), si bien también conllevaría una mejora en la tasa de remoción según indicaron Eskandarian et al. (2013) y Xenofontos et al. (2015) en sus trabajos.

La concentración de cobre divalente y hierro total se definieron según la metodología establecida en 3.2.4.3 en caso de ser medio MAC. Para el hierro total en medio 9K se siguió la metodología descrita en 3.2.4.1.

Tras el análisis de los parámetros en cada intervalo, la probeta de OFE se introdujo de nuevo en la disolución, dando comienzo a la segunda hora de biomecanizado y así sucesivamente hasta completar las 3 horas.

3.2.6. Determinación de la tasa de remoción

Para la determinación de la tasa de remoción se tomaron como referencia los estudios de Istiyanto et al. (2012), Hocheng et al. (2012) y Jadhav et al. (2013).

La tasa de remoción por hora se obtuvo mediante la relación entre la diferencia de pesos en dos intervalos consecutivos y el tiempo transcurrido entre ellos (Ecuación 3.2). Las unidades de medida eran mg/h.

$$MRR = \frac{w_t - w_{t-1}}{\Delta t} \text{ (mg/h)} \quad \text{(Ecuación 3.2)}$$

En algunos ensayos también se estudió la evolución de la masa eliminada acumulada, parámetro semejante a la tasa de remoción. Se determinó mediante la diferencia del peso de la probeta en dos intervalos consecutivos sumada a la masa total eliminada hasta ese instante.

3.2.7. Análisis superficial

El análisis superficial de las probetas de OFE constó en determinar la rugosidad de la superficie, en obtener una imagen de la topografía, así como observar el estado superficial mediante microscopio óptico y mediante SEM. Estas técnicas de análisis han sido los más comunes en los trabajos publicados sobre biomecanizado (Saragih and Jo Ko, 2013; Eskandarian et al., 2013; Hocheng and Jadhav, 2015).

Para la obtención de la rugosidad superficial, se empleó el equipo de perfilometría tridimensional de la marca Form TalySurf series 2 de Taylor Hobson. La toma de datos se realizó mediante un captador inductivo. El parámetro de rugosidad empleado fue la rugosidad media aritmética del perfil Ra, siendo la media aritmética de los valores absolutos de las desviaciones del perfil, en los límites de la longitud estudiada.

El estudio topográfico se realizó con el equipo Leica DCM3D, sistema diseñado para un rápido análisis de micro y nano estructura de superficies. Combinando tecnología confocal e interferometría, puede llegar hasta una resolución de 0.1 nm. Este equipo

además de obtener imagen 3D de la superficie, permitió poder estudiar las geometrías generadas, detallando su profundidad y anchura entre otros.

Finalmente, se empleó un microscopio óptico Mitutoyo y un microscopio electrónico de barrido Hitachi S4800 del servicio SGIker, este último para análisis SEM.

3.2.8. Otras determinaciones

Entre otras de las determinaciones, cabe destacar la medida del pH y del Potencial Redox mediante equipos calibrados y verificados. Los equipos empleados fueron de las marcas Crison GLP 21+ y Thermo-Orion 920A+ para los ensayos realizados en medio 9K y de las marcas Thermo Scientific Orion 3 Star Benchtop y Hanna Instruments HI2550 respectivamente para los ensayos realizados en el medio MAC.

3.3. Referencias

- Almengló, F., 2014. Desulfuración de biogás mediante un biofiltro percolador piloto con bacterias nitrato-reductoras sulfoxidantes. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencias. Universidad de Cádiz.
- Amann, R.I., 1995. In situ identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. In: Akkermans, A.D.L., van Elsas, J.D., de Bruijn, F.J., (Eds.), Molecular Microbial Ecology Manual, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 1-15.
- Amann, R., Fuchs, B.M., Behrens, S., 2001. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization. Current Opinion in Biotechnology 12, 231-236.
- Barcellona, M.L., Chen, Y., Müller, J.D., Gratton, E., 2001. 4', 6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) interacts with rare structures of GC polymers. Journal of European Biophysics 30, 98-109.
- Chang, J.H., Hocheng, H., Chang, H.Y., Shih, A., 2008. Metal Removal rate of *Thiobacillus thiooxidans* without pre-secreted metabolite. Journal of Materials Processing Technology 201, 560-564.
- Chenu, J.W., Pavic, A., Cox, J.M., 2013. A novel miniaturized most probable number method for the enumeration of *Campylobacter* sp. From poultry-associated matrices. Journal of Microbiological Methods 93, 12-19.

- Eskandarian, M., Karimi, A., Shabgard, M., 2013. Studies on enzymatic biomachining of copper by glucose oxidase. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 44, 331-335.
- German standard methods for the examination of water, waste water and sludge; cations (group E); determination of iron (E 1). Norma DIN 38406-1:1983-05. Accesible desde www.beuth.de. Último acceso diciembre 2015.
- Giaveno, M.A., 2010. Biolixiviación y biooxidación de minerales utilizando cepas nativas con capacidad termófila. Tesis Doctoral. Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de La Plata.
- Harris, A.S.D., Jones, J.K., Lewis, J., 1998. An assessment of the accuracy and reproducibility of the most probable number (MPN) technique in estimating numbers of nutrient stressed diatoms in sediments samples. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 231, 21-30.
- Hocheng, H., Jadhav, U.U., 2011. Novel sustainable metal removal by biologically produced ferric sulphate. *Second International Conference on Digital Manufacturing & Automation*, 784-787.
- Hocheng, H., [et al.] 2012. Metal removal by *Acidithiobacillus ferrooxidans* through cells and extra-cellular culture supernatant in biomachining. *CIRP Journal of Manufacturing Science and Technology* 5, 137-141.
- Hocheng, H., Jadhav, U., 2015. Process of biological machining. A.Y.C. Nee (ed.). *Handbook of Manufacturing Engineering and Technology*. Springer-Verlag London.
- Istiyanto, J., Jo Ko, T., Yoon, H.C., 2010. A study on copper micromachining using microorganisms. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing* 11, 659-664.
- Istiyanto, J., Kim, M.Y., Jo Ko, T., 2011. Profile characteristics of biomachined copper. *Microelectronic Engineering* 88, 2614-2617.
- Istiyanto, J., Saragih, A.S., Jo Ko, T., 2012. Metal based micro-feature fabrication using microorganisms process. *Microelectronic Engineering* 98, 561-565.
- Jadhav, U.U., Hocheng, H., Weng, W.H., 2013. Innovative use of biologically produced ferric sulphate for machining of copper metal and study of specific metal removal rate and roughness during the process. *Journal of Material Processing Technology* 213, 1509-1515.

- Jež, M., [et al.] 2013. The hazards of DAPI photoconversion: Effects of dye, mounting media and fixative, and how to minimize the problem. *Histochemistry and Cell Biology* 139, 195-204.
- Johnson, D., Warner, R., Shih, A.J., 2007. Surface roughness and material removal rate in machining using microorganisms. *Journal of Manufacturing Science and Engineering* 123, 223-227.
- Kumada, M., [et al.] 2001. Investigation of fine biomachining of metals by means of microbially influenced corrosion: Differences between steel and copper in metal biomachining using *Thiobacillus ferrooxidans*. *Corrosion Engineering* 50 (9), 585-596.
- Li, M., Wu, R.S., Tsai, J.S.C., 2003. DAPI derivative: A fluorescent DNA dye that can be covalently attached to biomolecules. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13, 4351-4354.
- Mackintosh, M.E., 1978. Nitrogen fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of General Microbiology* 105, 215-218.
- Mazzini, A., Incerti, M., Favilla, R., 1997. Interaction of DAPI with pepsin as a function of pH and ionic strength. *Biophysical Chemistry* 67, 65-74.
- Ramírez, M., 2007. Viabilidad de un proceso para la eliminación conjunta de H₂S y NH₃ contenido en efluentes gaseosos. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y Tecnologías del Medio Ambiente. Universidad de Cádiz.
- Silverman, M.P., Lundgren, D.G., 1959. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and harvesting procedure for securing high cell yields. *Journal of Bacteriology* 77, 642-647.
- Standard Methods Online - Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 3500-Fe B. Phenanthroline Method. Accesible desde www.standardmethods.org. Último acceso diciembre 2015.
- Standard Specification for Copper Sheet, Strip, Plate, and Rolled Bar. ASTM B152. Accesible desde www.astm.org. Último acceso diciembre 2015.
- Saragih, A.S., Jo Ko, T., 2013. Development of digital lithography masking method with focusing mechanisms for fabrication of micro-feature on biomachining process. *Journal of Mechanical Science and Technology* 27 (10), 3017-3022.

- Suwandi, D., Whulanza, Y., Istiyanto, J., 2014. Visible light maskless photolithography for biomachining application. *Applied Mechanics and Materials* 493, 552-557.
- Thaithongnum, S., [et al.] 2006. Detection of *V. harveyi* in shrimp postlarvae and hatchery tank water by the most probable number technique with PCR. *Aquaculture* 261, 1-9.
- Ting, Y.P., Kumar, A.S., Rahman, M., Chia, B.K. 2000. Innovative use of *Thiobacillus ferrooxidans* for the biological machining of metals. *Acta Biotechnology* 20 (2), 87-96.
- Uno, Y., Kaneeda, T., Yokomizo, S., 1996. Fundamental study on biomachining (Machining of metals by *Thiobacillus ferrooxidans*). *International Journal of the Japan Society of Mechanical Engineers, Series C* 39 (4), 837-842.
- Xenofontos, E., Feidiou, A., Costantinou, M., Constantinides, G., Vyrides, I., 2015. Copper biomachining mechanisms using the newly isolated *Acidithiobacillus ferrooxidans* B1. *Corrosion Science* 100, 642-650.
- Yang, Y., Wang, X., Liu, Y., Wang, S., Wen, W., 2009. Techniques for micromachining using *Thiobacillus ferrooxidans* based on different culture medium. *Applied Mechanics and Materials* 16-19, 1053-1057.
- Zwirgmaier, K., 2015. Fluorescence in situ hybridization (FISH)- the next generation. *FEWS Microbiology Letters* 246, 151-158.
- Zhang, D., Li, Y., 1998. Possibility of biological micromachining used for metal removal. *Science in China, Series C* 41 (2), 151-156.
- Zhang, D., Li, Y., 1999. Studies on kinetics and thermodynamics of biomachining pure copper. *Science in China, Serices C* 42 (1), 57-62.



CAPITULO 4

ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACION



4. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACION

4.1. Introduction

The objective pursued by this first experimental phase, prior to the use of bacteria, was to obtain practical experience in the area of study of biomachining. To this end, two experimental stages were performed.

First, OFE workpieces were introduced in a natural medium, which contains a huge range of bacterial diversity, including the bacteria *A. ferrooxidans*. Second, as ferric iron is the fundamental chemical component in biomachining, a series of experiments with ferric iron dissolutions and OFE workpieces were carried out, in this case, without bacteria.

The following Figure 4.1 shows a diagram of the procedure for a better understanding of the experimental set-up.

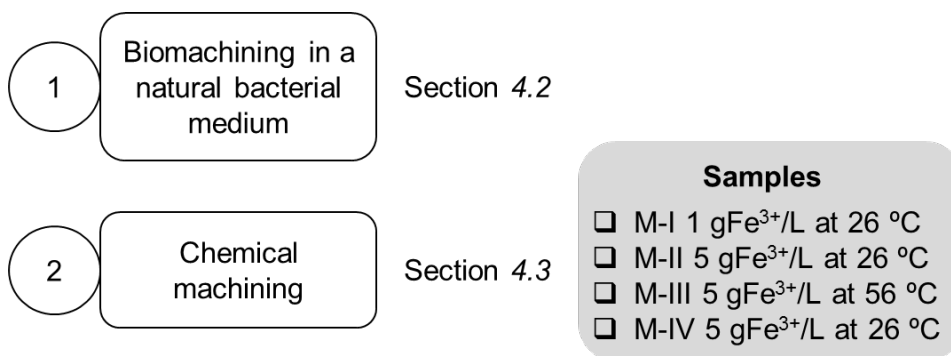


Figure 4.1. Experimental set-up diagram.

4.2. First experiments based on nature examples

4.2.1. Experimental set-up

As first approach to the biomachining process and to check the capacity and feasibility of this technology, some experiments in a natural bacterial medium were performed, namely, in Rio Tinto (Huelva, Andalucía, Spain) (GPS Coordinates 37.703333, - 6.602778). The idea was taken from the study of Miyano et al. (2003).

Rio Tinto, shown in Figure 4.2, is known for being part of a NASA experiment because of its similarities with Mars (Amils et al. 2007; Edwards et al. 2007). Its unusual characteristics have been widely studied (López-Archilla et al. 2001; Ferris et al. 2004; Aguilera et al. 2007; González-Toril et al. 2010).

Due to the presence of a high biodiversity in Rio Tinto, it was thought that the introduction of OFE workpieces into the river could provide the opportunity to evaluate the effect of this biosystem on the final surface.

OFE milled workpieces, with the dimensions defined in section 3.1.1, were introduced into the river. After 15 days of exposure time, workpieces were taken out of the river and analyzed. Firstly, they were weighed to determine the amount of removed material (see section 3.2.6). Then a surface analysis was carried out based on the methodology determined in section 3.2.7.

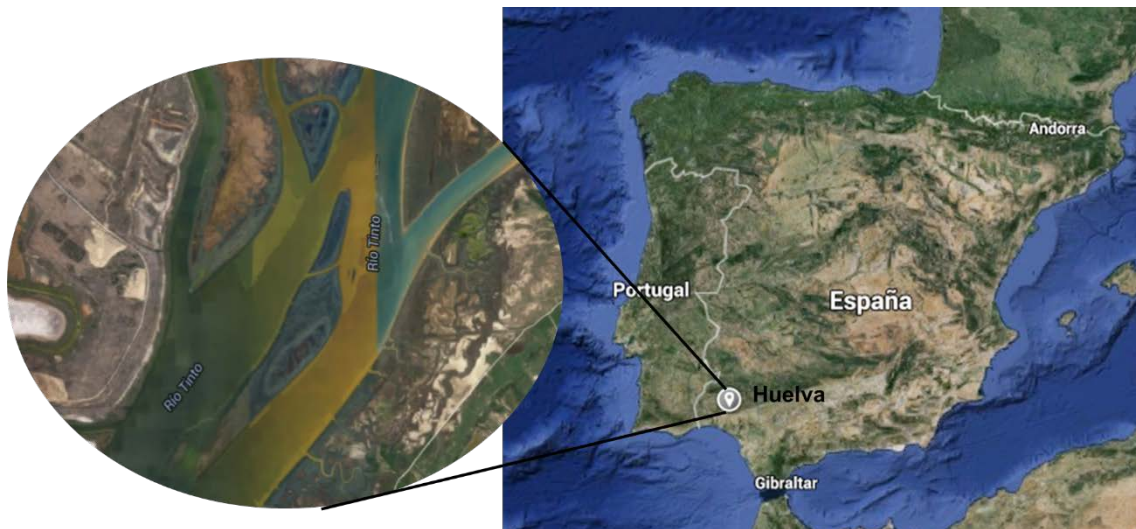


Figure 4.2. Localization of Rio Tinto and the state of its reddish waters from an air view (Source: google maps).

4.2.2. Results and discussion

Results of the topographical analysis of one of the workpieces are shown in Figure 4.3. It was observed that the material removal led to a topographical surface change. The initial machining pattern (Figure 4.3a) disappeared. Thus, this preliminary experiments showed that OFE workpieces suffered a notable surface alteration with the presence of bacteria (Figure 4.3b). Similar results were obtained in Miyano et al. (2003). This indicated the possible feasibility and capacity for biomachining techniques.

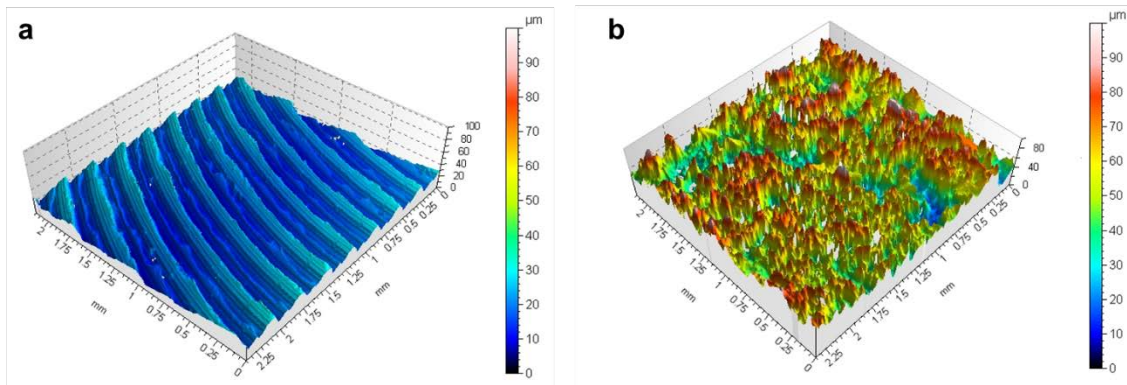


Figure 4.3. a) Workpiece topography before experiments in Rio Tinto, b) Workpiece topography after experiments in Rio Tinto.

4.3. Experiments under chemical conditions

4.3.1. Experimental set-up

The oxidation-reduction reaction between the ferric iron and the OFE is one of the fundamental reactions that take part on the biomachining process (see Reactions 2.2 and 2.3 in section 2.2). It was of great interest the possibility of studying this reaction separately to obtain the factors that influence it. Therefore, the aim of the first stage of the present work was to analyze the effect that ferric iron concentration and temperature had on the chemical reaction.

For chemical experiments, the solutions were prepared reproducing basically the medium used in other studies reported in the literature (Johnson et al. 2007, Istiyanto et al. 2010 and Istiyanto et al. 2011). Synthetic solutions of ferric iron were created from iron salts (sulfates), and acidified to about pH 2.0 with sulfuric acid. The OFE workpieces were designed as the methodology indicated in section 3.1.1.

Tests to analyze the effect of iron concentration were performed in two different samples, one with a concentration of 1 gFe³⁺/L (M-I) and the other one with 5 gFe³⁺/L (M-II). Two pre-weighed OFE workpieces were suspended in the solutions. The bottles were exposed to an agitation of 90 rpm at 26 °C. At 15 minutes intervals, workpieces were removed, washed, weighed, and introduced again into each sample. This process was repeated for a total of 1.5 hours of testing.

For the analysis of the temperature effect, another sample was used, with a concentration of $5 \text{ gFe}^{3+}/\text{L}$ and heated to $56 \text{ }^\circ\text{C}$ (M-III). As in the previous case, at each interval of time (15 minutes) the workpiece was extracted, washed, weighed, and reintroduced in the sample, reaching 1.5 hours of testing.

A complementary experiment was carried out under conditions of $5 \text{ gFe}^{3+}/\text{L}$ and at $26 \text{ }^\circ\text{C}$ to determine the evolution of the material removal rate of OFE (M-IV). The time interval to analyze the workpiece was 45 minutes, and a total of 3 hours of experiment was performed.

In all cases, during the experiments, it was determined the evolution of ferric iron concentration (see section 3.2.4.1), among other parameters, such as, pH and Redox Potential (see section 3.2.8). The workpieces were analyzed superficially by optical microscopy and via SEM after the experiments were concluded according to the methodology mentioned in section 3.2.7.

4.3.2. Results and discussion

From the experiments made under chemical conditions, the following results were derived. It was observed that in chemical machining experiments both the concentration of ferric iron and temperature influenced the weight loss. A higher concentration and a higher temperature increased weight loss (Figure 4.4). In all cases the OFE weight loss presented a linear behavior over the test time.

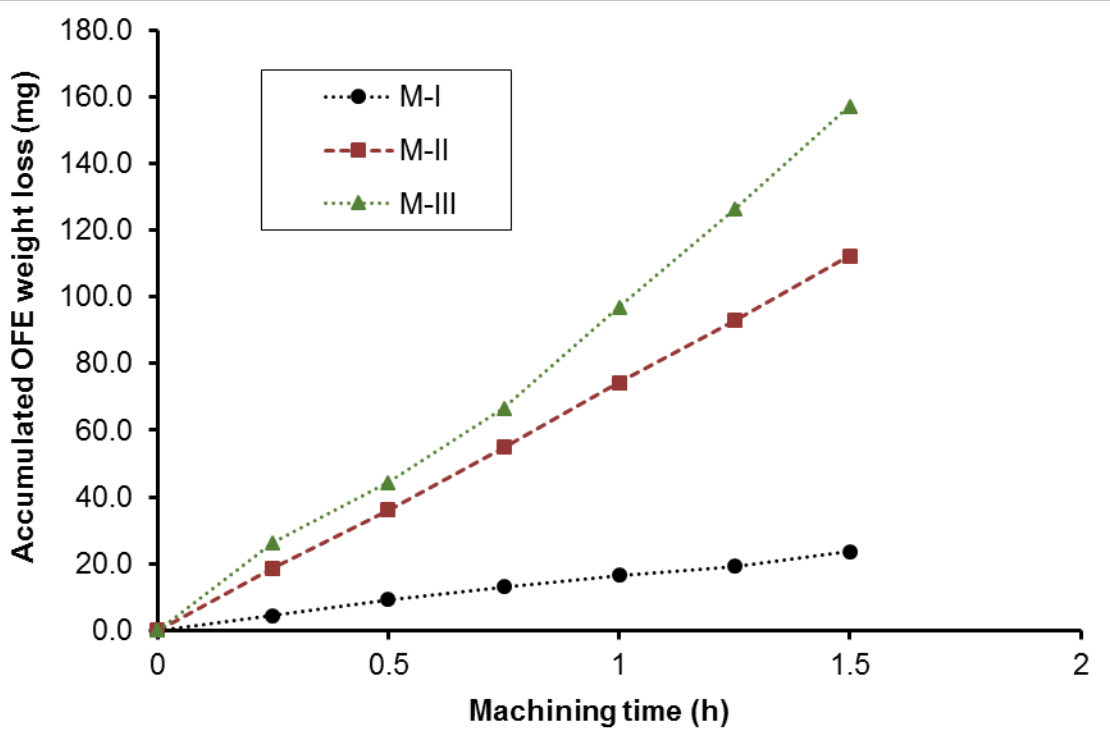


Figure 4.4. Accumulated weight loss for different concentrations of iron and different temperatures in pure chemical machining.

Analyzing the surface condition, it was clear that the surface was more affected in those workpieces in which the concentration of ferric iron was higher (Figure 4.5). Temperature variation did not show any appreciable effect (Jadhav et al., 2013; Xenofontos et al., 2015).

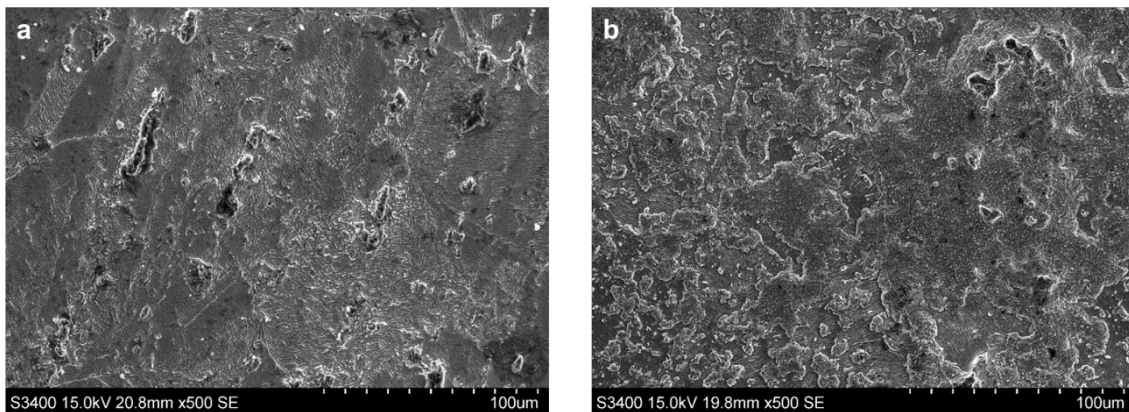


Figure 4.5. a) SEM of the workpiece tested in M-I sample, b) SEM of the workpiece tested in M-II sample.

From the last experiment corresponding to this first stage (M-IV), the evolution of the removal rate during the time of exposure was obtained. The evolution of OFE removal rate and ferric iron concentration over the time are shown in Figure 4.6. Taking into account the redox reaction that is being occurred in the process (Reaction 4.1), Cu^0 and ferric iron were consumed as the time passes. In a first stage, there was a notable ferric iron concentration in solution so a notable removal rate was produced.



As time passed, ferric iron concentration decreased and so the removal rate, slowing the reaction. The time limit which may be considered to not remove more material was approximately 3 hours. These results showed the necessity to work with bacteria during the material removal process to obtain a continuous process of generation of ferric iron to sustain the reaction.

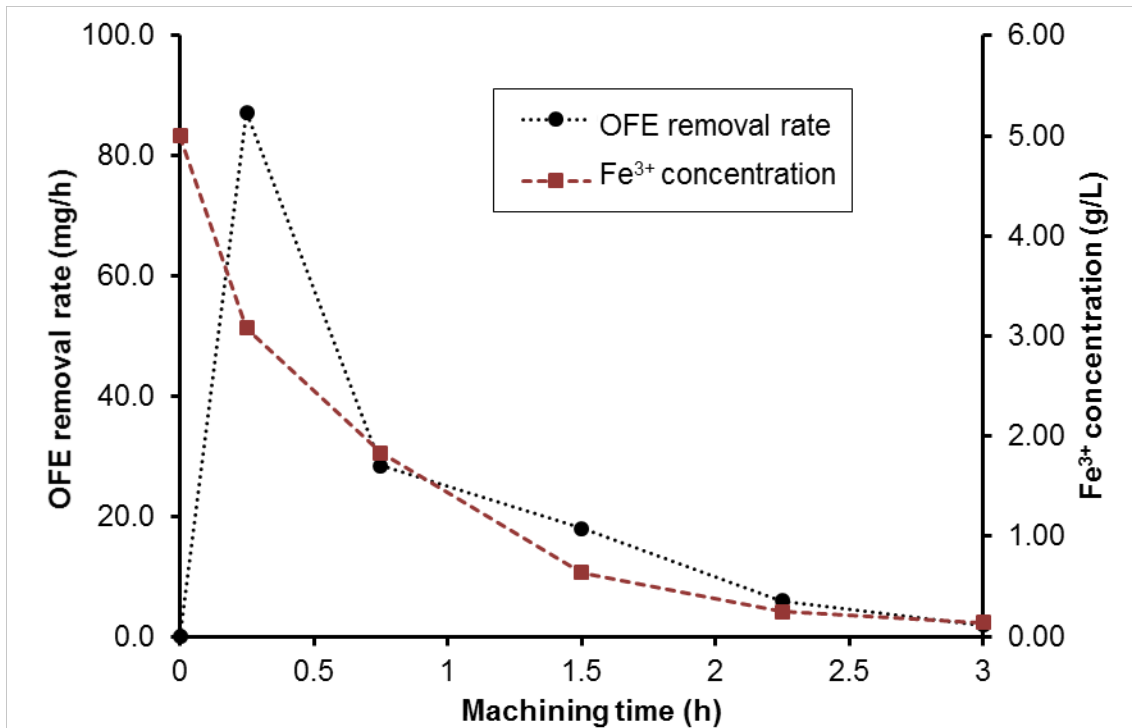


Figure 4.6. Removal rate and ferric iron concentration in M-IV sample.

4.4. Conclusions

In view of the results of the experiments carried out during this research, the following conclusions can be drawn.

The results obtained after the performance of the first attempts on natural media indicated the possible feasibility and capacity for biomachining techniques.

Regarding the experiments done under chemical conditions, without bacteria, the importance of both ferric iron concentration and the temperature value in terms of weight loss and final workpiece surface quality was observed. A major concentration of ferric iron caused more removed material, but in turn, it generated poor surface quality, with a higher value of roughness, so it should come to a compromise. However, the rise of temperature could be linked to the process optimization, since it did not significantly affect the surface quality and led to higher copper removal.

4.5. References

- Aguilera, A., [et al.] 2007. Distribution and seasonal variability in the benthic eukaryotic community of Río Tinto (SW, Spain), and acidic, high metal extreme environment. *Systematic and Applied Microbiology* 30, 531-546.
- Amils, R., [et al.] 2007. Extreme environments as Mars terrestrial analogs: The RioTinto case. *Planetary and Space Science* 55, 370-381.
- Edwards, H.G.M., [et al.] 2007. The Rio Tinto Mars Analogue site: An extremophilic Raman spectroscopic study. *Spectrochimica Acta Part A* 68, 1133-1137.
- Ferris, F.G., Hallbeck, L., Kennedy, C.B., Pedersen, K., 2004. Geochemistry of acidic Rio Tinto headwaters and role of bacteria in solid phase metal partitioning. *Chemical Geology* 212, 291-300.
- González-Toril, E., [et al.] 2010. Microbial ecology of Río Tinto, a natural extreme acidic environment of biohydrometallurgical interest. *Hidrometallurgy* 104, 329-333.
- Istiyanto J., Jo Ko, T., Yoon, II-C., 2010. A Study on Copper Micromachining Using Microorganisms. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing* 11 (5), 659-664.
- Istiyanto, J., Kim, M.Y., Jo Ko T., 2011. Profile characteristics of biomachined copper. *Microelectronic Engineering* 88, 2614-2617.

- Jadhav, U.U., Hocheng, H., Weng, W.H., 2013. Innovative use of biologically produced ferric sulphate for machining of copper metal and study of specific metal removal rate and roughness during the process. *Journal of Materials Processing Technology* 213, 1509-1515.
- Johnson, D., Warner, R., Shih, A.J., 2007. Surface roughness and material removal rate in machining using microorganisms. *Journal of Manufacturing Science and Engineering* 129 (1), 223-227.
- Miyano, Y., Kamiya, O., Lotfi, C., Kikuchi, Y., 2003. Fundamental studies on biomachining of carbon steel by iron oxidizing bacteria. *Transactions of JWRI* 31 (1), 239-242.
- Xenofontos, E., Feidiou, A., Constantinou, M., Constantinides, G., Vyrides, I., 2015. Copper biomachining mechanisms using the newly isolated *Acidithiobacillus ferrooxidans* B1. *Corrosion Science* 100, 642-650.



CAPITULO 5



BIOMECANIZADO EN MEDIO 9K

5. BIOMECANIZADO EN MEDIO 9K

5.1. Introduction

The 9K medium together with *A. ferrooxidans* bacteria has been one of the most used medium-bacteria in the biomachining studies carried out so far (Johson et al., 2007; Jadhav et al., 2013; Suwandi et al., 2014).

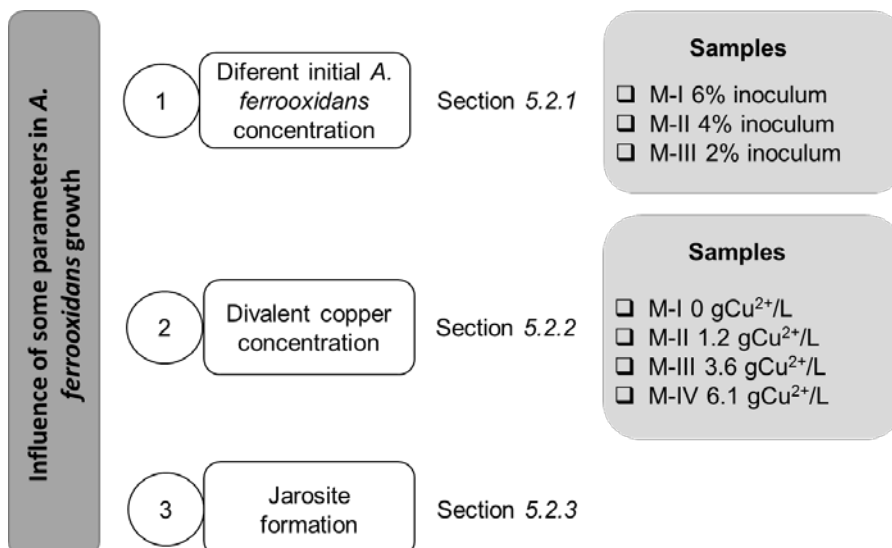
That is why, the Chemical and Environmental Engineering Department of the UPV/EHU wanted to study important aspects of both the bacteria growth phase, as well as the biomachining process itself. This would lead to a better understanding of the process and to know how several parameters could affect it.

Regarding the growth period, the evolution of different samples starting with the same ferrous iron concentration but with a different initial concentration of *A. ferrooxidans* was studied. The effect that the presence of divalent copper could have on the metabolism of the bacteria was also analyzed, and also the effect of the appearance of jarosite.

A biomachining in 9K medium experiment was conducted, in order to analyze the effect of two parameters that were considered influential in the process: the concentration of ferric iron and the superficial effect of the workpiece.

In addition, a methodology to biomachine workpieces with a defined geometry was validated, being different from those ones already published. And a methodology was developed to treat the liquid waste obtained after the biomachining process.

The following Figure 5.1 shows a diagram of the procedure for a better understanding of the experimental set-up.



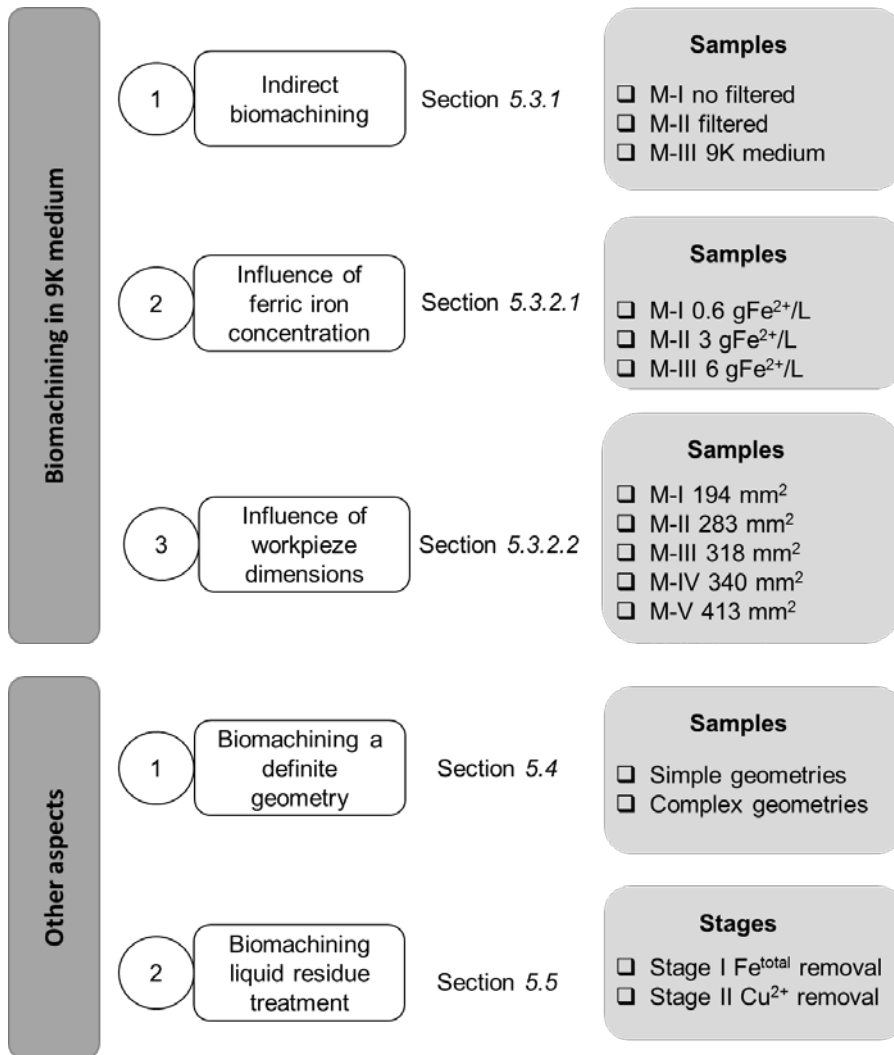


Figure 5.1. Experimental set-up diagram.

5.2. Parameters affecting growth period of *A. ferrooxidans*

5.2.1. Effect of different initial *A. ferrooxidans* concentration

5.2.1.1. Experimental set-up

9K medium commonly used for growth of the bacteria *A. ferrooxidans* is characterized as an acidic aqueous solution of various inorganic salts (nutrients) including the ferrous sulfate as a ferrous iron source. With the start of the incubation period, the oxidation of ferrous iron to ferric iron begins, which end is marked by the almost total disappearance of the ferrous iron in the solution.

Kumada et al. (2001) mentioned in their study the effect that the concentration of *A. ferrooxidans* bacteria could have in the oxidation rate of ferrous iron, indicating that a higher concentration of bacteria would lead to generate a higher concentration of ferric iron in less time.

Focusing on that idea, the aim of this phase of the work was to determine the evolution of the concentrations of ferrous iron and ferric iron, as well as the Redox Potential during the growth period of *A. ferrooxidans* in 9K medium in samples with different concentrations of bacteria.

The experiment began with the preparation of the 9K medium for three samples according to the methodology indicated in 3.2.1.1, with a final volume of 150 mL and a concentration of 6 gFe²⁺/L. The percentage of inoculum with respect to the final volume was different in each of them, specifically 6% (v/v) for the sample M-I, 4% (v/v) for the sample M-II and 2% (v/v) for the sample M-III.

Since the beginning of the growth period, an interval of 2 hours was set to analyze those parameters believed to provide relevant information regarding the process state. These parameters were the Redox Potential (see section 3.2.8) and the concentrations of ferrous iron and ferric iron (see section 3.2.4.1).

The process ended when, in each of the three solutions, the concentration of ferrous iron was reduced to less than 0.05 gFe²⁺/L, which coincided with values of Redox Potential over 600.0 mV.

5.2.1.2. Results and discussion

Figure 5.2 graphically represents the evolution of the concentration of ferrous iron at the end of the incubation period, in each of the three experimented solutions (ferric iron evolution is not shown). Because the importance of the conversion process was in the final hours of growth, only values after the 55 hour are shown, considering values before that time irrelevant.

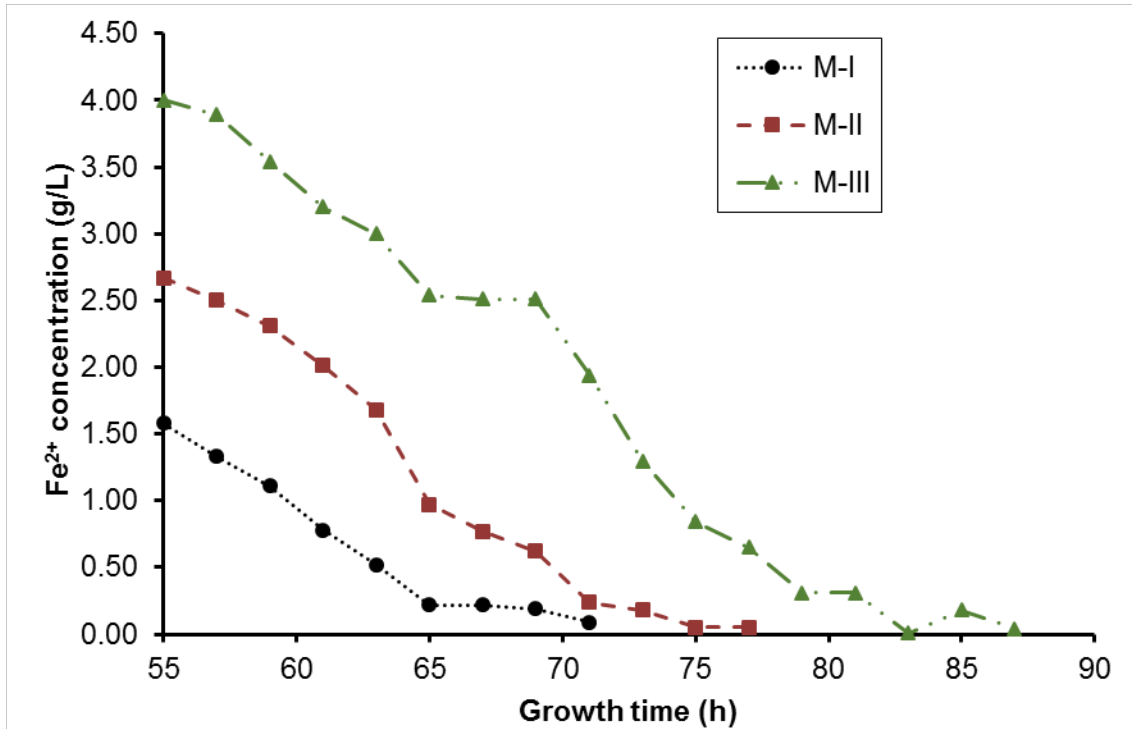


Figure 5.2. Ferrous iron concentration for M-I, M-II and M-III samples.

The results presented in the graph confirm the effect that the concentration of bacteria had in the process of conversion of the ferrous iron to ferric iron. The sample, M-I, inoculated with a larger amount of initial inoculum (6%,v/v), was the first to reach the final concentration of 6 gFe³⁺/L after about 71 hours of incubation, presenting a Redox Potential of 652.1 mV. The solution inoculated with 4% (v/v) of the initial inoculum, M-II, was the second to reach the final state of growth (about 77 hours), and followed by M-III sample which growth period increased up to 87 hours. The results of the M-III sample are consistent with the results reported by Uno et al. (1996).

Therefore, it can be said that, as it seems, a larger amount of initial inoculum, and thus a higher initial concentration of bacteria, entails a shorter incubation period.

Figure 5.3 graphically shows the evolution of Redox Potential in the three solutions, during growth period.

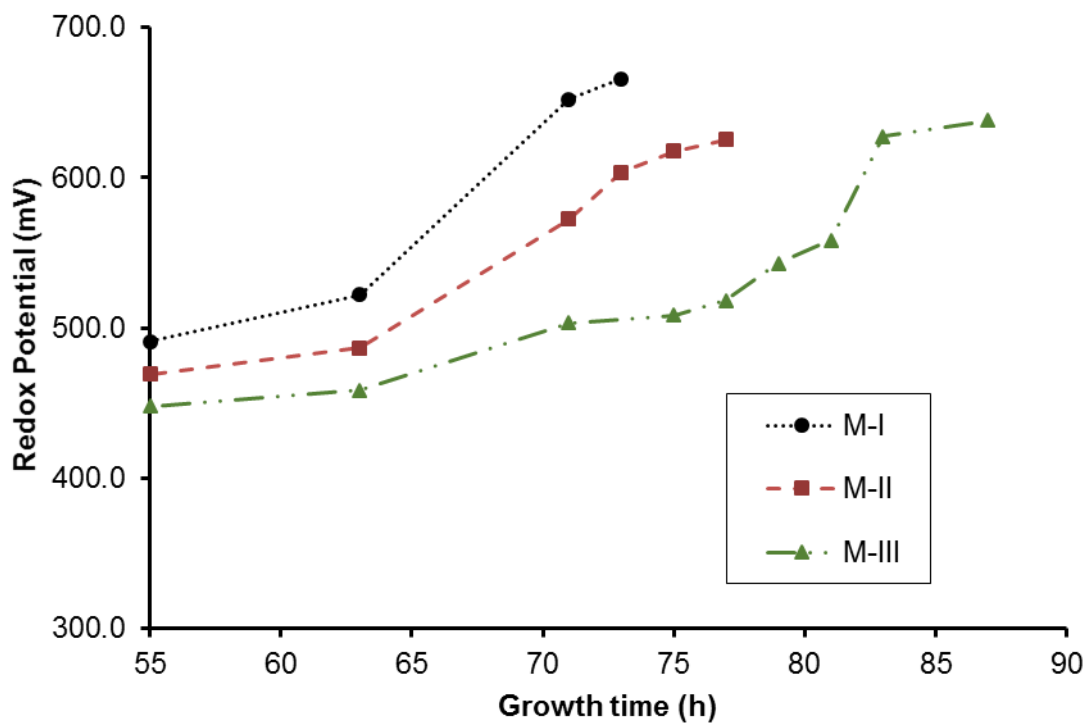


Figure 5.3. Redox Potential for M-I, M-II and M-III samples.

From this experiment it was concluded that the completion of the growth period could be determined by determination of the concentration of ferrous iron and that it was principally conditioned by the starting concentration of bacteria.

5.2.2. Effect of divalent copper concentration

5.2.2.1. Experimental set-up

A. ferrooxidans bacteria get some of the energy required for their metabolism from the ferrous iron oxidation. This process is sensible to the presence of heavy metals cations in the growth medium, since they reduce the oxidative capacity of the aforesaid bacteria and even inhibit the process of growth of microorganisms (Cabrera et al., 2005). Among heavy metals, according to Felício et al. (2003), copper is the one that has more effect on the growth of the bacteria *A. ferrooxidans*.

Furthermore, copper is essential for *A. ferrooxidans* development as it serves as an electron donor during bacterial growth and it is found in the structure of rusticyanin, a protein that functions as the major electron carrier in the iron respiratory electron transport chain (Mykytczuk et al., 2011). Nevertheless, *A. ferrooxidans* bacteria might not tolerate the excessive copper amounts accumulated during the biomachining process.

Values of metal toxicity are often defined differently. Maximum tolerated concentrations of divalent copper up to 19 gCu²⁺/L have been reported in the literature for *A. ferrooxidans* (Cabrera et al., 2005; Das et al., 1998). Dopson et al. (2003) and Orell et al. (2010) defined 800mM as the maximum divalent copper concentration for *A. ferrooxidans* where either growth or a defined enzyme activity still occurs.

Because divalent copper is a cation present in the solution, which is produced during the biomachining, it was considered convenient to study the effect that the mentioned cation could have on *A. ferrooxidans* bacteria metabolism.

To this end, four samples (M-I, M-II, M-III, M-IV) were prepared according to the methodology indicated in section 3.2.1.1 for a final volume of 50 mL and a concentration of 6 gFe²⁺/L. A different divalent copper concentration was added to each sample, as indicated in Table 5.1, being the M-I sample the only one to which no copper was added to. The mother dissolution of divalent copper, of 67 gCu²⁺/L, was prepared from CuSO₄·5H₂O.

Table 5.1. Composition of the M-I, M-II, M-III and M-IV samples.

	Initial Volume (mL)	Cu ²⁺ solution added (mL)	Deionized water added (mL)	Final Volume (mL)	Final Cu ²⁺ concentration (g/L)
M-I	50	0	5	55	0
M-II	50	1	4	55	1.2
M-III	50	3	2	55	3.6
M-IV	50	5	0	55	6.1

Then, the growth period proceeded to start according to the conditions defined in section 3.2.1.1. In some time intervals, samples were taken in order to determine the concentrations of ferrous iron and ferric iron (see section 3.2.4.1). A count of bacteria was also carried out at the end of the growing period following the methodology indicated in section 3.2.3.2.

5.2.2.2. Results and discussion

Growth curves, based on rates of ferrous iron oxidation, were plotted for each sample (Figure 5.4). The presence of divalent copper decreased the oxidative capacity of the bacterial culture under study. In the absence of divalent copper (M-I), 99% of ferrous iron oxidation was accomplished after 47 hours, whilst similar oxidation degree (98%) was reached after 67 hours for the sample with 1.2 gCu²⁺/L (M-II). Oxidation process was incomplete for M-III (88%) and M-IV (47%) even after 91 hours.

Cellular growth was also inhibited as the metal concentration in the medium increased. Bacterial concentration was $1.3 \cdot 10^8$ cells/mL in M-I and $9.1 \cdot 10^7$, $1.2 \cdot 10^7$ and $4.4 \cdot 10^6$ cells/mL in M-II, M-III and M-IV, respectively at the end of each sample's growth period.

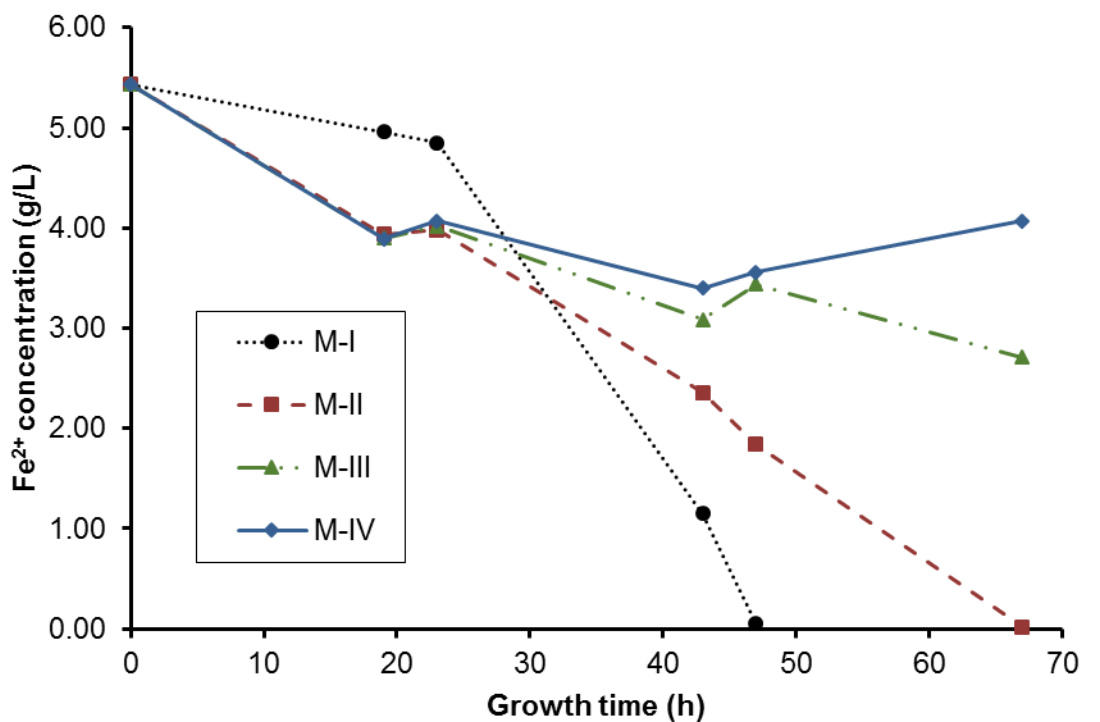


Figure 5.4. Ferrous iron concentration for M-I, M-II, M-III and M-IV samples.

Even though the growth of *A. ferrooxidans* is not normally done in presence of divalent copper, this experiment performed under the growth period, showed that the metabolism of *A. ferrooxidans* bacteria could be affected during the biomachining by the presence of this cation.

5.2.3. Effect of jarosite formation

5.2.3.1. Experimental set-up

The formation of a sulfate mineral known as jarosite during the oxidation of ferrous iron in a 9K medium with *A. ferrooxidans* was studied in this section.

Jarosite precipitation is a very important unwanted phenomenon which is observed in many industrial processes involving bacterial cultures in acidic and sulfate-rich environments. An excessively lengthy incubation period leads the ferric iron to form a sulfate complex within the periplasm of the *A. ferrooxidans* bacteria and its subsequent precipitation as a polymeric ferric sulfate outside the cell wall (Lazaroff, 1997). Since pH has been stated as the main parameter affecting the jarosite formation (Daoud and Karamanev, 2006), the main purpose of this section was to characterize the composition of the precipitate formed and establish the optimal pH value for an efficient ferrous iron oxidation by *A. ferrooxidans* under which minimal risk of jarosite precipitation was produced.

For this purpose, a sample was prepared according to the methodology indicated in section 3.2.1.1, and it was grown under the conditions defined in the same section. The growth period lasted for several days, in order to ensure a good formation of the precipitate and in a good quantity for its analysis. Finally, the sample was filtered by 14 μm – 18 μm paper filter (FilterLab 1240) and the obtained precipitate was dried at room temperature. The composition of the precipitate was then analyzed in SGIker facilities.

5.2.3.2. Results and discussion

The ferrous iron oxidation by means of *A. ferrooxidans* activity in 9K medium involves a consumption of hydrogen ions, and the pH of the liquid medium increases as the reaction progresses (Zhang et al., 1998; Zhang and Li, 1999). In this case, the pH value increased from 1.75 to 2.00 after 48 hours of incubation process. The first signs of solid accumulation were visually observed after 72 hours of incubation period. In a similar way, Liu et al. (2007) showed that the formation of jarosite began when *A. ferrooxidans* culture reached logarithmic growth phase (above 46 hours of incubation period) with pH values higher than 2.2.

The precipitate formed within the Erlenmeyer flask and collected after 5 days of growth was confirmed via X-ray powder diffraction in SGIker facilities to be a compound

related to jarosite-group minerals with the chemical formula $\text{KFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$ (Figure 5.5).

The appearance of this solid halved the ferric iron concentration in the 9K medium from approximately $6 \text{ gFe}^{3+}/\text{L}$ to $3 \text{ gFe}^{3+}/\text{L}$, and even if it was not analyzed, surely, the biomass was also reduced.

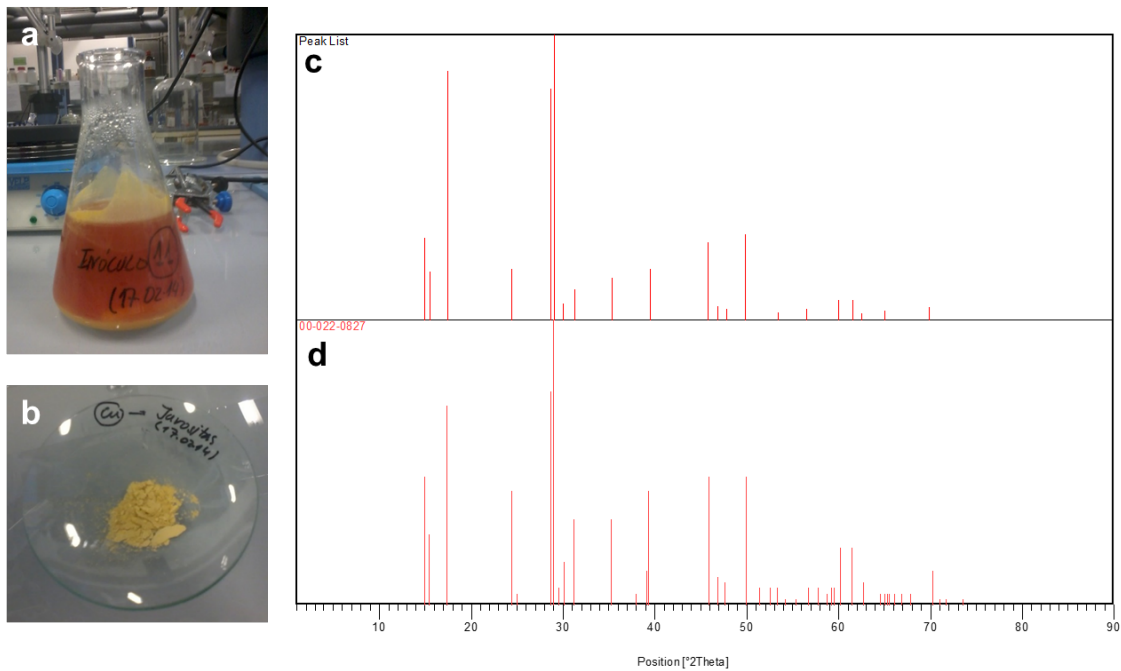


Figure 5.5. a) *A. ferrooxidans* culture containing precipitate after 5 days, b) Filtered and dried mustard-coloured precipitate, c) Diffractogram for a jarosite standard sample, d) Diffractogram for the precipitated solid from the experiment.

Since it was crucial to minimize jarosite formation in order to avoid the loss of ferric iron necessary to carry out biomachining, a pH threshold value under 2.0 (between 1.7-1.8) was maintained in the following experiments by the periodic addition of sulfuric acid.

5.3. Biomachining in 9K medium

5.3.1. Indirect biomachining mechanism

5.3.1.1. Experimental set-up

As seen in Chapter 2, direct and indirect mechanisms have been proposed in order to explain the biomachining process (Hocheng and Jadhav, 2015). In the direct mechanism, the attachment between bacteria and the metal is physical and constant, as microorganisms directly exchange electrons with the metallic surface. In this case, the bacteria oxidize and dissolve copper by means of iron-oxidizing enzymes contained in the periplasmic space and inner membrane (see Reaction 2.1 in section 2.2). The indirect mechanism requires an intermediate redox couple, such as ferrous iron and ferric iron (see Reactions 2.2 and 2.3 in section 2.2).

The ferrous iron contained in the growth 9K medium, defined as the main energy source for *A. ferrooxidans*, is first bio-oxidized to ferric iron. Resulting cation is a strong oxidant (standard reduction potential (Eh) of +0.77 V) able to readily solubilize pure copper by oxidizing Cu^0 to divalent copper. The ferrous iron simultaneously formed is trapped again by the bacteria, and the process is repeated cyclically. Therefore, the indirect mechanism includes a redox cycle combining microbiological (see Reaction 2.2 in section 2.2) and pure chemical (see Reaction 2.3 in section 2.2) processes (Lilova et al., 2007).

In order to verify that the biomachining process of OFE was of indirect nature, two samples were prepared (M-I and M-II) according to the methodology indicated in section 3.2.1.1 for a final volume of 150 mL and a concentration of $6 \text{ gFe}^{2+}/\text{L}$. Another sample was also prepared (M-III) to analyze the biomachining capability of 9K medium, this one without bacteria. Then, the samples were grown according to the conditions defined in the section aforementioned.

After the growth period, 3 hours of biomachining test was performed for the three samples according to the methodology indicated in section 3.2.5, prior filtration of M-II sample by $0.45 \mu\text{m}$ membrane filter (FilterLab 1765-100) in order to separate the bacteria from the supernatant. During the biomachining, bacteria concentration was analyzed by the methodology indicated in section 3.2.3.1. The workpieces were analyzed superficially by optical microscopy and via SEM before the experiment and after the experiment was concluded according to the methodology indicated in section 3.2.7.

5.3.1.2. Results and discussion

Figure 5.6 shows the evolution of OFE removal rate by means of a standard incubated sample with simultaneous presence of *A. ferrooxidans* and ferric iron (M-I) and a filtered sample only with ferric iron (M-II) during a biomachining stage. Copper removal rate was similar for both cases during the biomachining, with a total metal release of 166.8 mgCu²⁺/L and 141.8 mgCu²⁺/L for M-I and the filtered M-II samples, respectively. This proves that the indirect mechanism was predominant in this biomachining. This values matched with the data obtained by Kumada et al. (2001), Hocheng et al. (2012), Jadhav et al. (2013) and Xenofontos et al. (2015). The last two obtained a quite similar removal rate in biomachined copper samples with supernatant and with supernatant and *A. ferrooxidans*.

In both cases, the removal rate reached a maximum in the first hour, decreasing thereafter as time passed, as it happened in chemical experiments (see section 4.3). The removal rate also has this behavior in the studies made by Johnson et al. (2007), Istiyanto et al. (2010), Hocheng et al. (2012) and Jadhav et al. (2013).

Again as in the experiments done under chemical conditions, the concentration of the ferrous iron increased (Table 5.2), although in a first stage it was thought that it would maintain constant because of the presence of bacteria. The increase was more noticeable in M-II sample, in which most of the iron (approximately 70%) was as ferrous iron after 3 hours (3.94 gFe²⁺/L). In M-I, only the 20% of the iron was as ferrous iron after the same time. This means that the presence of bacteria helped to re-oxidize the ferrous iron obtained from the reaction with OFE, although not in the same velocity as ferric iron was reduced to ferrous iron by means of Reaction 2.3 (see section 2.2).

The bacteria concentration remained constant during the experiment, with a concentration around 1.0·10⁹ cells/mL as in Johnson et al. (2007) and Yang et al. (2009).

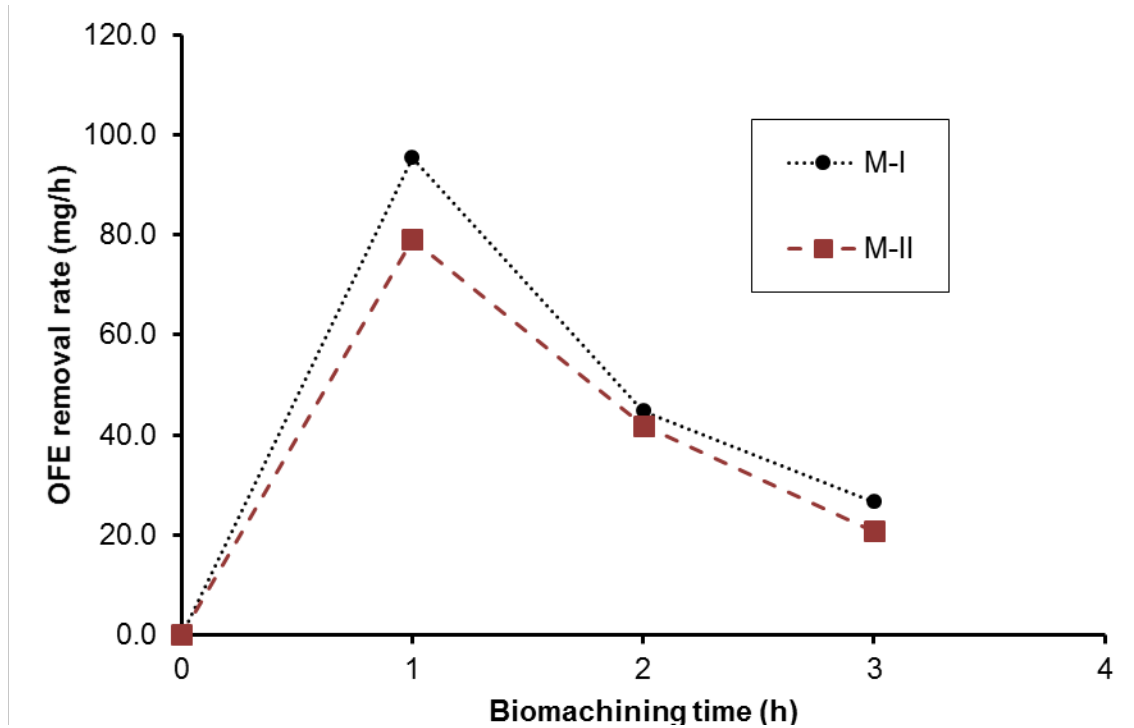


Figure 5.6. Removal rate for M-I and M-II samples.

In agreement with other studies (Shikata et al., 2009; Istiyanto et al., 2010; Jadhav et al., 2013) the biomachining of copper in 9K medium (M-III) was negligible, with a removal rate lower than 1.0 mg/h for each analysis interval (data not shown). It was concluded that this biomachining occurred by the abiotic oxidation of ferrous iron.

The values of the Redox Potential and pH are shown in Table 5.2 for M-I and M-II samples. During the biomachining experiment, pH increased as in Zhang et al. 1998 and Zhang and Li 1999 and Redox Potential decreased.

Table 5.2. Redox Potential, pH and ferrous iron concentration during the experiment for M-I and M-II samples.

	SAMPLE	M-I	M-II
Initial stage	Redox Potential (mV)	634.2	634.2
	pH (-)	2.2	2.2
	pH (-) (adjusted)	1.8	1.8
	Fe ²⁺ (g/L)	0.13	0.14
1st hour	Redox Potential (mV)	438.4	445.3
	pH (-)	2.1	2.0
	pH (-) (adjusted)	1.8	1.8
	Fe ²⁺ (g/L)	0.44	2.6
2nd hour	Redox Potential (mV)	422.7	416.3
	pH (-)	1.9	1.9
	pH (-) (adjusted)	1.8	1.8
	Fe ²⁺ (g/L)	0.98	3.58
3th hour	Redox Potential (mV)	412.5	394.5
	pH (-)	1.8	1.8
	pH (-) (adjusted)	1.7	1.7
	Fe ²⁺ (g/L)	1.07	3.94

In the next Figure 5.7 the change in the surface characteristics of the OFE workpiece before and after being biomachined in M-I sample could be seen. As it happened to Johnson et al. (2007), Istiyanto et al. (2010) and Saragih and Jo Ko (2013), after the biomachining process the surface texture changed, increasing the roughness and losing the initial pattern (Istiyanto et al., 2012; Hocheng and Jadhav, 2015).

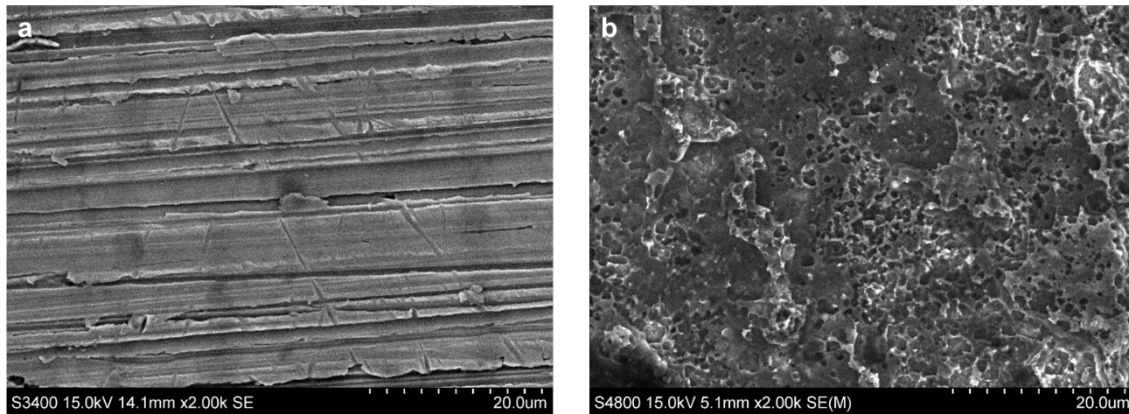


Figure 5.7. SEM of the biomachined workpiece in M-I sample, a) Before biomachining, b) After 3 hours of biomachining.

5.3.2. Influence of some parameters during biomachining

5.3.2.1. Ferric iron concentration

5.3.2.1.1. Experimental set-up

As it has been proven in the previous section, metallic copper biomachining mainly occurs due to the existence of ferric irons within the bacterial dissolution. Regarding the typical range of ferric iron concentration used in previous bioleaching studies using *A. ferrooxidans* (0-9 gFe³⁺/L) (Rastegar et al., 2015), the effect of the initial ferric iron concentration on copper biomachining was investigated by comparing the response of some samples with different ferric iron concentration.

For that purpose, three samples were prepared according to the methodology indicated in section 3.2.1.1 for a final volume on 150 mL and a concentration of 0.6 gFe²⁺/L (M-I), 3 gFe²⁺/L (M-II) and 6 gFe²⁺/L (M-III). Then, the samples were grown in the conditions defined in the section described before.

After the growth period, a biomachining experiment was done under the conditions defined in section 3.2.5 with a final duration of 3 hours. The workpieces were analyzed superficially by optical microscopy and via SEM before and after the experiment was concluded according to the methodology mentioned in section 3.2.7.

5.3.2.1.2. Results and discussion

Accumulated OFE weight loss for each sample is plotted in Figure 5.8. A linear correlation was observed between ferric iron concentration and divalent copper release, so that double amount of ferric iron implied a twofold copper biomachining in the case of M-II and M-III as an example (77.7 mg and 155.7 mg respectively). Similar results were obtained in the experiments done under chemical conditions in section 4.3.

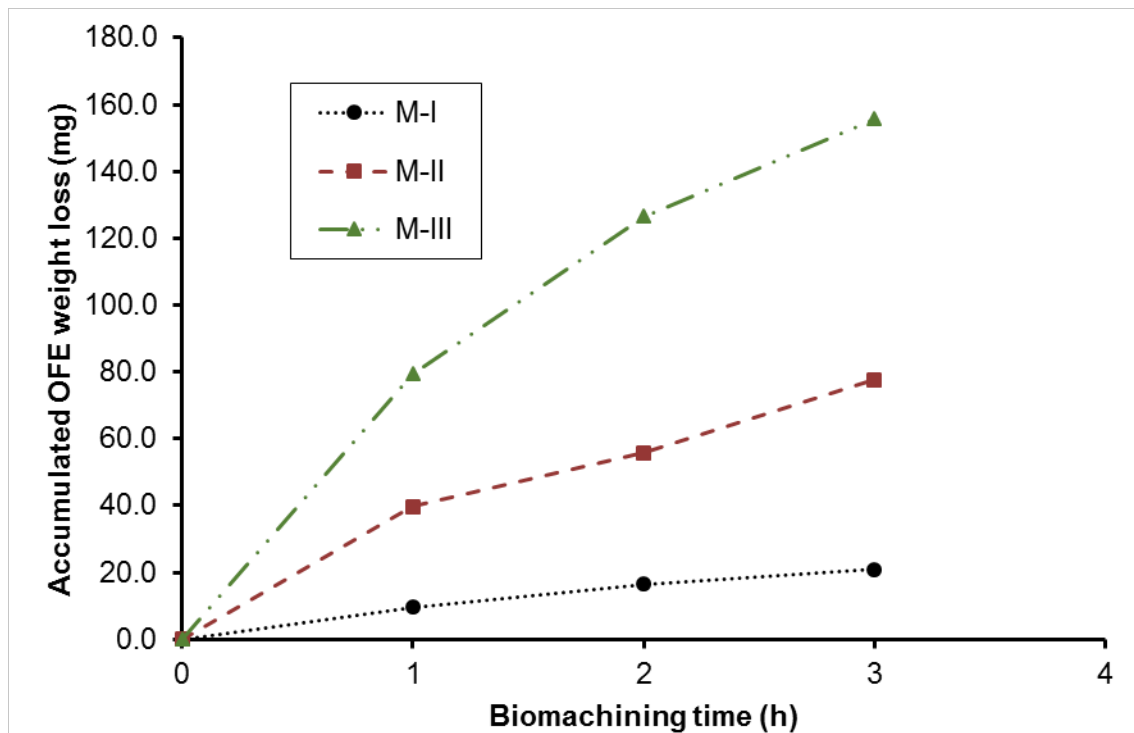


Figure 5.8. Accumulated weight loss for M-I, M-II and M-III samples.

Analyzing the surface of the workpieces after the experiments, it was found that different concentrations of ferric iron also caused different surface finishing. Figure 5.9 shows the difference in surface finishing of four workpieces, one only polished (not biomachined) (Figure 5.9a) and three of them after being introduced into M-I sample (Figure 6.9b), M-II sample (Figure 6.9c) and M-III sample (Figure 6.9d). Regarding to the roughness parameter values (R_a), $0.08 \mu\text{m}$, $0.32 \mu\text{m}$ and $0.54 \mu\text{m}$ were achieved in workpieces tested in M-I, M-II and M-III respectively.

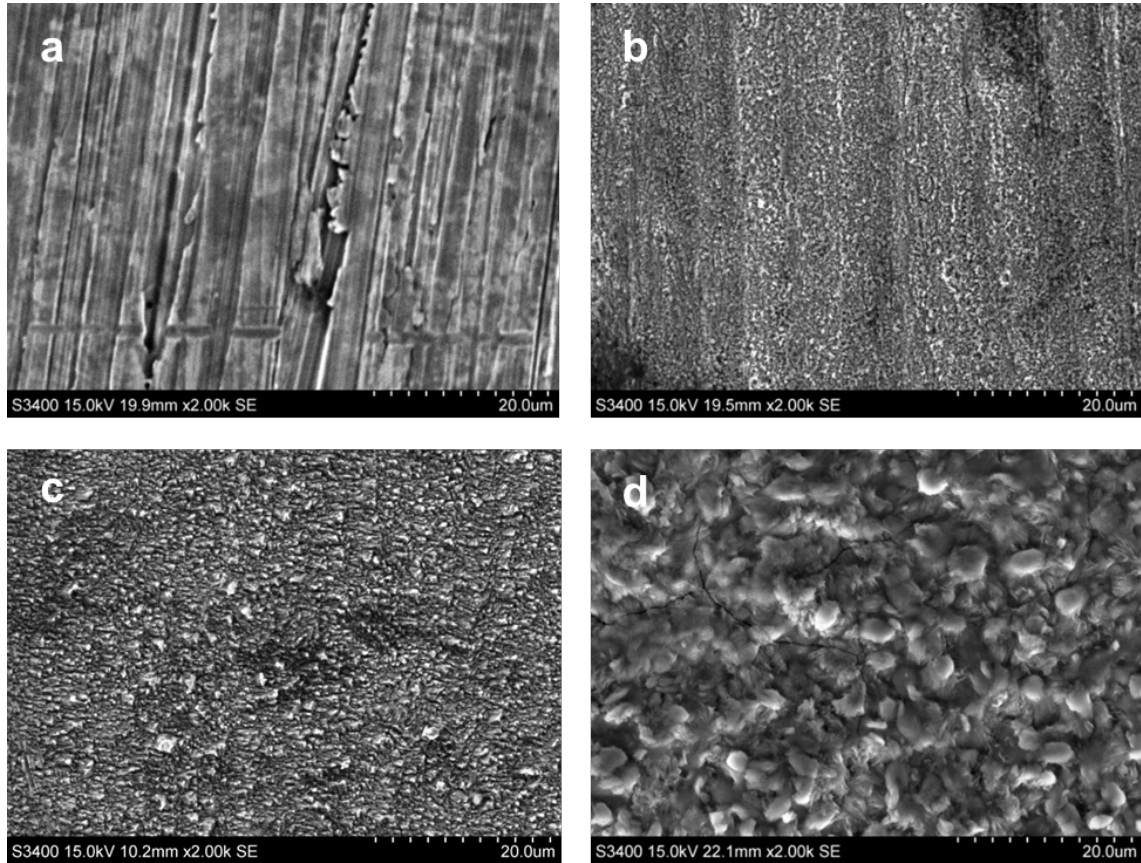


Figure 5.9. SEM of different workpieces, a) Not biomachined workpiece, b) Biomachined workpiece in M-I sample, c) Biomachined workpiece in M-II sample, d) Biomachined workpiece in M-III sample.

Even if increasing the concentration of trivalent iron favors the loss of material, addition of high amounts of ferric iron would not be applicable in industry since a number of related problems might come up, such as roughness increase in the final copper surface quality, higher sulfuric acid consumption or uncontrolled jarosite mineral precipitation (Xiang et al., 2010; Lambert et al., 2015). In addition, Kawabe et al. (2003) revealed that iron-oxidizing enzyme system of *A. ferrooxidans* was competitively inhibited by ferric iron. So 6 gFe³⁺/L is a good concentration to biomachine.

Since copper biomachining process is determined by ferric iron/ferrous iron redox couple, it was thought that experimental Redox Potential could be correlated with ferric iron and ferrous iron concentration ratio as described by Nernst equation (Hancock et al., 2004) defined in Equation 5.1. Redox Potential values, based on ties established among ferric iron depletion and ferrous iron generation, were plotted for M-II and M-III samples in Figure 5.10.

$$E = E_{\text{Fe}}^{\circ} + 0.059 \log \frac{[\text{Fe}^{3+}]}{[\text{Fe}^{2+}]} \quad (\text{Equation 5.1})$$

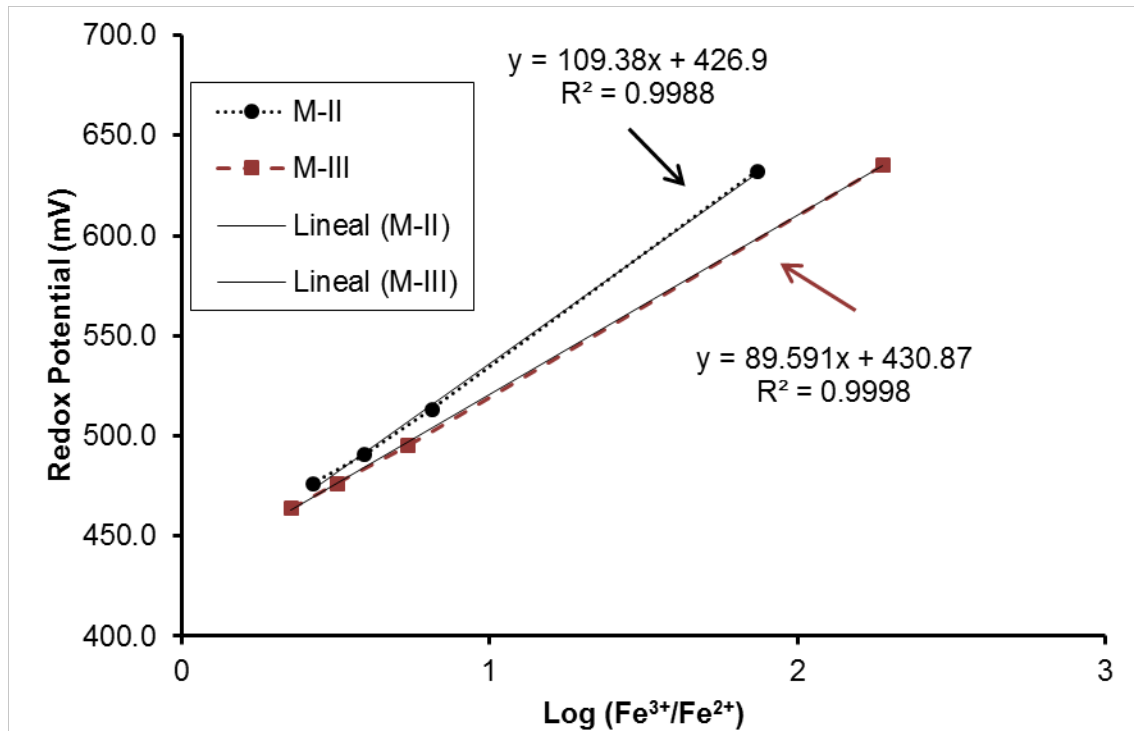


Figure 5.10. Relation between Redox Potential and logarithmic ferric iron and ferrous iron concentration ratio for M-II and M-III samples.

In both cases, a practically total correlation (correlation coefficient, R , around 1) was described between Redox Potential and the logarithm ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$). This results demonstrated that experimental results satisfied Nernst equation. Therefore, Redox Potential measurement would be a fast and easy way to gain information about the biomachining process status.

5.3.2.2. Workpiece dimensions

5.3.2.2.1. Experimental set-up

Because the biomachining is considered a superficial process, and since ferric iron acts over the OFE exposed surface, it was considered convenient to study the effect that such parameter had in the biomachining process.

To this end, five samples were prepared according to the methodology indicated in section 3.2.1.1, for a final volume of 50 mL and a concentration of 6 g Fe^{2+} /L, starting then the bacteria growth period under the conditions defined in the same section.

Once the growth period of bacteria was over, the biomachining process started with a total duration of 4 hours and under the conditions defined in section 3.2.5. Unlike other biomachining experiments, the five workpieces were selected in this case were different in regards to the exposed surface (W-I, W-II, W-III, W-IV, W-V). The characteristics of each one of them are given in Table 5.3.

Table 5.3. Characteristics of the workpieces selected for the experiment.

Dimensions	Length (mm)	Width (mm)	Height (mm)	Hole diameter (mm)	Exposed surface (mm²)
W-I	13	6	1	2	194
W-II	11	10	1.5	3	283
W-III	15	9	1	2	318
W-IV	16	9	1	1	340
W-V	15	11	1.5	2	413

5.3.2.2.2. Results and discussion

Figure 5.11 shows the evolution of the accumulated weight loss for each of the workpieces studied over the 4 hours of biomachining. It is significant how to those workpieces with a greater exposed surface, a greater amount of removed OFE was obtained from, both at 2 hours and at 4 hours of experiment. These results are similar to those obtained by Chang et al. (2008).

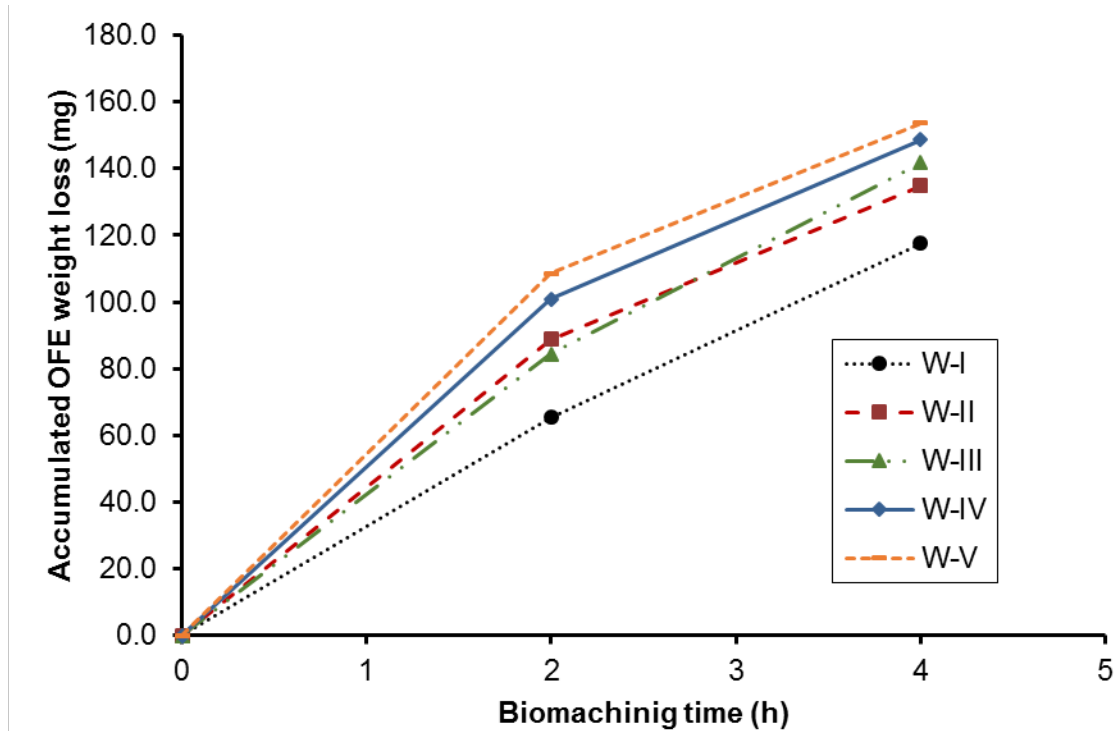


Figure 5.11. Accumulated weight loss for W-I, W-II, W-III, W-IV and W-V workpieces.

5.4. Biomachining a definite geometry

5.4.1. Experimental set-up

Biomachining gives the opportunity not to remove material for the entire surface. Therefore, if some areas of the surface are covered with a particular protective material, the oxidation agent would not access that area. In this case, the process only would remove material from those areas exposed to the solution. This feature enables marking any kind of geometry on a workpiece and machine parts with different functionality. To control the machining of a specific area of an OFE piece, a process methodology was developed (Figure 5.12).

The surface was covered with a protective resin (Electrolube Positive Photoresist PRP200) which was easy to apply and cure. Photoresistant resin with ultraviolet curing was chosen to cover the surface, the same type used in the fabrication of circuits on copper plates.

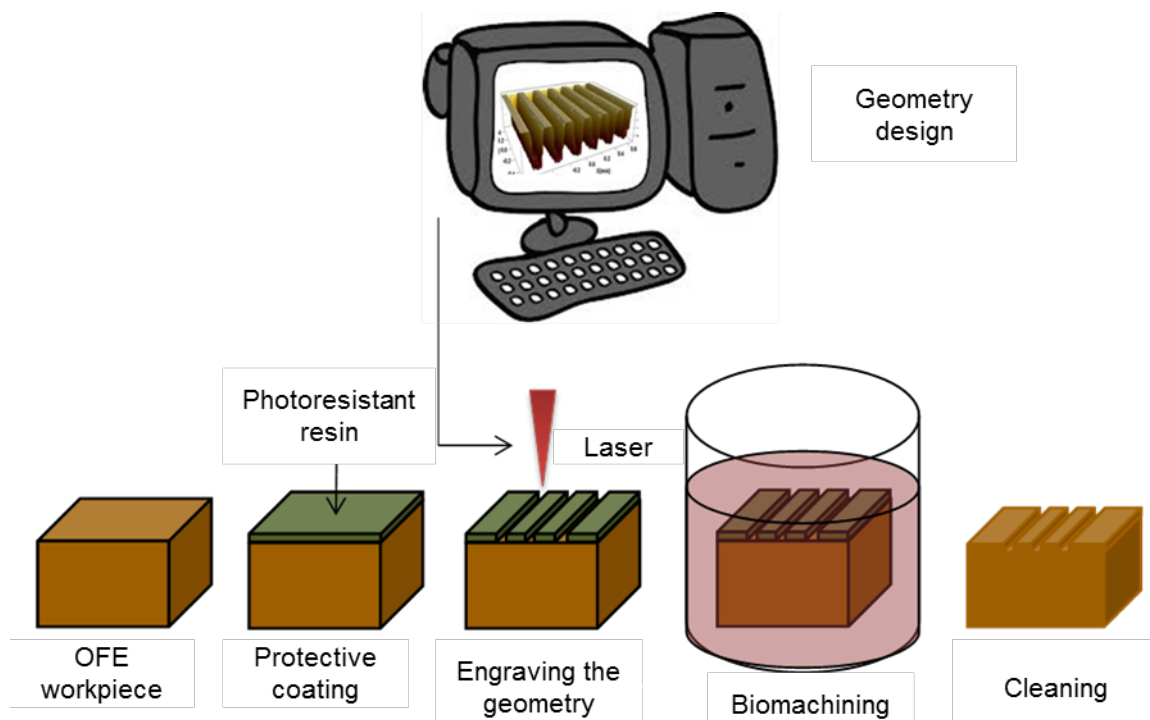


Figure 5.12. Engraving process of a geometry on a OFE workpiece combining laser processes and biomachining.

A laser beam was used to eliminate the resin and therefore leaving exposed the surface to be biomachined, unlike previous studies carried out before. (Zhang and Li 1998, Kurasaki et al. 2003 and Istiyanto et al. 2011). With a low power laser, whose trajectory was controlled by galvanometer mirrors, the geometry to be engraved was defined with high accuracy and high precision. For this purpose, previous to the laser marking, the geometry to be engraved was drawn in a 2D drafting software. The laser beam parameters had to be adjusted so that the resin was volatilized without affecting metallurgically the surface of the workpiece. In total, 16 combinations of potency (10-1000 W), duty-cycle (5-100%) and velocity (10-1000 mm/s) were analyzed.

After engraving the geometry on the workpiece, it was introduced into a solution prepared and growth according to methodology indicated in section 3.2.1.1. and then, the biomachining process started (see section 3.2.5). Once biomachining was finished, the workpiece was removed from the medium and was cleaned with acetone to remove the resin.

5.4.2. Results and discussion

A reliable methodology to machine complex shapes was validated. Covering areas with a resin and by the use of a laser beam, both simple and complex geometries could be engraved with high precision on metal pieces.

The good adjustment of the laser parameters was essential, in order to not creating any thermal damage on the workpiece surface and to ensure the good volatilization of the resin. Laser parameters were set in 1000 W of potency, duty-cycle of 5% and a speed of 10 mm/s, as with these ones the OFE workpiece did not present any thermal damage and the resin was evaporated completely. Figure 5.13 shows a workpiece with thermal damage caused by not having selected good laser parameters.



Figure 5.13. Thermal damage on OFE surface caused by a bad selection of laser parameters.

The final shape of the geometry after being biomachined, was similar to the geometry marked by laser. The depth to be achieved was controlled by the time that the part remained in the medium, increasing the depth as biomachining time increased.

Figure 5.14 shows some of the geometries experimented. As it can be observed there were both, simple biomachined geometries like lines and numbers, as well as complex ones, as a self-portrait of a funny bacteria.

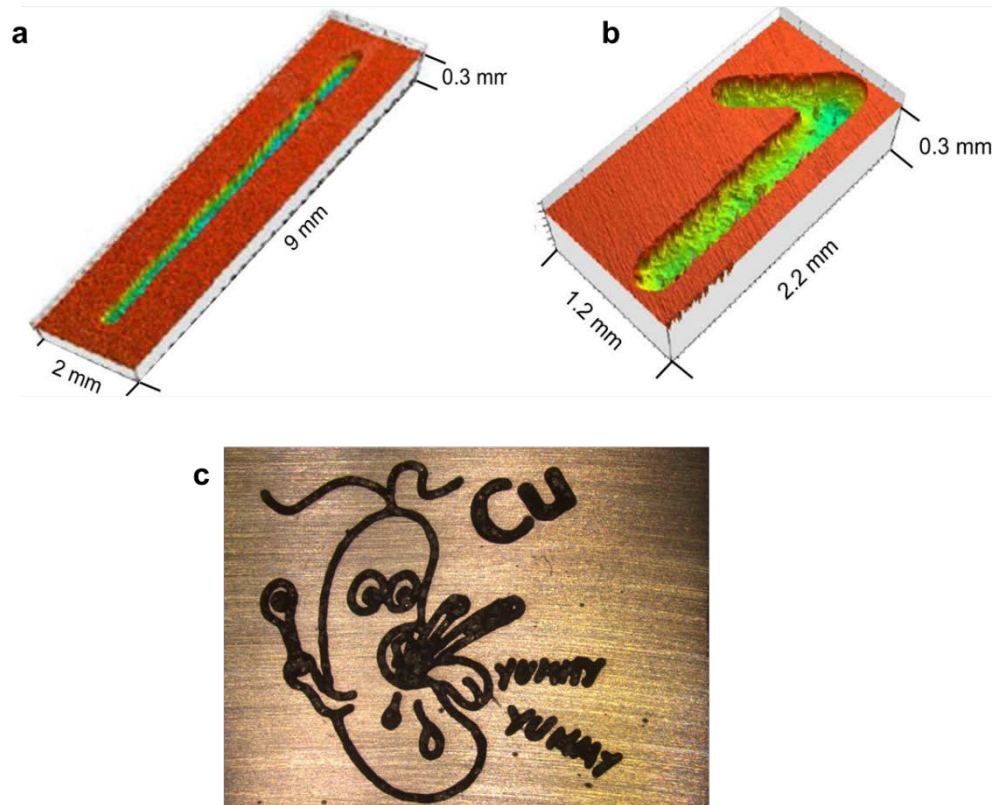


Figure 5.14. Some of the geometries biomachined in OFE workpieces.

5.5. Biomachining liquid residue treatment

5.5.1. Experimental set-up

Although biomachining is more environmental friendly than other machining processes, it does generate a waste. After the biomachining is performed, the dissolution where the process has been done remains as a residue that has to be treated. That is why, in this section a methodology procedure for the treatment of the biomachining liquid residue (BLR) is described. This treatment will enhance the green aspect of the process.

The BLR consist mainly in two components: the biological one with the bacteria and the chemical one with the components of the 9K medium. As bacteria were easy to eliminate by simply sterilizing the medium, the BLR treatment was focused in the treatment of the chemical components.

For that purpose, synthetic BLR was prepared. The BLR composition simulated the typical liquid residue obtained after the biomachining process, an acidic liquid (pH over

2.0) which contains approximately 3.0 gFe²⁺/L, 3.0 gFe³⁺/L, 6.7 gCu²⁺/L and 1.0 gNH₄⁺/L.

Thus, 3.8 g of FeSO₄·7H₂O, 6.5 g of (NH₄)Fe(SO₄)₂·12H₂O and 6.6 g of CuSO₄·5H₂O were dissolved in 250 mL of deionized water. Initial pH was adjusted to 2.3 by adding sulfuric acid. The initial value of the Redox Potential was 436.9 mV.

A 100 mL of the BLR was subjected to several successive stages as defined in Table 5.4.

Table 5.4. BLR treatment procedure

Objective	Procedure	Involved Reactions
Stage I: Fe^{total} removal		
i) Oxidation of Fe ²⁺ to Fe ³⁺	i) H ₂ O ₂ addition	$2 \text{Fe}^{2+} (\text{aq}) + \text{H}_2\text{O}_2 (\text{aq}) + 2 \text{H}^+ (\text{aq}) \rightarrow 2 \text{Fe}^{3+} (\text{aq}) + 2 \text{H}_2\text{O}$
ii) Fe ³⁺ precipitation as Fe(OH) ₃	ii) NaOH addition	$3 \text{Fe}^{3+} (\text{aq}) + 3 \text{NaOH} (\text{aq}) \rightarrow \text{Fe}(\text{OH})_3 (\text{s}) + 3 \text{Na}^+ (\text{aq})$
iii) Fe(OH) ₃ filtration	iii) Filtration	
Stage II: Cu²⁺ removal		
i) Cu ²⁺ precipitation as Cu(OH) ₂	i) NaOH addition	$\text{Cu}^{2+} (\text{aq}) + 2 \text{NaOH} (\text{aq}) \rightarrow \text{Cu}(\text{OH})_2 (\text{s}) + 2 \text{Na}^+ (\text{aq})$
ii) Cu(OH) ₂ filtration	ii) Filtration	

In the Stage I.i, ferrous iron was oxidized to ferric iron by adding hydrogen peroxide (30%, v/v) to a continuously stirred 100 mL BLR sample until a change in the Redox Potential trend was observed. In Stage I.ii, pH was increased from 2.27 to 4.0 by adding NaOH (97.0 mg/mL) and, finally, all the iron of the solution precipitated as $\text{Fe}(\text{OH})_3$, being separated by simple filtration with 14 μm – 18 μm paper filter (FilterLab 1240).

In the second stage (Stage II), the pH of the solution separated by filtration in the previous stage was increased to 8.0 by adding NaOH (97.0 mg/mL) and the precipitate formed was separated by 14 μm – 18 μm paper filter (FilterLab 1240). In addition, the final solution was characterized by determining the dissolved salt content by measuring the dry residue of the solution by evaporating the water content of an aliquot at 105 °C to constant weight.

The divalent copper was determined by the methodology indicated in section 3.2.4.3 and the total iron by the methodology indicated in section 3.2.4.1.

5.5.2. Results and discussion

In Stage I.i the initial Redox Potential (436.9 mV) of the synthetic BLR solution increased as a consequence of the continuous hydrogen peroxide addition. After adding 0.45 mL of hydrogen peroxide this trend changed, and when an additional drop of hydrogen peroxide was supplemented the Redox Potential value decreased from 616.8 mV to 590.3 mV, as an indicative of complete oxidation of ferrous iron to ferric iron.

In the next Stage I.ii, 9.3 mL of NaOH were added to the continuously stirred BLR solution, until the pH of the solution increased to 4.0. During this step the total ferric iron precipitated as $\text{Fe}(\text{OH})_3$ which was then recovered by filtration of the solution (Stage I.iii). It is noteworthy that the pH was thoroughly controlled in Stage I.ii, as an increase in the pH above 4.0 during $\text{Fe}(\text{OH})_3$ precipitation could lead to the co-precipitation of divalent copper and the consequent reduction of the quality of the obtained precipitate. In this study high purity $\text{Fe}(\text{OH})_3$ was obtained, a valuable product that could be directly used as cement additive.

As far as BLR solution volume is concerned, approximately 95 mL out of the initial 100 mL of BLR solution were recovered after $\text{Fe}(\text{OH})_3$ filtration. In Stage I, 0.5 mg of hydrogen peroxide by mg of oxidized ferrous iron and 1.5 mg of NaOH by mg of precipitated ferric iron were consumed.

Color changes of the BLR dissolution during Stage I are shown in Figure 5.15.

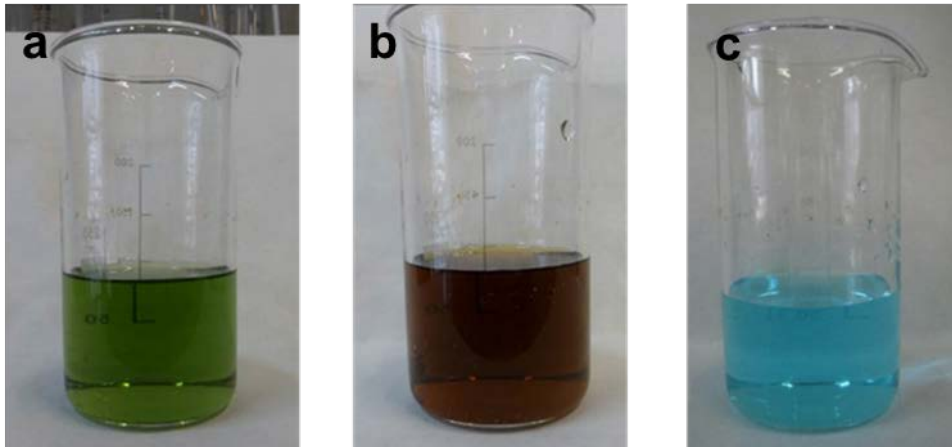


Figure 5.15. a) Initial BLR, b) BLR after ferrous iron oxidation (Stage I.i), c) BLR after $\text{Fe}(\text{OH})_3$ precipitation and filtration (Stage I.iii).

In Stage II.i, the pH was increased up to 8.3 by adding 5.3 mL of NaOH; therefore, 0.8 mg of NaOH was consumed by mg of divalent copper dissolved in the BLR.

The control of the pH also played an important role in $\text{Cu}(\text{OH})_2$ precipitation. Ammonium can partly transform into NH_3 when pH increased above 8.0. The NH_3 and the divalent copper could form a soluble complex that would solubilize the precipitated $\text{Cu}(\text{OH})_2$, reducing the amount of product obtained. The $\text{Cu}(\text{OH})_2$ was a valuable product that could be dissolved and recovered as highly pure copper by electrolysis.

Regarding solution volume, 80 mL of liquid were recovered after $\text{Cu}(\text{OH})_2$ filtration. Figure 5.16 shows the BLR dissolution color before and after $\text{Cu}(\text{OH})_2$ filtration.

Both total iron and divalent copper were drastically reduced from the initial to the final solution. Hydroxides precipitation, both $\text{Fe}(\text{OH})_3$ and $\text{Cu}(\text{OH})_2$, led to the insolubility of the 99.9% of the initial total iron and divalent copper content, as total iron and divalent copper concentration were reduced from 3.0 g/L in the initial BLR to 3.6 mg/L and 3.4 mg/L, respectively, in the final solution. The total iron concentration was presumably related to the ferrous iron that was not completely oxidized in the first step (Step I,i); thus, the optimization of the ferrous iron to ferric iron oxidation step could reduce the total iron concentration in the final solution.

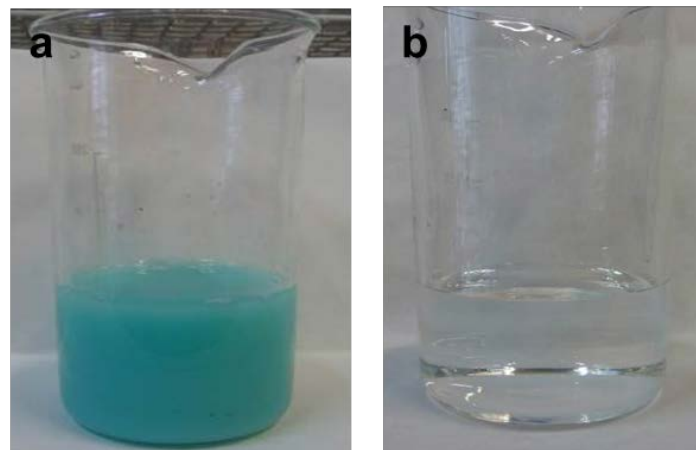


Figure 5.16. a) BLR dissolution after divalent copper precipitation (Stage II.i), b) BLR dissolution after $\text{Cu}(\text{OH})_2$ filtration (Stage II.ii).

As far as the dry residue in the final solution is concerned, 25.7 g/L of dry residue were experimentally measured. This result is in agreement with the theoretical Na_2SO_4 concentration in the solution (25.1 g/L), calculated by taking into account the stoichiometric Na^+ concentration (from the NaOH consumed in both ferric iron and divalent copper precipitation steps) and assuming that all the Na^+ was in the Na_2SO_4 form. Therefore, it can be concluded that the dry residue is, essentially, Na_2SO_4 . In solution, SO_4^{2-} and Na^+ concentration will be 17.0 g/L and 8.1 g/L, respectively.

5.6. Conclusions

In this chapter, some of the factors that may come to influence the growth of *A. ferrooxidans* in 9K medium have been analyzed, as well as the biomachining process with the same bacteria in the same culture medium, thus defining those factors that may come to have an effect on the process of biomachining. A process of etching geometries, both simple and complex, has also been defined and a detailed methodology of the BLR treatment.

Regarding the *A. ferrooxidans* growth, it was evident that having a higher concentration of bacteria at the beginning (or what is the same, a higher initial proportion of inoculum), made the growth process to be faster. A higher initial concentration allowed a more rapid ferrous iron oxidation. Given that from the point of view of production, in which the bacteria growth period is a dead time, it was known that starting from a higher concentration of bacteria, that dead time could be considerably reduced.

Both the presence of divalent copper in the medium, as well as the appearance of jarosite, were found to be detrimental to the overall process, the first one for the growth of bacteria and the second one for the biomachining process. Copper slowed down the *A. ferrooxidans* growth period, being its effect more remarkable when the greater the concentration. Increasing the pH in the growth stage involves a ferric iron precipitation as jarosite, thereby decreasing its concentration in the medium and being less iron available for the biomachining process. This would reduce the removal rates and would increase the presence of a mud, being both aspects negative from the industrial point of view. The concentration of bacteria would also be affected.

As expected, the biomachining in 9K medium through *A. ferrooxidans* was found to be of an indirect nature, resulting in a similar removal rate to the filtered sample (without bacteria) and the unfiltered sample. However, the presence of bacteria resulted in a ferrous iron simultaneous re-oxidation, being its concentration lower than the presented one in the filtered sample. Even though, this re-oxidation happened at a lower rate at which the ferric iron reduction occurred, thus ferrous iron continued to increase in concentration.

After biomachining, surface quality deteriorated, resulting in the polished pattern to disappear. The pH increased, and the Redox Potential decreased.

The removal rate was boosted by an increase in the concentration of ferric iron and a larger surface of the exposed part, while in return the surface quality worsened with the first one. Furthermore, high concentrations of ferric iron could interfere with the metabolism of bacteria, besides generating a premature appearance of precipitates. That is why, a $6 \text{ gFe}^{3+}/\text{L}$ was established as the appropriate concentration for the biomachining process, being the Redox Potential a good analysis parameter due to the good correlation that presented against the ratio of concentrations of ferric iron and ferrous iron.

A new method of biomachining parts from simple to complex geometries was presented and verified by applying resin and laser marking. It was of vital importance to define the right marking conditions, as to avoid a possible thermal damage to the workpiece and/or a poor evaporation of the resin, which would interfered in the biomachining process.

Finally, the synthetic BLR was treated based on two successive chemical precipitations with NaOH. The first one until pH 4.0 (previous oxidation of ferrous iron with hydrogen peroxide) to insolubilize ferric iron as $\text{Fe}(\text{OH})_3$, and the second one up to pH 8.0 to insolubilize the divalent copper as $\text{Cu}(\text{OH})_2$. The final aqueous effluent achieved contained only significant amounts of sulfates and sodium, as well as the nutrients ammonia nitrogen. The solid subproducts separately obtained in the process, high purity ferric and cupric hydroxides, could be assessed for industrial applications.

5.7. References

- Cabrera, G., Gómez, J.M., Cantero, D., 2005. Influence of heavy metals on growth and ferrous sulphate oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in pure and mixed cultures. *Process Biochemistry* 40, 2683-2687.
- Daoud, J., Karamanev, D., 2006. Formation of jarosite during Fe^{2+} oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Minerals Engineering*. 19: 960–967.
- Das, A., Modak, J.M., Natarajan, K.A., 1998. Surface chemical studies of *Thiobacillus ferrooxidans* with reference to copper tolerance. *Ant Van Leeuwenhoek* 73, 215-222.
- Dopson, M., Baker-Austin, C., Koppineedi, P.R., Bond, P.L., 2003. Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic microorganisms. *Microbiology* 149, 1959-1970.
- Felício, A.P., García, O., Bertolini, M.C., Mariscal, L.M., Marques, M.T., 2003. The effects of copper ions on the synthesis of periplasmic and membrane proteins in *Acidithiobacillus ferrooxidans* as analyzed by SDS-PAGE and 2D-PAGE. *Hydrometallurgy* 7, 165-171.
- Hancock, J.T., Desikan, R., Neill, S.J., Cross, A.R., 2004. New equations for redox and nanosignal transduction. *Journal of Theoretical Biology* 226, 65-68.
- Hocheng, H., Chang, J.H., Jadhav, U.U., 2012. Micromachining of various metals by using *Acidithiobacillus ferrooxidans* 13820 culture supernatant experiments. *Journal of Cleaner Production* 20, 180-185.
- Hocheng, H., Jadhav, U., 2015. Process of Biological Machining. A.Y.C. Nee (ed.). *Handbook of Manufacturing Engineering and Technology*. Chapter 47. Springer-Verlag London, 1687-1710.

- Istiyanto, J., Jo Ko, T., Yoon, H.-C., 2010. A study on copper micromachining using microorganisms. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing* 11 (5), 659-664.
- Istiyanto, J., Yeop Kim, M., Jo Ko, T., 2011. Profile characteristics of biomachined copper. *Microelectronic Engineering* 88, 2614-2617.
- Istiyanto, J., Saragih, A.S., Jo Ko, T., 2012. Metal based micro-feature fabrication using microorganisms process. *Microelectronic Engineering* 98, 561-565.
- Jadhav, U.U., Hocheng, H., Weng, W.H., 2013. Innovative use of biologically produced ferric sulphate for machining of copper metal and study of specific metal removal rate and roughness during the process. *Journal of Materials Processing Technology* 213, 1509-1515.
- Johnson, D., Warner, R., Shih, A.J., 2007. Surface roughness and material removal rate in machining using microorganisms. *Journal of Manufacturing Science and Engineering* 123, 223-227.
- Kumada, M., [et al.] 2001. Investigation of fine biomachining of metals by means of microbially influenced corrosion: Differences between steel and copper in metal biomachining using *Thiobacillus ferrooxidans*. *Corrosion Engineering* 50, 585-596.
- Kurosaki, Y., Matsui, M., Nakamura, Y., Murai, K., Kimura, T., 2003. Material processing using microorganisms (an investigation of microbial action on metals). *Corrosion Engineering* 46 (1), 322-330.
- Lambert, F., [et al.] 2015. Copper leaching from waste electric cables by biohydrometallurgy. *Mineral Engineering* 76, 38-46.
- Lazaroff, N., 1997. Mineral leaching, iron precipitation and sulfate requirement for chemolithotrophic iron oxidation. *Studies in Environmental Science* 66, 61-75.
- Lilova, K., Karamanev, D., Flemming, R.L., Karamaneva, T., 2007. Biological oxidation of metallic copper by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnology and Bioengineering* 97, 308-316.
- Liu, J.S., Li, B.M., Zhong D.Y., Xia L.X., Qiu, G.Z. 2007. Preparation of jarosite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* oxidation. *Journal of Central South University of Technology* 14 (5), 623-628.

- Mykytczuk, N.C.S., Trevors, J.T., Ferroni, G.D., Leduc, L.G. 2011. Cytoplasmic membrane response to copper and nickel in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Microbiological Research* 166, 186-206.
- Orell, A., Navarro, C.A., Arancibia, R., Mobarec, J.C., Jerez, C.A., 2010. Life in blue: Copper resistance mechanisms of bacteria and *Archaea* used in industrial biomining of minerals. *Biotechnology Advances* 28, 839-848.
- Rastegar S.O., Mousavi, S.M., Shojaosadati, S.A., Sarraf Mamoori, R., 2015. Bioleaching of V, Ni, and Cu from residual produced in oil fired furnaces using *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 157, 50-59.
- Shikata, S., Sreekumari, K.R., Nandakumar, K., Ozawa, M., Kikuchi, Y., 2009. Laboratory studies on biomachining of copper using *Staphylococcus sp.* *Biofouling* 25 (6), 557-562.
- Suwandi, D., Whulanza, Y., Istiyanto, J., 2014. Visible light maskless photolithography for biomachining application. *Applied Mechanics and Materials* 493, 552-557.
- Uno, Y., Kaneeda, T., Yokomizo, S., 1996. Fundamental study on biomachining (machining of metals by *Thiobacillus ferrooxidans*). *International Journal of the Japan Society of Mechanical Engineers Series C* 39 (4), 837-842.
- Yang, Y., Wang, X., Liu, Y., Wang, S., Wen, W., 2009. Techniques for micromachining using *Thiobacillus ferrooxidans* based on different culture medium. *Applied Mechanics and Materials* 16-19, 153-1057.
- Xiang, Y., [et al.] 2010. Bioleaching of copper from waste printed circuit boards by bacterial consortium enriched from acid mine drainage. *Journal of Hazardous Materials* 184, 812-818.
- Zhang, D., Li, Y., 1998. Possibility of biological micromachining used for metal removal. *Science in China, Series C* 41 (2), 151-156.
- Zhang, D., Li, Y., Chunsheng, W., 1998. Fundamental study on biomachining. *Progress of Cutting and Grinding*, 303-307.
- Zhang, D., Li, Y., 1999. Studies on kinetics and thermodynamics of biomachining pure copper. *Science in China, Series C* 42 (1), 57-62.



CAPITULO 6



BIOMECANIZADO EN MEDIO MAC

6. BIOMECANIZADO EN MEDIO MAC

6.1. Introducción

Como ya se ha visto en el capítulo anterior, los estudios llevados a cabo en el Departamento de Ingeniería Química y del Medio Ambiente de la UPV/EHU sobre el biomecanizado de piezas OFE, se realizaron empleando bacterias del género *Acidithiobacillus*, concretamente *A. ferrooxidans* cultivadas en el medio de cultivo denominado medio 9K.

Para completar el estudio de la influencia del medio en el biomecanizado se llevaron a cabo diversos estudios en colaboración directa con el CINDEFI, del proceso de biomecanizado en un medio de cultivo nuevo, concretamente el medio MAC. Aprovechando la gran variedad de cepas que el grupo de investigación del CINDEFI posee, se decidió también estudiar la posibilidad de emplear otro tipo de bacterias hierro-oxidantes, como son las *S. thermosulfidooxidans*. Si bien esta bacteria ha sido mayormente estudiada y empleada en procesos de biolixiviación (Karavajko et al., 1990; Watling et al., 2008; Pina et al., 2010; Xiong et al., 2015), su uso en el biomecanizado no ha sido hasta la fecha comprobado.

La naturaleza biológica del biomecanizado hace que sea fundamental conocer y entender el metabolismo de las bacterias implicadas en la eliminación del metal de interés, así como conocer las condiciones óptimas de cultivo, puesto que la clave para el buen funcionamiento del proceso tiene como base el buen desarrollo de las bacterias.

Para tal fin, se estudió el crecimiento de las bacterias *A. ferrooxidans* y *S. thermosulfidooxidans* en medio de cultivo MAC bajo diferentes condiciones de pH y concentraciones de hierro. Se pudieron así determinar las condiciones óptimas de crecimiento de ambas bacterias para su posterior aplicación en el proceso de biomecanizado.

Una vez seleccionadas las condiciones óptimas de crecimiento para cada caso, se activaron cultivos de *A. ferrooxidans* y *S. thermosulfidooxidans* bajo dichas condiciones, realizándose posteriormente un proceso de biomecanizado. Así, se pudo comparar los resultados obtenidos con el biomecanizado con *A. ferrooxidans* en medio 9K y ver la tendencia de la tasa de remoción.

En la Figura 6.1 se indica un diagrama del procedimiento seguido para un mejor entendimiento del mismo.

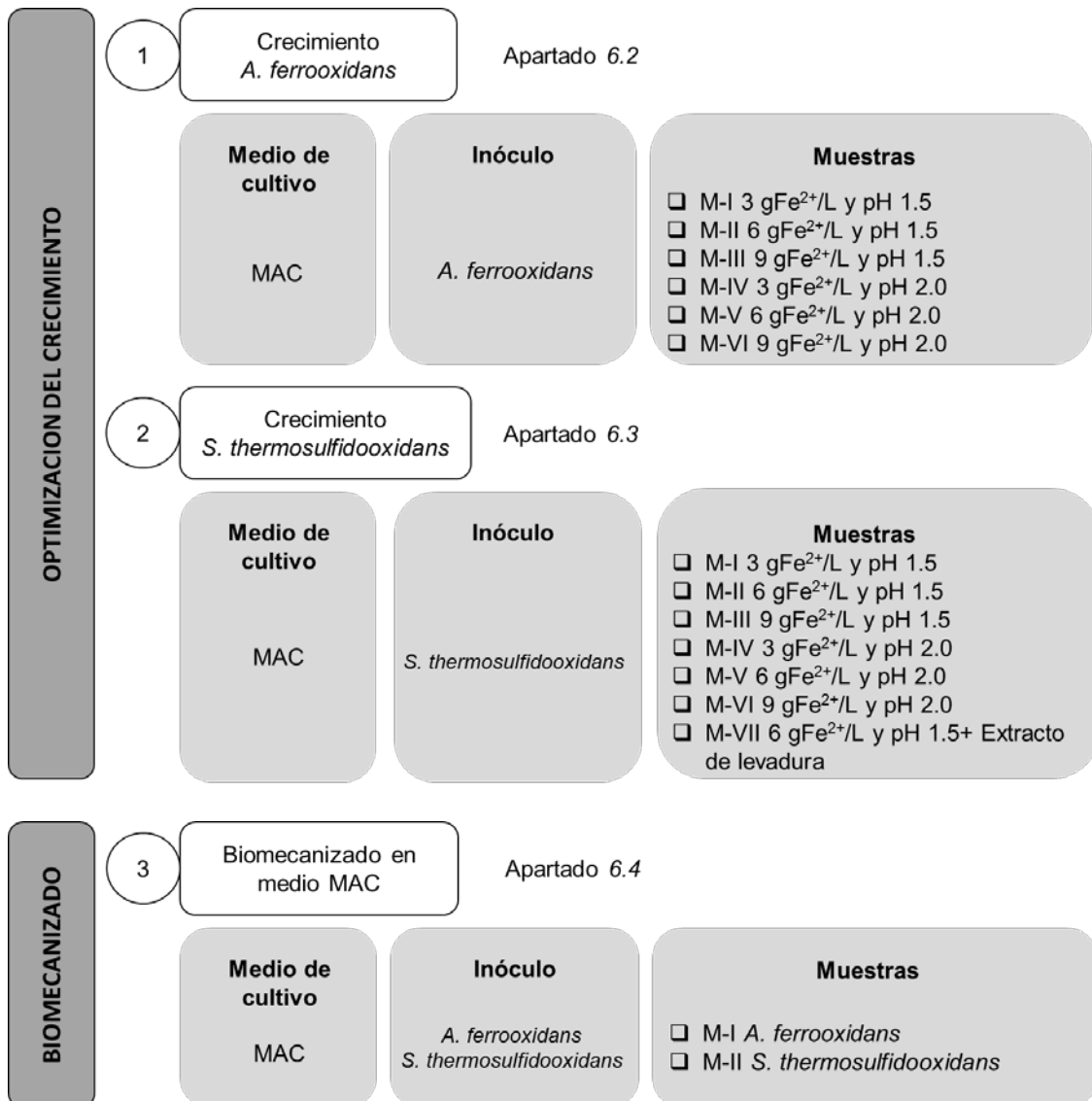


Figura 6.1. Diagrama del proceso.

6.2. Optimización del crecimiento de *A. ferrooxidans*

6.2.1. Desarrollo experimental

El ensayo comenzó por preparar el medio de cultivo para cada una de las muestras objeto de estudio según la metodología indicada en el apartado 3.2.1.2.

Se partió de tres concentraciones de hierro ferroso diferentes, estudiando cada una a pH 1.5 y pH 2.0, resultado un total de 6 muestras (Tabla 6.1). Previo al comienzo de la preparación de los cultivos, fue necesario ajustar el pH del medio MAC al valor que en

cada caso correspondiera. Cada muestra se preparó junto con una muestra estéril (sin bacterias), permitiendo controlar así la oxidación abiótica del hierro ferroso.

Tabla 6.1. Concentración de hierro ferroso y pH de las muestras ensayadas.

Muestra	Concentración Fe ²⁺ (g/L)	pH(-)
M-I	3	1.5
M-II	6	1.5
M-III	9	1.5
M-IV	3	2.0
M-V	6	2.0
M-VI	9	2.0

El volumen de ensayo fue de 150 mL, con un porcentaje del 7% (v/v) de inóculo respecto del volumen final. Las condiciones de ensayo se establecieron en 180 rpm y 30 °C, según se indica en el apartado 3.2.1.2. La concentración de *A. ferrooxidans* inicial rondaba las $1.0 \cdot 10^6$ células/mL determinado según la metodología indicada en el apartado 3.2.3.2.

Durante el periodo de crecimiento, con vistas a poder conocer el estado en el que se encontraban las muestras, se establecieron unos tiempos de análisis en los que se determinaron los parámetros siguientes: concentración de hierro ferroso (ver apartado 3.2.4.2), concentración de bacterias (ver apartado 3.2.3.2), pH y Potencial Redox (ver apartado 3.2.8). Al comienzo y al final del ensayo se realizó la determinación del hierro total para poder verificar la existencia o no de hierro precipitado mediante la metodología indicada en el apartado 3.2.4.3. En puntos intermedios también se tomaron muestras para análisis de FISH y DAPI, siguiendo la metodología indicada en los apartados 3.2.2 y 3.2.3.3 respectivamente.

Según lo establecido en el apartado 3.2.1.2, el ensayo se dio por finalizado cuando se alcanzó en las muestras un Potencial Redox superior a 600.0 mV y la concentración del hierro ferroso presente en el medio fue inferior a 0.05 gFe²⁺/L.

6.2.2. Resultados y discusión

Debido a la diferente concentración de hierro, la duración del periodo de crecimiento fue diferente para cada una de las muestras. La muestra M-I a pH 1.5 se desarrolló por completo tras aproximadamente 26 horas de incubación; mientras que las muestras a mismo pH y concentraciones 6 gFe²⁺/L y 9 gFe²⁺/L (M-II y M-III respectivamente) finalizaron su incubación a las 32 horas y a las 38 horas de haber comenzado el ensayo respectivamente. El pH promedio al finalizar el crecimiento fue de 2.0.

Las muestras de pH 2.0 tuvieron un desarrollo más lento en comparación con las de pH 1.5. Por ejemplo, la muestra de concentración 3 gFe²⁺/L (M-IV) finalizó su crecimiento tras 32 horas de incubación, presentando un pH de 2.4. En cuanto a las muestras M-V y M-VI a pH 2.0, su incubación tuvo que ser detenida a las 38 horas debido a la presencia de precipitado.

En cuanto al Potencial Redox se refiere, tanto a pH 1.5 como a pH 2.0, los valores de este parámetro fueron mayores para las muestras de menor concentración de hierro ferroso, seguidas de las de 6 gFe²⁺/L y 9 gFe²⁺/L. A pH 1.5, la muestra M-I fue la primera en alcanzar el valor de 600.0 mV tras 26 horas de incubación, seguida de la M-II que alcanzó dicho valor tras 32 horas. Finalmente, la M-III logró llegar a 640.0 mV tras 38 horas de incubación (Figura 6.2).

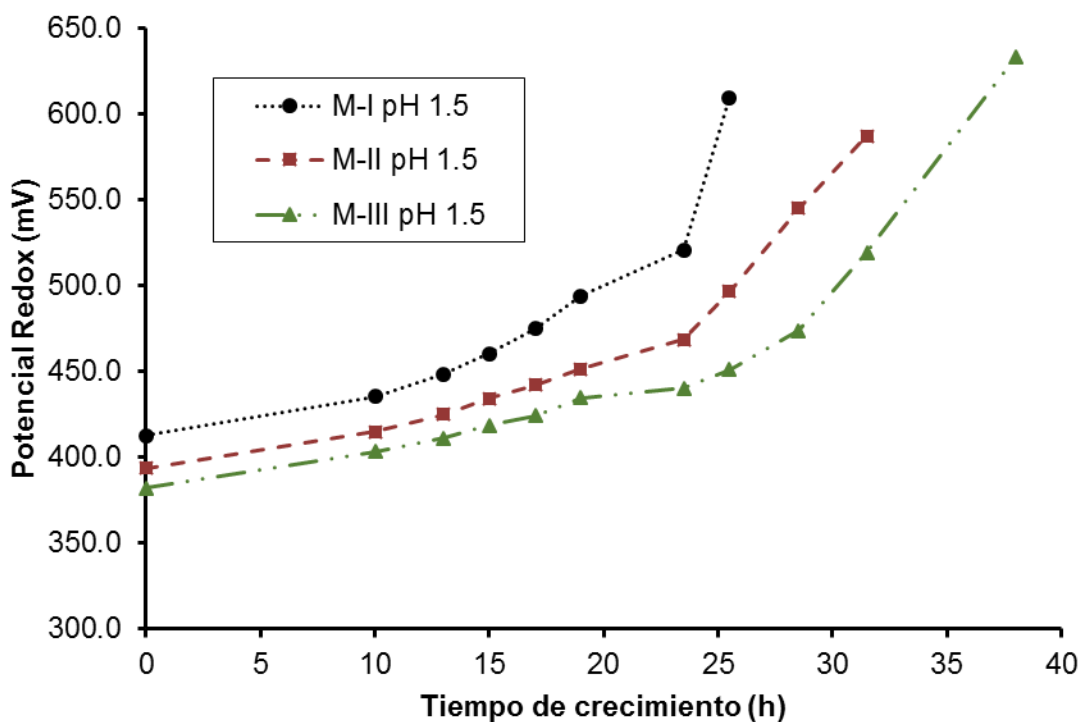


Figura 6.2. Potencial Redox para las muestras de pH 1.5.

Para el caso de pH 2.0, comparando con las de pH 1.5 e igual concentración de hierro, las muestras evolucionaron más lentamente, pero al igual que ocurría a pH 1.5, el valor del Potencial Redox era mayor en las muestras de menor concentración de hierro. Estos resultados se muestran en la Figura 6.3.

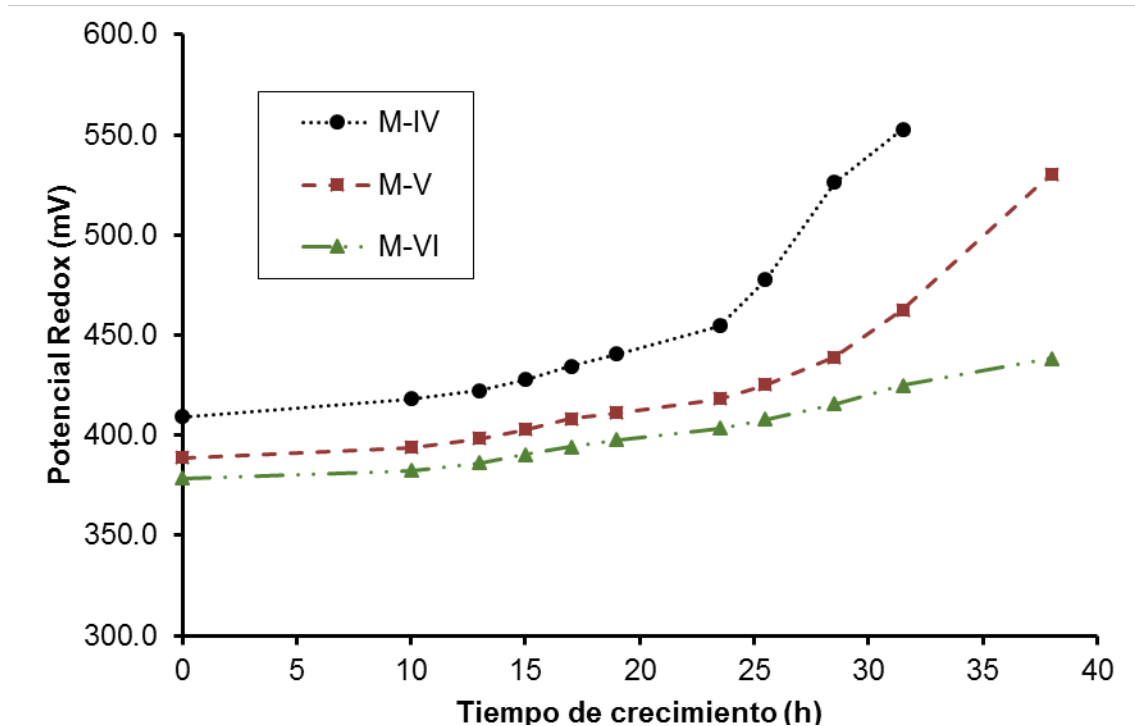


Figura 6.3. Potencial Redox para las muestras de pH 2.0.

La concentración final de las bacterias fue de $5.5 \cdot 10^7$ células/mL, $1.5 \cdot 10^8$ células/mL y $2.0 \cdot 10^8$ células/mL para las muestras M-I, M-II y M-III respectivamente. En el caso de la muestra M-IV fue de $5.8 \cdot 10^7$ células/mL. Los resultados se muestran en la Figura 6.4, a excepción de los de pH 2.0 y concentración de $6 \text{ gFe}^{2+}/\text{L}$ y $9 \text{ gFe}^{2+}/\text{L}$ (M-V y M-VI), ya que al no haber finalizado correctamente su crecimiento no se tomó muestra para el análisis de concentración de bacterias.

Como se puede observar, todas las muestras evolucionaron paralelamente hasta la décima hora de ensayo. A partir de ese momento, las muestras de mayor concentración de hierro, M-II y M-III, tuvieron un crecimiento mayor en comparación con las muestras M-I y M-IV. Las muestras de concentración $3 \text{ gFe}^{2+}/\text{L}$ a ambos pH (M-I y M-IV) tuvieron una evolución bastante parecida en la concentración de bacterias.

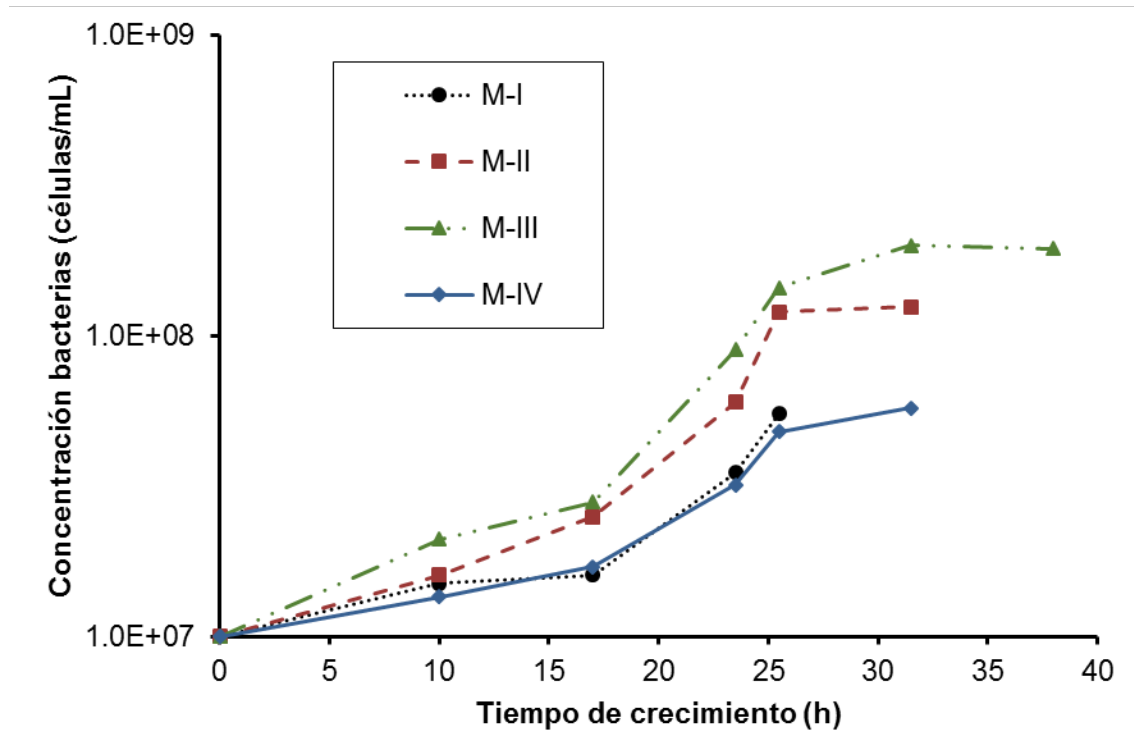


Figura 6.4. Concentración de bacterias para algunas de las muestras.

Las muestras M-I y M-IV presentaron una fase exponencial entre los tiempos 10 horas y 23 horas aproximadamente. La fase exponencial de las muestras M-II y M-III estaban situadas entre la hora 10 y la hora 25 y la hora 10 y la hora 31 respectivamente.

La Figura 6.5 muestra las imágenes obtenidas de DAPI tras 18 horas de ensayo para las muestras de pH 1.5 y concentración de 3 gFe²⁺/L (Figura 6.5a), 6 gFe²⁺/L (Figura 6.5b) y 9 gFe²⁺/L (Figura 6.5c). En la misma se puede observar, que si bien hubo una gran diferencia en la concentración de *A. ferrooxidans* de la muestra M-I, entre las muestras M-II y M-III dicha diferencia no fue apreciable, siendo coincidente con los resultados de la determinación de bacterias realizada mediante cámara de Neubauer (Figura 6.4).

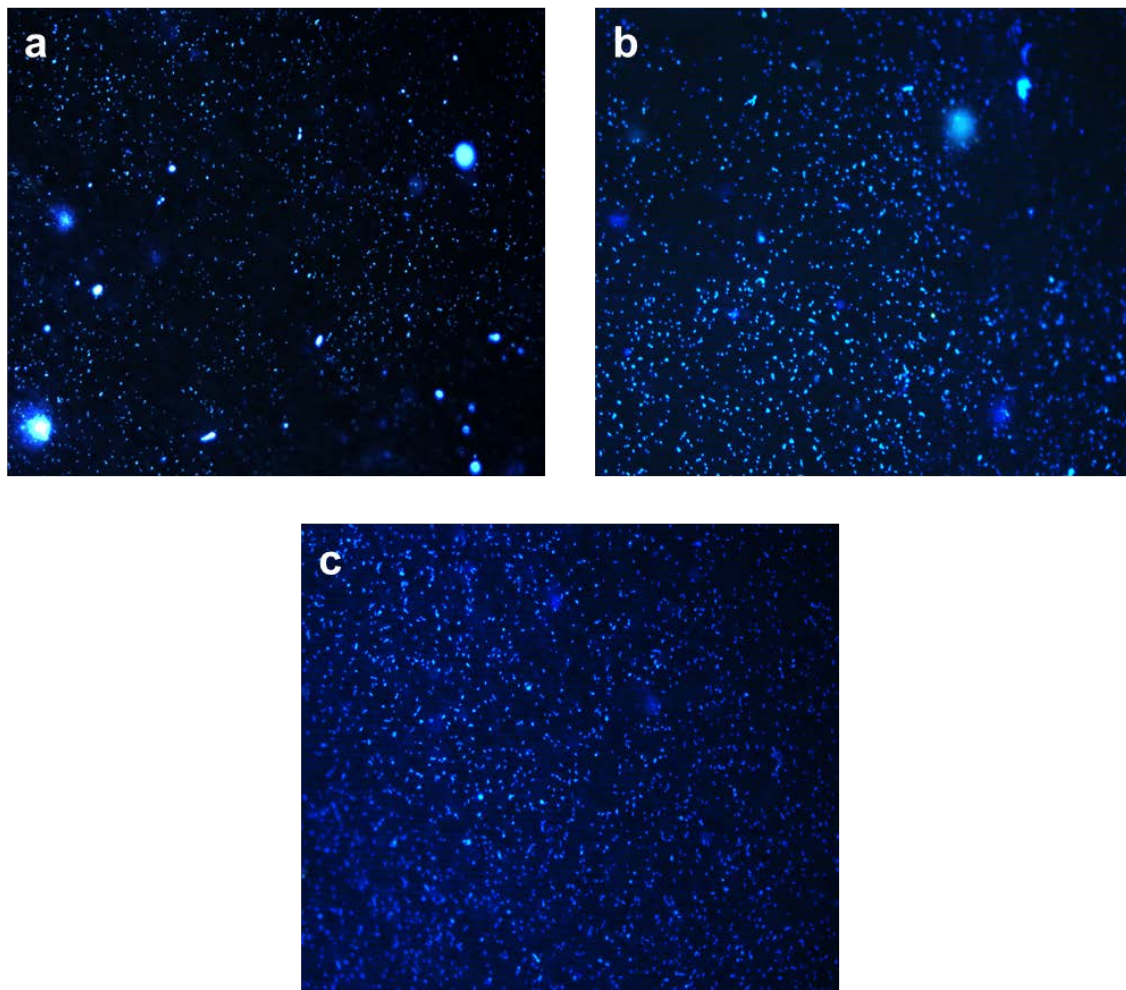


Figura 6.5. Resultados de DAPI para las muestras de pH 1.5 tras 18 horas de crecimiento, a) M-I, b) M-II, c) M-III.

De igual manera, el DAPI realizado a las muestras de pH 1.5 una vez finalizado su crecimiento (Figura 6.6), fue coincidente con los resultados del conteo realizado en cámara de Neubauer (Figura 6.4), siendo mayor la concentración a mayor concentración de hierro ferroso.

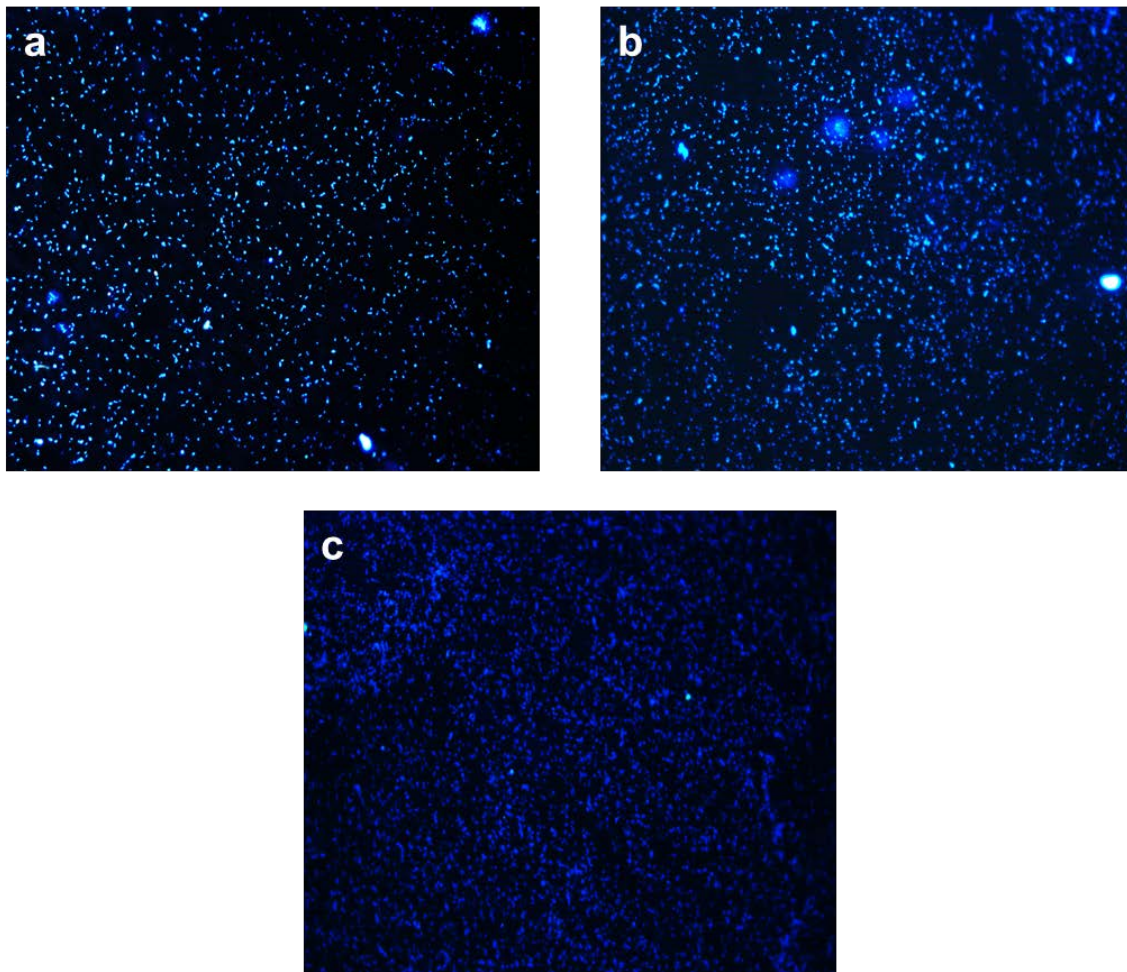


Figura 6.6. Resultados de DAPI para las muestras de pH 1.5 al finalizar el crecimiento, a) M-I, b) M-II y c) M-III.

La Figura 6.7 muestra el resultado de FISH para una de las muestras de *A. ferrooxidans*, observándose que sí hibridó con la sonda TF 539, constatando lo que ya se sabía, que el cultivo correspondía a una comunidad pura de *A. ferrooxidans*.

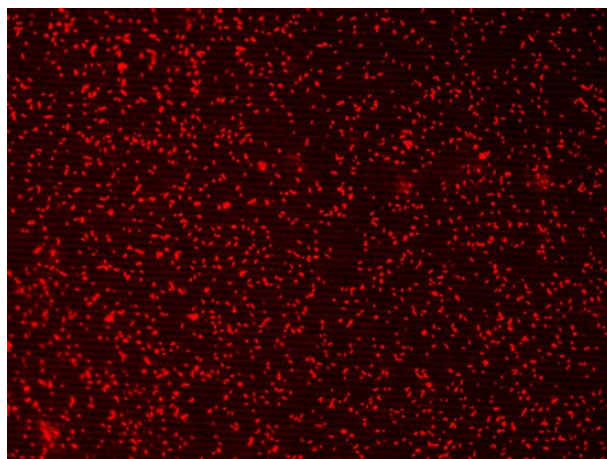


Figura 6.7. Resultados de FISH para una de las muestras de *A. ferrooxidans*.

En el caso de las muestras de pH 1.5, la oxidación del hierro ferroso fue casi total, quedando únicamente el 0.8%, el 0.6% y el 1% del hierro ferroso presente inicialmente sin oxidar para las muestras M-I, M-II y M-III respectivamente tras finalizar su crecimiento (Figura 6.8).

Para pH 2.0, las muestras M-IV y M-V también presentaron una oxidación casi completa (99% para el primer caso y 98% para el segundo caso), mientras que en la muestra de mayor concentración de hierro quedaba aún más del 20% de hierro ferroso por oxidar tras 38 horas de incubación (no se muestran los datos).

Respecto de las muestras estériles, la concentración de hierro ferroso se mantuvo prácticamente invariable (no se muestran los datos).

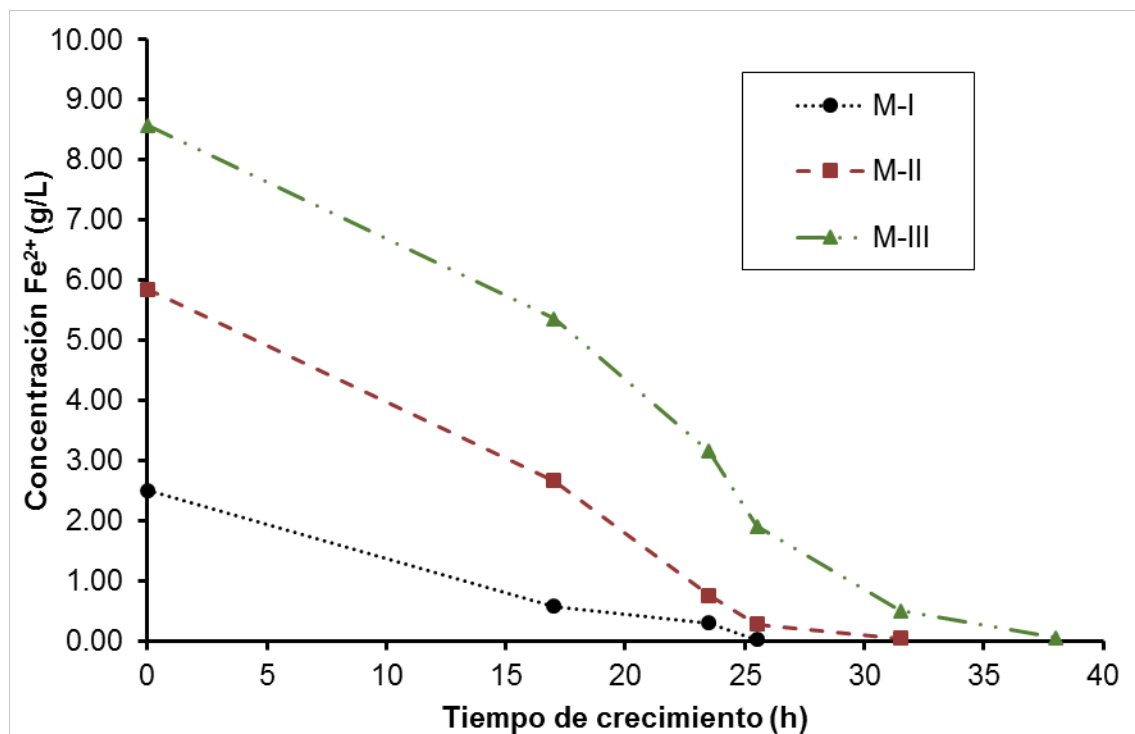


Figura 6.8. Concentración de hierro ferroso para las muestras de pH 1.5.

En comparación con el crecimiento de *A. ferrooxidans* en medio 9K para pH 1.8 y concentración 6 gFe²⁺/L, el crecimiento de la bacteria en medio MAC resultó ser más rápido para la misma concentración de hierro. Si bien como se ha podido observar en el apartado 5.2.1 la muestra en medio 9K inoculada con un 6% (v/v) de inóculo respecto del volumen final se desarrolló por completo tras 71 horas, en medio MAC el crecimiento terminó tras 32 horas siendo la proporción del inóculo del 7% (v/v). Se debe tener en cuenta que tanto el crecimiento en medio 9K como el crecimiento en medio MAC se realizaron bajo diferentes condiciones de agitación (150 rpm y 180 rpm respectivamente) y a un pH de partida diferente (1.8 y 1.5 respectivamente), lo cual

podría haber beneficiado al desarrollo de las bacterias en el medio MAC, aunque no se creyó que esto fuese un factor determinante en la diferencia de tiempos obtenidos. Si pudo haber influido la concentración inicial de bacterias, cercana a $1.0 \cdot 10^6$ células/mL en el medio MAC, pero desconocida en el caso del medio 9K.

Tras el análisis de todos los parámetros determinantes en la etapa de crecimiento, se optó por definir las condiciones de crecimiento óptimas de *A. ferrooxidans* en medio MAC a pH 1.5 y concentración 6 gFe²⁺/L. La razón fue doble. Trabajando a ese pH, la presencia de precipitados al finalizar el crecimiento sería inexistente. La otra razón reside en la buena relación tiempo de crecimiento-tasa de remoción en biomecanizado. Si bien una concentración menor conllevaría un menor tiempo de crecimiento, la tasa de remoción alcanzada durante el periodo de biomecanizado sería menor también (en base a los resultados obtenidos en el apartado 5.3.2.1 para *A. ferrooxidans* en medio 9K); y una concentración mayor, supondría una mayor tasa de remoción a expensas de un mayor tiempo de crecimiento. Por tanto, el trabajar con 6 gFe²⁺/L aúna tiempos de crecimiento y tasas de remoción razonables.

Estos resultados difieren con los obtenidos por Kumada et al. (2001), que si bien ellos estudiaron el crecimiento de *A. ferrooxidans* en medio 9K, indicaron que el mejor crecimiento se daba a pH 2.5, con una mayor concentración de bacterias y un menor tiempo de cultivo en comparación con el resto de pH estudiados, entre un rango de 1.5 y 3.0.

6.3. Optimización del crecimiento de *S. thermosulfidooxidans*

6.3.1. Desarrollo experimental

Para el segundo tipo de bacterias seleccionado, e igual que para el caso de *A. ferrooxidans*, se estudiaron 2 condiciones de pH (1.5 y 2.0) y tres concentraciones de hierro ferroso, concretamente 3 gFe²⁺/L, 6 gFe²⁺/L y 9 gFe²⁺/L, con un total de 6 muestras (Tabla 6.2). Los ensayos se realizaron con una muestra estéril para cada condición que sería el indicativo de la oxidación abiótica. Las muestras se prepararon según la metodología indicada en el apartado 3.2.1.2.

En este caso, se decidió estudiar una séptima condición, a pH 1.5 y 6 gFe²⁺/L adicionando 300 µL de extracto de levadura estéril (Chamberland®) al 10% (p/v) (M-VII) (Tabla 6.2). Si bien esta condición difería de las condiciones de cultivo de *A. ferrooxidans* en medio MAC, se creyó conveniente estudiarla debido a que en casi toda la bibliografía consultada se indica la necesidad de tener que crecer este tipo de microorganismos con una fuente de carbono adicional (Watling et al., 2008; Pina et al., 2010; Xiong et al., 2015).

Tabla 6.2. Concentración de hierro ferroso y pH de las muestras ensayadas.

Muestra	Concentración Fe ²⁺ (g/L)	pH(-)
M-I	3	1.5
M-II	6	1.5
M-III	9	1.5
M-IV	3	2.0
M-V	6	2.0
M-VI	9	2.0
M-VII (Extrato levadura)	6	1.5

Los volúmenes ensayados fueron de 150 mL, con un porcentaje del 10% (v/v) de inóculo respecto del volumen final. Las condiciones de ensayo se establecieron en 180 rpm y 45 °C, según lo indicado en el apartado 3.2.1.2. La concentración de *S. thermosulfidooxidans* inicial rondaba las 1.0·10⁵ células/mL, obtenida según la metodología indicada en el apartado 3.2.3.2.

Para poder conocer el estado en el que se encontraban las muestras, los parámetros de seguimiento, como en el caso de *A. ferrooxidans*, fueron concentración de hierro ferroso (ver apartado 3.2.4.2), concentración de bacterias (ver apartado 3.2.3.2), pH y Potencial Redox (ver apartado 3.2.8). Al comienzo y al final del ensayo se realizó la determinación del hierro total para poder verificar la existencia o no de hierro precipitado mediante la metodología indicada en el apartado 3.2.4.3. Debido a que el ensayo se realizó a una temperatura elevada, periódicamente se pesaron las muestras para poder determinar la pérdida de peso debido a la evaporación y adicionar agua destilada estéril en caso de ser necesario. En puntos intermedios también se tomaron muestras para análisis de FISH y DAPI, siguiendo la metodología indicada en los apartados 3.2.2 y 3.2.3.3 respectivamente.

Según lo establecido en el apartado 3.2.1.2, el ensayo se dio por finalizado cuando se alcanzó un Potencial Redox superior a 600.0 mV en cualquiera de las muestras y la concentración de hierro ferroso presente en el medio fue inferior a 0.05 gFe²⁺/L.

6.3.2. Resultados y discusión

La muestra con extracto de levadura a pH 1.5 y concentración de 6 gFe²⁺/L (M-VII) fue la primera en desarrollarse por completo, llegando a tener el aspecto habitual indicativo de la completa oxidación del hierro ferroso tal y como se muestra en la Figura 6.9, donde también se indica el estado en el que se encontraba la muestra análoga pero sin extracto de levadura. Su crecimiento se dio por finalizado transcurridas 86 horas.

Con el resto de las muestras se continuó el ensayo hasta alcanzar un total de 315 horas. Al observar que no se había dado el desarrollo completo en ninguna de ellas aun habiendo casi cuadruplicado el tiempo de crecimiento de la muestra con extracto de levadura, se decidió finalizar el ensayo. La muestra M-VI tuvo que ser descartada previamente, aproximadamente a las 200 horas de ensayo, debido a la abundante presencia de precipitado que se podía observar en la misma.

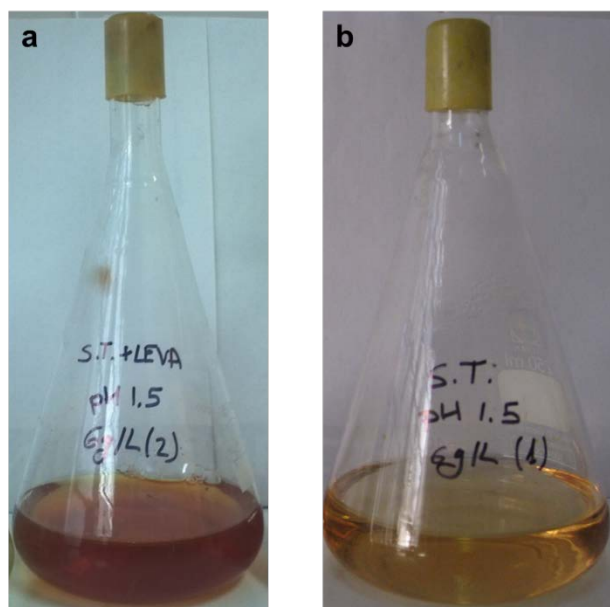


Figura 6.9. a) Estado de la muestra M-VII tras 86 horas de crecimiento; b) Estado de la muestra M-II tras 86 horas de crecimiento.

Comparando los valores obtenidos de Potencial Redox a lo largo del ensayo, la muestra a la que se le adicionó extracto de levadura alcanzó el valor de 600.0 mV tras 86 horas de incubación (Figura 6.10). El valor del pH en ese instante fue de 2.1.

El resto de muestras, tanto las de pH 1.5 como las de pH 2.0, tuvieron una evolución más lenta en comparación con la anterior, llegando casi todas a los 420.0 mV tras las 315 horas de incubación, siendo algo más alto el valor del Potencial Redox en la muestras de pH 1.5 que para las de pH 2.0 si se compara las muestras de una misma concentración de hierro (los resultados para pH 2.0 no se muestran en la Figura 6.10). En el caso de las muestras de pH 1.5, la tendencia del Potencial Redox para las muestras de diferente concentración de hierro fue similar según se puede observar en la Figura 6.10.

En cuanto al pH, las muestras de pH 1.5 presentaron un valor promedio de 1.9 tras 315 horas y las de pH 2.0 un promedio de 2.2.

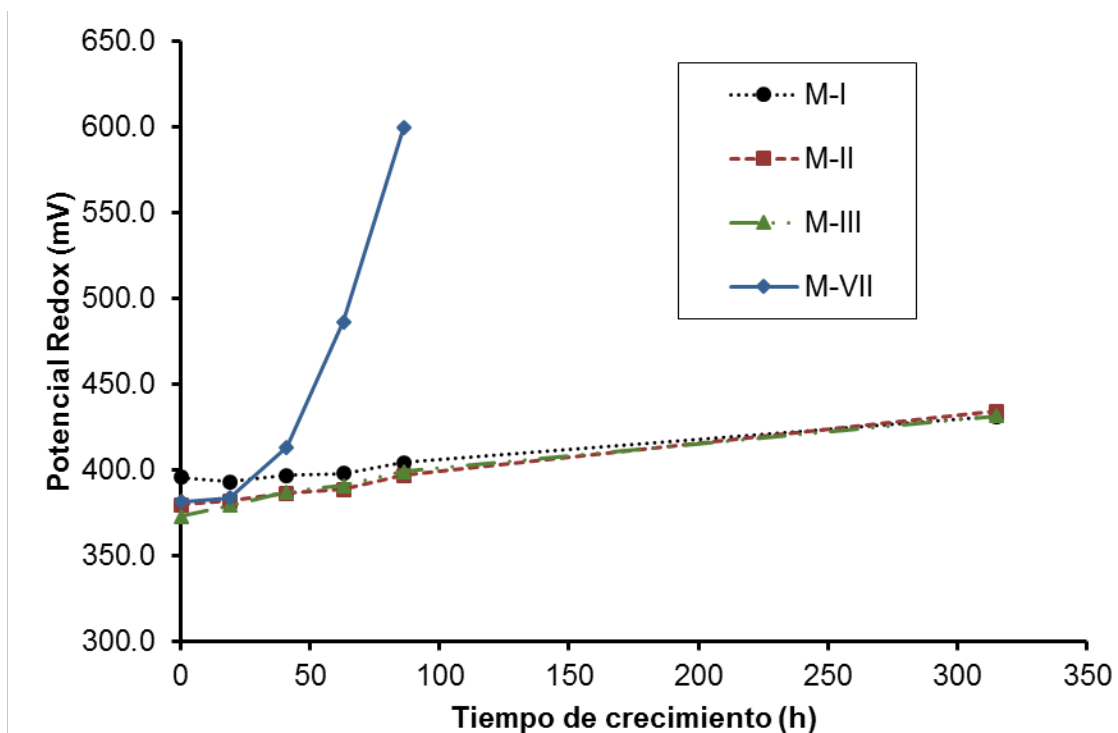


Figura 6.10. Potencial Redox para las muestras de pH 1.5.

En cuanto a la concentración de bacterias se refiere, la muestra con extracto de levadura (M-VII) fue la única que presentó un buen crecimiento de bacterias, alcanzando un valor superior a $2.0 \cdot 10^7$ células/mL tras 86 horas de incubación. El resto de muestras de pH 1.5, tuvieron un crecimiento más lento, no superando las $1.0 \cdot 10^7$ células/mL tras 315 horas de incubación. Estos resultados se muestran en la Figura 6.11. En el mismo se puede observar la fase exponencial y fase estacionaria típica del crecimiento de bacterias para la muestra M-VII, estando la primera comprendida entre las horas 19 y 63 del crecimiento.

Para las muestras M-I, M-II y M-III de pH 1.5, no existió diferencia apreciable en el crecimiento de bacterias, evolucionando prácticamente de manera semejante, dándose este comportamiento también para las muestras de pH 2.0 (resultados en Figura 6.11 sólo para pH 1.5).

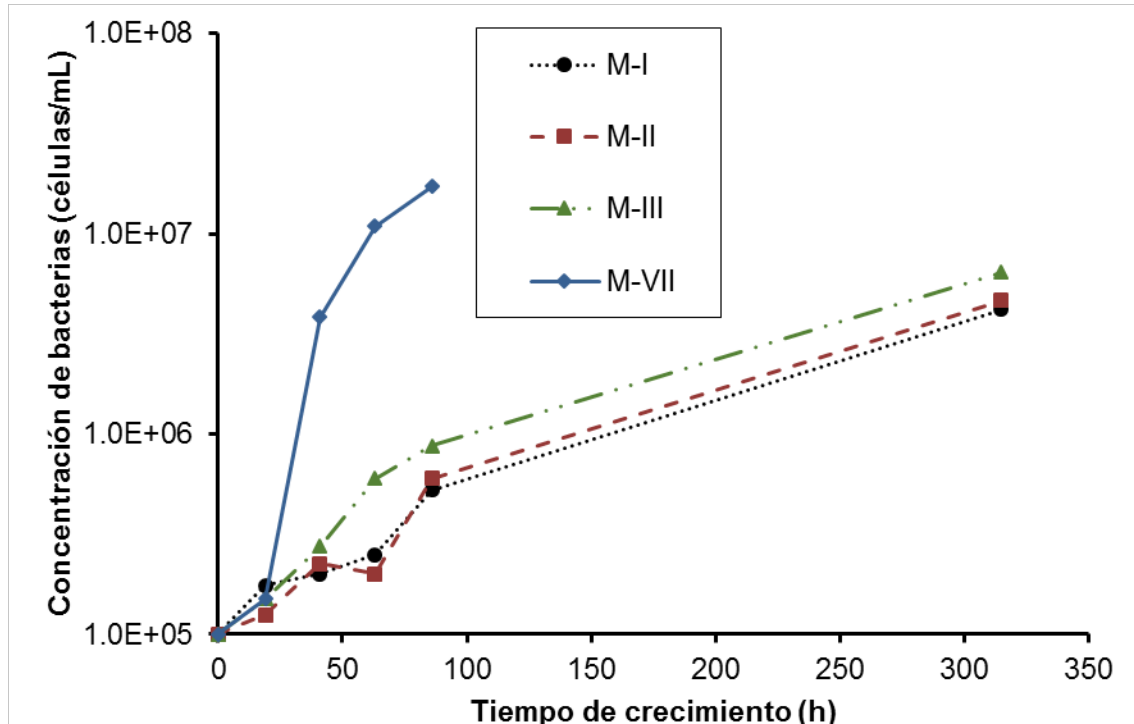


Figura 6.11. Concentración de bacterias para las muestras de pH 1.5.

De los resultados del DAPI, se evidenció cómo la presencia del extracto de levadura favoreció un crecimiento más rápido (Figura 6.12). Tanto en la fase exponencial (Figura 6.12a y Figura 6.12b) como en la fase estacionaria (Figura 6.12c y Figura 6.12d), la muestra M-VII presentó una mayor concentración de bacterias, así como un tamaño mayor de las mismas en comparación con la muestra M-II.

Los resultados obtenidos coincidieron con los obtenidos en el conteo mediante cámara de Neubauer, que para la hora 41 y la hora 86 indicaban una clara diferencia en la concentración de bacterias en las muestras de 6 gFe²⁺/L con extracto de levadura (M-VII) y sin extracto de levadura (M-II) (Figura 6.11).

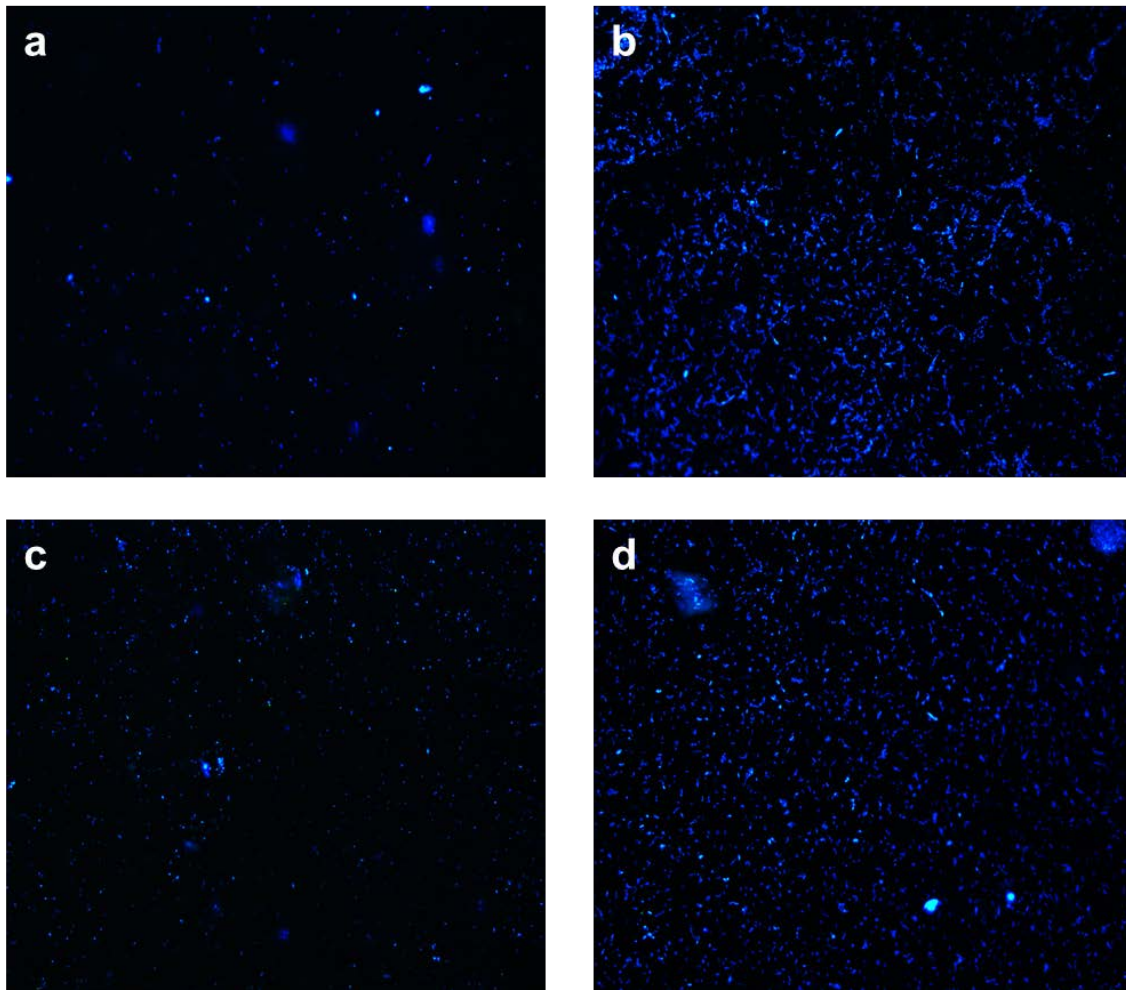


Figura 6.12. Resultados de DAPI para las muestras de pH 1.5 y concentración de $6 \text{ gFe}^{2+}/\text{L}$, a) M-II en la fase exponencial tras 41 horas de crecimiento, b) M-VII en la fase exponencial tras 41 horas de crecimiento, c) M-II en la fase estacionaria tras 86 horas de crecimiento, d) M-VII en la fase estacionaria tras 86 horas de crecimiento.

La Figura 6.13 muestra el resultado de FISH para una de las muestras de *S. thermosulfidooxidans*, observándose que sí hibridó con la sonda SUL 228, constatando lo que ya se sabía, que el cultivo correspondía a una comunidad pura de *Sulfobacillus*. A diferencia del caso de *A. ferrooxidans*, con el cultivo de *S. thermosulfidooxidans* sólo pudo verificarse el género de la cepa, no la especie, debido a que la especificidad de la sonda SUL 229 era menor que la de TF 539 empleada para el caso de *A. ferrooxidans*.

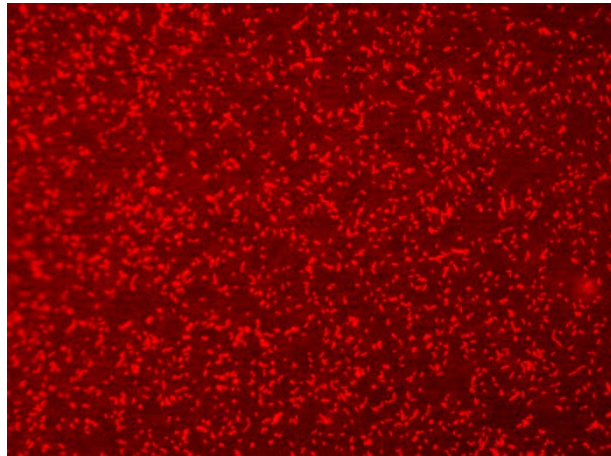


Figura 6.13. Resultados de FISH para una de las muestras de *S. thermosulfidooxidans*.

En cuanto al hierro ferroso inicial presente en el medio, éste se redujo hasta prácticamente el 1% en la muestra M-VII, llegando a presentar un valor de 0.11 g/L tras 86 horas de incubación.

Para las muestras de pH 1.5 la disminución ocurrió casi de manera paralela en las muestras M-I, M-II y M-III, tal y como se puede apreciar en los Figura 6.14. En todas ellas, la cantidad final de hierro ferroso presente en el medio rondaba el 40-60% de la cantidad inicial, produciéndose por tanto únicamente la oxidación de la mitad del hierro en el mejor de los casos. El mismo comportamiento mostraron las muestras de pH 2.0 (no se muestran los resultados).

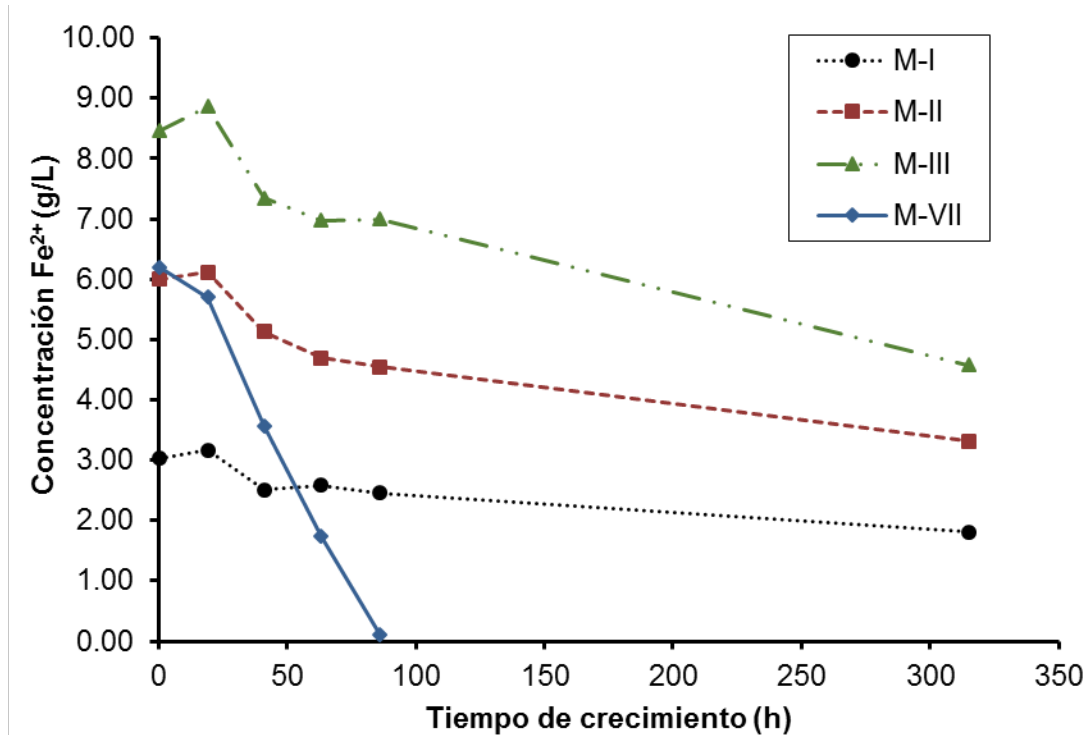


Figura 6.14. Concentración de hierro ferroso para las muestras de pH 1.5.

En cuanto a los estériles, tanto a pH 1.5 como a pH 2.0, la oxidación fue menor en comparación con la oxidación biótica del hierro ferroso, manteniéndose prácticamente invariable la concentración del hierro ferroso en las mismas (no se muestran los datos).

Tras el análisis de todos los parámetros determinantes en la etapa de crecimiento, sin duda alguna, la condición óptima de crecimiento de la bacteria *S. thermosulfidooxidans* en medio MAC fue la de pH 1.5 y concentración 6 gFe²⁺/L con extracto de levadura.

Si bien no se estudiaron muestras de pH 2.0 con extracto de levadura, ni muestras de concentración 3 gFe²⁺/L ni tampoco de concentración 9 gFe²⁺/L con extracto de levadura, se estimó que la de concentración 6 gFe²⁺/L seguiría siendo la mejor opción. Un pH mayor conllevaría el riesgo de precipitación del hierro, una concentración menor (como lo es la de 3 gFe²⁺/L) llevaría una menor tasa de remoción durante el periodo de biomecanizado (en base a los resultados obtenidos en el apartado 5.3.2.1 para *A. ferrooxidans* en medio 9K) y una concentración mayor (9 gFe²⁺/L) conllevaría un aumento en los tiempos de crecimiento.

6.4. Biomecanizado en medio MAC

6.4.1. Desarrollo experimental

Para la condición del conjunto pH y concentración de hierro seleccionada como óptima para cada una de las bacterias estudiadas en los apartados 6.2 y 6.3 se creció un cultivo según la metodología indicada en el apartado 3.2.1.2.

Finalizado el periodo de crecimiento, comenzó el ensayo de biomecanizado para la muestra con *A. ferrooxidans* (M-I) y para la muestra con *S. thermosulfidooxidans* (M-II), según la metodología indicada en el apartado 3.2.5.

6.4.2. Resultados y discusión

La tendencia de la tasa de remoción de cobre en las primeras horas de biomecanizado tanto para la muestra M-I como para M-II fue prácticamente igual a la que se obtuvo en el ensayo de *A. ferrooxidans* en medio 9K (ver apartado 5.3.1), presentando un valor máximo en la primera hora y descendiendo a continuación a medida que aumentó el tiempo de biomecanizado.

El valor de la tasa tras la primera hora de remoción fue cercano a los 120.0 mg/h en la muestra M-II, siendo superior tanto a la tasa registrada en la primera hora en medio 9K para *A. ferrooxidans* con concentración de 6 gFe²⁺/L, como a la tasa registrada en la primera hora en medio MAC para la muestra M-I (Figura 6.15). Esta diferencia podría estar relacionada con el efecto superficial del proceso estudiado en el apartado 5.3.2.2, si bien se procuró que la selección de las probetas a ensayar fuera la adecuada para poder minimizar dicho efecto. En la Figura 6.16 se muestran los resultados del análisis de hierro ferroso a lo largo del ensayo de biomecanizado para cada caso.

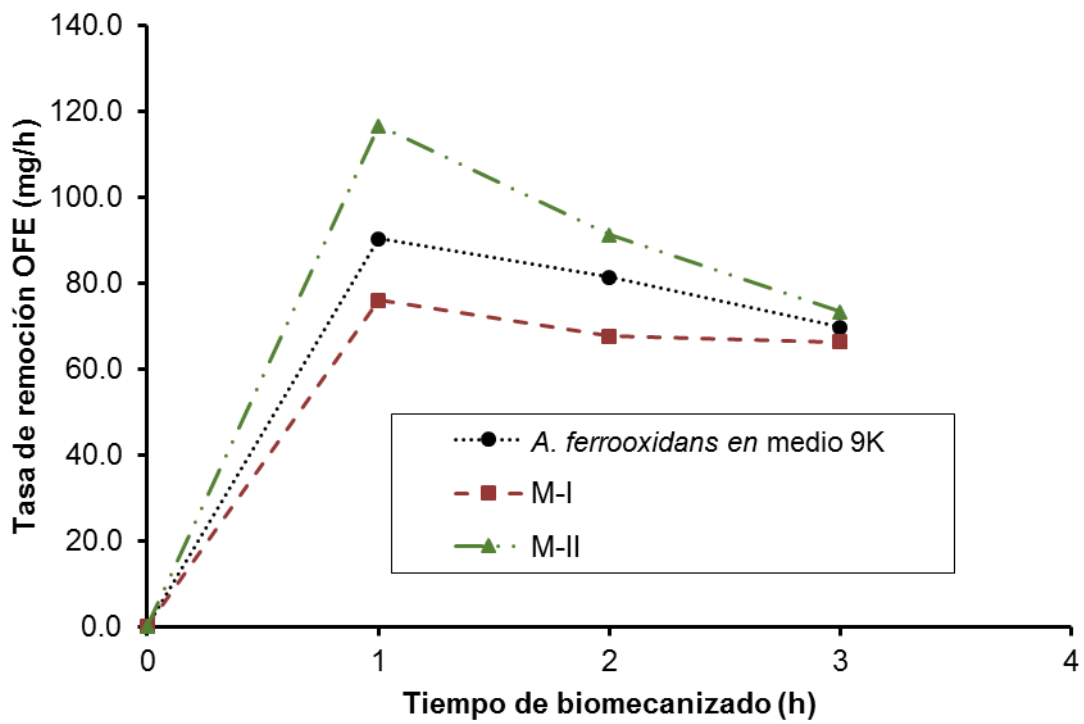


Figura 6.15. Tasa de remoción para el proceso de biomecanizado en medio 9K con *A. ferrooxidans* y en medio MAC para las muestras M-I y M-II.

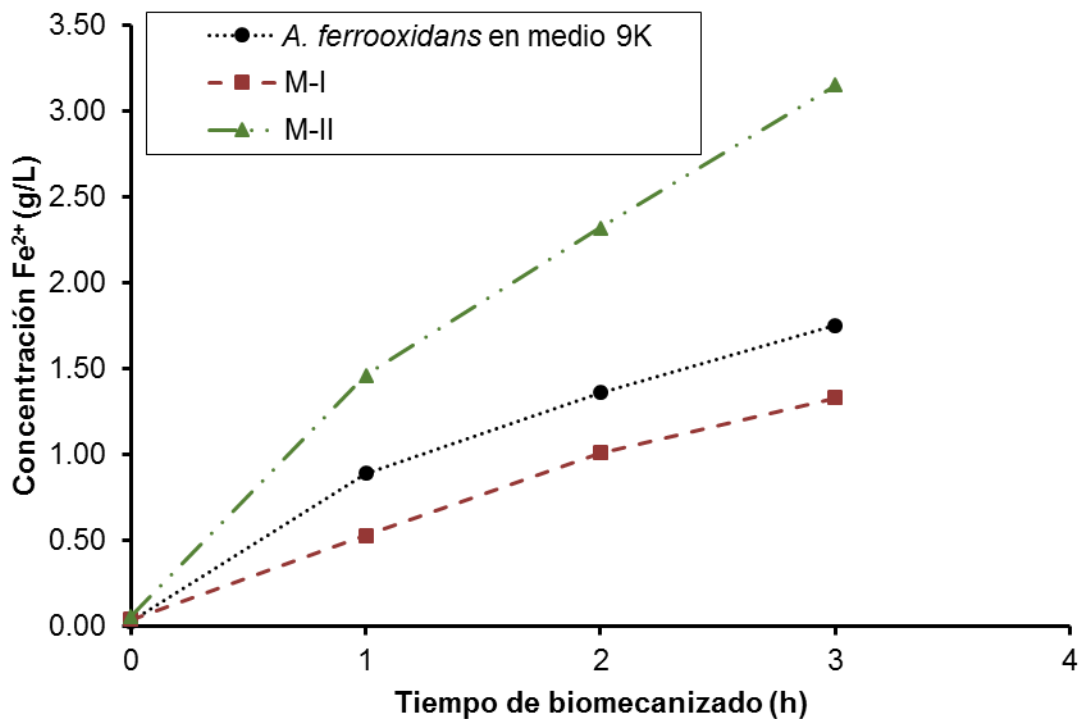


Figura 6.16. Concentración de hierro ferroso para el proceso de biomecanizado en medio 9K con *A. ferrooxidans* y en medio MAC para las muestras M-I y M-II.

El Potencial Redox también presentó un comportamiento similar para ambos casos estudiados al obtenido en el biomecanizado en medio 9K. Tras la primera hora de biomecanizado, descendió considerablemente hasta llegar por debajo de los 500.0 mV, disminuyendo a continuación pero de manera más paulatina. Estos resultados se pueden observar en la Figura 6.17.

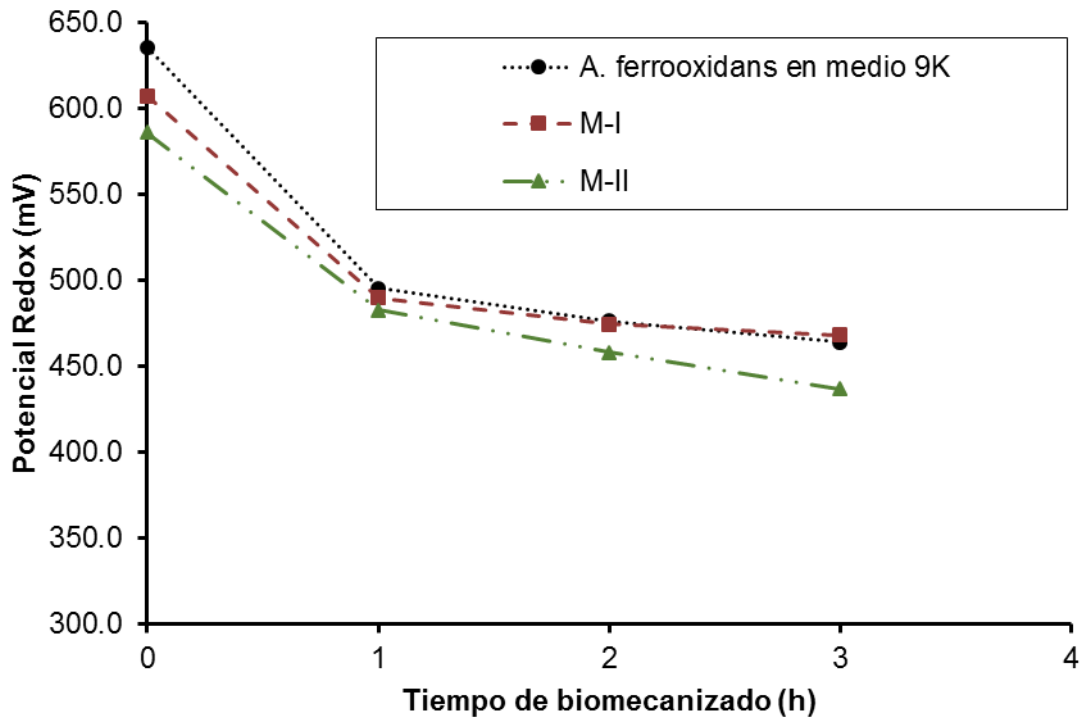


Figura 6.17. Potencial Redox para el proceso de biomecanizado en medio 9K con *A. ferrooxidans* y en medio MAC para las muestras M-I y M-II.

6.5. Conclusiones

El estudio del crecimiento tanto de la bacteria *A. ferrooxidans* como de la bacteria *S. thermosulfidooxidans* en medio MAC bajo diferentes condiciones de pH y concentración de hierro, permitió seleccionar las condiciones óptimas de crecimiento, en base a las cuales se desarrollaron los ensayos posteriores.

En cuanto a la bacteria *A. ferrooxidans*, debido a la presencia de precipitado en las muestras de pH 2.0 así como su crecimiento más tardío en comparación con las de pH 1.5, se seleccionaron un pH de 1.5 y una concentración inicial de hierro ferroso de 6 gFe²⁺/L como condiciones óptimas de crecimiento, asegurando así una tasa de remoción moderada en los ensayos de biomecanizado, así como un tiempo de crecimiento no excesivo.

Para el caso de la bacteria *S. thermosulfidooxidans* se vio la necesidad de añadir extracto de levadura a la muestra para que el crecimiento se diera en tiempos razonables. Así pues, las condiciones establecidas como óptimas para el crecimiento de esta bacteria en medio MAC fueron: pH 1.5 y 6 gFe²⁺/L de concentración de hierro con extracto de levadura. El trabajar con una concentración de hierro de 6 gFe²⁺/L permitiría de nuevo, al igual que con las *A. ferrooxidans*, obtener una buena relación tiempo de crecimiento-tasa de remoción en biomecanizado.

En cuanto al biomecanizado se refiere, en los dos casos estudiados, el comportamiento de la tasa de remoción fue idéntica a la obtenida en medio 9K con *A. ferrooxidans*. Si bien para el caso de 6 gFe²⁺/L la tasa de remoción de cobre obtenida tras la primera hora de biomecanizado fue mayor en el caso de *S. thermosulfidooxidans*, en ambos casos tras el máximo alcanzado en la primera hora de ensayo, se produjo una reducción de la tasa de remoción a medida que aumentabó el tiempo de biomecanizado.

6.6. Referencias

- Karavajko, G.I., Bulygina, E.S., Tsaplina, I.A., Bogdanova, T.I., Chumakov, K.M., 1990. *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*: A new lineage of bacterial evolution?. Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division) 261 (1), 8-10.
- Kumada, M., [et al.] 2001. Investigation of fine biomachinig of metals by means of microbially infuenced corrosión: Differences between steel and copper in metal biomachining using *Thiobacillus ferrooxidans*. Corrosion Engineering 50, 585-596.
- Pina, P.S., Oliveira, V.A., Cruz, F.L.S, Leão, V.A., 2010. Kinetics of ferrous iron oxidation by *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. Biochemical Engineeering Journal 51, 194-197.
- Uno, Y., Kaneeda, T., Yokomizo, S., 1996. Fundamental study on biomachining (Machining of metals by *Thiobacillus ferrooxidans*). International Journal of the Japan Society of Mechanical Engineers, Series C 39 (4), 837-842.
- Watling, H.R., Perrot, F.A., Shiers, D.W., 2008. Comparison of selected characteristics of *Sulfobacillus* species and review of their occurrence in acidic and bioleaching environments. Hydrometallurgy 93, 57-65.

- Xiong, X.X., Gu, G.H., Ban, J.R., Li, S.K., 2015. Biobleaching and electrochemical property of marmatite by *Sulfobacillus thermosulfodioxidans*. Transactions of Nonferrous Metals Society of China 25, 3103-3110.
- Yang, Y., Wang, X., Liu, Y., Wang, S., Wen, W., 2009. Techniques for micromachining using *Thiobacillus ferrooxidans* based on different culture medium. Applied Mechanics and Materials 16-19, 1053-1057.



CAPITULO 7



BIOMECANIZADO EN CONTINUO

7. BIOMECANIZADO EN CONTINUO

7.1. Introducción

Es bien sabido, que para que una empresa se mantenga en el mercado de la fabricación debe hacer frente a sus competidores. La clave para poder cumplir con ese objetivo es poder contar con un proceso continuo a la vez que controlado y fiable. Sin embargo, hasta la fecha no se ha dedicado tiempo a orientar el biomecanizado hacia tales retos.

En apartados anteriores (5.3.1 y 6.3), se ha podido observar que la tasa de remoción se comportó de igual manera durante el proceso de biomecanizado en medio 9K y en medio MAC tanto para *A. ferrooxidans* como para *S. thermosulfidooxidans*. En todos los casos estudiados, se obtuvo una tasa de remoción máxima en el primer periodo de tiempo de ensayo, descendiendo a continuación a medida que avanzaba el tiempo de biomecanizado. En el apartado 2.4 del Capítulo 2 se han mencionado autores que intentaron justificar dicho comportamiento, siendo diversas las razones aportadas (Kumada et al., 2001; Johnson et al., 2007; Chang et al., 2008; Istiyanto et al., 2010).

Así pues, se decidió trabajar para obtener un proceso en el que dicha tasa se mantuviera constante, realizando una serie de ensayos con el fin de encontrar el factor que afectara a la discontinuidad del proceso. En base a ideas tomadas de varias citas bibliográficas, se propusieron las cuatro alternativas que a continuación se exponen. Algunos de ellos se desarrollaron en el Departamento de Ingeniería Química y del Medio Ambiente de la UPV/EHU, mientras que otros tuvieron lugar en las instalaciones del CINDEFI en la Universidad Nacional de La Plata.

En total fueron cuatro las opciones experimentadas:

- ✓ Se intentó obtener un proceso continuo eliminando el cobre divalente de la disolución mediante la precipitación del mismo (apartado 7.2.1).
- ✓ Se experimentó la posibilidad de poder realizar el biomecanizado durante el proceso de crecimiento de las bacterias *A. ferrooxidans* y *S. thermosulfidooxidans* (apartado 7.2.2).
- ✓ Se realizó una inoculación intermedia en el proceso de biomecanizado, introduciendo bacterias crecidas hasta su etapa exponencial, además de crecer las bacterias *A. ferrooxidans* con una fuente de energía adicional (apartado 7.2.3).

- ✓ Se introdujeron periodos de regeneración entre sucesivas etapas de biomecanizado (apartado 7.2.4).

Siendo la última la opción con la que mejores resultados se consiguió, se trabajó para su optimización, con el objetivo de llegar a reducir el tiempo necesario de regeneración.

En la siguiente Figura 7.1 se indica un esquema del procedimiento seguido para una mejor comprensión del desarrollo experimental y de los resultados que se muestran en este capítulo.

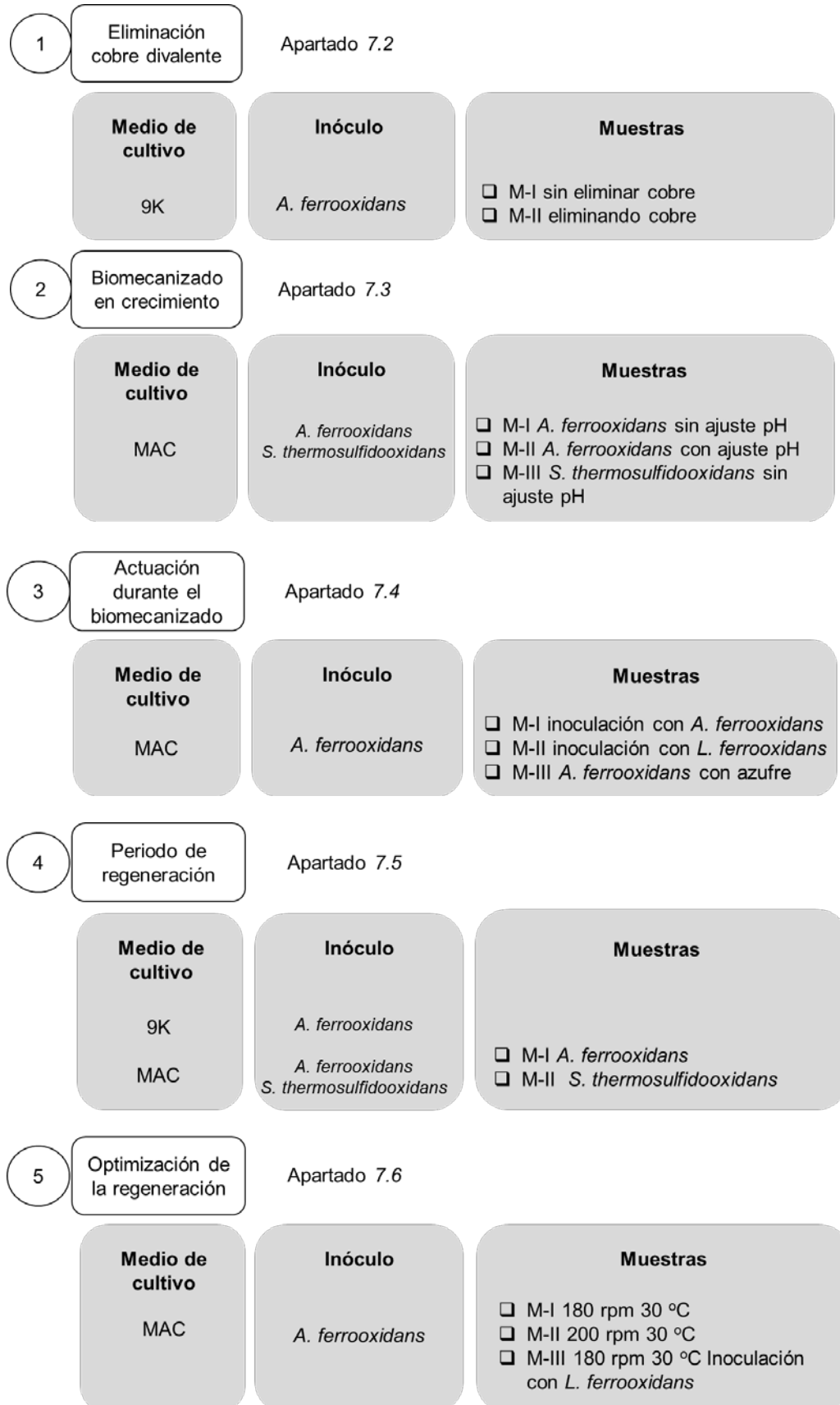


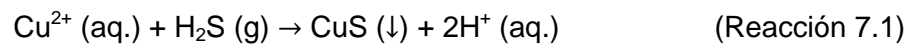
Figura 7.1. Diagrama del proceso.

7.2. Opción 1: Eliminación de cobre divalente

7.2.1. Desarrollo experimental

En sus estudios, Zhang y Li (1999), Chang et al. (2008) e Istiyanto et al. (2010) mencionaban la posibilidad de mejorar la tasa de remoción mediante la eliminación del cobre divalente disuelto. Además, según se pudo observar en los resultados obtenidos en el apartado 5.3.1.1, la presencia de cobre afectó de manera negativa el proceso de crecimiento de las bacterias *A. ferrooxidans* en medio 9K. Por tanto se evidenció que el cobre interfería en el metabolismo de las mismas. Por lo que en un principio se pensó que la eliminación del cobre divalente de la disolución, mejoraría la reacción biológica.

Así pues, se diseñó un ensayo con el objetivo de eliminar el cobre divalente generado en el biomecanizado por precipitación como CuS empleando sulfuro de hidrógeno (H₂S) como agente precipitante en base a la reacción de la Reacción 7.1.



El ensayo comenzó por preparar el medio de cultivo para dos muestras (M-I y M-II) según la metodología dispuesta en el apartado 3.2.1.1, para una concentración de 6 gFe²⁺/L, con un volumen final de 50 mL y una proporción de inóculo del 3% (v/v). Se procedió entonces con el crecimiento de las bacterias bajo las condiciones indicadas en el mismo apartado.

Finalizado el periodo de crecimiento, se comenzó con el ensayo de biomecanizado, siguiendo el proceso convencional indicado en el apartado 3.1.1 para la muestra M-I.

Paralelamente, con la muestra M-II se procedió del mismo modo que con la M-I durante la primera hora de ensayo. Tras esa primera hora y extraída la probeta de la muestra, se analizaron los parámetros comunes y posteriormente se añadió H₂S gaseoso desde una bombona durante unos 15 segundos, tras lo cual, y sin filtrar la muestra, se realizó de nuevo un nuevo análisis de los parámetros. A continuación, se introdujo la probeta y se comenzó con la segunda hora de ensayo. Después de la segunda hora, se procedió de manera análoga a la primera hora y se llevó a cabo una nueva adicción del gas, continuándose el proceso de biomecanizado hasta la tercera hora, donde se dio por finalizado.

7.2.2. Resultados y discusión

En cuanto a las tasas de remoción de OFE, comparando las muestras M-I y M-II, se observó que ambas presentaban resultados casi iguales tras la primera hora de biomecanizado (Figura 7.2). Como era habitual en el biomecanizado, las tasas de remoción disminuyeron, casi linealmente, con el tiempo de ensayo en ambos casos, si bien la disminución fue más acusada en la muestra tratada con H_2S , M-II. Entre la primera y la segunda hora y entre la segunda y tercera hora, las tasas de remoción decrecieron en 10.7 y 12.9 mg en M-I, y 18.7 y 19.0 mg en M-II respectivamente.

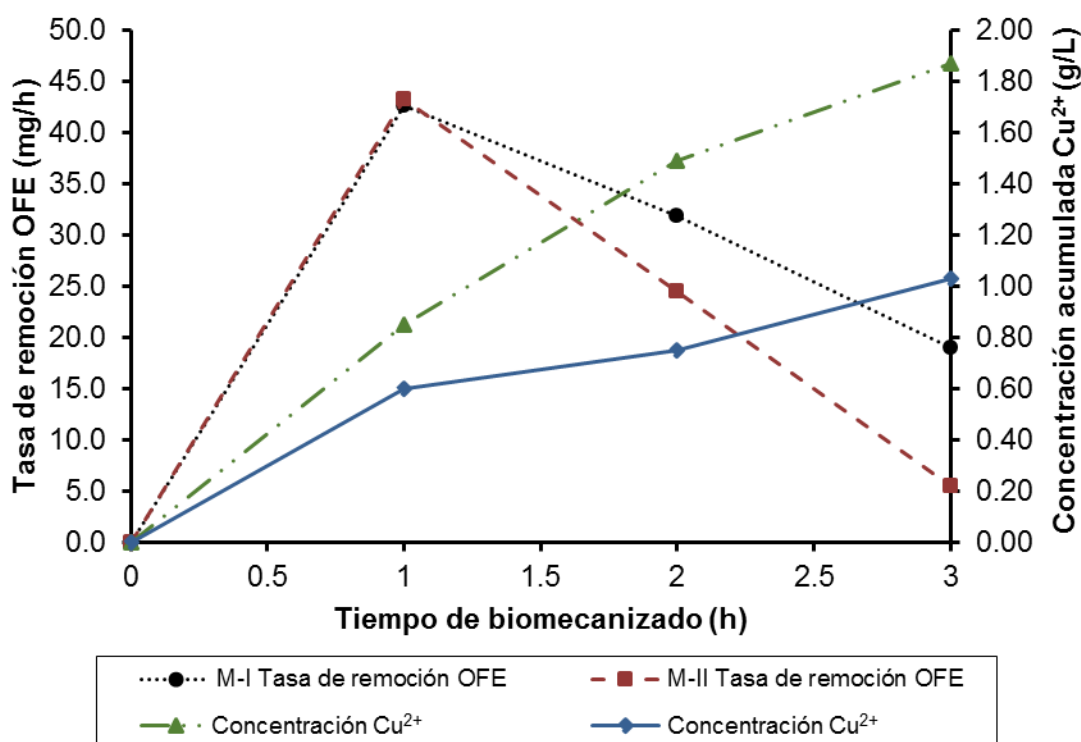


Figura 7.2. Tasa de remoción y concentración de cobre divalente acumulada durante el ensayo para las muestras M-I y M-II. Para el caso de M-II los resultados que se muestran son los valores obtenidos tras añadir el gas.

Para la M-II, el pH y el Potencial Redox disminuyeron sistemáticamente con la cantidad de H_2S añadida, mientras que la concentración de hierro ferroso aumentó, según puede observarse en la siguiente Tabla 7.1. Asimismo, en la disolución tratada M-II no se apreció olor a sulfuro de hidrógeno y los precipitados de sulfuro de cobre coagularon rápidamente por agitación, originando flóculos fáciles de filtrar. Por el contrario, la concentración de hierro total disuelto tras el tratamiento no varió, indicativo de que no existió una precipitación conjunta de hierro y cobre durante el tratamiento con H_2S .

La cantidad de cobre precipitado tanto en la primera hora como en la segunda hora tras añadir el gas fue del 30% y del 33% del presente en la disolución en cada momento respectivamente.

Tabla 7.1. Evolución del Potencial Redox, pH y hierro ferroso en M-II antes y después de añadir H₂S.

Tiempo de biomecanizado (h)		Potencial Redox (mV)	pH (-)	Fe ²⁺ (g/L)
Inicio	-	634.8	1.9	0.02
1	Antes de añadir H ₂ S	465.6	2.1	0.13
	Después de añadir H ₂ S	448.6	1.8	2.03
2	Antes de añadir H ₂ S	426.0	1.9	2.77
	Después de añadir H ₂ S	394.5	1.5	3.91
3	-	351.5	1.4	4.20

Se evidenció que el cobre divalente no era el agente responsable de la rápida caída de la tasa de remoción durante el biomecanizado, y que además, no sólo no hizo mejorar la tasa de remoción, sino que empeoró el rendimiento del proceso.

7.3. Opción 2: Biomecanizado durante el crecimiento de las bacterias

7.3.1. Desarrollo experimental

En base al estudio de Xenofontos et al. (2015), se buscó la forma de obtener una tasa de remoción constante realizando el proceso de biomecanizado simultáneo a la etapa de crecimiento en medio MAC.

Se prepararon tres muestras de concentración 6 gFe²⁺/L según el procedimiento indicado en 3.2.1.2. Dos de ellas se inocularon con un 7% (v/v) de *A. ferrooxidans* (M-I y M-II) y otra con un 10% (v/v) de *S. thermosulfidooxidans* (M-III). Se procedió entonces con el crecimiento de las bacterias bajo las condiciones indicadas en el mismo apartado.

Seguido, se seleccionaron probetas de OFE de similares características y preparadas según la metodología indicada en el apartado 3.1.1. Previo lavado, secado y pesaje de las mismas, se introdujo cada una en la disolución correspondiente, dando comienzo al ensayo de crecimiento según las condiciones establecidas en el mismo apartado 3.2.1.2 para cada caso.

A diferencia del procedimiento de crecimiento convencional, en una de las muestras de *A. ferrooxidans* (M-II) se llevó un control exhaustivo del valor del pH, tomando medida cada 2 horas y ajustándolo a pH 1.7-1.8 con ácido sulfúrico en caso de ser necesario.

Durante el periodo de crecimiento, con vistas a poder observar el estado en el que las muestras se encontraban, se establecieron unos tiempos de análisis en los que se determinaban los siguientes parámetros: concentración de hierro ferroso (método 3.2.4.2), pH y Potencial Redox (3.2.8). También se realizó el análisis del hierro total y del cobre divalente presente en disolución mediante la metodología indicada en 3.2.4.3. En puntos intermedios se tomaron muestras para análisis de FISH y DAPI, siguiendo el proceso indicado en 3.2.2 y 3.2.3.3. En cada intervalo de análisis, se pesó la probeta de OFE, previo lavado y secado, para poder determinar la tasa de remoción según lo indicado en el apartado 3.2.6.

El ensayo de biomecanizado se prolongó durante el tiempo necesario, bien hasta que las disoluciones mostraran alguna anomalía y se tuviera que paralizar el ensayo, o bien hasta que la tasa de remoción dejara de tener los resultados que se esperaba.

7.3.2. Resultados y discusión

La muestra M-I tuvo que ser descartada tras 38 horas de ensayo debido a la alta presencia de precipitado. El comenzar el crecimiento con la probeta de OFE introducida en la muestra, hizo que el pH aumentara más rápido que en un proceso de crecimiento normal, alcanzado valores por encima de los 2.3 tras 38 horas de crecimiento y produciendo por tanto la precipitación del hierro presente en la disolución. En la Figura 7.3 se puede observar el aspecto de la muestra M-I tras 21 horas de crecimiento y tras 38 horas de crecimiento.

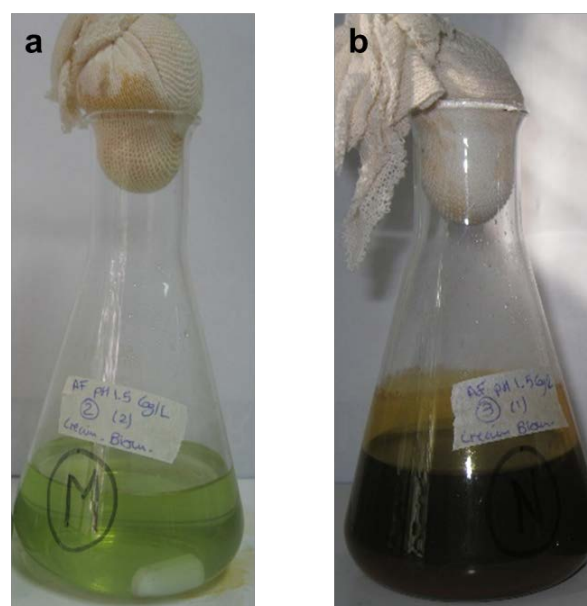


Figura 7.3. Estado de la muestra M-I, a) Tras 21 horas de crecimiento, b) Tras 38 horas de crecimiento.

El hierro ferroso descendió repentinamente en la hora 38 del ensayo, alcanzando valores muy bajos tras ese periodo de tiempo; ocurriendo lo mismo para el hierro total, cuya concentración resultó ser próxima a 2.20 g/L al finalizar el ensayo. El que más del 50% de la concentración de hierro inicial se precipitara, hizo que la tasa de remoción cayera en la hora 38, si bien había tenido una tendencia creciente hasta la hora 21. Tanto la evolución del hierro ferroso y hierro total como la evolución de la tasa de remoción se reflejan en la Figura 7.4. En comparación con las tasas de remoción obtenidas en el ensayo de biomecanizado con *A. ferrooxidans* en medio MAC, el valor de las tasas de este ensayo fueron muy inferiores (ver apartado 6.1.1).

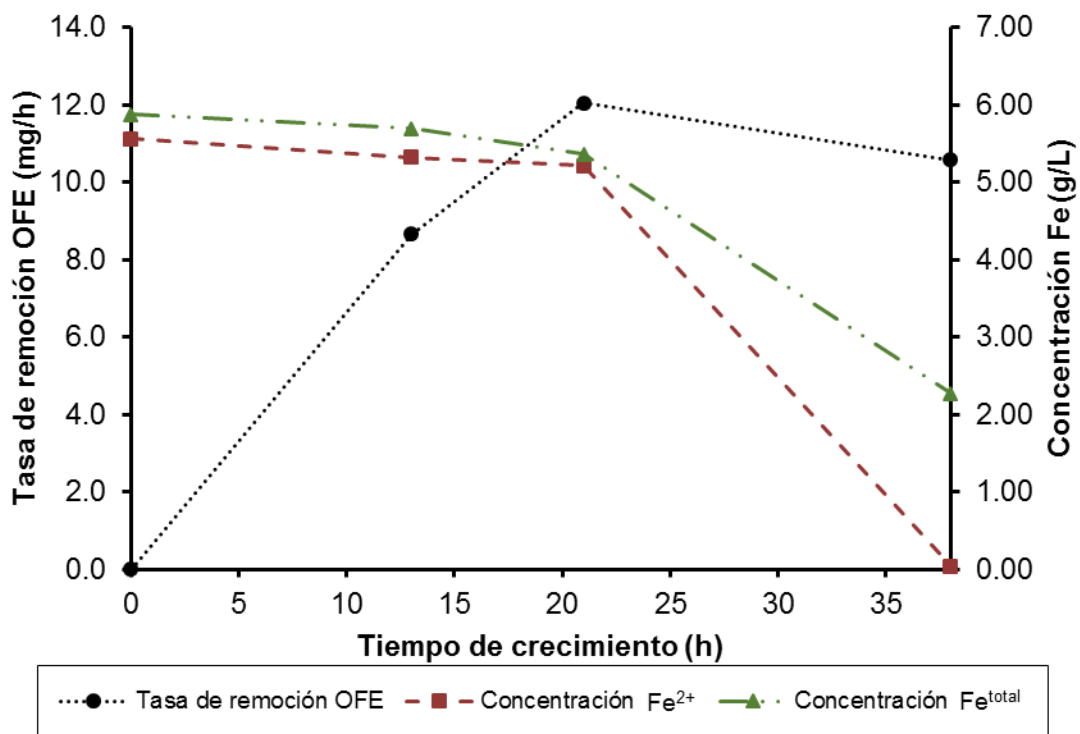


Figura 7.4. Concentración de hierro ferroso, hierro total y tasa de remoción en la muestra M-I para el biomecanizado durante el crecimiento de *A. ferrooxidans* en medio MAC.

Al igual que ocurrió con la muestra de *A. ferrooxidans*, en el caso de la muestra M-III, muestra inoculada con *S. thermosulfidooxidans*, las tasas de remoción obtenidas si bien fueron aumentando con el tiempo (Figura 7.5), en valor fueron muy inferiores a las tasas de remoción obtenidas en el biomecanizado convencional en medio MAC con la misma bacteria (ver 6.1.1). En comparación con el biomecanizado durante el crecimiento en presencia de *A. ferrooxidans*, las tasas de remoción obtenidas fueron inferiores.

La cantidad de precipitado que la muestra presentó al finalizar el ensayo fue considerable, estando ligado al aumento del pH, que alcanzó un valor de 2.6; valor por encima del alcanzado para la hora 86 en el crecimiento convencional, que fue de 2.1 (ver 6.2). Debido a la abundante presencia de precipitado, el ensayo se dio por finalizado pasadas 86 horas.

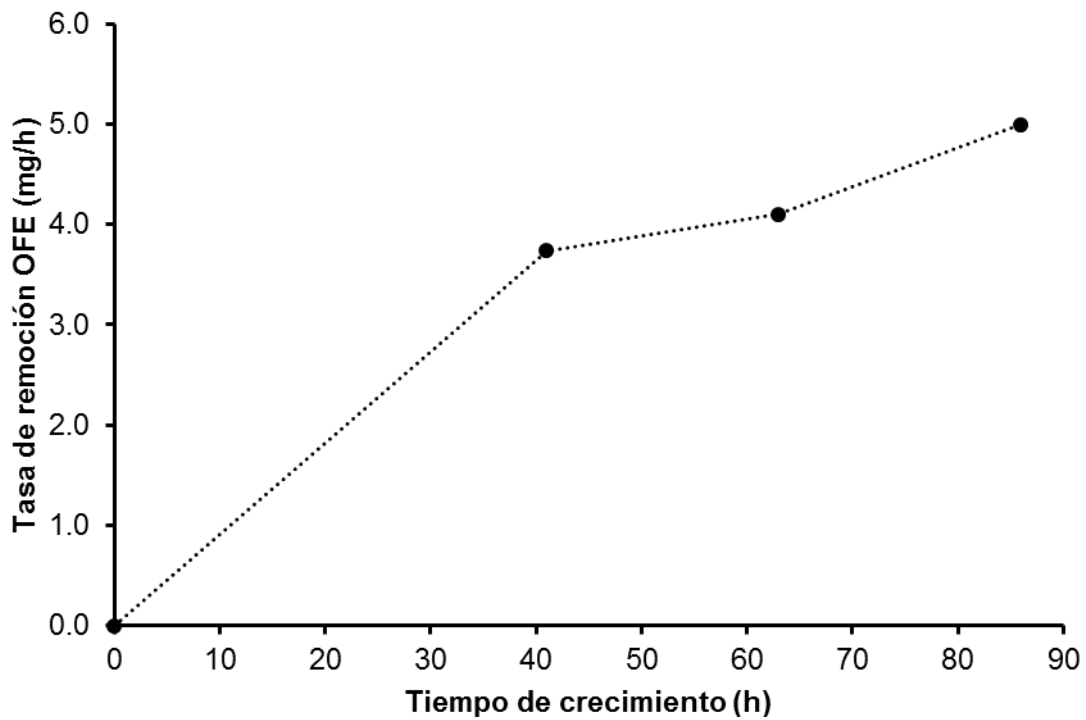


Figura 7.5. Tasa de remoción en la muestra M-III.

Con respecto a la concentración de bacterias, hasta la hora 41 el crecimiento de las *S. thermosulfidooxidans* fue prácticamente nulo. La razón de este comportamiento se le atribuyó a la presencia de cobre divalente en la disolución. En la hora 41 se estaba en concentraciones de 16mM de cobre divalente, muy por encima del valor límite en el que se registra actividad metabólica en este tipo de bacterias en presencia de cobre, establecido en 6 mM según Dopson et al. 2003 (si bien hay autores que lo establecen en 300 mM como Orell et al. 2010). Debido a la poca presencia bacteriana que había en las primeras horas, se creyó que el cobre divalente que se oxidó fue debido a la presencia de hierro ferroso oxidado abióticamente.

El DAPI realizado en la hora 86 (Figura 7.6) evidenció la clara diferencia entre la concentración de bacterias en el caso de crecimiento convencional y el crecimiento en presencia de probeta de cobre.

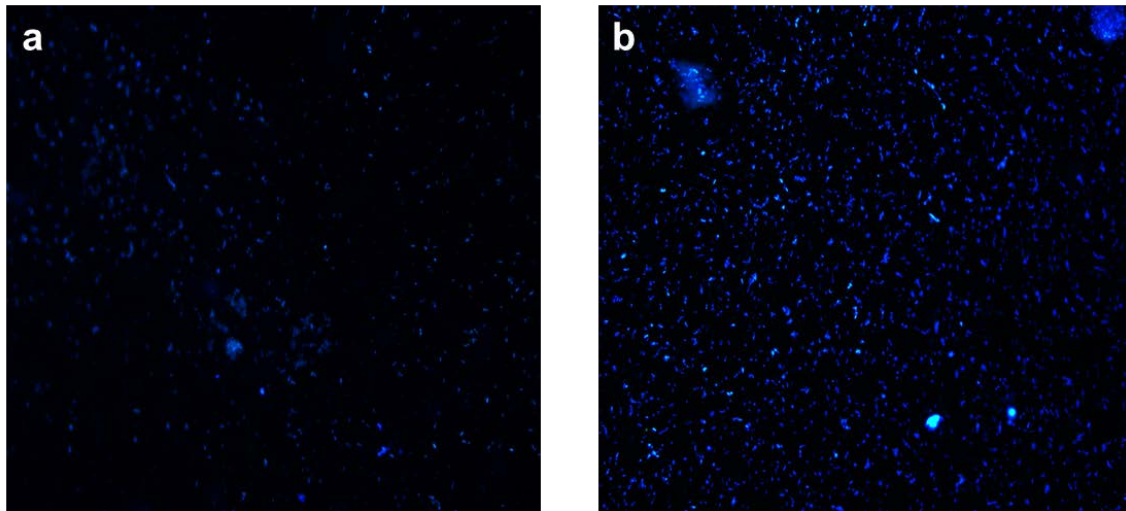


Figura 7.6. Resultados de DAPI para las bacterias *S. thermosulfidooxidans* tras 86 horas de crecimiento, a) Crecimiento con biomecanizado simultáneo (M-III), b) Crecimiento convencional.

El mejor de los resultados se obtuvo para la muestra M-II. El ajuste del pH durante el proceso de crecimiento, hizo poder controlar la aparición de precipitado, evitando que tras 38 horas las muestras se quedaran sin parte de su hierro como ocurrió con la muestra M-I debido a la presencia de precipitado. Esto permitió poder seguir con el ensayo durante un tiempo más prolongado.

Una vez más, los valores de las tasas de remoción fueron inferiores a los del biomecanizado convencional. A diferencia de las muestras M-I y M-III, la tasa aumentó consecutivamente y casi de manera lineal con el tiempo hasta la hora 50 de ensayo, estabilizándose a continuación durante un período de aproximadamente 30 horas y comenzando a decrecer tras la hora 80, tal y como se puede observar en la Figura 7.7. En la misma Figura 7.7 se puede también ver cómo hasta la hora 21 la evolución de la tasa de remoción para las muestras M-I y M-II fue idéntica. El ensayo se dio por finalizado tras aproximadamente 86 horas, tras observar durante algún tiempo un descenso progresivo de la tasa de remoción.

Si bien el aumentar la tasa de remoción durante la primera etapa hacía pensar que la concentración de hierro ferroso sería constante, existiendo por tanto un equilibrio entre la reacción química y la reacción biológica y que al comenzar a disminuir la tasa de remoción el hierro ferroso iría en aumento debido a la mayor velocidad de la reacción química, no fue así. Tal y como se representa en la Figura 7.6, el hierro ferroso fue disminuyendo durante todo el tiempo, incluso tras alcanzar el máximo en la tasa de remoción. Dado que la concentración de hierro total no varió (no se muestran los

resultados), la disminución de la concentración del hierro ferroso indicaba un aumento en la concentración del hierro férrico. Sin embargo, aun yendo en aumento dicha concentración, llegó un punto en el que la tasa de remoción disminuyó. No se encontró razón para poder justificar este hecho.

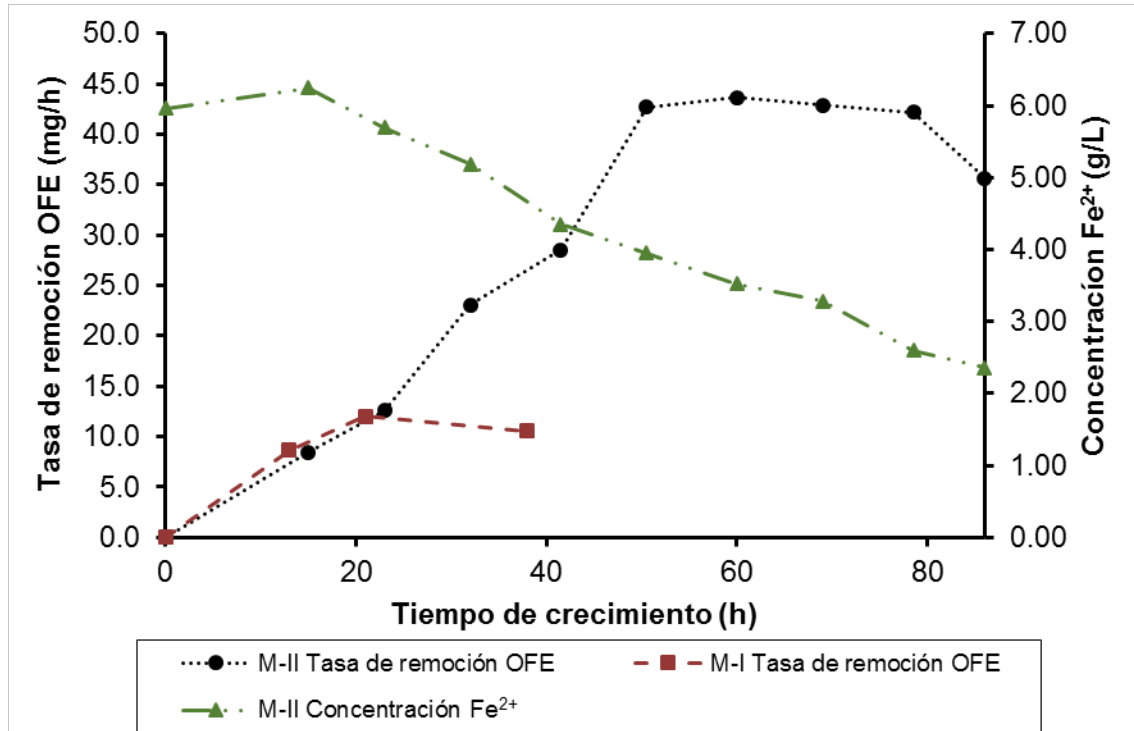


Figura 7.7. Tasa de remoción y concentración de hierro ferroso para la muestra M-II.

En comparación con el proceso de crecimiento convencional de *A. ferrooxidans* en medio MAC, las bacterias parecieron crecer más rápido. El análisis de DAPI realizado a las 38 horas de crecimiento, evidenció una mayor concentración de bacterias en comparación con la concentración observada para el caso de crecimiento convencional. En la Figura 7.8 puede verse cómo además de tener un mayor número de bacterias, éstas son de menor tamaño, puesto que estaban en continua división.

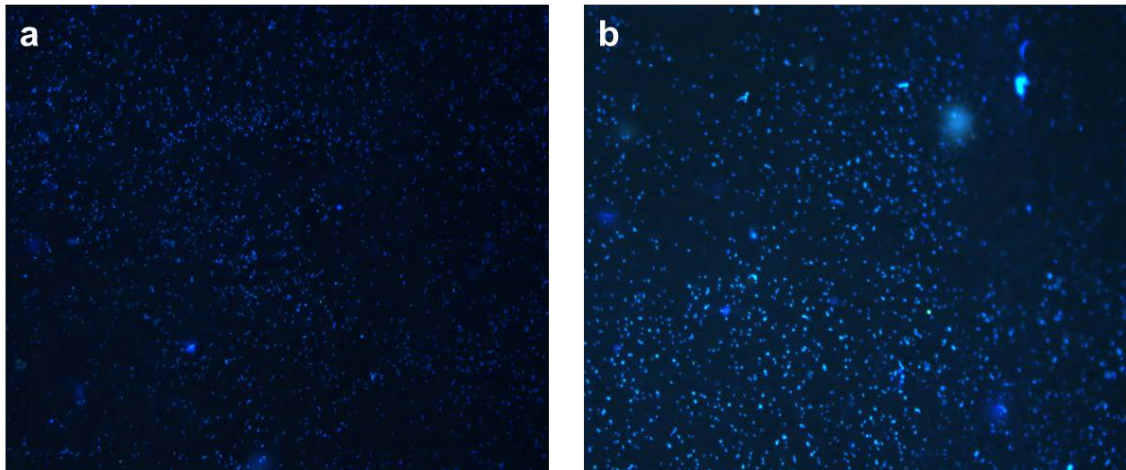


Figura 7.8. Resultados de DAPI para la hora 38 de crecimiento, a) Con biomecanizado simultáneo (M-II), b) Crecimiento convencional.

7.4. Opción 3: Actuación durante la etapa de biomecanizado

7.4.1. Desarrollo experimental

Se estudiaron dos acciones simultáneamente. Por un lado, se comprobó el efecto que tenía en la tasa de remoción el añadir un inóculo crecido hasta su fase exponencial una vez el cultivo hubiera sido crecido. Y por otro lado, se probó a crecer las *A. ferrooxidans* con doble fuente de energía: hierro, la fuente habitual y azufre.

La idea de inocular la disolución previo al comienzo del biomecanizado surgió de conocer que había autores que emplearon bacterias en su estado de crecimiento exponencial para realizar el proceso de biomecanizado (Shikata et al., 2009; Istiyanto et al., 2010; Jadhav y Hocheng, 2014).

Para este caso, además de emplear la bacteria *A. ferrooxidans*, se estudió la bacteria *L. ferrooxidans*, de aplicación común en el ámbito de la biolixiviación y con capacidad de trabajar a mayores valores de Potencial Redox en comparación con *A. ferrooxidans* (Rawlings, 2005; Ghauri et al., 2007; Zhu et al., 2012; Ban et al., 2013).

El ensayo comenzó por preparar dos muestras (M-I y M-II) en medio MAC según lo establecido en 3.2.1.2 de concentración de $6 \text{ gFe}^{2+}/\text{L}$, siendo ambas inoculadas con un 7% (v/v) de *A. ferrooxidans*. Se procedió entonces con el crecimiento de las bacterias bajo las condiciones indicadas en el mismo apartado.

Paralelamente a la etapa de crecimiento de las muestras M-I y M-II, se crecieron otros dos cultivos (C-I y C-II) según el mismo proceso y para la misma concentración de hierro ferroso. Una de ellos fue inoculado con *A. ferrooxidans* (C-I), mientras que el otro se inoculó con *L. ferrooxidans* (C-II). El crecimiento de estos dos cultivos se paralizó tras aproximadamente 15 horas, los cuales, en base a los resultados obtenidos en el apartado 6.3.1, se encontraban en la fase de crecimiento exponencial.

El siguiente paso fue obtener un concentrado de bacterias de ambos casos. Para ello, cada uno fue dividido en 2 frascos de plástico, ajustando el peso por pares hasta igualarlos con el fin de asegurar un buen funcionamiento de la centrifuga. A continuación, se centrifugaron en centrifuga Sorvall®Traveler™ TA3001 durante 15 minutos a aproximadamente 8000 rpm para poder separar el sobrenadante de las bacterias. Transcurrido ese tiempo, se extrajo de cada frasco el sobrenadante mediante pipeta automática, resuspendiendo el cultivo restante en 5 mL de medio MAC y agitando vigorosamente durante 5 minutos.

Llegados a ese paso, se observaron los concentrados obtenidos al microscopio para determinar la eficacia de la concentración. En el caso de *A. ferrooxidans* se obtuvo una población bastante abundante, superior a la de *L. ferrooxidans*. Se añadieron 5 mL de cada cultivo C-I y C-II a las muestras M-I y M-II respectivamente una vez éstas finalizaron su crecimiento.

Además de las muestras inoculadas, se preparó otra muestra más con azufre (M-III) en medio MAC según lo establecido en 3.2.1.2 de concentración de $6 \text{ gFe}^{2+}/\text{L}$, siendo inoculada con un 7% (v/v) de *A. ferrooxidans* y agregando una concentración de 0.1 g/L de azufre. La razón de añadir azufre residía en el hecho de que las *A. ferrooxidans* son capaces de crecer en azufre (Polar y Reysenbach, 2006; Carbajosa et al., 2010), por lo que se creyó que al finalizar la fuente de energía del hierro, las bacterias continuarían creciendo y por tanto manteniéndose activas, con la fuente de energía proveniente del azufre, de manera que se prolongaría su fase de crecimiento exponencial.

Una vez preparadas las muestras M-I y M-II y finalizado el crecimiento de la muestra M-III, se realizó un ensayo biomecanizado de 3 horas en base a lo establecido en el apartado 3.1.1.

7.4.2. Resultados y discusión

En la siguiente Figura 7.9 vienen representados tanto la evolución de la tasa de remoción como la evolución del hierro ferroso a lo largo de las 3 horas de biomecanizado para cada una de las muestras estudiadas. En todas ellas, el comportamiento de la tasa de remoción volvió a ser el habitual: un máximo tras la primera hora de ensayo y disminuyendo a continuación a medida que avanzaba el tiempo de biomecanizado. Las diferencias en la tasa de remoción entre las muestras estudiadas es debido al efecto superficial del proceso (ver apartado 5.3.2.2).

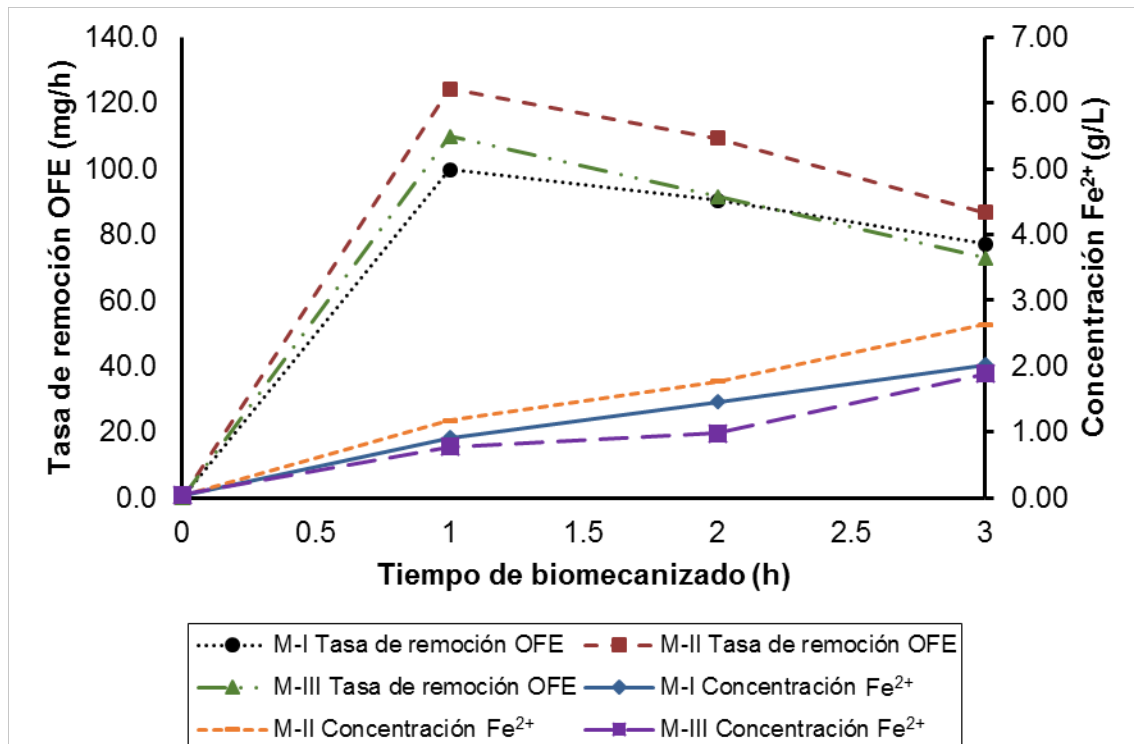


Figura 7.9. Tasa de remoción y concentración de hierro ferroso en las muestras M-I, M-II y M-III.

7.5. Opción 4: Periodo de regeneración

7.5.1. Regeneración en medio 9K con *A. ferrooxidans*

7.5.1.1. Desarrollo experimental

Para dar comienzo al ensayo, se preparó el medio de cultivo para una muestra según la metodología dispuesta en el apartado 3.2.1.1. Se procedió entonces con el crecimiento de las bacterias bajo las condiciones indicadas en el mismo apartado.

Finalizado el periodo de crecimiento, se comenzó con el ensayo de biomecanizado, siguiendo el proceso indicado en el apartado 3.1.1. A diferencia de los ensayos de biomecanizado realizados hasta el momento, en este caso, la duración del biomecanizado fue de 4 horas.

Transcurrido ese tiempo, se dio paso al primer periodo de regeneración. Este periodo consistió en dejar la muestra, sin probeta, bajo condiciones de agitación de 150 rpm y 30 °C durante. El periodo de regeneración se extendió hasta que la muestra volvió a alcanzar el Potencial Redox inicial (superando los 600.0 mV), indicativo de que todo el hierro ferroso estaba oxidado. Tras dicho periodo, se introdujo de nuevo la probeta en la muestra y se comenzó con un segundo periodo de biomecanizado, de nuevo de 4 horas de duración. Tras la segunda etapa, se extrajo una vez más la probeta de la muestra y se dejó incubando, hasta que la muestra alcanzara el valor del Potencial Redox inicial, finalizando el ensayo con una última etapa de biomecanizado.

Durante los periodos de regeneración, el pH se ajustó únicamente al finalizar y previamente al comienzo de la siguiente etapa de biomecanizado.

7.5.1.2. Resultados y discusión

En la siguiente Figura 7.10 viene representada la evolución de la tasa de remoción para las tres etapas de biomecanizado estudiadas. Las líneas discontinuas indican el periodo de regeneración intermedio a cada biomecanizado. Como se puede observar, en cada etapa de biomecanizado, la tasa de remoción presentó su comportamiento habitual, con un máximo en la primera hora de ensayo y descendiendo a continuación. Sin embargo, tras la regeneración, la tasa de remoción volvía a alcanzar su máximo. En cada periodo de regeneración, la muestra necesitó aproximadamente 8 horas para volver a alcanzar un valor de Potencial Redox cercano al inicial.

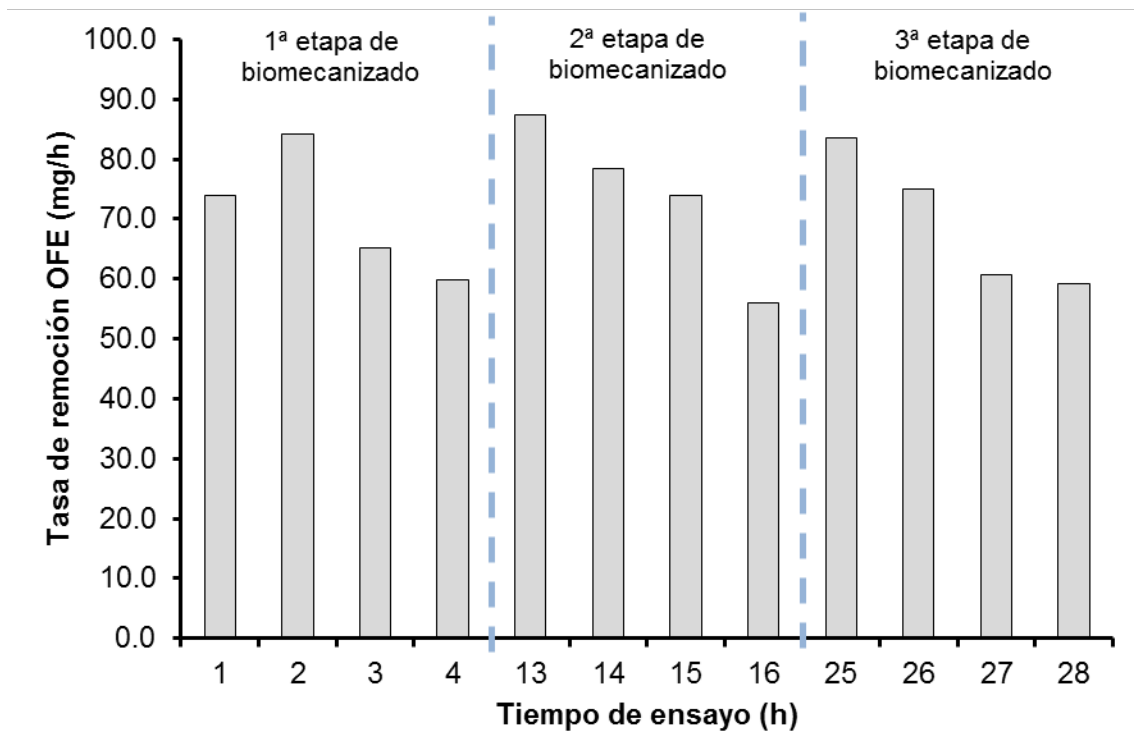


Figura 7.10. Tasa de remoción en cada etapa de biomecanizado.

Durante la regeneración, el pH de la muestra fue en aumento, al igual que ocurría durante el periodo de crecimiento (no se muestran los resultados). También aumentó el Potencial Redox, superando los 600.0 mV (Tabla 7.2). En la misma Tabla 7.2 también se indica la evolución del hierro ferroso, observando que si bien durante las etapas de biomecanizado su concentración iba en aumento, tras las regeneraciones volvió a descender hasta valores cercanos a los 0.01 g/L. Esto indicó que en los periodos de regeneración seguía existiendo actividad bacteriana, oxidando el ion ferroso a ion férrico.

Tabla 7.2. Evolución del Potencial Redox y hierro ferroso durante las sucesivas etapas de biomecanizado y periodos de regeneración.

Tiempo (h)	Potencial Redox (mV)	Fe ²⁺ (g/L)
Inicio	642.9	0.09
1ª etapa de biomecanizado	1º hora	0.66
	2º hora	0.78
	3º hora	0.85
	4º hora	1.07
1ª periodo de regeneración	621.0	0.14
2ª etapa de biomecanizado	13º hora	0.49
	14º hora	0.72
	15º hora	0.90
	16º hora	1.02
2ª periodo de regeneración	622.0	0.17
3ª etapa de biomecanizado	25º hora	0.35
	26º hora	0.56
	27º hora	1.10
	28º hora	1.49

7.5.2. Regeneración en medio MAC con *A. ferrooxidans* y *S. thermosulfidooxidans*

7.5.2.1. Desarrollo experimental

Se prepararon dos muestras (M-I y M-II) de concentración 6 gFe²⁺/L según el procedimiento indicado en 3.2.1.2. Una de ellas se inoculó con un 7% (v/v) de *A. ferrooxidans* (M-I) y otra con un 10% (v/v) de *S. thermosulfidooxidans* (M-II). Se procedió entonces con el crecimiento de las bacterias bajo las condiciones indicadas en el mismo apartado.

Una vez finalizado el crecimiento, se comenzó con el biomecanizado siguiendo las indicaciones del apartado 3.1.1. En este caso, y para ambas muestras, el biomecanizado tuvo una duración de 1 hora, tras la cual se extrajo la probeta de las muestras y se dio comienzo al periodo de regeneración. La agitación durante el periodo de regeneración para ambas muestras fue de 150 rpm, mientras que la temperatura fue de 30 °C para M-I y de 45 °C para M-II.

Para dar fin a dicho periodo, se establecieron las mismas condiciones que para el periodo de regeneración en medio 9K con *A. ferrooxidans*. Es decir, las muestras deberían alcanzar un valor de Potencial Redox cercano al que tenían previo al comienzo del proceso de biomecaizado (superior a 600.0 mV).

Durante la regeneración, en intervalos de 1 hora se determinaron el hierro ferroso, el pH y Potencial Redox siguiendo la metodología establecida en los apartados 3.2.4.2 y 3.2.8 respectivamente.

Completada la regeneración, de nuevo se introdujeron las probetas en sus correspondientes disoluciones y se finalizó el ensayo con una última hora de biomecanizado.

Durante el periodo de regeneración, el pH no se ajustó, únicamente al finalizar y previo al comienzo de la siguiente etapa de biomecanizado.

7.5.2.2. Resultados y discusión

En el medio MAC las bacterias *A. ferrooxidans* tras un intervalo de 4 horas de regeneración volvieron a transformar todo el hierro ferroso que había quedado presente en el medio tras una primera hora de biomecanizado a hierro férrico. El Potencial Redox fue próximo a 600.0 mV tras ese tiempo, llegando a alcanzar los valores obtenidos en el estado inicial previo a la etapa de biomecanizado.

La tasa de remoción obtenida tras la regeneración volvió a ser máxima y muy próxima a la que se tuvo en el instante inicial de la primera hora de biomecanizado (82.4 mg/h en la primera etapa y 85.4 mg/h en la segunda etapa).

En la siguiente Figura 7.11 se puede observar la evolución de la concentración de hierro ferroso y la tasa de remoción a lo largo del ensayo para la muestra M-I. En el mismo gráfico se indica entre líneas el periodo de regeneración.

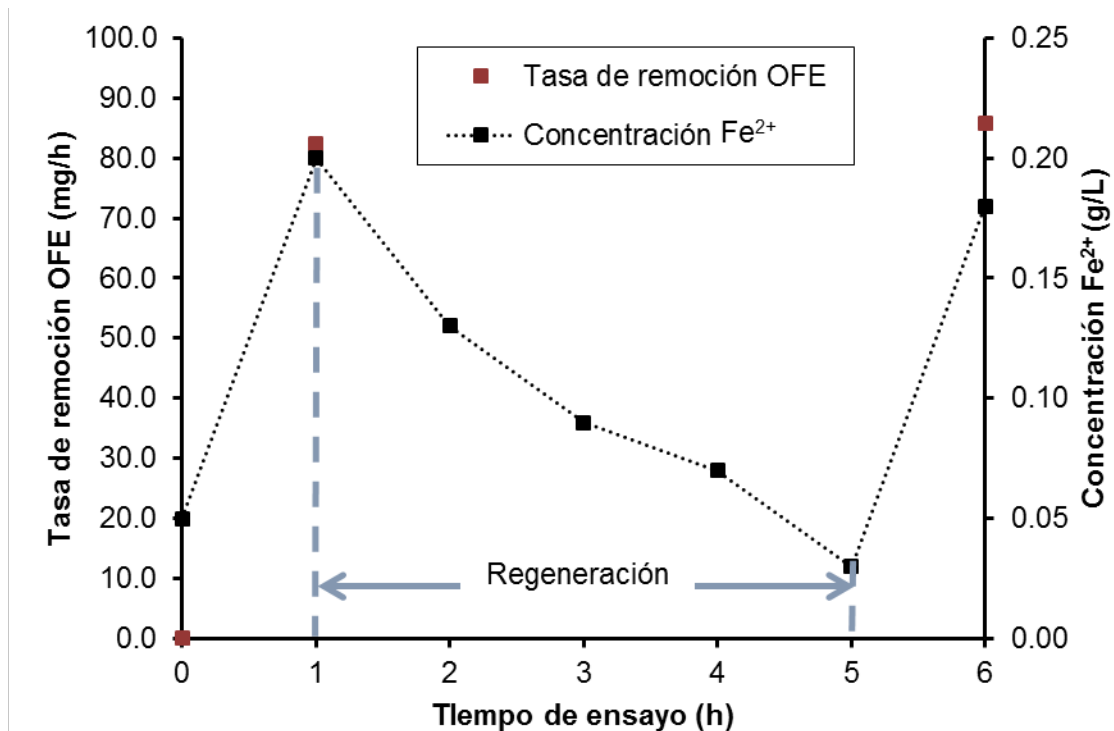


Figura 7.11. Concentración de hierro ferroso y la tasa de remoción para la muestra M-I.

En el caso de la muestra M-II con *S. thermosulfidooxidas*, la etapa de regeneración presentó una gran diferencia en comparación con la regeneración tanto en medio 9K como en medio MAC con la bacteria *A. ferrooxidans*. Si bien en el caso de muestra M-I la duración de dicho periodo fue de 4 horas tal y como se ha visto anteriormente, en el caso de M-II, tras haber dado un tiempo de regeneración de 4 horas el Potencial Redox sobrepasó tímidamente los 500.0 mV, no llegando a oxidar por completo el hierro ferroso presente en el medio. Por tanto, se tuvo que proseguir con el periodo de regeneración, puesto que finalizarlo en ese instante supondría no alcanzar la máxima tasa de remoción.

En total fueron 16 horas las que la muestra M-II necesitó para regenerarse. Tras ese tiempo, el Potencial Redox sí que alcanzó los 600.0 mV, el hierro ferroso era inferior a 0.04 g/L, permitiendo que en una segunda etapa de biomecanizado se volviera a alcanzar una tasa máxima con valor de 107.4 mg/h (Figura 7.12).

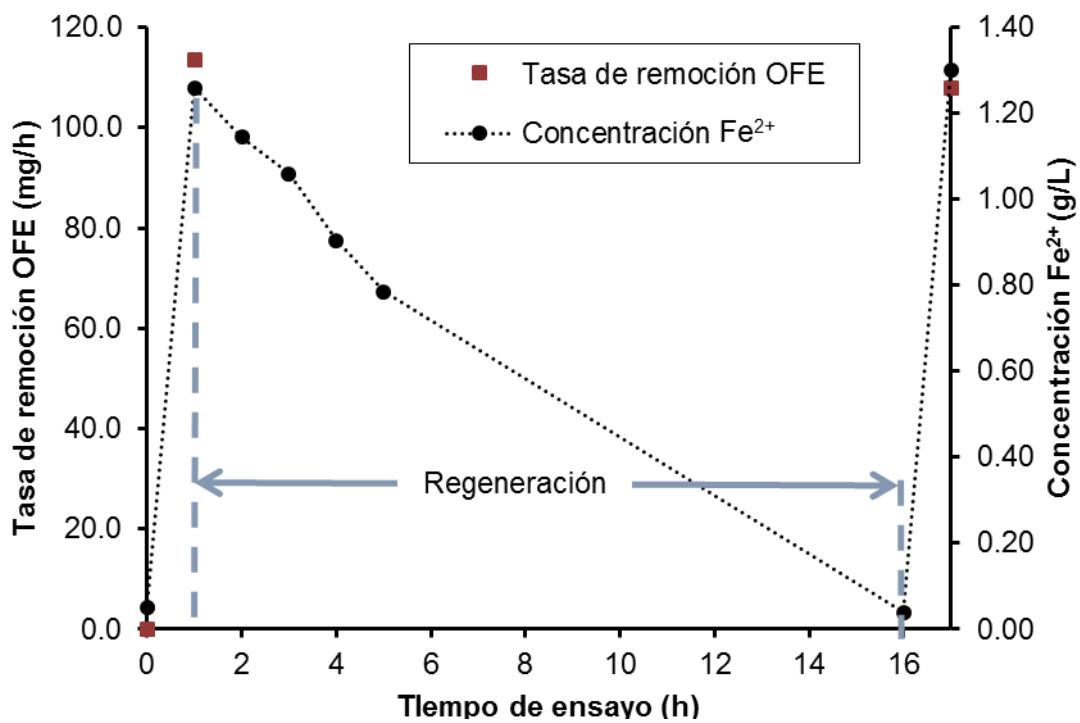


Figura 7.12. Concentración de hierro ferroso y la tasa de remoción para la muestra M-II.

Este comportamiento pudo estar ligado a dos razones. La primera es que como ya se observó en los ensayos de crecimiento realizados en medio MAC, el metabolismo de la bacteria *S. thermosulfidooxidas* era más lento que el de la *A. ferrooxidans*, necesitando de un tiempo mayor de crecimiento para una misma concentración de hierro ferroso. Pero además, y como ya se ha mencionado anteriormente, el metabolismo de esta bacteria es sensible a la presencia del cobre divalente (Dopson et al., 2003; Orell et al., 2010). En este caso, tras la primera hora de biomecanizado la disolución tenía aproximadamente 12 mM de cobre divalente. Dicha concentración podría haber hecho que la actividad de las bacterias presentes en el medio disminuyera o se ralentizara, interfiriendo en la conversión de hierro ferroso a hierro férrico y requiriendo por tanto de un tiempo de regeneración mayor en comparación con las *A. ferrooxidans*, cuya resistencia a la presencia de cobre es mayor (800 mM).

7.6. Optimización de la regeneración en medio MAC para *A. ferrooxidans*

7.6.1. Desarrollo experimental

Con estos ensayos se trató de optimizar el tiempo del periodo de regeneración para *A. ferrooxidans* en medio MAC, que se estableció en 4 horas.

Para ello, se estudió la posibilidad de aumentar la agitación probando con 180 rpm y 200 rpm y también inoculando la disolución con *L. ferrooxidans* del mismo modo que se hizo en la inoculación para la fase del biomecanizado (7.2.3). Si bien la inoculación no tuvo efecto alguno en el comportamiento de la tasa de remoción durante el biomecanizado (ver apartado 7.3.3), se creyó conveniente volver a estudiarla como solución a la optimización de la regeneración, dado que durante la misma el Potencial Redox tendió a aumentar y esto podría hacer funcionar mejor a las *L. ferrooxidans* (cosa que no ocurría en el biomecanizado).

Se prepararon tres muestras (M-I, M-II y M-III) de concentración $6 \text{ gFe}^{2+}/\text{L}$ según el procedimiento indicado en 3.2.1.2, procediéndose a continuación con el crecimiento de las bacterias bajo las condiciones indicadas en el mismo apartado.

Paralelamente a la etapa de crecimiento de las muestras M-I, M-II y M-III, se creció un cultivo (C-I) según el mismo proceso y para la misma concentración de hierro ferroso inoculándose con un 7% (v/v) de *L. ferrooxidans*. El crecimiento de C-I se paralizó tras aproximadamente 15 horas, pues en base a los resultados obtenidos en el apartado 6.3.1 se encontraba en la fase de crecimiento exponencial.

Para la obtención del concentrado de bacterias, se siguió el mismo proceso indicado en 7.1.3. Finalizado el crecimiento de las bacterias de la muestra M-III, se adicionaron 5 mL del concentrado a la misma.

El ensayo se constituyó por una primera etapa de biomecanizado, seguida de 4 horas de regeneración y finalmente una última etapa de biomecanizado de otra hora. Las condiciones de regeneración fueron de 180 rpm de agitación y $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ para las muestras M-I y M-III y de 200 rpm de agitación y $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ para la muestra M-II.

Durante los periodos de regeneración, en intervalos de 1 hora, en todas las muestras se analizaron el hierro ferroso y el pH y Potencial Redox siguiendo la metodología establecida en los apartados 3.2.4.2 y 3.2.8 respectivamente.

Durante los periodos de regeneración, el pH no se ajustó en ninguna de las muestras, únicamente al finalizar y previo al comienzo de la siguiente etapa de biomecanizado.

7.6.2. Resultados y discusión

El comportamiento de las muestras M-I, M-II y M-III fue idéntico. Tras cuatro horas de regeneración todas volvieron a obtener una tasa de remoción similar a la inicial (Tabla 7.3). En la Figura 7.13 se pueden observar los resultados de la evolución del hierro ferroso. En la misma figura también se ha indicado los resultados de la regeneración en condiciones de 150 rpm y 30 °C con fines comparativos. Se ha indicado la duración del periodo de regeneración para una mejor comprensión.

Tabla 7.3. Tasas de remoción de las muestras M-I, M-II y M-III en las etapas de biomecanizado.

	M-I	M-II	M-III
Tasa de remoción en la 1ª etapa (mg/h)	87.5	111.7	91.4
Tasa de remoción en la 2ª etapa (mg/h)	86.8	110.1	97.7

El comportamiento de las tres muestras es semejante al de la regeneración a 150 rpm y 30 °C estudiado para *A. ferrooxidans* en medio MAC con anterioridad, si bien a 150 rpm parece que la oxidación de hierro ferroso es un poco más rápida tras la primera hora de regeneración

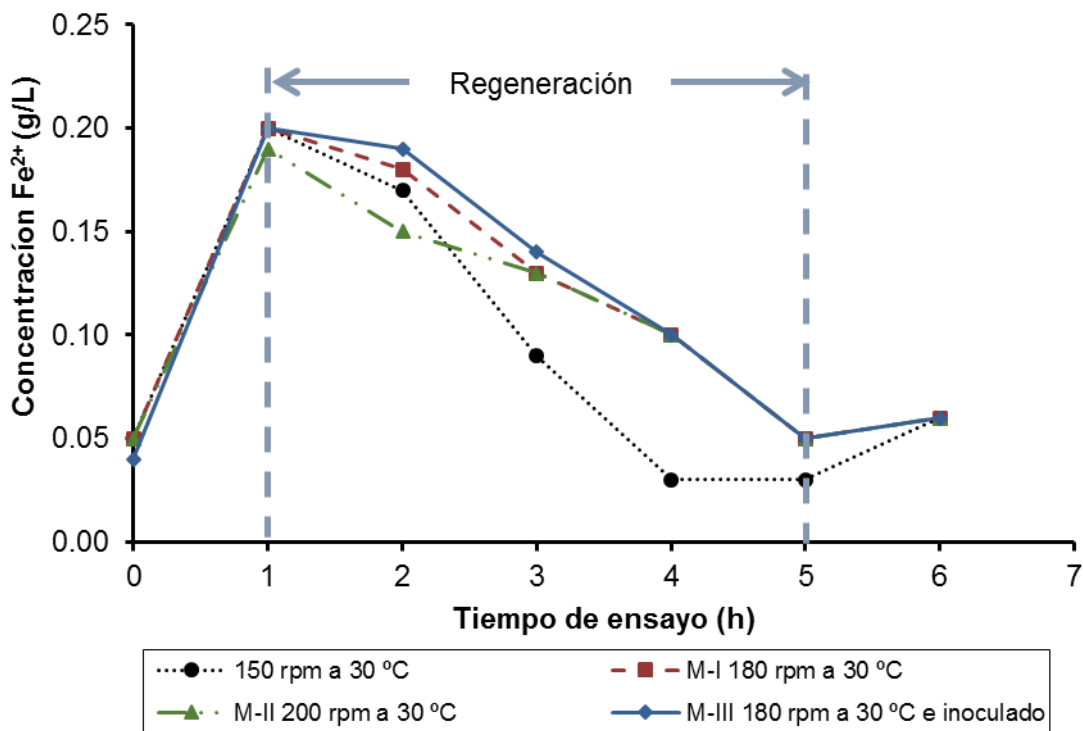


Figura 7.13. Concentración de hierro ferroso para las muestras M-I, M-II y M-III.

En cuanto al Potencial Redox, de nuevo siguió la misma tendencia en todas las disoluciones, con prácticamente valores semejantes en cada hora de estudio en todos los casos (Figura 7.14). Como era habitual, el Potencial Redox disminuyó durante la primera hora de biomecanizado, aumentando luego durante las 4 horas de regeneración y volviendo a disminuir al introducir la probeta por segunda vez.

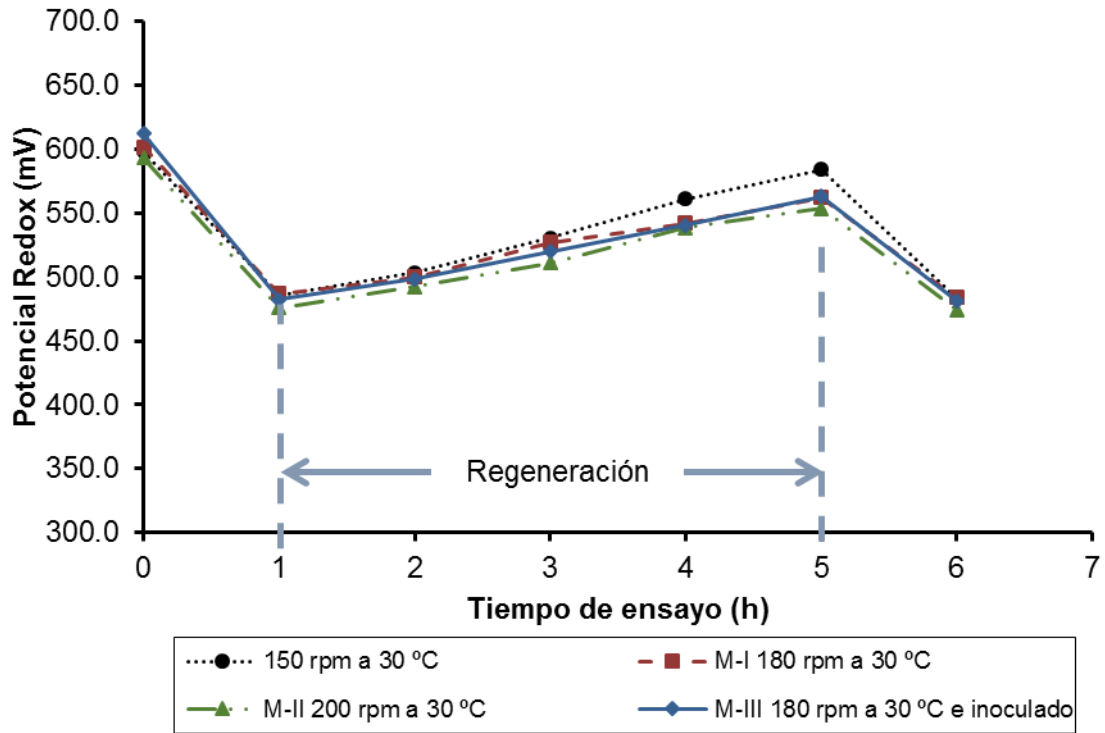


Figura 7.14. Potencial Redox para las muestras M-I, M-II y M-III.

7.7. Propuesta de reactor de operación en continuo

Habiendo logrado el objetivo de obtener un proceso de biomecanizado en continuo, y con vistas a la posible aplicación industrial que el mismo pudiera llegar a tener, se diseñó un reactor como el que aparece en la Figura 7.15.

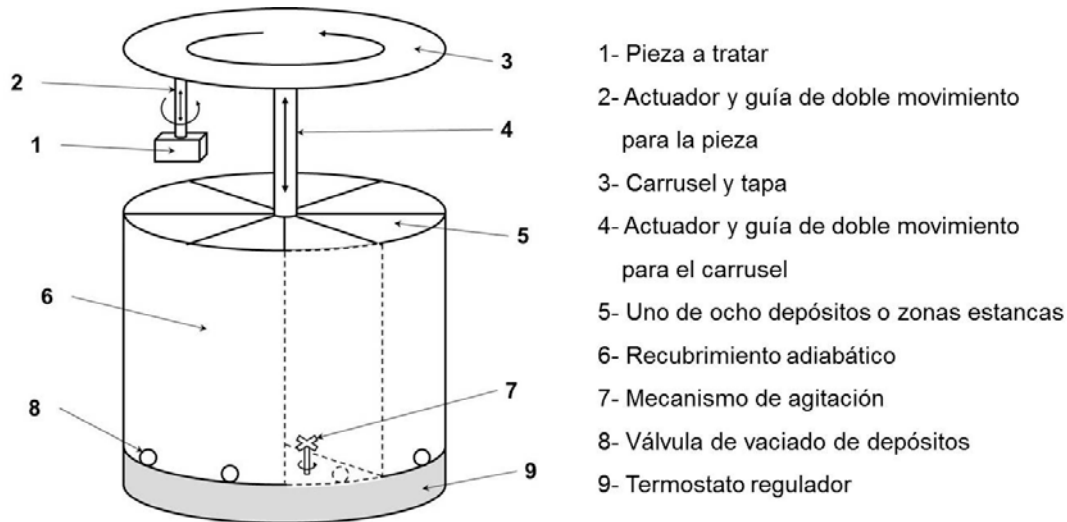


Figura 7.15. Propuesta de reactor para operación de biomecanizado en continuo.

De manera simplificada, el modo de operación era el siguiente. El proceso permitía la remoción de OFE, en la pieza (1) mediante soporte (2) en cualquiera de los recintos de tratamiento (5). Transcurrida una hora, la pieza sería extraída del recinto mediante plataforma (3) y actuador (4) pasando al siguiente recinto. En ese instante, la disolución del recinto del que la pieza había sido extraída comenzaría con su periodo de regeneración. Tras la siguiente hora, la pieza sería extraída del recinto y de nuevo introducida en un nuevo medio, comenzando la regeneración para el recinto anterior. Y así sucesivamente hasta que la pieza volviera a ser introducida en el primer recinto, cuya disolución estaría completamente regenerada.

El número de recintos debería ser como mínimo las horas que el medio necesitaría para regenerarse más uno más. Es decir, si por ejemplo se estuviera trabajando en medio MAC con la bacteria *A. ferrooxidans*, dado que su tiempo de regeneración es de 4 horas (ver apartado 7.5.2), se necesitaría un total de cinco recintos.

Este diseño, permitiría además poner en algún recinto intermedio una disolución de lavado. De esta manera la pieza podría ser lavada para así remover el precipitado que se hubiera podido depositar en su superficie o incluso, poder esterilizarla para no contaminar las disoluciones de los siguientes recintos.

Debido a la necesidad de agitar y mantener una temperatura constante en el sistema para una correcta operación y una máxima tasa de remoción, el reactor dispondría de un sistema de regulación de temperatura (9), favorecido por el aislamiento del sistema (6). La remoción se conseguiría que fuera homogénea mediante el sistema de agitación (7).

Una vez se considerara que la disolución había llegado a su fin de vida útil, ésta sería extraída mediante válvula (8), no sin antes realizar el tratamiento de dicho residuo líquido según la metodología dispuesta en el apartado 5.5.

7.8. Conclusiones

En este apartado, son varias las pruebas que se llevaron a cabo con el objetivo de conseguir un proceso de biomecanizado continuo.

La precipitación del cobre divalente, conllevó una reducción del hierro férrico a hierro ferroso, lo que se tradujo en una disminución de la concentración de hierro férrico y consecuentemente un aumento de la concentración de hierro ferroso. La tasa de remoción descendió tras la primera hora de ensayo, incluso más que en la disolución en la que no se precipitó el cobre divalente. Así pues la opción de eliminar el cobre divalente de la disolución mediante ácido sulfhídrico no dio el resultado esperado, quedando invalidada. Además, se debe recordar que el gas empleado es tóxico y en ciertas concentraciones puede producir mal olor, siendo también de difícil manejo.

El realizar el proceso de biomecanizado al mismo tiempo que se dio el crecimiento de las bacterias, permitió reducir los tiempos muertos del proceso, utilizando la etapa de crecimiento como tiempo útil. Sin embargo, resultó ser imprescindible tener que ajustar el pH durante el proceso, debido a que éste aumentó de manera más rápida que en un proceso de crecimiento convencional, haciendo que el hierro precipitara manera inesperada.

El proceso de biomecanizado durante el crecimiento en medio MAC tuvo resultados en los dos tipos de bacterias estudiadas. Para el caso de *S. thermosulfidooxidans*, las tasas de remoción fueron bastante inferiores a las obtenidas con *A. ferrooxidans*, si bien en ambos casos las tasas fueron menores a las alcanzadas para un biomecanizado convencional, realizado tras haber alcanzado la etapa de crecimiento estacionario en las bacterias y haberse dado por completo la oxidación del hierro ferroso.

En el caso de *S. thermosulfidooxidans*, se observó un retardo en el comienzo del crecimiento de las bacterias, posiblemente debido a que la presencia del cobre interfirió en su metabolismo, ralentizándolo. Por el contrario, el realizar el biomecanizado durante el crecimiento de la bacteria *A. ferrooxidans* supuso un crecimiento más abundante y de menor tamaño, debido a que estaban en continua división.

Si bien en un principio se pensó que el realizar el biomecanizado junto con el crecimiento de las bacterias daría como resultado una concentración de hierro ferroso constante y por tanto la existencia de la fuente de energía inagotable para las bacterias, resultó no ser así. El hierro ferroso fue disminuyendo a medida que avanzó el ensayo, no pudiendo darse una explicación concreta a este comportamiento.

En cuanto a los estudios realizados dentro del conjunto de actuación en el biomecanizado, ni el inocular las disoluciones con un concentrado de biomasa en su estado más activo (estado exponencial de crecimiento), ni realizar el crecimiento con una cierta concentración inicial de azufre supuso mejora alguna. Al igual que con las propuestas anteriores, la tasa de remoción seguía descendiendo.

La opción que sí dio resultado fue el introducir un periodo de regeneración entre sucesivas etapas de biomecanizado. El extraer la probeta de la disolución y dejarla durante cierto tiempo bajo las mismas condiciones de agitación y temperatura a las que se realizó el biomecanizado, hizo que las bacterias siguieran actuando, oxidando de nuevo el hierro ferroso por completo. Al igual que ocurría durante el periodo de crecimiento, durante la regeneración tanto el pH como el Potencial Redox aumentaban, llegando este último a alcanzar los valores habituales superiores a 600.0 mV.

Comparando el periodo de regeneración las diferentes bacterias estudiadas, la regeneración más larga se dio para el caso de *S. thermosulfidooxidans* con una duración de 16 horas. Para el caso de *A. ferrooxidans* en medio 9K, tras una etapa de 4 horas de biomecanizado, tardó 8 horas en regenerarse por completo, mientras que en medio MAC, tras 1 hora de biomecanizado, tardó 4 horas.

El intento de optimización de la regeneración en medio MAC para *A. ferrooxidans* no dio resultados. Ni aumentando la agitación, ni inoculando la disolución con *L. ferrooxidans* se consiguió reducir el tiempo de regeneración establecido en 4 horas. Incluso la oxidación del hierro para los tres casos estudiados durante el periodo de

regeneración se dio de una manera más lenta en comparación con las condiciones de regeneración habituales (150 rpm y 30 °C).

Así pues, se evidenció la necesidad de intercalar periodos en los que la disolución trabajara sin probeta entre sucesivos biomecanizados para poder obtener un proceso de biomecanizado controlado, estable y fiable, en el que la remoción se de manera constante. Las mejores condiciones de regeneración se establecieron en 150 rpm y 30 °C en medio MAC con *A. ferrooxidans*.

Finalmente, se diseñó un prototipo de reactor para el proceso de biomecanizado en continuo. Su diseño básico consistía en un conjunto de recintos, estando el número en función del tiempo de regeneración necesario. La pieza a mecanizar avanzaría de recinto en recinto, introduciéndose en disoluciones ya regeneradas y asegurando así una tasa de remoción máxima a la par que constante. El sistema permitiría hacer el tratamiento del residuo líquido obtenido previo a su vertido.

7.9. Referencias

- Ban J.R., Gu, G.H., Hu, K.T., 2013. Bioleaching and electrochemical property of marmatite by *Leptospirillum ferrooxidans*. Transactions of Nonferrous Metals Society of China 23, 494-500.
- Carbajosa, S., et al., 2010. Electrochemical growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on a graphite electrode for obtaining a biocathode for direct electrocatalytic reduction of oxygen. Biosensors and Bioelectronics 26, 877-880.
- Chang, J.H., Hocheng, H., Chang, H.Y., Shih, A., 2008. Metal removal rate of *Thiobacillus thiooxidans* without pre-secreted metabolite. Journal of Materials Processing Technology 201, 560-564.
- Dopson, M., Baker-Austin, C., Koppineedi, P.R., Bond, P.L., 2003. Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic microorganisms. Microbiology 149, 1959-1970.
- Ghuri, M.A, Okibe, N., Johnson, D.B., 2007. Attachment of acidophilic bacteria to solid surfaces: The significance of species and strain variations. Hydrometallurgy 85, 72-80.
- Istiyanto, J., Jo Ko, T., Yoon, II-C., 2010. A study on copper micromachining using microorganisms. International Journal of Precision Engineering and Manufacturing 11 (5), 659-664.

- Jadhav, U., Hocheng, H., 2014. Use of *Aspergillus niger* 34770 culture supernatant for tin metal removal. *Corrosion Science* 82, 248-254.
- Johnson, D., Warner, R., Shih, A.J., 2007. Surface roughness and material removal rate in machining using microorganisms. *Journal of Manufacturing Science and Engineering* 129, 223-227.
- Kumada, M., [et al.] 2001. Investigation of fine biomachining of metals by means of microbially influenced corrosion: Differences between Steel and copper in metal biomachining using *Thiobacillus ferrooxidans*. *Corrosion Engineering* 50, 585-596.
- Lambert, F., [et al.] 2015. Copper leaching from waste electric cables by biohydrometallurgy. *Minerals Engineering* 76, 38-46.
- Orell, A., Navarro, C.A., Arancibia, R., Mobarec, J.C., Jerez, C.A., 2010. Life in blue: Copper resistance mechanisms of bacteria and *Archaea* used in industrial biomining of minerals. *Biotechnology Advances* 28, 839-848.
- Podar, M., Reysenbach, A.L., 2006. New opportunities revealed by biotechnological explorations of extremophiles. *Current Opinion in Biotechnology* 17, 250-255.
- Rawlings, D.E., 2005. Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microbial Cell Factories* 4, 13-27.
- Shikata, S., Sreekumari, K.R., Nandakumar, K., Ozawa, M., Kikuchi, Y., 2009. Laboratory studies on biomachining of copper using *Staphylococcus sp.* *Biofouling* 25(6), 557-562.
- Xenofontos, E., Feidiou, A., Costantinou, M., Constantinides, G., Vyrides, I., 2015. Copper biomachining mechanisms using the newly isolated *Acidithiobacillus ferrooxidans* B1. *Corrosion Science* 100, 642-650.
- Zhang, D., Li, Y., 1999. Studies on kinetics and thermodynamics of biomachining pure copper. *Science in China, Series C* 42 (1), 57-62.
- Zhu, J., [et al.] 2012. Adhesion forces between cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* or *Leptospirillum ferrooxidans* and chalcopyrite. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 94, 95-100.

CAPITULO 8

PRESERVACION DE *A. ferrooxidans*

8. PRESERVACIÓN DE *A. ferrooxidans*

8.1. Introduction

Considering the use of biomachining as a complement or an alternative process of the traditional ones, the study of bacteria preservation for their further use is of great interest. This will provide the opportunity of reducing the costs related to the acquisition of bacteria once the process is implemented in the industry.

Regarding *A. ferrooxidans* preservation, few studies have been performed up to date. Enabling long term storage of the cells whilst preserving its viability would ensure not only the availability of the microorganisms for their further use, but also the avoidance of mutation or even the contamination of the culture (Wu et al., 2008; Kurtzman and Labeda, 2009; Hegler and Kappler, 2010; Overmann, 2013).

Freezing in liquid nitrogen at -70 °C (Gupta and Agate, 1986, Wu et al., 2013), freezing (Barron et al., 1990), mixing with inert carriers (Gupta and Agate, 1986) and liquid drying (Cleland et al., 2004) have been reported to be successful techniques for *A. ferrooxidans* preservation. On the contrary, this microorganism has been reported to be challenging to preserve by freeze drying (Gupta and Agate, 1986, Cleland et al., 2004). This is a highly recommendable method that allows the samples to be stored at room temperature, thus reducing storing and distribution costs. Nevertheless, Cleland et al. (2004) reported that only 10-100 viable cells per vial were recovered after freeze drying using glycine betaine (12% w/v) as cryoprotectant.

A. ferrooxidans are highly susceptible to cryoinjury (Wu et al., 2013). Therefore, the addition of a suitable protective agent is critical in order to increase cell survival (Cleland et al., 2004, Wu et al., 2013, Chotiko and Sathivel 2014). Even though a wide variety of compounds have been tested (Hubalek, 2003), the most adequate cryoprotectant largely depends on the microorganism (Morgan et al., 2006). In the particular case of *A. ferrooxidans*, protective agents such as GP, glycine betaine, skimmed milk, sucrose, sucrose + mannitol and glycerol have been already tested in the different preservation methods described above (Gupta and Agate, 1986, Cleland et al., 2004, Wu et al., 2013). The preservation in the absence of cryoprotective agents is also possible by means of cryoballs, whose use is now widespread (García et al., 2011).

In this chapter, preservation experiments were conducted for *A. ferrooxidans* in freeze drying, freezing, drying and continuous techniques, studying the influence of different

cryoprotectants and also the storage time among other key parameters. Figure 1 summarizes the carried out steps for a better understanding.

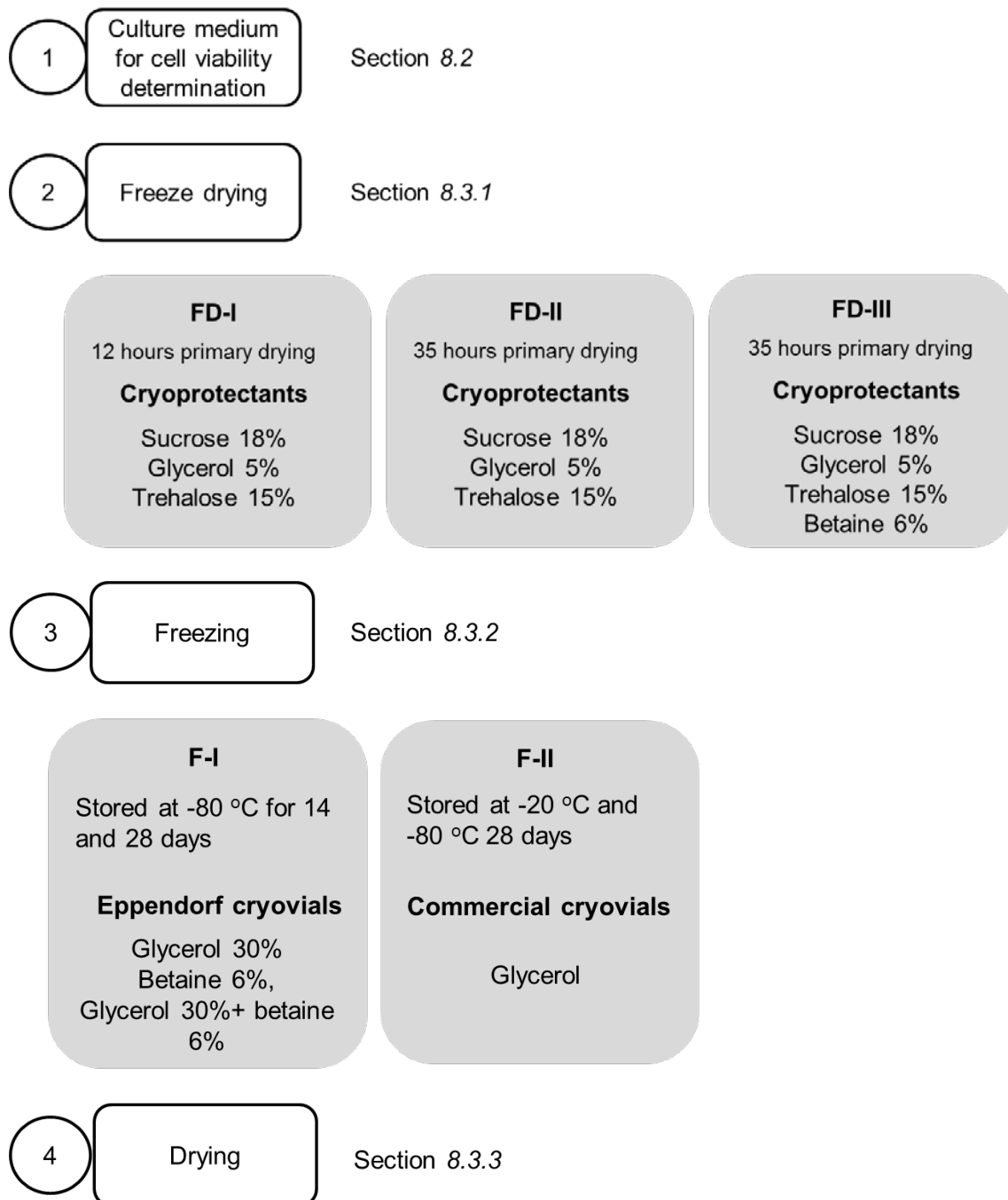


Figure 8.1. Experimental set-up diagram.

8.2. Culture medium for cell viability

8.2.1. Experimental set-up

Three culture media (CM-I, CM-II and CM-III) were tested separately in order to determine their suitability for cell viability determination by making colony counts on solid media. Both CM-I and CM-II media, described by Sugio et al. (1984) and Johnson et al. (1987), respectively, contained $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ and FeSO_4 . In addition, the first was supplemented with KCl , K_2HPO_4 and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ whereas the second one required only the addition of tryptone soya broth (TSB). Bacteria were incubated at 28 °C until growth was observed.

The chemical composition and the initial pH value (adjusted with sulfuric acid) of the three tested solid media are shown in Table 8.1.

Solid medium	Chemical composition (g/L)	Reference
C-I	3.0 (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.1KCl 0.5 K ₂ HPO ₄ 0.5MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.01Ca(NO ₃) ₂ 16.5 FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.7% (w/v) Agarose pH 2.5	Sugio et al. (1984)
	Solution A: 20% (w/v) FeSO ₄ (36.57 g/L FeSO ₄ ·7H ₂ O). pH 2.0	
	Solution B: 1.8 (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.7 MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.35 TSB pH 2.5	Johnson et al. (1987)
C-II (FeTSB)	Solution C: Agarose 2.8% (w/v) No pH adjustment	
	A:B:C solutions mixed in 1:14:5 ratio	
	Solution A: 0.5 (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.5 Mg(SO ₄)·7H ₂ O 0.5 K ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O 5.0 mL H ₂ SO ₄ (15 N) pH 1.3	Robertson and Gijs-Kuenen (2006)
C-III	Solution B: 167 g FeSO ₄ ·7H ₂ O 50 mL H ₂ SO ₄ (15 N) pH 1.3	
	A:B solutions mixed in 4:1 ratio and agarose added to 0.7% (w/v)	

Table 8.1. Chemical composition and initial pH of the culture medium

8.2.2. Results and discussion

A. ferrooxidans were developed on the solid medium described by Johnson et al. (1987) (CM-II) and Sugio et al. (1984) (CM-I) within 6-7 days of incubation at 28 °C. On the contrary, bacteria growth was not observed when using the medium described by Robertson and Gijs-Kuenen (2006), even after 11 days of incubation (see Figure 8.2). CM-I (Table 5.1) was selected for microorganisms' viability counts, due to its lower complexity compared to the medium CM-I.

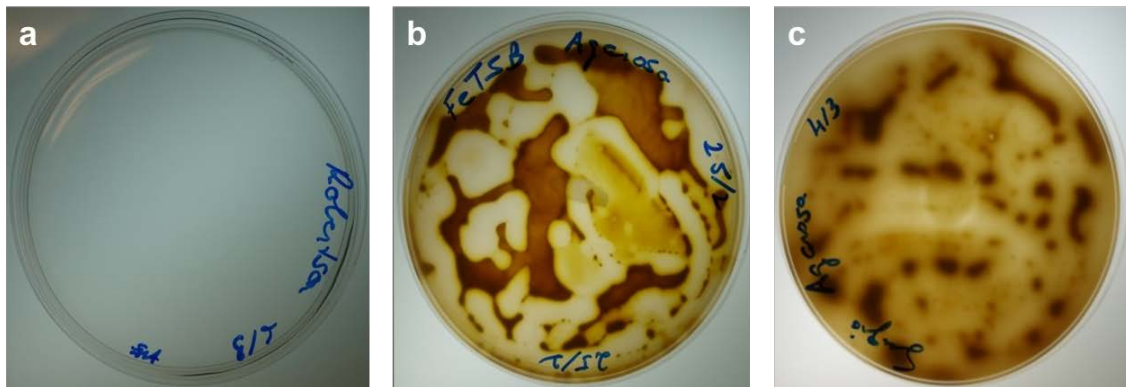


Figure 8.2. *A. ferrooxidans* growth in the three medium tested, a) CM-I, b) CM-II and c) CM-III.

8.3. Cell preservation

Cryopreservation of bioleaching bacteria was first reported about 40 years ago (Wu et al., 2013). From that time on, several preservation methods, protocols and cryoprotectants have been developed.

Storing microorganisms methods generally include passage culture, sterile sand tube preservation, freeze drying and freezing (Zeng et al., 2010). When one of the last two methods are mentioned in relation to the preservation of microorganisms, it is nearly always with regards to long-term storage (Morgan et al., 2006, Overmann, 2013). Whenever possible, long-term storage methods must be considered as the most appropriate option, since they involve stopping the growth of the cells and keeping them in viable state (García et al., 2011).

8.3.1. Freeze drying

8.3.1.1. Experimental set-up

Freeze drying, also known as lyophilisation, is a stabilizing process in which a substance is first frozen and then the quantity of water is reduced first by sublimation (primary drying) and then by desorption (secondary drying) (García et al., 2011). It is currently one of the most economical and preferred methods of culture collections preservation worldwide (Safronova and Novikova, 1996, Morgan et al., 2006, Morgan and Vesey, 2009).

In the process, samples are first frozen and then the water content is reduced in two consecutive steps: sublimation (primary drying) and desorption (secondary drying) (García et al., 2011). It is essential to determine a correct culture time prior to cells harvesting and also to select an appropriate cryoprotectant agent (Morgan and Vesey, 2009).

Freeze drying was tested as a possible storage method for *A. ferrooxidans* microorganisms by means of three experiments FD-I, FD-II and FD-III (Table 8.2).

The influence of the primary drying duration and the cryoprotectant agent used on *A. ferrooxidans* freeze dried cell viability was studied in two different experiments (FD-I and FD-II). In both experiments three cryoprotectants with the following concentration were tested: glycerol 5% (w/v), sucrose 18% (w/v) and trehalose 15% (w/v). Regarding the primary drying duration, it was set at 12 hours in FD-I and at 35 hours in FD-II. Cell growth period was 14 and 18 days in experiment FD-I and FD-II, respectively.

In the third experiment (FD-III) cells with 4 growth days were used, in order to study the influence of using less mature cells from the beginning of the process. In addition to the cryoprotectants used in previous experiments (FD-I and FD-II), a fourth cryoprotectant agent was tested in FD-III: betaine (6% w/v). Primary drying duration in FD-III was the same as in FD-II (35 hours). In this third experiment, duplicates of each sample were freeze dried in order to study the influence of cell viability after storage at 4 °C for one month (4 weeks).

In all the experiments (FD-I, FD-II and FD-III), the first step in sample preparation was the removal by deposition of the solid ferrous residues that could exist in solution after cell growth. Thus, the culture (200 mL - 400 mL) was incubated at room temperature for 10 minutes without shaking. After deposition, cells were harvested by centrifugation (Eppendorf 5810-R) at 10000 rpm during 20 minutes and at 4 °C, in 65 mL aliquots. The cell pellet obtained in each tube was washed and re-suspended using 10-15 mL of 9K medium. The re-suspended aliquots were collected together as a single sample which was then centrifuged under the same conditions described above. The supernatant was removed and the cell pellet re-suspended in 10 mL of distilled water.

The re-suspended bacteria were divided into aliquots in 1.5 mL Eppendorf tubes (1.5 mL per tube) and centrifuged in an Eppendorf 5415-R microcentrifuge under the aforementioned conditions (10000 rpm, 20 minutes, 4 °C). After removing the supernatant, the cell pellet was re-suspended in 0.5 mL of the corresponding cryoprotectant (Table 8.2). In the three experiments two additional samples were re-suspended in distilled water as a control. All the samples were incubated at 30 °C for 1 hour.

Finally, freeze drying was carried out in a Telstar LyoBeta 20, and consisted of three stages: freezing at -40 °C, primary drying at 5 °C (12 hours in FD-I and 35 hours in FD-II and FD-III, 0.250 mbar), and secondary drying at 30 °C (3 hours, 0.250 mbar) .

One of the two samples re-suspended in distilled water was used to define the initial cell concentration (prior to freeze drying) by serial dilutions in CM-II medium.

Cell viability was determined before (CFU_0) and after (CFU_t) storage. Both the initial and final CFU/mL were calculated by making serial dilutions of the liquid samples and spread plating onto the surface of Petri plates containing CM-II medium (Table 8.1). Plates were incubated at 30°C for 12-14 days. The viability rate (V%) was expressed by the cell survival rate as indicated in Equation 8.1 (Zeng et al., 2009).

$$V (\%) = 100 \cdot CFT_t / CFU_0 \quad (\text{Equation 8.1})$$

A. ferrooxidans viability was tested just after freeze drying in the samples obtained in all the experiments (FD-I, FD-II and FD-III). In addition, in experiment FD-III, one of the aliquots of each sample was stored at 4 °C for 4 weeks. Cell viability was determined by re-suspending the samples in 1 mL of distilled water and calculating the number of colony forming units per milliliter (CFU/mL) as Equation 8.1.

Table 8.2. Freeze drying experiments

	FD-I	FD-II	FD-III
Culture time (days)	14	18	4
Initial cell concentration (CFU/mL)	$1.8 \cdot 10^9$	$5.2 \cdot 10^8$	$2.1 \cdot 10^9$
Primary drying temperature (°C)	5	5	5
Primary drying duration (h)	12	35	35
Secondary drying temperature (°C)	30	30	30
Secondary drying duration (h)	3	3	3
Cryoprotectant	Glycerol (5%) Sucrose (18%) Trehalose (15%)	Glycerol (5%) Sucrose (18%) Trehalose (15%)	Glycerol (5%) Sucrose (18%) Trehalose (15%) Betaine (6%)
Storage time	None	None	None 4 weeks at 4 °C

8.3.1.2. Results and discussion

It has been already reported that cell survival rate could vary noticeably depending on the equipment and the process conditions (Morgan and Vesey, 2009, Zeng et al., 2010). As expected, the primary drying duration had an influence on freeze drying effectiveness. In FD-I (12 h of primary drying) only the negative control was successfully freeze dried, while the samples re-suspended in glycerol, sucrose and trehalose were damp after the process. On the contrary, when the primary drying was set at 35 hours (FD-II and FD-III), the control and the sample re-suspended in the trehalose solution were effectively freeze dried.

After FD-I (primary drying = 12 h) cell viability decreased drastically and survival rate was below 0.10% in all the samples (Figure 8.3). The best results were obtained in the control sample, even though cell viability dropped at least 4 orders of magnitude (from $1.8 \cdot 10^9$ CFU/mL to $1.1 \cdot 10^5$ CFU/mL). Cell counts in the samples preserved using cryoprotectants ranged between $2.8 \cdot 10^2$ CFU/mL and $8.1 \cdot 10^3$ CFU/mL.

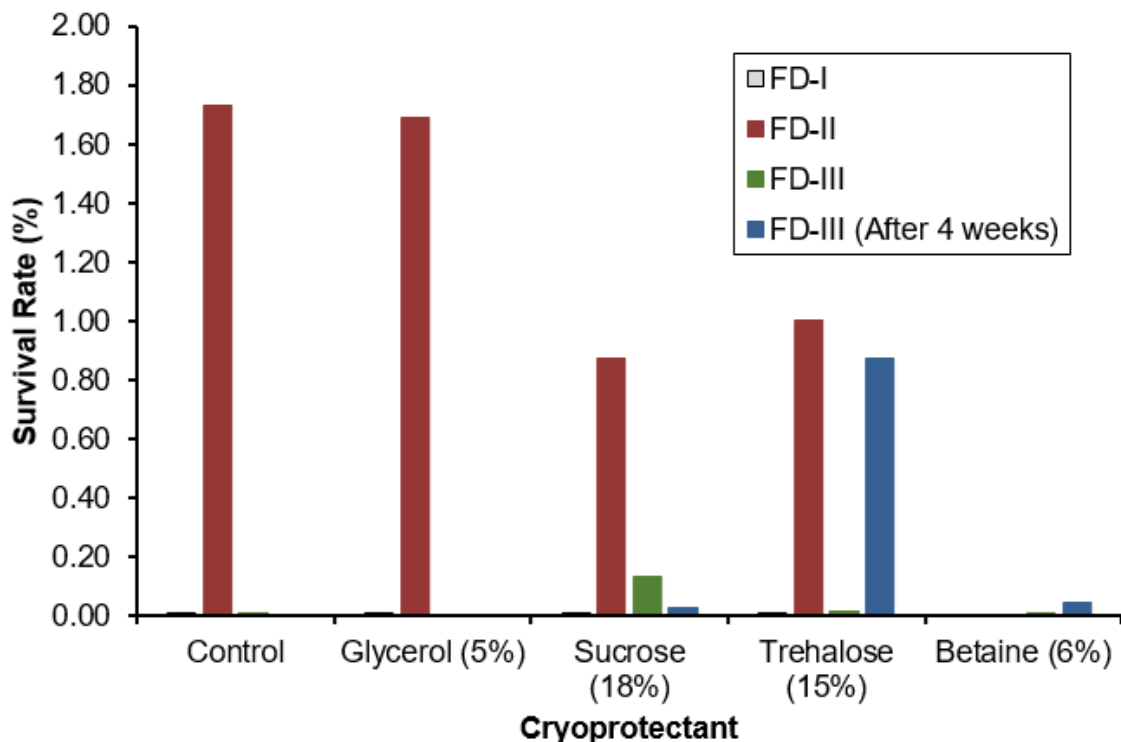


Figure 8.3. Survival rate after freeze drying in experiments FD-I (12 h of primary drying), FD-II (35 h of primary drying) and FD-III (35 h of primary drying).

Survival rate increased when the duration of the primary drying was prolonged to 35 h in experiment FD-II (Figure 8.3). Nevertheless, only 0.90-1.70% of the cells survived after freeze drying in all the samples, being the control and the sample supplemented with glycerol reported the highest survival rates. Even though the survival rate was low, Bozoglu et al. (1987) reported that the survival of 0.1% of the original cell population after freeze drying has been suggested to be a sufficient number to allow continuation (Bozoglu et al., 1987). On the contrary, Morales-García et al. (2010) and García et al. (2011) set a higher necessary survival percentage after storage (70-80%).

Cell viability was further reduced in experiment FD-III. In this experiment, the control achieved the highest survival rate (0.01%). As the operation conditions were the same as in FD-II (primary drying set at 35 hours), the reason of this dissimilarity could be related to the early stage in which the samples were harvested prior to freeze drying (18 days for FD-II and 4 days for FD3-III).

It is noteworthy that in the sample in which glycerol was used as cryoprotectant in FD-III, *A. ferrooxidans* were not detected. This could be related to the complicated retrieval procedure that it involves which, as reported by Wu et al. (2013), makes glycerol not an ideal cryoprotectant for many bioleaching bacteria.

The influence of storing time on cell survival was determined in the samples from experiment FD-III, even though cell survival immediately freeze drying was extremely low. Storing the samples in FD-III for 4 weeks at 4 °C after freeze drying had a negative impact in all the samples. Cell viability in the aliquots preserved using sucrose, trehalose and beatine decreased to $7 \cdot 10^1$ CFU/mL, $2.3 \cdot 10^3$ CFU/mL and $2.0 \cdot 10^1$ CFU/mL, respectively, which accounts for the 0.03%, 0.87% and 0.04% of the viable cells immediately after freeze drying. Bacteria were not detected in the control sample and in that supplemented with glycerol after 4 weeks of storage.

8.3.2. Freezing

8.3.2.1. Experimental set-up

Along with freeze drying, freezing is considered to be the most feasible and effective storage procedure for pure strains and mixed cultures in long time (Zeng et al., 2010).

This storage method is based on the freezing of cells that have been suspended in a liquid medium, which could or not contain a cryoprotective agent (although it is advisable). The storage is done at temperatures under below 0 °C, thus maintaining intracellular and extracellular water in a solid state (García et al., 2011). The low temperatures reduces de cell metabolism activity and due to the absence of liquid water the cell growth is prevented. Generally, the colder the storage temperature, the lower the intracellular recrystallization of water and the longer the culture will retain viable cells (García et al., 2011).

Regarding *A. ferrooxidans*, two freezing procedures were tested with the aim of studying the possibility of preserve them by this method.

The study was initiated with cells harvesting by centrifugation (10000 rpm, 15 minutes and 4°C, Eppendorf 5810-R) in five aliquots of 65 mL (total initial sample volume = 325 mL). The cell pellet obtained in each tube was washed and re-suspended using 10-15 mL of distilled water. The re-suspended aliquots were collected together as a single sample which was then centrifuged under the previously described conditions. The supernatant was removed and the cell pellet re-suspended in 15 mL of sterile distilled water. Thereafter, the effect of two freezing procedures on *A. ferrooxidans* viability were tested. The first method consisted of cryofreezing the samples in Eppendorf tubes using different cryoprotectans (F-I), while commercial Cryoinstant vials (Scharlab) were used in the second method (F-II). The experiments were carried out with different

storage temperatures and storage durations as key factors to obtain a high survival rate.

F-1: Freezing using Eppendorf cryovials

Freezing procedure was based on the protocols reported by Cleland et al. (2004), Wu et al. (2008) and Wu et al. (2013).

The re-suspended bacteria were distributed in 13 sterile Eppendorf tubes (1.5 mL), in 1 mL aliquots, and were centrifuged at 10000 rpm and 4 °C for 15 minutes (Eppendorf 5810-R). The supernatant was removed and the cell pellet in each Eppendorf tube was re-suspended in 1 mL of the following protective agents: 3 aliquots were re-suspended in a autoclaved glycerol solution (30%, w/v) (Selecta 40001415); 3 aliquots in a filter sterilized betaine solution (6%, w/v); and 3 aliquots in a sterile mixed solution containing glycerol and betaine (30% glycerol and 6% betaine, w/v). In addition, 4 aliquots were re-suspended in distilled water and were considered as controls.

The initial cell concentration of the samples prior to freezing was determined by spread plating one of the control samples onto the surface of a Petri plate containing CM-II medium. The determined initial cell concentration was approximately 1.4×10^9 CFU/mL, and was considered to be similar for all the samples before freezing. The rest of the samples were progressively frozen in three consecutive steps: first the vials were refrigerated at 4 °C for 30-40 min, then incubated at -20 °C for 1 hour and, finally, stored at -80 °C up to 28 days.

Cell viability was calculated on day 14 and 28, in order to evaluate the effect of preservation time in *A. ferrooxidans* viability. Eppendorf vials were thawed in a water bath set at 37 °C, and the cryoprotectant was then removed by centrifugation (10000 rpm, 10 minutes, 4 °C, Eppendorf 5810-R). The cell pellet was washed twice using 1 mL of fresh 9K broth (centrifuged at 10000 rpm, 10 minutes, 4 °C) before it was re-suspended and ten-fold diluted in distilled water.

Finally, the cell viability of each sample was obtained by Equation 8.1 as described in 8.2.2.1.

Freezing using commercial cryovials

Two samples of 1.0 mL each were frozen using the commercially available Cryoinstant vials (Scharlab), which contain a culture medium and glycerol as cryoprotectant. One of the cryovials was stored at -20 °C for 28 days while the second was frozen at -20 °C for 1 hour, and then stored at -80 °C for 28 days. On day 14 and 28 the commercial cryovials were thawed at room temperature and two pearls were extracted from each cryovial. Cell viability after freezing was calculated as described in 8.2.2.1 by spreading the pearls in B solid medium and incubating the samples at 30 °C until bacterial colonies were developed (Equation 8.1).

8.3.2.2. Results and discussion

F-I: Freezing using Eppendorf cryovials

For F-I experiments (Eppendorf cryovials) storing time (14 and 28 days) did not have a significant impact on cell survival in the samples stored at -80 °C in Eppendorf tubes and treated with the same cryoprotectant, except in those in which glycerol was added (Figure 8.4). On the contrary, the cryoprotectant used influenced cell viability after freezing. The sample stored in the 6% (w/v) betaine solution showed the highest cell viability after 28 days ($5.1 \cdot 10^8$ CFU/mL), with a 37.78% survival rate. This later parameter was slightly lower (15.19%) in the sample preserved in the absence of the protective agents (control) and noticeably lower in the samples stored with the glycerol and glycerol + betaine solution (0.03% and 1.61%, respectively).

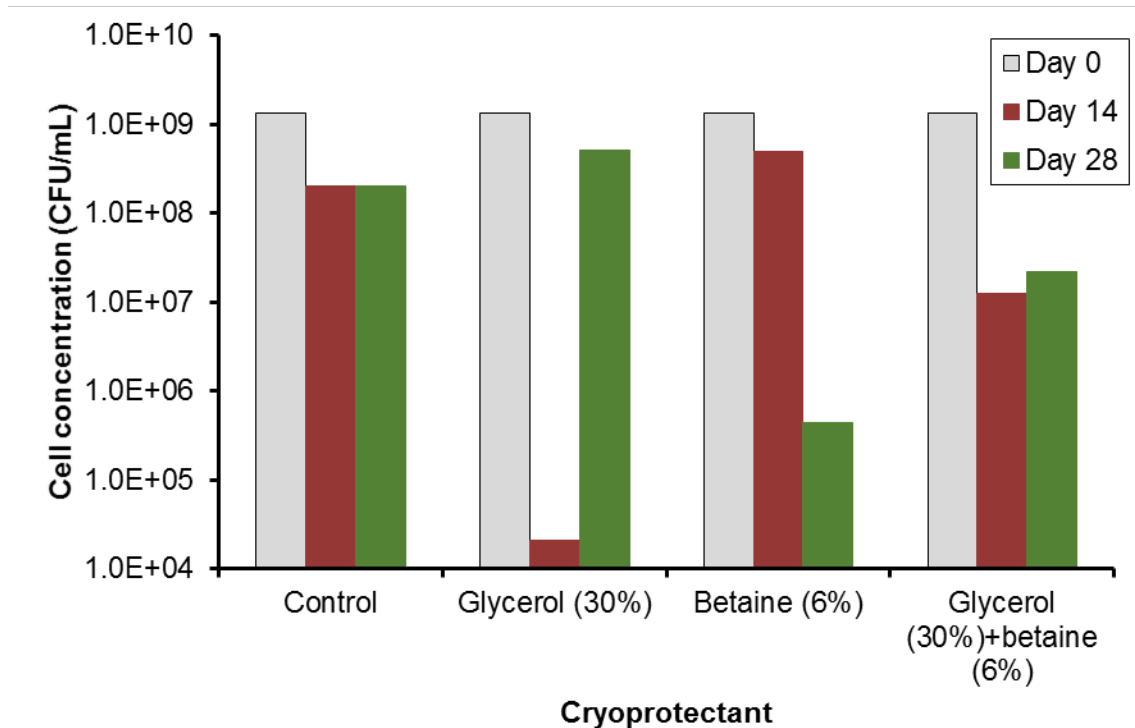


Figure 8.4. *A. ferrooxidans* cell concentration after freezing at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Eppendorf vials (F-I) for 14 and 28 days and using different cryoprotectants.

Freezing using commercial cryovials

In the samples stored in commercial cryovials (F-II), cell viability was influenced by both storing time and freezing temperature. Regardless the storing temperature cell viability decreased with time. This drop was more significant in the samples stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ than in those stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cell growth was not observed after 28 days in the samples stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, while the microorganism was recovered from those samples stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for the same period of time. The cell viability of the samples is shown in Figure 8.5.

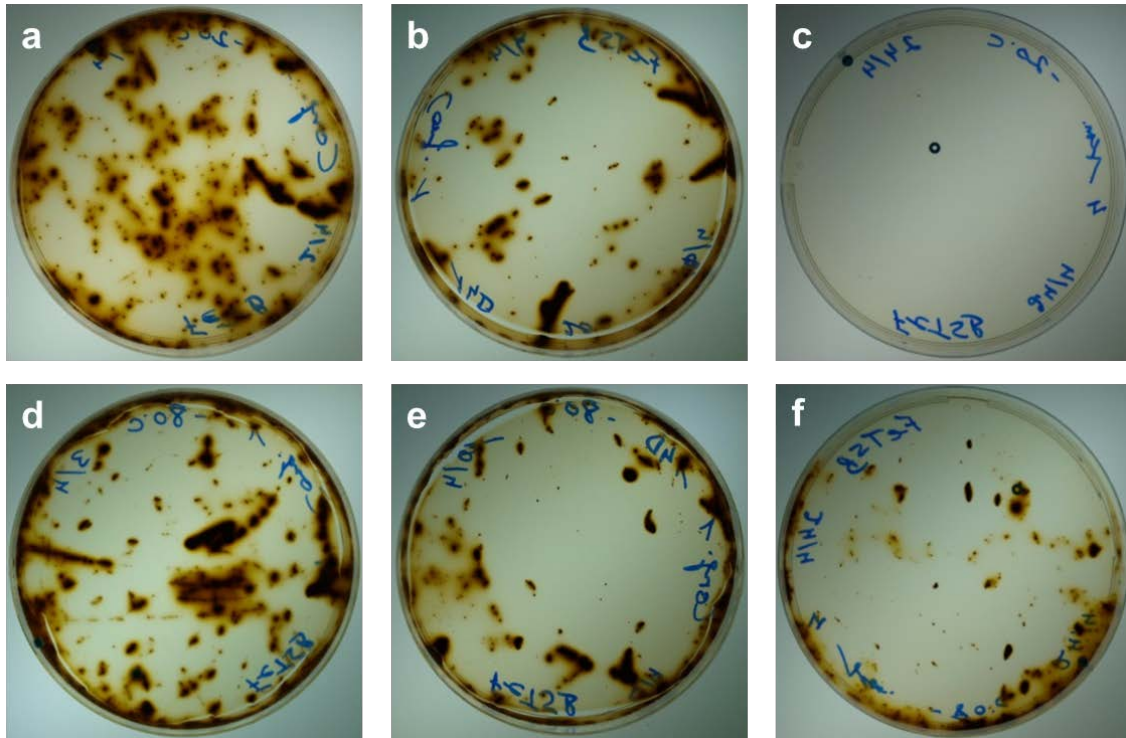


Figure 8.5. Cell viability in the samples stored at -20°C and -80°C in commercial cryovials, a) -20°C , after 7 days; b) -20°C , after 14 days; c) -20°C , after 28 days; d) -80°C , after 7 days; e) -80°C , after 14 days; f) -80°C , after 28 days.

8.3.3. Drying

8.3.3.1. Experimental set-up

Drying is one of those few methods that are not widely used in the preservation of microorganisms. However, sometimes it is unavoidable to employ it, especially when specific groups of microorganisms do not tolerate storage methods such as freeze drying or freezing (García et al., 2011).

In case that prior storage methods (freeze drying and freezing) do not guarantee a high survival rate when preserving *A. ferrooxidans* cells, drying method was studied.

An *A. ferrooxidans* culture containing approximately $3.5 \cdot 10^9$ CFU/mL was filtered using a $0.22 \mu\text{m}$ nitrocellulose vacuum filter (Sartorius 11407-47-ACN). The concentrated culture retained on the filter (cell viability = $3.5 \cdot 10^9$ CFU/mL) was dried at 30°C for 24 hours in a sterile empty Petri plate. The filter containing the dry biomass was stored at 4°C and, after 14 days, the bacteria were re-suspended in 10 mL of distilled water. Finally, the cell viability of the sample was determined by Equation 8.1 as described in 8.2.2.1.

8.3.3.2. Results and discussion

In this study, desiccation negatively affected cell viability and growth was not observed after drying the filter at 30 °C for 24 hours. Microbial growth was not observed after 12 days of incubation at 30 °C, even when samples obtained by washing the filter using CM-II medium were direct seeded in the plates.

8.4. Conclusions

FeTSB medium (CM-II medium) was the most suitable of the three tested to determine the viability of *A. ferrooxidans*, due to its simplicity and good bacteria growth presented herein.

The freeze drying adversely affect the viability of the strain studied, since the percentage of recovery after the lyophilization process did not exceed 2% in any of the cases. An increase in the primary drying time of 12 to 35 hours improved the drying of some of the lyophilized samples, although even after this increase, samples resuspended in glycerol (5%, w/v) and sucrose (18%, w/v), still had a remarkable degree of humidity.

Drying proved to be unsuitable for the preservation of *A. ferrooxidans* as it annulled all possibility of microbial growth after processing.

Freezing procedure in Eppendorf vials showed high dependency on the type of cryoprotectant used, obtaining the highest recovery percentages for the negative control and the betaine (15% and 40%, respectively). However, freezing time, up to 28 days, had no influence on cell viability. In contrast, the viability of the samples decreased significantly over the freezing time in the samples frozen in commercial cryovials. The temperature also proved to be an important factor, thus obtaining better results when the samples were stored at -80 °C.

Therefore, freezing at -80 °C using Eppendorf cryovials or commercial cryovials is the procedure that provides the best results regarding the feasibility for the type *A. ferrooxidans* microorganisms studied in this assay.

An easier preservation option would be the ongoing re-seed. In this method, the microorganism to be preserved is cultured in an adapted culture medium and once grown is stored at a temperature of around 4 °C. After some time (about a month), the microorganism is again seeded in a fresh culture medium, providing optimal growth

conditions. Again, after use, the microorganism can be stored, repeating the process as many times as necessary. However, although it is an easy process, the biggest disadvantage of the continuous re-seeding, is that it carries a high risk of contamination and variability of the characteristics of the strains, being able to even generate mutations very different from the original strain.

8.5. References

- Chotiko, A., Sathivel, S., 2014. Effects of enzymatically-extracted purple rice bran fiber as a protectant of *L. plantarum* NRRL B-44796 during freezing, freeze drying and storage. *LWT-Food Science and Technology* 59, 59-64.
- Cleland, D., [et al.] 2004. Glycine betaine as a cryoprotectant for prokaryotes. *Journal of Microbiological Methods* 58, 31-38.
- Gupta, S.G., Agate, A.D., 1986. Preservation of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* with activity check. *Antonie van Leeuwenhoek* 52, 121-127.
- Hegler, F., Kappler, A., 2010. Cryopreservation of anoxygenic phototrophic Fe(II)-oxidizing bacteria. *Cryobiology* 61, 158-160.
- Johnson, D.B., McVivar, J.H.M., Rolfe, S., 1987. A new solid medium for the isolation and enumeration of *Thiobacillus ferrooxidans* and acidophilic heterotrophic bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 7, 9-18.
- Kurtzman, C.P., Labeda, D.P., 2009. Type culture collections and their databases. *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*, 306-312.
- Morgan C.A., Herman N., White P.A., Vesey G., 2006. Preservation of microorganisms by drying: A review. *Journal of Microbiological Methods* 66, 183-193.
- Morgan, C., Vesey, G., 2009. Freeze-drying of microorganisms. *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*, 162-173.
- Overmann, J., 2013. Principles of enrichment, isolation, cultivation, and preservation of prokaryotes. *The Prokaryotes- Prokariotic Biology and Symbiotic Associations*, 150-207. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Robertson, L.A., Gijs-Kuenen, J., 2006. The genus *Thiobacillus*. *Prokaryotes* 5, 812-827.

- Safronova, V.I., Novikova, N.I., 1996. Comparison of two methods for root nodule bacteria preservation. Lyophilization and liquid nitrogen freezing. *Journal of Microbiological Methods* 24, 231-237.
- Sugio, T., [et al.] 1984. Role of ferrous ions in synthetic cobaltous sulfide leaching of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology* 48 (3), 461-467.
- Wu, X.L., [et al.] 2008. Liquid-nitrogen cryopreservation of three kinds of autotrophic bioleaching bacteria. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 18 (6), 1386-1391.
- Wu, X.L., [et al.] 2013. Preservation of new cryoprotectant used for *Acidithiobacillus ferrooxidans* in liquid nitrogen. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 23, 818-823.
- Zeng, W.M., [et al.] 2009. Preservation of *Acidithiobacillus caldus*: A moderately thermophilic bacterium and the effect on subsequent bioleaching of chalcopyrite. *Hidrometallurgy* 96, 333-336.
- Zeng, W.M., Zhou, H.B., Liu, X.D., Qui, G.Z., 2010. Preservation of moderately thermophilic culture by freeze drying and frozen preservation way and effect on subsequent bioleaching of chalporite. *Transactions of Nonferrous Metal Society of China* 20, 882-887.



SOLICITUD DE PATENTE

SOLICITUD DE PATENTE

**Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente**

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica, utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. Asimismo, se le ha asignado de forma automática un número de solicitud y una fecha de recepción, conforme al artículo 14.3 del Reglamento para la ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes. La fecha de presentación de la solicitud de acuerdo con el art. 22 de la Ley de Patentes, le será comunicada posteriormente.

Número de solicitud:	P201530814	
Fecha de recepción:	10 junio 2015, 15:57 (CEST)	
Oficina receptora:	OEPM Madrid	
Su referencia:	P150289ES	
Solicitante:	Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea	
Número de solicitantes:	1	
País:	ES	
Título:	PROCEDIMIENTO CONTINUO DE BIOMECANIZADO DE UNA PIEZA DE COBRE	
Documentos enviados:	Descripción.pdf (8 p.) Reivindicaciones.pdf (2 p.) Resumen.pdf (1 p.) Dibujos.pdf (2 p.) OLF-ARCHIVE.zip	package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf
Enviados por:	CN=VALLEJO LOPEZ JUAN PEDRO - 33501382L,givenName=JUAN PEDRO,SN=VALLEJO LOPEZ,serialNumber=33501382L,C=ES	
Fecha y hora de recepción:	10 junio 2015, 15:57 (CEST)	
Codificación del envío:	65:71:E0:A6:4E:59:FB:9A:C4:63:BC:77:06:3A:BA:A7:88:FA:CE:E1	

ADVERTENCIA: POR DISPOSICIÓN LEGAL LOS DATOS CONTENIDOS EN ESTA SOLICITUD PODRÁN SER PUBLICADOS EN EL BOLETÍN OFICIAL DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL E INSCRITOS EN EL REGISTRO DE PATENTES DE LA OEPM, SIENDO AMBAS BASES DE DATOS DE CARÁCTER PÚBLICO Y ACCESIBLES VÍA REDES MUNDIALES DE INFORMÁTICA.
Para cualquier aclaración puede contactar con la O.E.P.M.

/Madrid, Oficina Receptora/

(6-4) INVENTOR 4:	NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE:	
	APELLIDOS: ELÍAS SÁENZ NOMBRE: Ana Josefina NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE:	
(6-5) INVENTOR 5:	APELLIDOS: RODRÍGUEZ EZQUERRO NOMBRE: Adrián NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE:	
(7) TÍTULO DE LA INVENCIÓN:		PROCEDIMIENTO CONTINUO DE BIOMECANIZADO DE UNA PIEZA DE COBRE
(8) PETICIÓN DE INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA:	SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/>	
(9) SOLICITA LA INCLUSIÓN EN EL PROCEDIMIENTO ACCELERADO DE CONCESIÓN	SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/>	
(10) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:	SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/>	
(11) DEPÓSITO:	REFERENCIA DE IDENTIFICACIÓN: INSTITUCIÓN DE DEPÓSITO: NÚMERO DE DEPÓSITO: ACCESIBILIDAD RESTRINGIDA A UN EXPERTO (ART. 45.1. B):	
(12) DECLARACIONES RELATIVAS A LA LISTA DE SECUENCIAS:	LA LISTA DE SECUENCIAS NO VA MÁS ALLÁ DEL CONTENIDO DE LA SOLICITUD LA LISTA DE SECUENCIAS EN FORMATO PDF Y ASCII SON IDENTICOS	<input type="checkbox"/>
(13) EXPOSICIONES OFICIALES:	LUGAR: FECHA:	
(14) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:	PAÍS DE ORIGEN: CÓDIGO PAÍS: NÚMERO: FECHA:	
(15) AGENTE DE PROPIEDAD INDUSTRIAL:	APELLIDOS: VALLEJO LÓPEZ NOMBRE: Juan Pedro CÓDIGO DE AGENTE: 09946 NÚMERO DE PODER:	
(16) RELACION DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:	DESCRIPCIÓN: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 8 REIVINDICACIONES: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de reivindicaciones: 13 DIBUJOS: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de dibujos: 5 RESUMEN: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1 FIGURA(S) A PUBLICAR CON EL RESUMEN: <input type="checkbox"/> N.º de figura(s): ARCHIVO DE PRECONVERSION: <input checked="" type="checkbox"/> DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: LISTA DE SECUENCIAS PDF: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: ARCHIVO PARA LA BÚSQUEDA DE LS: <input type="checkbox"/>	

OTROS (Aparecerán detallados):	
<p>(17) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASA PREVISTO EN EL ART. 162 DE LA LEY 11/1986 DE PATENTES, DECLARA: BAJO JURAMIENTO O PROMESA SER CIERTOS TODOS LOS DATOS QUE FIGURAN EN LA DOCUMENTACIÓN ADJUNTA:</p> <p style="text-align: right;">DOC COPIA DNI: [] N.º de páginas:</p> <p style="text-align: right;">DOC COPIA DECLARACIÓN DE CARENCIA DE MEDIOS: [] N.º de páginas:</p> <p style="text-align: right;">DOC COPIA CERTIFICACIÓN DE HABERES: [] N.º de páginas:</p> <p style="text-align: right;">DOC COPIA ÚLTIMA DECLARACIÓN DE LA RENTA: [] N.º de páginas:</p> <p style="text-align: right;">DOC COPIA LIBRO DE FAMILIA: [] N.º de páginas:</p> <p style="text-align: right;">DOC COPIA OTROS: [] N.º de páginas:</p>	<p>[]</p>
(18) NOTAS:	
(19) FIRMA:	<p>FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE: VALLEJO LOPEZ JUAN PEDRO - 33501382L</p> <p>LUGAR DE FIRMA: MADRID</p> <p>FECHA DE FIRMA: 10 Junio 2015</p>

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Los primeros estudios sobre biomecanizado de OFE realizados en el Departamento de Ingeniería Química y del Medio Ambiente de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU), se llevaron a cabo en un medio bacteriano natural, como lo es el Río Tinto (Huelva, España), dando resultados interesantes. Si bien entonces no se tenía un conocimiento preciso de lo que le ocurría a una pieza metálica de cobre al sumergirla en las aguas del río, los resultados de los ensayos realizados sirvieron para observar que efectivamente las probetas de OFE sufrieron un proceso de remoción de material y alteración de la superficie bajo la acción bacteriana de especies extremófilas.

Los ensayos de mecanizado químico de OFE (en ausencia de bacterias), permitieron establecer la influencia de parámetros como la concentración de hierro férrico y la temperatura en la cantidad de masa eliminada. Se observó que a mayor concentración y temperatura la masa eliminada era mayor. Sin embargo, se encontró que a mayor concentración de hierro férrico, la calidad superficial de las piezas tratadas empeoró, obteniéndose superficies con una rugosidad mayor. De esta manera, se pudo conocer mejor el funcionamiento de una de las dos reacciones básicas en las que se basa el biomecanizado, concretamente la reacción química redox entre el hierro férrico y el OFE.

El siguiente paso fue estudiar el proceso de biomecanizado en medio 9K con las bacterias *A. ferrooxidans*. En cuanto al crecimiento de las bacterias en dicho medio, se concluyó que una mayor concentración de bacterias conllevó un crecimiento más rápido. Esto permitió conocer que el periodo de crecimiento de las bacterias podría reducirse ajustando adecuadamente la cantidad de inóculo inicial, o lo que es lo mismo, partiendo de un inóculo más concentrado. Sin embargo, una mayor presencia de cobre supuso un retraso en el crecimiento de las mismas. La presencia de cobre divalente afectó negativamente al metabolismo de las *A. ferrooxidans* ralentizando la conversión de hierro ferroso a hierro férrico y por tanto retrasando el periodo de crecimiento. Si bien el crecimiento de *A. ferrooxidans* en presencia de cobre no era lo habitual, este ensayo permitió dar a conocer el efecto que el cobre tenía en el metabolismo de las *A. ferrooxidans*, siendo interesante su conocimiento para los ensayos de biomecanizado, en los que sí se encontraría presente dicho ion.

El controlar el pH durante el periodo de crecimiento también resultó ser imprescindible para evitar la pérdida del ion férrico disuelto por precipitación en forma de jarosita, con el consiguiente descenso de la tasa de remoción que ello conllevaría en la etapa de biomecanizado, además de la pérdida de biomasa y del ensuciamiento del reactor por el lodo generado.

Tal y como era de esperar, el biomecanizado de OFE en medio 9K resultó ser de mecanismo indirecto, presentando una tendencia en la tasa de remoción similar a la publicada anteriormente por varios autores, con un máximo en la primera hora y descendiendo a continuación. En principio, cabría pensar que durante el biomecanizado la acción de las bacterias permitiría mantener el equilibrio entre el hierro férrico reducido (reacción química) y el hierro ferroso oxidado (reacción biológica), dando lugar por tanto a tasas de remoción constantes, pero realmente no ocurrió así.

Al igual que en el mecanizado en medio químico, la tasa de remoción fue mayor a mayor concentración de hierro férrico, comprobándose también la buena correlación existente entre el valor del Potencial Redox y el logaritmo del ratio de concentraciones de hierro férrico y hierro ferroso, cumpliéndose la ley de Nernst. Así pues, la medida del Potencial Redox se consideró una manera rápida y sencilla de conocer el estado en el que el proceso de biomecanizado se encontraba en cada momento.

Se comprobó que el biomecanizado es un fenómeno superficial, y que las tasas de remoción eran tanto más elevadas cuanto mayor era la superficie de las piezas procesadas.

Se consiguió definir un proceso de biomecanizado para piezas de OFE de geometrías predefinidas previo recubrimiento con resina y grabado con láser. Los parámetros de marcado resultaron ser importantes para poder mantener la integridad del material y asegurar una completa eliminación de la resina.

Con vistas a realzar el carácter ecológico del proceso, la metodología establecida para el tratamiento del residuo líquido obtenido tras el proceso de biomecanizado resultó ser factible y simple. Básicamente, en dos sucesivas etapas de precipitación con NaOH, se consiguió primero precipitar el hierro férrico (previa oxidación del hierro ferroso) a pH 4.0, separando el hidróxido férrico precipitado por filtración, seguido de la precipitación del cobre divalente a pH 8.0 y la separación por filtración del hidróxido de cobre precipitado. Los precipitados obtenidos fueron de alta pureza, lo que permitiría

su valorización potencial como materias primas en diversos sectores industriales. El efluente líquido residual final presentó una muy baja toxicidad.

En cuanto al mecanizado en medio MAC, aun habiéndose trabajado en la optimización del crecimiento tanto de *A. ferrooxidans* como de *S. thermosulfidooxidans*, durante el biomecanizado, las tasas de remoción siguieron la misma tendencia a la baja a lo largo de los procesos, igual que en el medio 9K.

Para tratar de conseguir el objetivo principal, un proceso de biomecanizado en continuo, se realizó una batería de nuevos ensayos. que se realizaron tanto en medio 9K como en medio MAC para *A. ferrooxidans* y *S. thermosulfidooxidans*. Ni el eliminar el cobre divalente de la disolución, ni el realizar el biomecanizado durante la etapa de crecimiento de las bacterias, ni inocular la disolución con bacterias en su estado de crecimiento exponencial, ni crecer las *A. ferrooxidans* en presencia de azufre, dieron resultado positivo alguno.

Finalmente, se logró la continuidad del proceso introduciendo periodos de regeneración entre sucesivas etapas de biomecanizado. Durante la regeneración, la probeta de OFE se extraída de la disolución, dejándola un tiempo bajo las mismas condiciones de agitación y temperatura que en el proceso de biomecanizado, hasta volver a alcanzar el estado inicial previo a la etapa de biomecanizado. Los tiempos de regeneración variaron según el medio y el tipo de bacterias empleado, siendo de 8 horas para *A. ferrooxidans* en medio 9K (tras 4 horas de biomecanizado), de 4 horas para *A. ferrooxidans* en medio MAC (tras 1 hora de biomecanizado) y de 16 horas para *S. thermosulfidooxidans* en medio MAC (tras 1 hora de biomecanizado). Si bien se intentó optimizar dicho periodo mediante inoculación y variación de la agitación, no se obtuvo mejor alguna.

En base a la necesidad de introducir periodos de regeneración entre etapas de biomecanizado, se diseñó un reactor distribuido en compartimentos. De esta manera, la pieza sería mecanizada de manera continua pasando de un compartimento a otro, permaneciendo en cada uno un tiempo determinado y asegurando una tasa de remoción máxima en cada caso. El que la probeta de OFE estuviera en un cambio continuo de compartimento, daría la opción de que las disoluciones en las que no estuviera la misma entrarían en su fase de regeneración. El número de compartimentos se debería de calcular según el tiempo de regeneración necesario, de manera que la probeta al volver a ser introducida en una misma disolución, hubiera

transcurrido el tiempo necesario para que ésta se regenerara. Este diseño condujo a la solicitud de la patente P201530814.

ANEXO I

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Evolución histórica de la precisión en los procesos de micro-mecanizado (adaptada de Dornfel et al., 2006).....	27
Figura 1.2. Usos del cobre para diferentes continentes y sectores en el año 2013 (adaptado de International Copper Study Group, 2014).....	31
Figura 1.3. Algunas de las aplicaciones de la biotecnología en actividades antropogénicas (adaptado de Gavrilesco, 2010).....	35
Figura 1.4. Recogida de los equipos electrónicos (electrodomésticos) y componentes de equipos electrónicos desechados en España durante los años 2001-2010 y el porcentaje de gestión mediante reciclaje-recuperación y vertido (elaboración propia a partir de datos del Instituto Nacional de Estadística).....	37
Figura 1.5. Clasificación de los organismos según su fuente de carbono y su fuente de energía (adaptado de Uno et al., 1996)	40
Figure 2.1. Outline of the direct biomachining mechanism on a copper workpiece.....	52
Figure 2.2. Outline of the indirect biomachining mechanism on a copper workpiece ...	52
Figure 2.3. Schematic diagram of the biomachining process of coated workpieces (adapted from Istiyanto et al. (2012))	65
Figura 3.1. a) Diseño de las probetas de OFE, b) Probeta de OFE preparada en el Departamento de Ingeniería Mecánica de la UPV/EHU	77
Figura 3.2. a) Perfil DGGE de la población microbiana estudiada, b) SEM de la bacteria <i>A. ferrooxidans</i> suministrada por la UCA (foto cedida por SGIker)	78
Figura 3.3. a) Medio de cultivo inicial, b) Disolución tras el periodo de crecimiento, c) Imagen SEM de la bacteria <i>A. ferrooxidans</i> tras el crecimiento.	81
Figura 3.4. Dibujo de la cuadrícula de recuento y la composición de sus cuadrados.	90
Figura 3.5. Procedimiento de medida en la cámara Improved Neubauer®	91
Figure 4.1. Experimental set-up diagram	106
Figure 4.2. Localization of Rio Tinto and the state of its reddish waters from an air view (Source: google maps).....	107

Figure 4.3. a) Workpiece topography before experiments in Rio Tinto, b) Workpiece topography after experiments in Rio Tinto.....	108
Figure 4.4. Accumulated weight loss for different concentrations of iron and different temperatures in pure chemical machining.....	110
Figure 4.5. a) SEM of the workpiece tested in S-I sample, b) SEM of the workpiece tested in S-II sample	110
Figure 4.6. Removal rate and ferric iron concentration in S-IV sample.....	111
Figure 5.1. Experimental set-up diagram	117
Figure 5.2. Ferrous iron concentration for M-I, M-II and M-III samples	119
Figure 5.3. Redox Potential for M-I, M-II and M-III samples	120
Figure 5.4. Ferrous iron concentration for M-I, M-II, M-III and M-IV samples.....	122
Figure 5.5. a) <i>A.ferrooxidans</i> culture containing precipitate after 5 days, b) Filtered and dried mustard-coloured precipitate, c) Diffractogram for a jarosite standard sample, d) Diffractogram for the precipitated solid from the experiment	124
Figure 5.6. Removal rate for M-I and M-II samples	127
Figure 5.7. SEM of the biomachined workpiece in M-I sample, a) Before biomachining, b) After 3 hours of biomachining	129
Figure 5.8. Accumulated weight loss for M-I, M-II and M-III samples	130
Figure 5.9. SEM of different workpieces, a) Not biomachined workpiece, b) Biomachined workpiece in M-I sample, c) Biomachined workpiece in M-II sample, d) Biomachined workpiece in M-III sample.....	131
Figure 5.10. Relation between Redox Potential and logarithmic ferric iron and ferrous iron concentration ratio for M-II and M-III samples	132
Figure 5.11. Accumulated weight loss for W-I, W-II, W-III, W-IV and W-V workpieces	134
Figure 5.12. Engraving process of a geometry on a OFE workpiece combining laser processes and biomachining.....	135
Figure 5.13. Thermal damage on OFE surface caused by a bad selection of laser parameters	136
Figure 5.14. Some of the geometries biomachined in OFE workpieces	137

Figure 5.15. a) Initial BLR, b) BLR after ferrous iron oxidation (Stage I.i), c) BLR after Fe(OH) ₃ precipitation and filtration (Stage I.iii)	141
Figure 5.16. a) BLR dissolution after divalent copper precipitation (Stage II.i), b) BLR dissolution after Cu(OH) ₂ filtration (Stage II.ii).....	142
Figura 6.1. Diagrama del proceso	149
Figura 6.2. Potencial Redox para las muestras de pH 1.5	151
Figura 6.3. Potencial Redox para las muestras de pH 2.0	152
Figura 6.4. Concentración de bacterias para algunas de las muestras	153
Figura 6.5. Resultados de DAPI para las muestras de pH 1.5 tras 18 horas de crecimiento, a) M-I, b) M-II, c) M-III	154
Figura 6.6. Resultados de DAPI para las muestras de pH 1.5 al finalizar el crecimiento, a) M-I, b) M-II y c) M-III	155
Figura 6.7. Resultados de FISH para una de las muestras de <i>A. ferrooxidans</i>	155
Figura 6.8. Concentración de hierro ferroso para las muestras de pH 1.5.....	156
Figura 6.9. a) Estado de la muestra M-VII tras 86 horas de crecimiento; b) Estado de la muestra M-II tras 86 horas de crecimiento	159
Figura 6.10. Potencial Redox para las muestras de pH 1.5.....	160
Figura 6.11. Concentración de bacterias para las muestras de pH 1.5	161
Figura 6.12. Resultados de DAPI para las muestras de pH 1.5, a) M-II en la fase exponencial tras 41 horas de crecimiento, b) M-VII en la fase exponencial tras 41 horas de crecimiento, c) M-II en la fase estacionaria tras 86 horas de crecimiento, d) M-VII en la fase estacionaria tras 86 horas de crecimiento	162
Figura 6.13. Resultados de FISH para una de las muestras de <i>S. thermosulfidooxidans</i>	163
Figura 6.14. Concentración de hierro ferroso para las muestras de pH 1.5.....	164
Figura 6.15. Tasa de remoción para el proceso de biomecanizado en medio 9K con <i>A. ferrooxidans</i> y en medio MAC para las muestras M-I y M-II	166
Figura 6.16. Concentración de hierro ferroso para el proceso de biomecanizado en medio 9K con <i>A. ferrooxidans</i> y en medio MAC para las muestras M-I y M-II	166

Figura 6.17. Potencial Redox para el proceso de biomecanizado en medio 9K con <i>A. ferrooxidans</i> y en medio MAC para las muestras M-I y M-II	167
Figura 7.1. Diagrama del proceso	174
Figura 7.2. Tasa de remoción y concentración de cobre divalente acumulada durante el ensayo para las muestras M-I y M-II. Para el caso de M-II los resultados que se muestran son los valores obtenidos tras añadir el gas.....	176
Figura 7.3. Estado de la muestra M-I, a) Tras 21 horas de crecimiento, b) Tras 38 horas de crecimiento.....	179
Figura 7.4. Concentración de hierro ferroso, hierro total y tasa de remoción en la muestra M-I para el biomecanizado durante el crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i> en medio MAC	180
Figura 7.5. Tasa de remoción en la muestra M-III.....	181
Figura 7.6. Resultados de DAPI para las bacterias <i>S. thermosulfidooxidans</i> tras 86 horas de crecimiento, a) Crecimiento con biomecanizado simultáneo (M-III), b) Crecimiento convencional.....	182
Figura 7.7. Tasa de remoción y concentración de hierro ferroso para la muestra M-II.....	183
Figura 7.8. Resultados de DAPI para la hora 38 de crecimiento, a) Con biomecanizado simultáneo (M-II), b) Crecimiento convencional	184
Figura 7.9. Tasa de remoción y concentración de hierro ferroso en las muestras M-I, M-II y M-III	186
Figura 7.10. Tasa de remoción en cada etapa de biomecanizado	188
Figura 7.11. Concentración de hierro ferroso y la tasa de remoción para la muestra M-I.	191
Figura 7.12. Concentración de hierro ferroso y la tasa de remoción para la muestra M-II	192
Figura 7.13. Concentración de hierro ferroso para las muestras M-I, M-II y M-III	194
Figura 7.14. Potencial Redox para las muestras M-I, M-II y M-III	195
Figura 7.15. Propuesta de reactor para operación de biomecanizado en continuo ...	196
Figure 8.1. Experimental set-up diagram	203
Figure 8.2. <i>A. ferrooxidans</i> growth in the three medium tested, a) CM-I, b) CM-II and c) CM-III.....	206

Figure 8.3. Survival rate after freeze drying in experiments FD-I (12 h of primary drying), FD-II (35 h of primary drying) and FD-III (35 h of primary drying)	210
Figure 8.4. <i>A. ferrooxidans</i> cell concentration after freezing at -80 °C in Epperdorff vials (F-I) for 14 and 28 days and using different cryoprotectans	214
Figure 8.5. Cell viability in the samples stored at -20 °C and -80 °C in commercial cryovials, a) -20°C, after 7 days; b) -20°C, after 14 days; c) -20°C, after 28 days; d) -80°C, after 7 days; e) -80°C, after 14 days; f) -80°C, after 28 days	215

ANEXO II

LISTA DE TABLAS

LISTA DE TABLAS

Table 2.1. General composition of several culture medium for biomass growth	56
Table 2.2. Qualitative evolution of ion concentration according to the reaction rate for indirect biomachining	63
Tabla 3.1. Composición del OFE empleado en este estudio según la empresa Gindre Torns S.L.....	76
Tabla 3.2. Composición del medio de cultivo 9K según concentración final de hierro para 150 mL de disolución.....	80
Tabla 3.3. Composición del medio de cultivo MAC según concentración final de hierro para 150 mL de disolución.....	82
Tabla 3.4. Composición del buffer PBS para 1L de disolución	84
Tabla 3.5. Composición del buffer de hibridación según el porcentaje de formamida .	85
Tabla 3.6. Datos de las sondas empleadas	85
Tabla 3.7. Composición del buffer de lavado según el porcentaje de formamida.....	86
Tabla 3.8. Composición de los tubos para el ensayo de NMP	88
Tabla 3.9. Reactivos empleados en la colorimetría.....	93
Tabla 3.10. Composición de la mezcla de reacción por muestra	95
Tabla 3.11. Preparación de las muestras para la curva de calibrado	96
Tabla 3.12. Patrones de hierro y cobre certificados.	97
Table 5.1. Composition of the M-I, M-II, M-III and M-IV samples.....	121
Table 5.2. Redox Potential, pH and ferrous iron concentration during the test for M-I and M-II samples	128
Table 5.3. Characteristics of the workpieces selected for the assay.....	133
Table 5.4. BLR treatment procedure.....	139
Tabla 6.1. Concentración de hierro ferroso y pH de las muestras ensayadas	150
Tabla 6.2. Concentración de hierro ferroso y pH de las muestras ensayadas	158
Tabla 7.1. Evolución del Potencial Redox, pH y hierro ferroso en M-II antes y después de añadir H ₂ S	177

Tabla 7.2. Evolución del Potencial Redox y hierro ferroso durante las sucesivas etapas de biomecanizado y periodos de regeneración.....	189
Tabla 7.3. Tasas de remoción de las muestras M-I, M-II y M-III en las etapas de biomecanizado.....	194
Table 8.1. Chemical composition and initial pH of the culture medium.....	205
Table 8.2. Freeze drying experiments.....	209

ANEXO III

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

A

AEE Aparatos Eléctricos y Electrónicos

A. ferrooxidans Acidithiobacillus ferrooxidans

A. thiooxidans Acidithiobacillus thiooxidans

B

BLR Biomachining Liquid Residue

C

CINDEFI Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales

CNC Control Numérico

D

DGGE Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

F

FISH Fluorescence IN Situ Hybridisation

I

I+D Investigación y Desarrollo

L

L. ferrooxidans Leptospirillum ferrooxidans

M

MAC Mackintosh

MRR Material Removal Rate

N

NMP Número Más Probable

O

OFC Oxygen-Free Copper

OFE Oxygen-Free Electronic Copper

R

RAEE Residuos de Aparatos Eléctricos y Electrónicos

S

SEM Scanning Electron Microscopy

SGIker Servicios Generales de Investigación de la UPV/EHU

S. thermosulfidooxidans *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*

U

UCA Universidad de Cádiz

UPV/EHU Universidad del País Vasco



Ingeniaritza Goi Eskola Teknikoa
Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Bilbao



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

NAZIOARTEKO
BIKAIN TASUN
CAMPUSA
CAMPUS DE
EXCELENCIA
INTERNACIONAL

CINDEFI

CONICET
U N L P

