

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería
Metalúrgica



FENOMENOS DE INTERACCIÓN QUÍMICO-BIOLÓGICOS
DEL HIERRO EN NUEVOS SISTEMAS DE GENERACIÓN DE
ENERGÍA

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Jaime Mauricio Tapia Quezada

Bajo la dirección de los doctores:
Felisa González González
Antonio Ballester Pérez

Madrid, 2010

• ISBN: 978-84-693-7733-8

©Jaime Mauricio Tapia Quezada, 2010

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE LOS MATERIALES E
INGENIERIA METALURGICA



TESIS DOCTORAL

**FENOMENOS DE INTERACCION QUIMICO-
BIOLOGICOS DEL HIERRO EN NUEVOS
SISTEMAS DE GENERACION DE ENERGIA**

Jaime Mauricio Tapia Quezada

DIRECTORES

Dra. Felisa González González

Dr. Antonio Ballester Pérez

Madrid, julio 2009

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE LOS MATERIALES E
INGENIERIA METALURGICA

**FENOMENOS DE INTERACCION QUIMICO-
BIOLOGICOS DEL HIERRO EN NUEVOS
SISTEMAS DE GENERACION DE ENERGIA**

Memoria para optar al grado de
Doctor en Ingeniería, presenta

Jaime Mauricio Tapia Quezada

DIRECTORES:

Dra. Felisa González González
Dr. Antonio Ballester Pérez

Madrid, Julio 2009

El Dr. Antonio Ballester Pérez y la Dra. Felisa González González, Catedrático y Profesora Titular del Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, hacen constar:

1º.- Que Jaime Mauricio Tapiá Quezada ha realizado el trabajo titulado **“FENOMENOS DE INTERACCIÓN QUÍMICO-BIOLÓGICOS DEL HIÉTERO EN NUEVOS SISTEMAS DE GENERACION DE ENERGIA”**, en los laboratorios del Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica de la citada Universidad.

2º.- Que como directores del trabajo, autorizan su presentación en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, para que quien lo ha realizado pueda obtener el grado de Doctor.

Y para que así conste, a los efectos de cumplir los trámites legales que procedan, firmamos el presente en Madrid, a 1 de julio de dos mil nueve.

Fdo. Dr. Antonio Ballester

Fdo. Dra. Felisa González

Dedicada a:

mi madre, por estar siempre conmigo

Marcela,... mi gran compañera de aventura y

Sofía, quién da sentido a todo



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento al Prof. Antonio Ballester, tanto por haberme acogido en su laboratorio, como por su estímulo y apoyo en el trabajo de investigación. Además, le agradezco especialmente su cercanía y confianza demostradas hacia mi y mi familia durante toda mi estadía.

Quisiera también agradecer la extraordinaria disposición y ayuda que la Profesora Felisa González me ha brindado, en especial, durante la compleja etapa de preparación de los primeros borradores del presente documento. Felisa, simplemente, MUCHAS GRACIAS.

Además, con mucho cariño expreso mi profundo agradecimiento al Prof. Jesús Muñoz, por su sapiencia y amistad, además de por su inestimable ayuda en aquellas largas sesiones de microscopía electrónica. Agradezco, también, la colaboración y camaradería que durante todo este período me brindaron las Profesoras Dras. María Luisa Blázquez y Camino García.

De igual manera quiero expresar mi agradecimiento a la Universidad Arturo Prat (Iquique, Chile), institución de la cual formo parte, por haber auspiciado mi estadía en el Laboratorio de Metalurgia Extractiva/Biohidrometalurgia de la Universidad Complutense, a partir de la cual se ha obtenido la presente Tesis.

En términos familiares, quiero expresar mi profundo agradecimiento a mi esposa, Marcela, por su apoyo, paciencia y compañía en este desafío que juntos emprendimos hace ya más de 3 años. También a mi hija, Sofía, por perdonarme alguna ausencia en sus juegos y, en especial, por recargarme de ánimo con sólo uno de sus mimos. También, a Carmen, mi madre, por su incondicional apoyo que me ha brindado toda su vida y a mi padre y hermanos por sentirlos siempre conmigo.

Finalmente, quiero agradecer la compañía y ayuda de todos aquellos con los que a lo largo de estos años he compartido en el Laboratorio. Aún a riesgo de cometer alguna injusticia, agradezco en primer lugar a los compañeros de la primera "cosecha", en especial a mi amigo Pedro "Chamo" Delvasto, Chema, Yasmina, Gustavo y Elena; y, a todos los chicos que han venido llegando al laboratorio en los últimos años y que han logrado que el día a día fuese más llevadero, entre los que puedo nombrar al especial Felipe, Acacia, Lidia (cuyo trabajo experimental me fue de gran ayuda), Marianita, Daniela, Dina, Cynthia, Ivonne, Horacio, Víctor, Olga, Laura (por su inagotable capacidad de gestión en favor del grupo) y al gran Leao: a todos, por su amistad, apoyo y compañía, muchísimas gracias.

INDICE

	<u>Pág.</u>
1. INTRODUCCION	1
1.1. Planteamiento del problema energético	2
1.1.1 Análisis del mercado en España	2
1.1.2 Tipos de energías alternativas	8
1.1.2.1 Alternativas energéticas disponibles	8
1.1.2.2 Pilas de combustible microbianas	10
1.1.2.3 Características de la pila microbiana propuesta	12
1.2. Bacterias acidófilas	17
1.2.1 Características	17
1.2.1.1 Género <i>Acidiphilium spp.</i>	17
1.2.1.2 Género <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	18
1.2.2 Fenómenos de adherencia: agregados microbianos (biofilms).....	18
1.3. Sustancias poliméricas extracelulares (EPS)	21
1.3.1 Fundamentos generales de las EPS	21
1.3.2 Descripción de los métodos de extracción de EPS	23
1.3.2.1 Métodos físicos de extracción de EPS	25
1.3.2.2 Métodos químicos de extracción de EPS	28
1.3.2.3 Métodos físico-químicos de extracción de EPS	30
1.3.3 Fenómenos de interacción EPS-Fe en sistemas acidófilos	31
1.3.3.1 Bioadsorción de Fe por EPS	34
1.3.3.2 Isotermas de adsorción	35
1.3.3.3 Mecanismos implicados en el proceso de bioadsorción.....	41
1.4. Justificación del trabajo	44
1.4.1 Objetivos	44
1.4.2 Plan de trabajo	46

2.	MATERIALES Y METODOS	48
2.1.	Crecimiento de cultivos bacterianos	49
2.1.1	Crecimiento de cultivos puros en condiciones planctónicas	49
2.1.1.1	Crecimiento de bacterias <i>Acidiphilium spp.</i>	50
2.1.1.2	Crecimiento de bacterias <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	51
2.1.2	Crecimiento de cultivos puros sobre soportes	54
2.1.3	Crecimiento de cultivos mixtos	56
2.2.	Descripción de los métodos utilizados en la extracción de EPS ...	58
2.2.1	Extracción por centrifugación	58
2.2.2	Extracción por EDTA	59
2.2.3	Extracción con NaOH	59
2.2.4	Extracción con resina de intercambio iónico	59
2.2.5	Extracción por calentamiento	60
2.3.	Caracterización química de las EPS	61
2.3.1	Análisis de proteínas	61
2.3.2	Análisis de carbohidratos	61
2.4.	Ensayos de interacción de las EPS con hierro	62
2.4.1	Interacción de las EPS con Fe(III)	63
2.4.2	Interacción de las EPS con Fe(II) y con mezclas de Fe(II) y Fe(III)	65
2.5.	Técnicas analíticas	68
2.5.1	Determinación de Fe(II) y Fe total	68
2.5.2	Valoración ácido-base	68
2.5.3	Espectroscopia de ultravioleta visible (UV-Vis)	69
2.5.4	Espectroscopia de infrarrojo mediante transformada de Fourier (FTIR)	70
2.5.5	Espectroscopia por difracción de rayos X (DRX)	70
2.5.6	Espectroscopia por fotoemisión de electrones (XPS).....	71
2.5.7	Microscopia electrónica de transmisión (TEM).....	71
2.5.8	Microscopia electrónica de barrido (SEM) y análisis por dispersión.. de rayos (EDX)	72
2.5.9	Microscopia electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM)..	72

3. RESULTADOS Y DISCUSION	74
3.1. Cinética y propiedades de los cultivos bacterianos	75
3.1.1 Crecimiento de bacterias sin soporte.....	75
3.1.2 Crecimiento de bacterias con soporte.....	78
3.2. Extracción y análisis de las EPS de bacterias acidófilas	81
3.2.1 Composición bioquímica de las EPS extraídas	81
3.2.1.1 EPS extraídas de cultivos planctónicos	81
3.2.1.2 EPS extraídas de cultivos crecidos con soportes.....	84
3.2.2 Análisis de lisis celular.....	87
3.2.3 Caracterización morfológica de células y EPS por TEM.....	91
3.2.4 Caracterización de la estructura de las EPS por FTIR	93
3.2.4.1 Influencia del método de extracción.....	95
3.2.4.2 Influencia del tiempo de crecimiento del cultivo.....	96
3.2.5 Caracterización por FE-SEM de la adhesión bacteriana a los soportes..	98
3.2.5.1 Soportes en blanco.....	98
3.2.5.2 Adhesión de bacterias <i>A. 3.2Sup(5)</i> sobre fieltro de carbono.....	100
3.2.5.3. Adhesión de bacterias <i>A. 3.2Sup(5)</i> sobre grafito.....	102
3.2.5.4 Adhesión de bacterias <i>A. ferrooxidans</i> sobre fieltro de carbono.....	104
3.2.5.5 Adhesión de bacterias <i>A. ferrooxidans</i> sobre grafito.....	106
3.3. Adsorción de Fe(III) por las EPS de <i>A. 3.2Sup(5)</i>.....	108
3.3.1 Cinética de adsorción	108
3.3.2 Isotermas de adsorción de Fe(III).....	110
3.3.2.1 Isotermas de adsorción de Fe(III) por EPS extraídas por EDTA.....	110
3.3.2.2 Isotermas de adsorción de Fe(III) por EPS extraídas por centrifugación..	113
3.3.3 Caracterización de las EPS puras y con Fe(III).....	116
3.3.4 Adsorción de Fe(III) en presencia de soportes	119
3.3.4.1 Isotermas de adsorción.....	119
3.2.4.2 Análisis de la influencia del soporte en la captación de hierro.....	121
3.3.5 Caracterización de los centros activos de la bioadsorción de Fe(III).....	127
3.3.5.1 Espectros FTIR de EPS extraídas por EDTA.....	128
3.2.5.2 Espectros FTIR de EPS extraídas por centrifugación.....	132
3.3.6 Valoración ácido-base de las EPS.....	133
3.3.7 Especiación de Fe(III) en las condiciones del sistema.....	137

3.3.8	Mecanismo de adsorción de Fe(III) por las EPS.....	139
3.4.	Adsorción de Fe(II) y Fe(III) por EPS de A. 3.2Sup(5)	147
3.4.1	Isotermas de adsorción de Fe(II).....	147
3.4.1.1	Isoterma de adsorción de Fe(II) por EPS extraídas por EDTA.....	147
3.4.1.2	Influencia del método de extracción en la adsorción de Fe(II).....	150
3.4.2	Isotermas de adsorción simultánea de Fe(II) y Fe(III).....	152
3.4.3	Caracterización de las EPS con Fe(II) y Fe(III).....	154
3.4.4	Caracterización de los centros activos de la bioadsorción de Fe(III)..	158
3.4.4.1	Espectros FTIR de EPS conteniendo Fe(II).....	158
3.4.4.2	Espectros FTIR de EPS conteniendo Fe(II) y Fe(III).....	161
3.4.5	Especiación de Fe(II) en disoluciones ácidas.....	162
3.4.6	Mecanismos de adsorción de Fe(II) por las EPS.....	163
3.5.	Adsorción de Fe por EPS de cultivos mixtos	170
3.5.1	Cinética y propiedades de cultivos mixtos.....	171
3.5.2	Composición química de EPS mixtas.....	175
3.5.3	Caracterización morfológica de células y EPS por TEM.....	176
3.5.4	Caracterización por microscopia FE-SEM.....	178
3.5.5	Caracterización de las EPS mixtas por XPS.....	179
3.5.6	Caracterización de los grupos funcionales en las EPS _{mixtas}	187
4.	CONCLUSIONES	194
5.	BIBLIOGRAFIA	199

INTRODUCCION

1.1 Planteamiento del problema energético

1.1.1 Análisis del mercado en España

El constante crecimiento de la economía española de las últimas décadas, se ha reflejado en un fuerte aumento en el consumo total de energía en el país. En efecto, España ha pasado de consumir 95 Ktpe en 1990 a 140 Ktpe¹ en el año 2006 (INE, 2008), período en el que su PIB ha aumentado en casi un 50%. Esto se aprecia con más detalle en la figura 1.1 que muestra, en términos relativos, que el crecimiento de la economía del país (PIB) ha estado íntimamente relacionado al crecimiento del consumo de energía primaria.

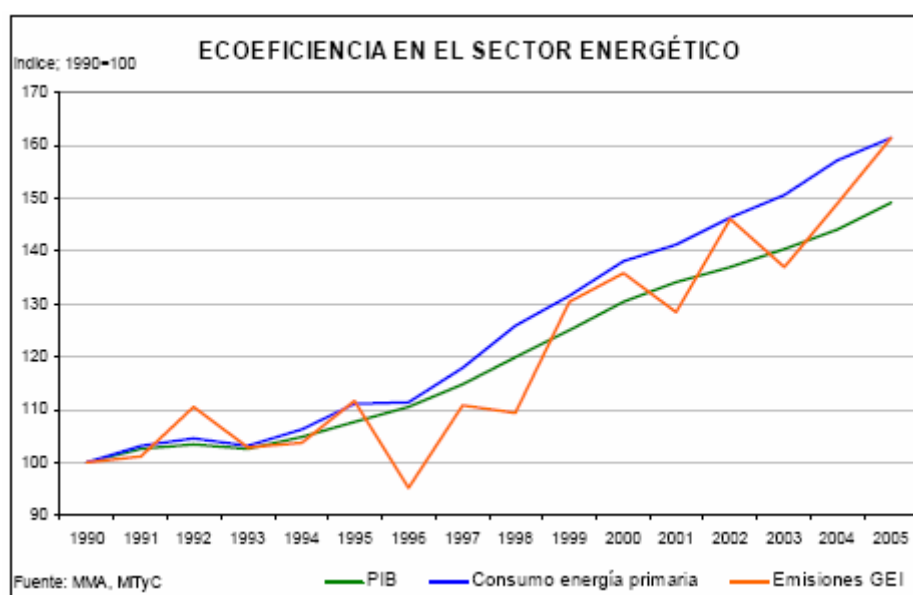


Figura 1.1 Variación porcentual del Producto Interior Bruto (PIB), consumo de energía primaria y emisión de gases de efecto invernadero (GEI) con respecto al año 1990 (MMA, 2008).

Además, la figura 1.1 muestra que este mayor consumo de energía ha sido paralelo a un sustantivo aumento en la generación de gases de efecto invernadero (GEI). Esto se debe a que las principales fuentes de generación de energía corresponden a combustibles fósiles que, al ser consumidos, generan una sustantiva cantidad de CO₂ y otros gases (figura 1.2).

¹ Ktpe = miles de toneladas de petróleo equivalente

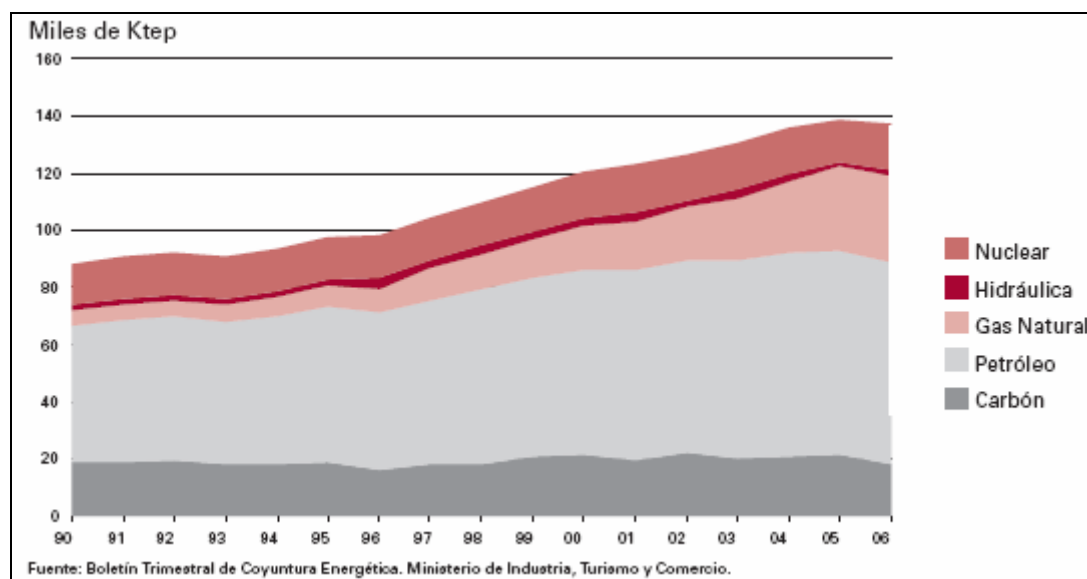


Figura 1.2 Evolución en la demanda de energía primaria entre 1990-2006 (INE, 2008).

La figura 1.2 pone de manifiesto la alta participación que tienen las fuentes convencionales (hidrocarburos) en la composición de la matriz energética española. En efecto, para el año 2006, se aprecia claramente la especial relevancia (cerca al 51%) que tiene el petróleo como fuente de energía, además de la importancia del carbón (13%) y el cada vez más significativo protagonismo del gas natural, que representa otro 21%. Lo anterior permite concluir que la actual matriz energética española, se caracteriza por una alta composición en fuentes de energía convencionales, representando, aproximadamente, el 85% del total de la energía consumida en el país en el año 2006.

Una primera consecuencia del origen de las fuentes de energía, es que éstas pueden ser altamente contaminantes. En efecto, la transformación de la energía química almacenada en los hidrocarburos, se traduce en una elevada generación de gases de tipo invernadero (GEI), que han aumentado en más de un 60% desde el año 1990. Este tipo de gases están compuestos principalmente por CO₂, cantidades menores de CH₄, N₂O y compuestos fluorados (HFC, PFC y SF₆), entre otros, los cuales han sido designados como uno de los principales responsables del denominado “efecto invernadero” (IPCC, 2007). Este fenómeno consiste en la retención de parte de la energía solar en la atmósfera terrestre por una capa de estos gases contenidos en la misma, y se le considera como uno de los principales causantes del llamado “cambio climático” que afecta al planeta en la actualidad. Este fenómeno, atribuido directa e

INTRODUCCION

indirectamente a la actividad humana, en el siglo XX se ha traducido en un aumento de la temperatura global de 0.6 °C y del 30% en el contenido de los gases de efecto invernadero en la atmósfera, entre otros parámetros.

Debido a estos factores, en el año 1997 más de 180 países – incluido España - firmaron en Kyoto (Japón) el convenio homónimo en el que se comprometían a poner en marcha programas de reducción en las tasas de emisión de este tipo de gases. Específicamente, España se comprometió a emitir en el año 2012 un máximo de un 15% más sobre la producción de GEI emitida al ambiente en el año 1990. Como se aprecia observando la figura 1.1, este objetivo es bastante difícil de cumplir, lo que se traducirá en sanciones económicas o bien se tendrá que evitar con la adquisición de “cupones” de emisión de GEI en el mercado internacional, con el consiguiente perjuicio económico para el país (MMA, 2008).

Un segundo aspecto relevante en la composición de la matriz energética española, es que el mercado es altamente dependiente de la oferta externa. En efecto, debido a las particulares condiciones geofísicas del país, a pesar de la producción de energía nuclear y al importante aumento en la producción de energías renovables (eólica y solar, principalmente), la carencia casi total de hidrocarburos hace que la producción nacional de energía sea claramente insuficiente para satisfacer la demanda, con la consiguiente vulnerabilidad para el país.

En este sentido, la figura 1.3 muestra la relación entre el tipo de energía producida y la consumida en el país en el año 2006. En primer lugar, de la figura 1.3(a) se aprecia que la principal fuente de producción nacional de energía, con 15.669 Kt/año, corresponde a la energía nuclear. Esta cantidad representa el 56% del total producido, mientras que otro 23% se obtiene a partir de la combustión de carbón y un 8% es de origen hidráulico. Sin embargo, en la figura 1.3(b) se ve que la energía nuclear, que representa más de la mitad de la capacidad de producción del país, es capaz de cubrir sólo el 11 % de la demanda total, mientras que las energías de tipo renovable (hidráulica, eólica, solar, etc) cubren como máximo un 4% de las necesidades totales de consumo.

INTRODUCCION

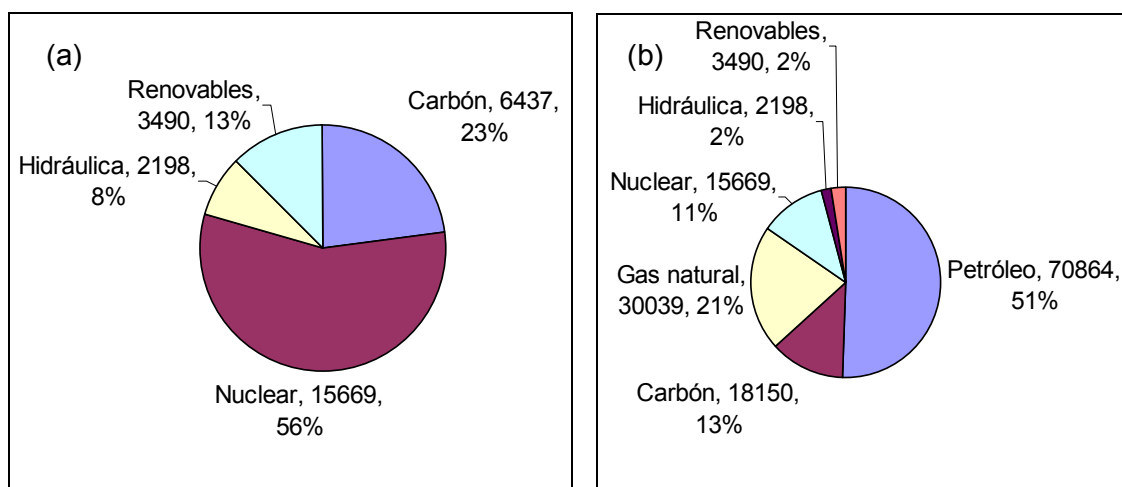


Figura 1.3 Esquemas de producción y consumo de energía primaria en España en el año 2006. (a) Producción interna por tipo de energía primaria; (b) Consumo por tipo de energía primaria (expresados en Ktpe y porcentaje del total consumido) (INE, 2008).

En concreto, la producción total del país, considerando todas las fuentes, alcanzó en dicho año un total de 27.794 Ktpe, cantidad que sirvió para solventar como máximo un 19.7% del total de 140.128 Ktpe a las que ascendió el consumo del país. De esta manera, en el año 2006, España debió importar el 100% del petróleo, el 100% del gas natural y el 67% del carbón consumido, lo que se tradujo en que se importó un 80.4% de la energía necesaria. Esta situación de dependencia podría acentuarse, debido a las políticas de eliminación gradual de la capacidad de generación de energía nuclear en el país, lo que haría aún más crítica la situación de dependencia energética externa. Todo este escenario convierte a España en un país especialmente vulnerable a las variaciones internacionales del mercado energético, tanto desde un punto de vista estratégico como financiero.

Desde un punto de vista estratégico, es importante prestar atención a los principales países proveedores de petróleo y gas natural. Al respecto, la figura 1.4 muestra una relación de los principales mercados proveedores de estos hidrocarburos.

En primer lugar, con la figura 1.4(a) se observa que, en el año 2006, Rusia fue el principal mercado proveedor de petróleo, contribuyendo con el 21% de las importaciones totales, seguido por México y Arabia Saudita. Cabe destacar que entre los restantes principales países proveedores de este combustible, se encuentran

INTRODUCCION

Nigeria, Libia, Irán, Iraq y Venezuela, los que en conjunto aportaron más de un tercio (37%) de los requerimientos de petróleo.

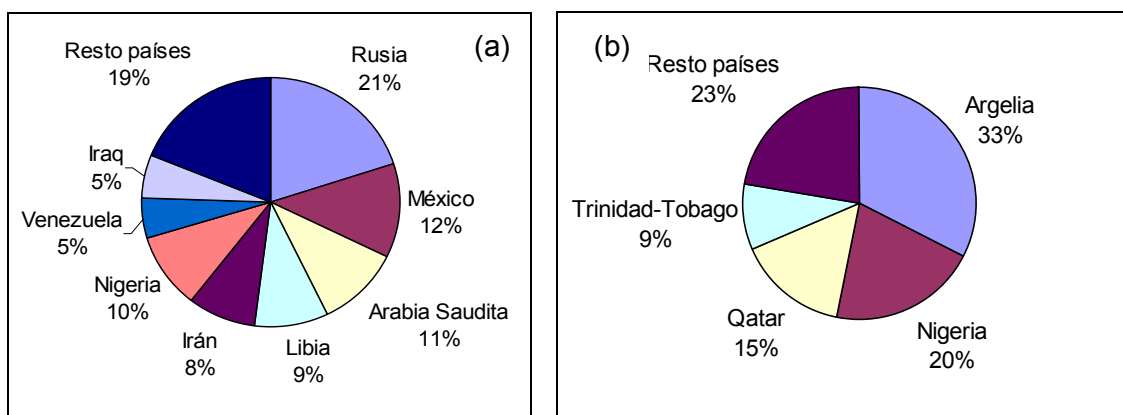


Figura 1.4 Principales países proveedores de hidrocarburos en el año 2006: (a) países proveedores de petróleo; (b) países proveedores de gas natural (expresados como porcentaje del total importado). Año: 2006 (INE, 2008).

Por su parte, en el caso del gas natural, la figura 1.3(b) refleja que un tercio del abastecimiento provino de Argelia, destacando también otros proveedores que fueron Nigeria, Qatar y Trinidad-Tobago. Para ambas fuentes de hidrocarburos, los principales mercados proveedores deben seleccionarse con atención, ya que la mayoría de ellos se sitúan en escenarios factibles de perturbaciones políticas, lo que los hacen sólo relativamente confiables en el mediano y largo plazo. Esta situación es delicada, ya que configura para el país un escenario de vulnerabilidad estratégica evidente.

En cuanto a las denominadas energías renovables, su producción ha aumentado sustancialmente en las últimas décadas, convirtiendo al país en uno de los más importantes en el mundo en la producción de este tipo de energías. Por ejemplo, en el caso de la energía eólica, España ha aumentado sustancialmente su producción de modo que se ha convertido en el segundo productor mundial. Por su parte, en el caso de la energía solar, la situación es aún mejor debido a que, en la actualidad, es el país con más capacidad instalada para la producción de esta energía (MMA, 2008). Todo lo anterior, se ha combinado de manera que la producción de energías renovables ascendió, en el año 2006, a un total de 3490 Ktpe (INE, 2008).

INTRODUCCION

El consumo de energía total se distribuye en las comunidades del país, en función de los respectivos tipos de actividad económicas. En el caso específico del sector industrial, el coste involucrado en esta actividad supera los 8.100 millones de euros al año, que se distribuyen según indica la tabla 1.1. Dicha tabla refleja que la principal fuente de energía consumida por el sector industrial en España lo hace, principalmente, bajo la forma de energía eléctrica y, apenas, un 4.6% desde fuentes alternativas de energía. En términos específicos, para la Comunidad de Madrid, el consumo de electricidad se eleva al 52%, mientras que las fuentes renovables apenas suponen un 4%.

Tabla 1.1 Distribución porcentual por tipos de energía y Comunidades Autónomas (INE, 2005)

Comunidades Autónomas	Carbón y Productos derivados petrolíferos	Gas	Electricidad	Otros consumos energéticos	Total consumo (miles de €)	
Andalucía	3	27	20	44	6	835,909
Aragón	2	19	33	43	2	374,291
Asturias	5	12	17	57	9	374,809
Baleares	9	28	18	43	2	36,647
Canarias	3	49	4	43	1	70,763
Cantabria	3	15	23	51	9	187,934
Castilla y León	2	25	23	44	6	505,121
Castilla-La Mancha	3	25	26	40	5	410,156
Cataluña	3	16	24	52	6	1,742,229
Comunidad Valenciana	2	16	41	39	2	1,078,736
Extremadura	2	39	12	47	1	96,308
Galicia	4	38	8	48	2	623,360
La Rioja	3	23	24	47	2	71,234
Madrid	1	23	19	52	4	502,866
Murcia	1	35	12	49	3	193,579
Navarra	3	15	29	50	3	244,659
País Vasco	1	11	28	55	5	823,899
Total Nacional	2.5	20.7	24.4	47.9	4.6	8,177,499

Del análisis anterior se puede concluir que, a pesar del enorme impulso dado al desarrollo de las energías alternativas renovables, su aporte no supera aún el 5% del total consumido, lo que demuestra que queda mucho por avanzar en este campo.

Otro aspecto relevante del mercado energético español es que el pronunciado aumento en requerimientos externos de energía ha venido acompañado de un período de prolongado aumento en los costes de las materias primas, en general, y de los hidrocarburos, en particular. En primer lugar, en el caso del petróleo, el precio de esta

materia prima, referida al petróleo Brent de referencia en Europa, ha aumentado desde 30 US\$/barril en el año 2000, a un máximo de 145 US\$/barril a mediados del 2008. Por su parte, en el caso del gas natural, el precio en la década ha aumentado de un valor de 1.5 a 5.5 US\$/MBTU², en el mismo período de tiempo. Esta combinación se ha traducido en que, en el año 2006, las importaciones significaron un total de 44.000 M€, lo que representa el 50% del déficit comercial español, contribuyendo a convertirlo, en la actualidad, en uno de los mayores déficits comerciales del mundo (INE, 2008).

Este escenario, en el que se combina una cada vez mayor dependencia energética externa con una alta tasa de contaminación en la generación, hace relevante la búsqueda de otras alternativas en la obtención de energía, que sean propias y sostenible ecológicamente. Además, como la matriz energética se basa principalmente en combustibles fósiles, en su gran mayoría importados, se configura un triple efecto negativo de alta dependencia exterior, importante gasto de divisas y fuerte impacto ambiental asociado a la generación de CO₂ durante la combustión.

En resumen, los factores señalados (contaminación, dependencia energética y gasto de divisas), se constituyen, entonces, en los principales estímulos para la búsqueda de nuevas fuentes y sistemas de generación de energía, que compatibilicen factibilidad técnico-económica y sostenibilidad ambiental.

1.1.2 Tipos de energías alternativas

1.1.2.1 Alternativas energéticas disponibles

Una forma de disminuir la emisión de gases contaminantes, paliar el déficit energético y disminuir la dependencia de energía extranjera es a través del desarrollo de energías propias renovables. Sin embargo, estas fuentes tienen aún ciertas restricciones técnicas y económicas que las hacen todavía no aplicables a gran escala. A continuación, se hace una breve descripción de cada una de ellas.

² Miles de BTU (british thermal unity); 1 BTU = 1.055 Joule

- (a) **Energía solar:** es una energía limpia e inagotable. Sirve para suministrar calefacción y electricidad. Es de una magnitud tal que la radiación absorbida por la tierra en un día equivale a 20 veces la energía almacenada en todos los combustibles del mundo y es 10.000 veces superior al consumo actual. No obstante, tiene el problema de una baja eficiencia y de requerir altos costos de capital: 3500 a 7000 US\$/kw.
- (b) **Energía eólica:** es una energía limpia que para su implementación requiere de superficies amplias con un potencial eólico tal que asegure una cierta constancia, velocidad y dirección del viento (la velocidad promedio del viento debe ser al menos de 14 km/h para viabilizar una instalación). Las potencias de los equipos varían generalmente entre 100 y 800 kw, encontrándose en estudio equipos de hasta 1500 kw. Ejemplo: un área de 1 km² con 16 turbinas de 500 kw son capaces de generar 23 Gw/año.
- (c) **Energía geotérmica:** es una fuente energética inestable y con un impacto ambiental medio. No hay desarrollos lo suficientemente exitosos, hasta el momento, debido a la gran cantidad de requisitos que debe cumplir para hacerse viable.
- (d) **Energía de H₂:** tiene la ventaja de ser un combustible que no genera CO₂ ni residuos de nitrógeno, azufre u otros. Por otro lado, se hace cada vez más interesante en la medida que se consumen los combustibles tradicionales y la contaminación aumenta. Se obtiene, generalmente, de la electrólisis del agua, la que se vuelve a generar al entrar en combustión el hidrógeno en presencia de oxígeno. La gran desventaja que tiene son sus altos costos (5000 US\$/kw aproximadamente), que la hacen, aún, una alternativa muy cara frente a las existentes en el mercado.
- (e) **Energía de biomasa:** es el combustible energético que se obtiene de los recursos biológicos. Se obtiene directamente por combustión (leña, carbón) o bien por la transformación de la biomasa en otros combustibles. Un ejemplo exitoso a nivel mundial es la obtención de etanol para consumo automotriz a

partir de caña de azúcar y maíz. Otro ejemplo es el de las pilas de combustible microbianas, que se describe a continuación.

1.1.2.2 Pilas de combustible microbianas

Las pilas de combustible microbianas, en adelante denominadas como PCM, constituyen uno de los medios más seguros, limpios y eficaces para convertir la biomasa en electricidad. Sin embargo, las biopilas sufren el problema que para lograr una adecuada transferencia electrónica requieren, generalmente, de catalizadores de Pt, un metal caro y fácilmente contaminable. Por este motivo, se está investigando en la generación de nuevos catalizadores o, mejor aún, en la generación de bio-electrocatalizadores a base de enzimas o bacterias que sean capaces de efectuar directamente la transferencia electrónica. En general, se puede hablar de tres tipos de pilas de combustible microbianas:

- (a) Pilas en las que el organismo genera directamente el combustible, que puede ser metanol, etanol, hidrógeno u otro hidrocarburo.

- (b) Pilas en las que los electrones liberados en la oxidación de compuestos orgánicos por la acción del metabolismo bacteriano son transportados al electrodo a través de mediadores redox. Esto tiene el problema de que se requiere un diseño muy complejo de la pila. Para eliminar este problema, se han realizado estudios que buscan la supresión de los mediadores a través de bio-mediadores como el "rojo neutro", sustancia que se adsorbe a superficies bióticas y abióticas, o bien el mediador redox ABTS (3-etilbenzothiazolina-6-sulfonato), entre otros.

- (c) Pilas en las que el intercambio de electrones pueda ser realizado directamente por el microorganismo, ya que se ha encontrado que existen una serie de bacterias que son capaces de transferir directamente electrones a electrodos sólidos. Entre ellas, se tienen bacterias de los géneros *Shewanella* y *Geobacter*.

INTRODUCCION

Esta última es la más interesante ya que en su eventual aplicación no requiere de catalizadores ni de membranas poliméricas. Un estudio con una celda de este tipo es el de Kim (Kim *et al.*, 2002), en el que a través de voltametría cíclica se estudió la transferencia electrónica directa de bacterias *Shewanella putrefaciens* a un electrodo de fibra de carbono. Los resultados mostraron que la capacidad de generación de corriente eléctrica era función de la concentración del combustible (la ctato) y del área superficial disponible, lo que sugirió que la transferencia electrónica desde las bacterias al electrodo dependió del contacto físico entre ambos. A una concentración de bacterias (base seca) de 0.47 g/L y un área superficial aparente del electrodo de 50 cm², la celda fue capaz de generar una carga eléctrica relativamente alta (3 C en 12 h). En el citado estudio, los autores identificaron a los citocromos como los responsables de la transferencia electrónica al electrodo.

Un trabajo similar es el presentado por Chaudhuri y Lovley (Chaudhuri and Lovley, 2003) en el que se emplearon bacterias *Rhodospirillum rubrum*, como electrocatalizador, y glucosa, como combustible. Este trabajo tiene la característica de que al usar glucosa como combustible, su oxidación puede generar 24 e⁻/mol, cifra que supera ampliamente a la de otros combustibles que se investigan en este tipo de celdas, como es el caso del hidrógeno (2 electrones) o metanol (6 electrones). Este combustible cobra, pues, una gran importancia ya que posee la mayor relación energía/volumen de los tres combustibles citados.

En el trabajo de Chaudhuri y Lovley, el combustible (glucosa) se oxida en el ánodo liberando electrones, iones compensadores de carga y productos de la oxidación (en este caso nCO₂, donde n representa el número de electrones equivalentes). Los iones de compensación de carga eléctrica migran a través de un conductor iónico interno (electrolito), mientras que los electrones fluyen a través de un circuito externo (es decir, generan la potencia eléctrica), utilizando O₂ como aceptor final de electrones generando nH₂O que se extrae del sistema. Un resultado interesante de este trabajo es que verifica que la transferencia electrónica se realiza a través de un contacto directo entre la biopelícula de la bacteria *R. ferrireducens* con el electrodo de carbono y no a través de la población bacteriana en solución (figura 1. 5). Esto implica que esta bacteria tiene no sólo la capacidad de usar la superficie del electrodo como un terminal oxidante al que le transfiere los electrones liberados en la oxidación de la glucosa (con

un 83% de eficiencia), sino que también puede adherirse a la superficie y transportar los productos de la oxidación a través de la pared de la membrana. Cómo funcionan estos mecanismos es aún algo no conocido, pero su comprensión y modelación puede tener importantes aplicaciones de futuro.

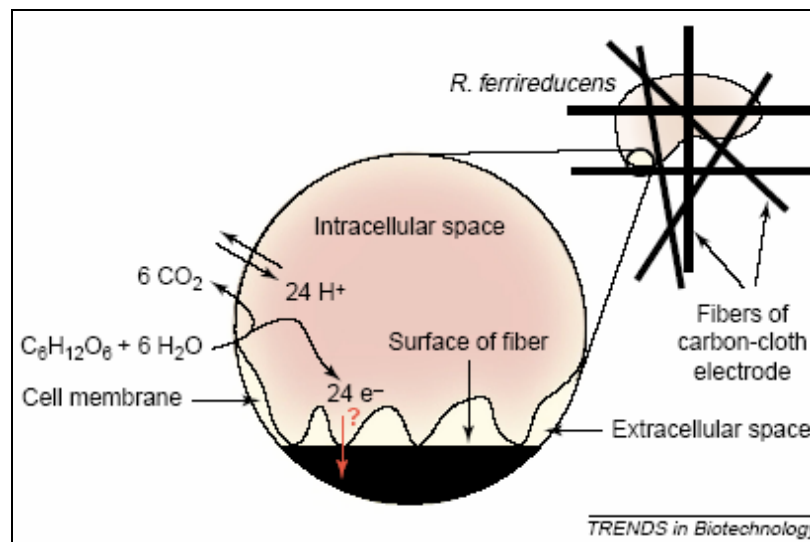


Figura 1.5 Detalle de transferencia electrónica bacteria-grafito.

Algo que caracteriza los sistemas anteriores es que todos los microorganismos involucrados son anaerobios estrictos, es decir, que sólo pueden operar en ambientes con ausencia total de oxígeno. Esta es una restricción muy seria, desde un punto de vista operacional, ya que condicionaría la viabilidad de una pila de este tipo en una eventual aplicación piloto o industrial.

Una alternativa a esta situación sería la de implementar una pila con microorganismos aeróbicos, es decir, que puedan trabajar en condiciones atmosféricas normales, ya que esto se traduciría en una gran ventaja operacional. Este es el caso que se pasa a describir a continuación y en el que se basa el presente trabajo.

1.1.2.3 Características de la pila microbiana propuesta

Recientemente, se ha encontrado que existen microorganismos capaces de realizar las funciones anteriores en ambientes aeróbicos. En efecto, con estudios preliminares (Fernández *et al.*, 2004) se ha encontrado que dos tipos de bacterias, *Acidiphilium spp.* y *Acidithiobacillus ferrooxidans*, provenientes del ecosistema del Río Tinto

INTRODUCCION

(Huelva, España), pueden conjugar la degradación aeróbica de compuestos orgánicos del tipo $(CH_2O)_n$ en CO_2 y H_2O de forma asociada a la reducción del Fe(III), siendo tolerantes al oxígeno (Malki *et al.*, 2006). Además, se ha detectado la presencia, en el mismo ecosistema, de bacterias *Acidithiobacillus ferrooxidans* capaces de oxidar el Fe(II) a Fe(III), siendo también tolerantes al oxígeno. Junto a lo anterior, estas bacterias demuestran tener la capacidad de transferir electrones directamente a electrodos de carbono sin necesidad de electro-mediadores (catalizadores), por lo que se podría trabajar con los electrodos catódicos y anódicos en un solo compartimento. Esto es relevante ya que evitaría la necesidad de membranas poliméricas, que perjudican la actividad de la pila y disminuyen su capacidad de generación de potencia eléctrica. Esto las hace especialmente atractivas para su eventual utilización en pilas microbianas.

En este sentido, también se ha logrado establecer que una de las cepas de las bacterias *Acidiphilium spp.* demuestra ser capaz de colonizar electrodos de fieltro de carbono y transferir directamente los electrones a estos sustratos en condiciones aeróbicas. Específicamente, esta cepa, denominada *Acidiphilium 3.2Sup(5)*, produce altas densidades de corriente – hasta $3 A/m^2$ a un potencial de + 0.15 V con respecto al potencial de referencia de calomelano – en ausencia de mediadores redox, a través de la oxidación de glucosa, incluso a concentraciones de aire hasta saturación y muy bajos valores de pH (Malki *et al.*, 2008).

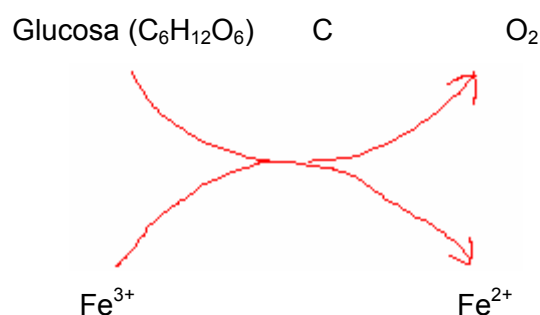
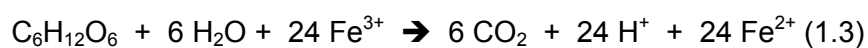
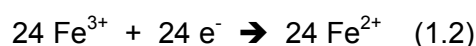
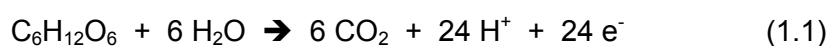
En resumen, las características de los microorganismos señalados los hacen muy atractivos en el desarrollo de un nuevo sistema de generación de energía consistente en una Pila de Combustible Microbiana PCM que tendría las siguientes características únicas:

- (a) No necesitaría catalizadores ni electro-mediadores de ningún tipo.
- (b) La pila no necesitaría de una membrana de separación de los compartimentos catódico/anódico.
- (c) Podría operar en condiciones de presión y temperatura ambientales.

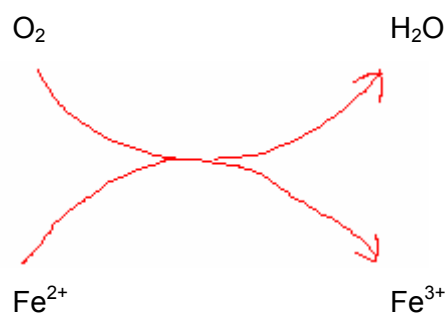
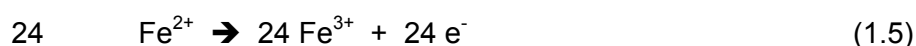
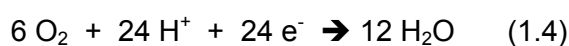
INTRODUCCION

Esta pila, en primera instancia, trabajaría con un combustible simple – por ejemplo, glucosa ($C_6H_{12}O_6$) – y sales de hierro, sustancias que establecerían sus reacciones electroquímicas de oxidación-reducción según la secuencia y los esquemas ilustrativos que se muestran a continuación:

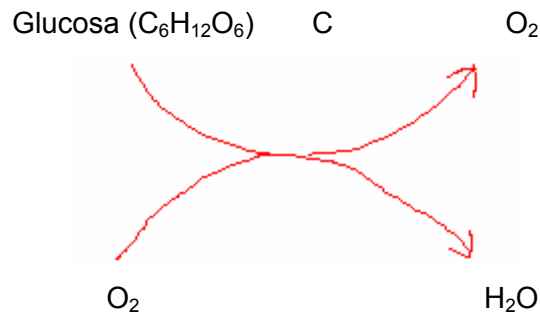
❖ Oxidación de la Glucosa y reducción del Fe(III)



❖ Oxidación del Fe(II) y formación de agua



❖ **Reacción global de la pila:**



La figura 1.6 muestra un esquema de la PCM propuesta, a partir de la que se podría obtener energía eléctrica en la medida en que se alimentase adecuadamente con compuestos orgánicos. La posibilidad de funcionar a partir de la oxidación de dichos compuestos orgánicos, más o menos complejos, abre la posibilidad de su eventual utilización ecológica, ya que podría combinar la generación de energía eléctrica con la degradación de compuestos orgánicos de desecho.

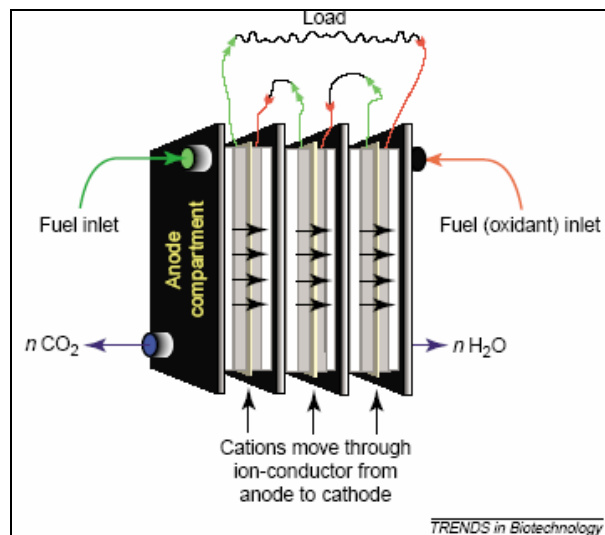


Figura 1.6 Esquema de la celda propuesta.

De las reacciones involucradas en la pila propuesta es evidente que un adecuado funcionamiento de ella requiere la presencia del hierro en forma catiónica en la disolución. Si este faltase, por ejemplo debido a procesos de precipitación de jarositas

INTRODUCCION

u de otros hidroxisulfatos de hierro, podría hacer inviable la operación de la pila, ya que inhibiría las reacciones de óxido-reducción asociadas a la glucosa y a la formación de agua. De lo anterior es evidente la necesidad de estudiar los eventuales fenómenos de interrelación entre las células bacterianas, sus principales metabolitos – tales como los exopolímeros - y los cationes de Fe presentes en el sistema.

1.2 Bacterias acidófilas

1.2.1 Características

Las bacterias forman parte de las Eubacterias, que son aquellos microorganismos que no disponen de un núcleo celular definido. En particular, las bacterias acidófilas se caracterizan porque pueden desarrollarse y crecer en ambientes cuya acidez puede variar desde valores cercanos a la neutralidad hasta valores de pH tan bajos como 0.5. Esta clase de bacterias, bastante común en ambientes naturales, son frecuentes en explotaciones mineras de sulfuros metálicos y en drenajes de aguas de mina. El efecto en el entorno en el que se desarrollan estas bacterias, puede ser tan acentuado que son capaces de generar microambientes fuertemente alterados; un claro ejemplo es el ecosistema del Río Tinto (Huelva), internacionalmente reconocido por sus extremas condiciones de acidez, fuerza iónica y concentración de metales pesados (Malki *et al.*, 2006). A continuación se presenta una breve descripción de las bacterias potencialmente utilizables en la pila microbiana propuesta anteriormente.

1.2.1.1 Género *Acidiphilium spp.*

Estas bacterias son las más representativas del género *Acidiphilium* (Harrison, 1983). Tienen forma de bacilo con dimensiones que varían entre 0.3 y 1.2 μm de diámetro y 0.6 a 4.2 μm de largo. La movilidad la logran a través de un flagelo polar, o bien, dos flagelos laterales. No tienen capacidad de formar endoesporas y presentan una tinción de Gram negativa (Bergey *et al.*, 1994). La mayoría de las especies de este género tienen un mecanismo de respiración aeróbica, aunque se ha reportado la existencia de cepas que se desarrollan en condiciones microaeróbicas o anaeróbicas (Fernández *et al.*, 2004; Cabrera *et al.*, 2005). Crecen en un rango óptimo de pH de entre 2.5 y 5.9, aunque algunas cepas pueden crecer a pH 2.0. Son mesófilas - con temperaturas de crecimiento óptimas de entre 25 y 30°C - y quimiorganotróficas, es decir, su mecanismo de obtención de energía es heterótrofo. Las especies más comunes de este género son *A. cryptum*, *A. organovorum*, *A. angustum*, *A. facilis* y *A. rubrum*.

1.2.1.2 Género *Acidithiobacillus ferroxidans*

Esta especie (Kelly and Wood, 2000) es una de las más importantes del género *Thiobacillus* y ha sido muy estudiada por su reconocida capacidad de oxidar aeróbicamente Fe^{2+} y compuestos reducidos de azufre (Meruane and Vargas, 2003; Eneroth and Koch, 2004; Cabrera *et al.*, 2005; Daoud and Karamanev, 2006; Mousavi *et al.*, 2007). Al igual que las anteriores, tienen forma de bacilos, con dimensiones que varían entre 0.3 y 0.6 μm de diámetro y de 1 a 4 μm de largo. Son quimiolitotróficas, es decir, tanto el carbono como la energía la obtienen a partir de fuentes inorgánicas (Bergey *et al.*, 1994). La mayoría de las cepas tienen un mecanismo de respiración aeróbica, aunque se han reportado algunas cepas facultativas. Otras especies de este género son *T. thioparus*, *T. denitrificans* y *T. thiooxidans*.

1.2.2 Fenómenos de adherencia: agregados microbianos (biofilms)

En la literatura se ha establecido que, en general, los microorganismos que crecen en presencia de soportes tienden a generar biopelículas sobre éstos, con el fin de generar condiciones de protección del medio y acumulación de nutrientes, entre otros factores (Liu and Fang, 2003). Estas biopelículas suelen tener una composición que es característica del sistema en el que se forman, aunque se ha establecido que, en general, están constituidas principalmente por células, sustancias poliméricas extracelulares (EPS), macromoléculas y coloides captados desde el medio (Wingender *et al.*, 1999). El contenido de sustancias orgánicas, generalmente, es función de las condiciones del sistema en el que se forma, aunque se estima que, en particular, las EPS pueden constituir desde el 50 hasta, incluso, el 90% de la materia orgánica de la biopelícula (Wingender *et al.*, 1999; Liu and Fang, 2003; Pal and Paul, 2008).

En literatura se han publicado variados trabajos que pretenden avanzar en la comprensión del fenómeno de formación de las biopelículas, aunque en general se ha establecido que la secuencia de formación de una de éstas consistiría de una primera etapa de adhesión bacteriana, seguida de una segunda en la que se generaría una red

INTRODUCCION

de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que harían de articuladores en la generación de la estructura de la biopelícula. Un estudio al respecto es el publicado por Harneit (Harneit *et al.*, 2006), en el que los autores estudiaron la adhesión, a distintas superficies sulfuradas, de bacterias *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans*. Para el caso de *A. ferrooxidans* encontraron que presentaba diferentes grados de adherencia según el tipo de mineral (pirita, calcopirita, galena, esfalerita y cuarzo), siendo el mejor para el caso de la pirita y el más bajo para el cuarzo. Los autores atribuyeron el diferente grado de adhesión superficial bacteriana a la generación de una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), que forma un biofilm que consolida la adherencia bacteriana. Además, mediante análisis microscópicos, se comprobó que la adherencia bacteriana estuvo focalizada en los sitios superficiales con defectos.

Un trabajo en el que se evaluó la adherencia de bacterias de *A. ferrooxidans* y *Acidiphilium*, como las utilizadas en este proyecto, es el presentado por Ghauri (Ghauri *et al.*, 2007). En él se evaluó la capacidad de adherencia de ambos tipos de bacterias a superficies de pirita, vidrio y cristales de hidroxisulfato férrico. Los resultados mostraron que, al igual que en el trabajo de Harneit, antes mencionado, las bacterias de distintas cepas de *A. ferrooxidans* se adhirieron en mayor medida sobre partículas de pirita (entre un 80 y 100% en 100 min), que sobre las otras superficies evaluadas. Un comportamiento similar presentaron las bacterias de las cepas de *Acidiphilium*. Los autores encontraron que incluso cepas muy similares de bacterias acidófilas pueden tener capacidades de adherencia muy distintas, incluso sobre las mismas superficies sólidas, lo que puede explicar los comportamientos tan dispares presentados en literatura relativos a mono o multicultivos de bacterias acidófilas. Finalmente, y como principal conclusión del trabajo, los autores mediante microscopía AFM, mostraron que la adhesión bacteriana se incrementaba con la formación de microcolonias de células embebidas en una matriz de sustancias EPS.

De igual modo, se ha reportado que en sistemas tan complejos como los que se encuentran en plantas de tratamiento de aguas residuales, las EPS son las componentes más importantes en las biopelículas que se forman en biorreactores que usan soportes tan distintos como membranas (Yeo *et al.*, 2007), bolas de acero (Kives

INTRODUCCION

et al., 2006), tambor rotatorio (Zhang *et al.*, 1999) y soportes cerámicos (Frölund *et al.*, 1996), entre otros.

De la anterior revisión bibliográfica se podría establecer, entonces, que las comunidades de microorganismos tienden a formar biopelículas sobre la superficie de sustratos sólidos, cuando crecen en presencia de éstos y, además, que un componente clave en la arquitectura y estabilidad de estos biofilms son las denominadas sustancias poliméricas extracelulares (EPS), de las que en el apartado 1.3.1 se presentan algunos fundamentos.

1.3 Sustancias poliméricas extracelulares (EPS)

1.3.1 Fundamentos generales de las EPS

Las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) son productos metabólicos de origen biológico y sus constituyentes principales consisten esencialmente en sustancias de alto peso molecular, como carbohidratos y proteínas, además de sustancias húmicas y ácidos nucleicos y urónicos (Morgan *et al.*, 1990). Su origen se debe principalmente a procesos tales como secreción y lisis celular y pueden formarse en las superficies de las células, o bien, pueden encontrarse diseminadas en el medio (Wingender *et al.*, 1999). En términos generales, se plantea que su función fundamental es la de procurar establecer un marco de condiciones adecuadas para el desarrollo de la comunidad microbiana (Laspidou and Rittmann, 2002).

El término EPS fue propuesto originalmente por Geesey (Geesey, 1982) como el acrónimo de *extracellular polymeric substances*, definiéndola como una “sustancia polimérica extracelular de origen biológico que participa en la formación de comunidades microbianas”. Dichas siglas se han usado también como correspondientes a los términos *extracellular polysaccharides*, *exopolymers* y *exopolysaccharides*. Esto se puede atribuir a que los primeros trabajos reportados indicaban que los polisacáridos eran los componentes mayoritarios de las EPS extraídas. Sin embargo, en lo sucesivo se ha encontrado que las EPS presentan también significativas cantidades de proteínas (Frölund *et al.*, 1996), ácidos nucleicos (Sheng *et al.*, 2005), sustancias húmicas (Liu and Fang, 2002) y fosfolípidos (Gehrke *et al.*, 1998), entre otros tipos de sustancias poliméricas.

En este sentido, en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, el uso del término EPS se entenderá como el **“conjunto de sustancias poliméricas extracelulares tales como carbohidratos, proteínas, ADN, lípidos y otros compuestos poliméricos, que se presentan en la superficie de las células y/o entre los espacios intercelulares presentes en conjuntos microbianos”**.

INTRODUCCION

En general, en la literatura existe un relativo consenso a que, en la práctica, se cuenta con dos tipos de EPS, una más masiva y estructurada denominada **superficial** y otra más dispersa denominada **soluble** (figura 1.7) (Laspidou and Rittmann, 2002):

- **EPS superficial:** este corresponde al conjunto de sustancias poliméricas que tienen una relación más o menos directa con la superficie de las células. Entre las sustancias de este tipo se incluyen: (a) polímeros fuertemente adheridos a la superficie celular, y (b) sustancias poliméricas que se encuentran en la matriz formada por células y materia tanto orgánica como inorgánica - captada desde el medio ambiente.
- **EPS soluble:** engloba al conjunto de sustancias poliméricas, macromoléculas solubles, células y coloides dispersos en el seno del medio.

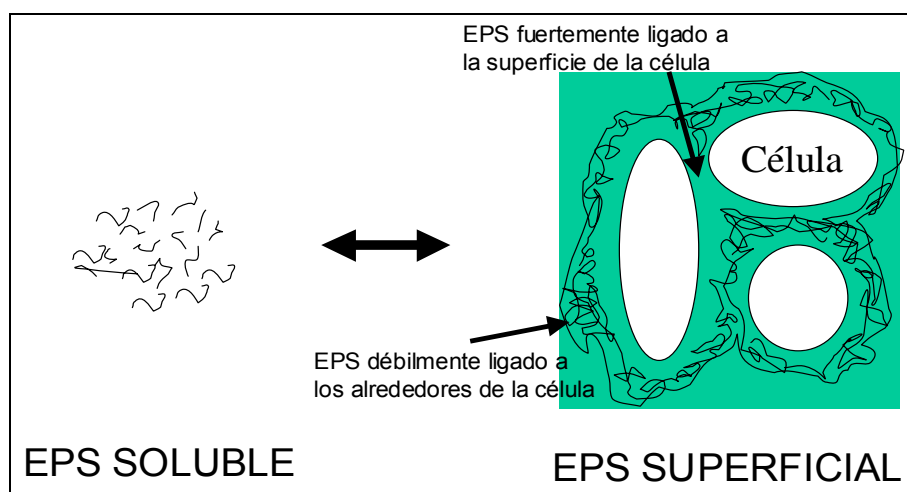


Figura 1.7 Representación de EPS superficial y soluble.

Generalmente las EPS están formadas por una polimerización de grupos similares o idénticos, los cuales pueden unirse de forma repetitiva tal como ocurre en muchos polisacáridos. Los constituyentes más frecuentes se muestran en la tabla 1.2.

Una fuente de emisión de EPS es la secreción por células vivas a través de mecanismos de biosíntesis que involucran la transferencia de EPS a través de la membrana hacia la superficie de la célula o bien al medio ambiente más cercano. Otro mecanismo de origen de este tipo de sustancias es la lisis de células vivas y muertas,

INTRODUCCION

que provoca la liberación de sustancias de alto peso molecular que se adhieren a las superficies de las células o se sitúan entre ellas, de modo que sirven como fuentes de reserva de carbono y nutrientes.

Tabla 1.2 Componentes principales de los EPS

Polímero	Componentes principales	Tipo de puente
Polisacáridos	Monosacáridos, ácidos urónicos amino-azúcares	Glicosídicos
Proteínas (polipéptidos)	Amino-ácidos	Péptidos
Acidos nucleicos	Nucleótidos	Fosfodiester
(Fosfo)lípidos	Ácidos grasos, glycerol fosfatos, azúcares	Esteres
Substancias húmicas	Amino-ácidos, azúcares simples compuestos fenólicos	Eter, tipo C-C Péptidos

Las funciones específicas de este tipo de sustancias no han sido desveladas hasta el momento, aunque existe un relativo consenso en que se forman y estructuran para cumplir una serie de distintas funciones, tales como favorecer la adhesión bacteriana, ayudar a la estabilización de la estructura del biofilm y formar una capa protectora a los biocidas del medio, entre otras. En general, se les atribuye que su rol principal es el de actuar como un elemento estructural fundamental de la matriz de EPS, determinando, de esta forma, la estabilidad mecánica de los biofilms. Esta misión la puede realizar a través de la acción de enlaces o interacciones no-covalentes y actuando, ya sea directamente, a través de las cadenas de polisacáridos o, indirectamente, a través de enlaces con cationes multivalentes (Wingender *et al.*, 1999).

1.3.2 Descripción de los métodos de extracción de EPS

Un aspecto que ha dificultado el análisis de las EPS es la extracción de estas sustancias desde las comunidades de microorganismos. En efecto, si bien se han reportado muchas técnicas de extracción, sus resultados se han visto alterados debido

INTRODUCCION

al inevitable impacto que la propia técnica tiene sobre las células en cuanto a la lisis celular que provocan, lo que afecta tanto a la composición como a la estructura de las EPS obtenidas, pudiendo, todo ello, inducir a conclusiones erróneas. Lo anterior implica que el proceso de extracción debe intentar combinar, por una parte, la mayor y más eficiente extracción de estas sustancias, y por otra, el menor grado de alteración de las células que componen el sistema en estudio. Esta dicotomía tiene la dificultad que ambos aspectos son difíciles de lograr, debido a que la aplicación de los principios físico-químicos en los que se basan los métodos de extracción acarrearán inevitables fenómenos de lisis celular.

La gran mayoría de los métodos de extracción se basan en la aplicación de técnicas mecánicas, químicas y en una combinación de ambas. Se pueden mencionar la aplicación de resinas de intercambio iónico (Jahn and Nielsen, 1995; Frölund *et al.*, 1996), de EDTA (Brown and Lester, 1980; Sheng *et al.*, 2005), de ultrasonidos (Dignac *et al.*, 1998) y de glutaraldehído (Azeredo *et al.*, 1998); así como, el calentamiento (Schmidt and Ahring, 1994; Zhang *et al.*, 1999), el empleo de NaOH (McSwain *et al.*, 2005) y enzimas (Sesay *et al.*, 2006), entre otras. Lamentablemente, los resultados publicados son contradictorios y difíciles de reproducir, por lo que no se ha logrado establecer un protocolo que reúna las mejores condiciones en cuanto al grado de eficiencia de extracción y pureza de las EPS obtenidas.

En este sentido, las diferentes técnicas de extracción obtienen cantidades de las EPS muy distintas, incluso para cultivos y condiciones similares, con variaciones de hasta 100 veces en la cantidad de las EPS obtenidas (Wingender *et al.*, 1999; Liu and Fang, 2002; Yu *et al.*, 2006). Asimismo, se ha encontrado que los métodos también influyen de modo importante en la composición de las EPS, provocando diferencias significativas en los contenidos relativos de las distintas sustancias poliméricas (Zhang *et al.*, 1999; Comte *et al.*, 2006), en la estructura y grupos funcionales que los constituyen (Omoike and Chorover, 2004; Sheng *et al.*, 2005; Comte *et al.*, 2007).

Como no existe un método que logre conjugar los aspectos de máxima extracción y mínima alteración, la elección del método de extracción se debe evaluar en función del tipo de análisis o aplicaciones que se quieran hacer con los EPS. Es decir, puede que se quiera separar cuantitativamente a las EPS de la biomasa o, bien, separar sólo un

cierto componente de ellas. Normalmente, lo que se quiere es obtener una separación cuantitativa, por lo que es vital no inducir un grado de lisis celular y tratar de mantener la estructura de la membrana lo más estable posible. Una secuencia de trabajo ideal sería la siguiente:

- (a) causar un mínimo grado de lisis celular,
- (b) no degradar o alterar los biopolímeros,
- (c) liberar y extraer todas las EPS,

La mejor extracción dependerá del tipo de interacción que mantenga unidas a las EPS con la matriz con la que se encuentren interrelacionadas. Entre las principales fuerzas de unión involucradas entre las EPS y las matrices que las contienen se pueden mencionar: fuerzas de Van der Waals, interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y, en algunos casos, enlaces covalentes. Estas fuerzas actúan de forma distinta entre un sistema y otro e, incluso, se pueden presentar distintas combinaciones en una misma matriz.

Debe considerarse que en el caso de cultivos puros las EPS que rodean la superficie celular pueden ser muy difíciles de extraer. Este material capsular, probablemente, no puede ser extraído a través del uso de los métodos comunes y quizá, difícilmente, se libere sin dañar la propia célula. Esto sirve para enfatizar que los métodos de extracción más estandarizados, hasta el momento, son eminentemente cualitativos y lo más probable es que al aplicarlos sólo se extraiga una pequeña parte de las EPS.

En literatura se recoge una gran variedad de métodos y protocolos para la extracción de EPS a partir de diferentes tipos de cultivos microbianos. La gran mayoría de éstos se basan en la aplicación de principios físicos, químicos o en combinaciones de ambos. A continuación, se realiza un breve análisis de la eficiencia de cada uno de ellos.

1.3.2.1 Métodos físicos de extracción de EPS

Los más usados se basan en la aplicación a los cultivos de ondas de ultrasonido, calor por medio de vapor (calentamiento) o centrifugación, seguidos de una posterior

INTRODUCCION

filtración para separar las células de los polímeros liberados. La tabla 1.3 muestra una recopilación de las condiciones en las que se aplicaron a algunos métodos físicos, a sistemas puros y multi-componentes.

Tabla 1.3 Extracción de EPS por métodos físicos

Método de extracción	Sistema	Referencia
Calentam. (70°C, 1 h, 1 bar)	<i>Rhodopseudomonas acidop.</i>	Sheng et al (2005)
Centrifug. (33.000 g, 10 min, 4°C)	<i>Klebsiella aerogenes</i>	Brown y Lester (1980)
Centrifug. (33.000 g, 10 min, 4°C)	Lodos activados	Brown y Lester (1980)
Centrifug. (12.000 g, 30 min, T _{amb})	Biofilms	Zhang et al (1999)
Ultrasonido (300W, 1 min)	Lodos activados	Azeredo et al (1998)
Ultrasonido (40W, 2 min)	Lodos activados	Comte et al (2006)
Ultrasonido (37W, 20 kHz, 1 min)	Lodos activados	Dignac et al (1998)
Calentam. (80°C, 10 min, 1 bar)	Lodos activados	Comte et al (2006)
Calentam. (80°C, 10 min, 1 bar)	Lodos activados	Frölund et al (1996)

En términos generales, de los resultados publicados se ha podido observar que con esta clase de métodos, se obtienen menores extracciones cuantitativas que usando métodos químicos o combinaciones de ambos. Un ejemplo de esto lo plantea Comte en un trabajo en el que compara 8 métodos de extracción (5 físicos y 3 químicos) y en el que encontró que las cantidades de exopolímeros extraídas por los métodos físicos resultaron inferiores que aquellas extraídas por los químicos (Comte *et al.*, 2006). En cuanto al grado de lisis celular que inducen, si bien existe poca información al respecto, se ha reportado que ésta puede llegar a ser muy significativa cuando se recurre al calentamiento del cultivo (Frölund *et al.*, 1996; Nielsen and Jahn, 1999).

A continuación se describen brevemente dos de los métodos de este tipo más utilizados en la extracción de EPS: centrifugación y calentamiento.

Extracción de EPS por centrifugación pura

Este método, de tipo netamente físico, está basado en la aplicación de fuerzas centrífugas que actúan sobre las células o un agregado bacteriano. Específicamente, consiste en la acción de fuerzas de corte, generadas por una cierta velocidad de rotación, que actúan sobre las paredes de las células hasta provocar la separación entre los exopolímeros y la pared de la célula.

En la literatura se ha recogido la aplicación de este método actuando tanto solo, y entonces sirve preferentemente como método de referencia, como combinado con otro principio físico o químico (Liu and Fang, 2002; Comte *et al.*, 2006). En general, las condiciones en las que se aplica en cuanto a la temperatura del sistema, 4 °C, y en relación al tiempo de centrifugación, entre 15 y 30 min, son ampliamente utilizadas en los trabajos publicados.

Sin embargo, en lo relativo a velocidades de rotación los valores utilizados varían en un amplio rango según la fuente consultada. Por ejemplo, en dos trabajos en los que se usa este método como control, la fuerza centrífuga aplicada durante 20 min a 4 °C varía entre 4.000 (Comte *et al.*, 2006) y 20.000 g (Liu and Fang, 2002), donde g es la aceleración de gravedad. Es decir, para similares condiciones del sistema, la fuerza de centrifugación aplicada fue cinco veces más intensa. Condiciones intermedias a las anteriores son las mencionadas por Zhang en un trabajo en el que realizó una centrifugación a 11.227 g durante 20 min (Zhang *et al.*, 1999). Otras condiciones, más extremas que las anteriores, se aplican en la denominada ultracentrifugación, con fuerzas centrífugas superiores a los 30.000 g. Un ejemplo de esto es la aplicación, a cultivos puros de *Klebsiella aerogenes* y lodos activados, de fuerzas centrífugas de 33.000 g durante dos periodos consecutivos de 10 min cada uno (Brown and Lester, 1980).

Si se buscan condiciones que afecten lo mínimo posible a las células pero que, a su vez, permitan obtener una cantidad de EPS adecuada para su análisis por las técnicas químicas y espectroscópicas mencionadas, éstas se pueden encontrar en un trabajo de Liu y Fang en el que después de realizar la extracción a 20.800 g (14.000 rpm) durante 20 min y a 4 °C, obtuvieron EPS con un mínimo impacto de contaminación intracelular (Liu and Fang, 2002).

Extracción de EPS por calentamiento

La aplicación de calor es otro de los métodos utilizados para liberar las EPS de la superficie de la célula. Esta técnica logra una alta tasa de extracción pero, simultáneamente, puede inducir una apreciable lisis celular (Nielsen and Jahn, 1999).

Normalmente, el calentamiento se realiza a presión atmosférica (1.0 bar) y a temperaturas entre 60 y 80 °C, con diferencias significativas en cuanto a los tiempos de aplicación. Por ejemplo, en la extracción de EPS de distintas biopelículas, Zhan g aplica una temperatura de 80 °C durante 10 min (Zhang *et al.*, 1999), condiciones idénticas a las usadas por Comte en la extracción de EPS a partir de dos tipos de lodos activados (Comte *et al.*, 2006). Por su parte, en otros trabajos se aplican tiempos significativamente superiores, tales como 80 °C durante 1 h en la extracción de EPS con lodos activados (Frölund *et al.*, 1996), y 70 °C, también durante 1 h, a cultivos puros de *Rhodopseudomonas acidophila* (Sheng *et al.*, 2005). Finalmente, en la literatura también se reportan condiciones intermedias a las anteriores, tales como calentar el cultivo a tratar (lodos activados) a 60 °C durante 30 min (Li and Yang, 2007).

1.3.2.2 Métodos químicos de extracción de EPS

Los métodos químicos se basan en la adición de distintos reactivos a cultivos bacterianos, que pueden establecer distintas reacciones químicas con los EPS, facilitando su liberación. Entre los reactivos más utilizados se tiene el uso de NaOH, H₂SO₄, EDTA, formaldehído y glutaraldehído, entre otros. La tabla 1.4 muestra las condiciones, recogidas en la literatura, en las que se aplicaron a algunos de estos métodos a cultivos puros y mixtos.

INTRODUCCION

Tabla 1.4 Extracción de EPS por métodos químicos

Método de extracción	Sistema	Referencia
EDTA 2% (3.2g/g-PS, 4°C, 3h)	<i>Rhodopseudomonas acidop.</i>	Sheng et al (2005)
EDTA 2% (4°C, 3h)	<i>Klebsiella aerogenes</i>	Brown y Lester (1980)
NaOH 1 N (2:10 v/v, 3h)	<i>Rhodopseudomonas acidop.</i>	Sheng et al (2005)
NaOH 1 N (4:10 v/v, 3h)	Lodos aeróbicos, ácidos	Liu y Fang (2002)
NaOH 2 M (2:1 v/v, 5 h)	<i>Klebsiella aerogenes</i>	Brown y Lester (1980)
Glutaraldehído 3% (4°C, 12h)	Lodos activados	Azeredo et al (1998)
Glutaraldehído 10% (4°C, 12h)	Lodos activados	Comte et al (2006)
EDTA 2% (4°C, 3h)	Lodos activados	Comte et al (2006)
EDTA 2% (4°C, 3h)	Lodos aeróbicos, ácidos y metanogénicos	Liu y Fang (2002)
Enzimas (amilasa, proteínasa)	Lodos activados	Sesay et al (2006)

Dos de los métodos químicos más utilizados son la extracción con NaOH y con EDTA, cuyas características y condiciones de aplicación se describen a continuación.

Extracción de EPS por adición de NaOH

El tratamiento con NaOH provoca la carga de grupos tales como el grupo carboxílico en proteínas y polisacáridos, los cuales se ionizan debido a que su punto isoeléctrico, valor de pH en el que su carga neta es nula, varía entre 4 y 6. Esto provoca una fuerte repulsión de las EPS en la propia matriz de estos compuestos, lo que induce a una mayor solubilidad de las mismas.

Normalmente, las condiciones apuntan a la interacción, sin agitación, durante 3 h, entre la disolución de NaOH y el volumen de cultivo a tratar. La concentración de la disolución de NaOH y los volúmenes dependen del tipo de cultivo. Por ejemplo, Sheng usó 10 mL de cultivo con 2 mL de una disolución de NaOH 1 N (Sheng *et al.*, 2005). Condiciones similares fueron las usadas por Liu y Fang, quienes utilizaron, durante 3 h, 10 mL de lodos con 4 mL de NaOH 1 N (Liu and Fang, 2002).

Extracción de EPS por adición de EDTA

La repulsión entre los componentes de la matriz de EPS y la solución acuosa puede aumentarse a través de la extracción de algunos de los cationes importantes para la estructura de la matriz de las EPS, por ejemplo Ca^{2+} y Mg^{2+} , y su eliminación ayuda en la desintegración de este tipo de gel. Estos cationes pueden ser extraídos usando una resina de intercambio iónico o agentes complejantes tales como EDTA.

En el caso del uso del EDTA, en la literatura se recogen resultados contradictorios en cuanto a las cantidades extraídas y a los grados de lisis inducidos. En efecto, se sabe que la recuperación de los cationes divalentes puede alterar la superficie de la célula, desestabilizándola, lo que podría inducir la liberación de sustancias tales como los LPS (lipopolisacáridos) u otro tipo de macromoléculas intracelulares (Nielsen and Jahn, 1999) que, además, podrían afectar la medición de proteínas.

Las condiciones de trabajo suelen ser similares a las del uso de NaOH , es decir, tiempos de entre 3 h y temperatura de 4°C , además, en la mayoría de los estudios, el EDTA se prepara a una concentración del 2%. La relación entre los volúmenes de cultivo y de EDTA usados en la extracción depende de la fuente pero, normalmente, 1:1 es la que suele emplearse (Brown and Lester, 1980; Liu and Fang, 2002).

1.3.2.3 Métodos físico-químicos de extracción de EPS

Una forma de incrementar la eficiencia en el grado de extracción de los métodos químicos, es aplicar al cultivo principios mecánicos tales como el de cizalla. En general, no se cuenta con muchas publicaciones en las que la adición de reactivos químicos se combine con la aplicación de esfuerzos de corte a través de la agitación, por ejemplo; sin embargo, se estima que la extracción química puede ser más efectiva y reproducible cuando está combinada con agitación. En la tabla 1.5 se dan algunos ejemplos en este sentido.

INTRODUCCION

Tabla 1.5 Extracción de EPS por métodos físico-químicos

Método	Sistema	Referencia
Resina (dosis y tiempos variables)	<i>Pseudomonas putida</i>	Frölund et al (1996)
Resina (70g/g-PS) + agitación (4°C, 600 rpm, 1 h)	Lodos aeróbicos, ácidos y metanogénicos	Liu y Fang (2002)
Resina (100g/g-PS) + agitación (4°C, 600 rpm, 5 h)	Lodos activados	Sesay et al (2006)
Resina (4°C, 1h, 600 rpm)	Lodos activados	Comte et al (2006)
Resina (dosis y tiempos variables)	Biofilms	Jahn y Nielsen (1995)
Resina (dosis y tiempos variables)	Lodos activados	Frölund et al (1996)
Formaldeh. 36.5% (4°C, 1h) + Ultrasonido (60 W, 2 min)	Lodos aeróbicos, ácidos y metanogénicos	Liu y Fang (2002)

Uno de los casos con más estudios reportados es el de la combinación del uso de resinas de intercambio iónico y agitación. Los cambios en los parámetros de trabajo más sustantivos entre los estudios de la bibliografía son el tipo, granulometría y dosis de la resina usada, además de las condiciones de agitación. En general, se usan comúnmente resinas ácidas de tamaño 50x8 # ASTM, con una concentración de entre 60 y 80 g resina/g-VS³, bajo condiciones de agitación de 300 - 750 rpm, durante períodos de 2 - 4 h y a temperaturas de 4 °C. Por ejemplo, en la extracción de EPS a partir de lodos y flóculos aeróbicos, McSwain usó 70 g de una resina sódica ácida por cada gramo de VS, de tamaño 50x8# y agitado durante 4 h a 750 rpm y con una temperatura de 4 °C (McSwain *et al.*, 2005). Otros estudios en condiciones similares son los de los grupos de Sesay y de Yeo, entre otros (Sesay *et al.*, 2006; Yeo *et al.*, 2007).

1.3.3 Fenómenos de interacción EPS-Fe en sistemas acidófilos

Como se ha mencionado anteriormente, la pila de combustible en desarrollo pretende la obtención de energía eléctrica a partir de la conversión de la energía química

³ VS volátil solids: sólidos orgánicos; PS: peso seco de células

INTRODUCCION

almacenada en compuestos orgánicos. Su diseño se basa en la transferencia directa, es decir, sin mediadores, de los electrones generados en la oxidación de estos compuestos a electrodos de carbono, por parte de las células de la bacteria *A. 3.2Sup(5)*, cuyo metabolismo, que genera dicha oxidación, se complementa en el sistema con el de la bacteria *A. ferrooxidans*. Como esta última bacteria requiere Fe(II) en la disolución para obtener la energía necesaria para su crecimiento, en dicho sistema se tendrá entonces la presencia simultánea de soportes de carbono, de las mencionadas bacterias (*A. 3.2Sup(5)* y *A. ferrooxidans*) y de Fe en disolución.

Como se ha mencionado en el apartado 1.3. 1, durante su crecimiento las células bacterianas generan sustancias poliméricas extracelulares (EPS), las que al estar constituidas por macromoléculas orgánicas, podrían interactuar a través de sus grupos funcionales activos con el Fe contenido en la disolución, induciendo un cierto grado de adsorción de dicho metal.

Además, podría ocurrir que la propia superficie del electrodo de carbono pudiera, también, interactuar directamente con el Fe contenido en la disolución a través de la formación de hidróxidos o oxihidrosulfatos del metal. Sin embargo, como se ha establecido en el apartado 1.2.2, las células bacterianas tienen la tendencia a formar una biopelícula sobre la superficie de soportes cuando crecen en presencia de éstos por lo que, en la práctica, cabría esperar que durante la operación de la pila la superficie de los electrodos de carbono fuese progresivamente cubierta por una biopelícula lo que, a su vez, podría disminuir la importancia de la interrelación directa superficie-metal. De esta manera, la biopelícula podría actuar como una barrera entre la superficie del electrodo y el seno de la disolución que contiene a las células planctónicas y al metal, convirtiéndose de hecho en la verdadera "superficie" del electrodo.

En definitiva, un efecto práctico de la biopelícula es que, debido a su alto contenido de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), que pueden llegar a constituir hasta el 90% de la materia orgánica que contiene, podría convertirse en una importante fuente de captación de dicho metal desde el medio. En función de la magnitud que tuviera dicha adsorción, los cambios en las concentraciones locales del hierro podrían inducir cambios en la acidez y especiación del metal en el microambiente que rodea los

INTRODUCCION

electrodos, los que a su vez podrían alterar, sustancialmente, el funcionamiento de la pila. Además, dicha interacción del hierro con las EPS, podría generar precipitados o fases que a su vez hicieran de agentes de nucleación preferencial para la precipitación adicional de nuevos compuestos de hierro sobre la biopelícula. Si esto ocurriera, más o menos masivamente, provocaría una disminución del contenido de hierro en la disolución, lo que, a su vez, se traduciría en una disminución de la fuente de energía necesaria para el crecimiento de la bacteria *A. ferrooxidans*.

Al respecto se cuenta con alguna información en la literatura. Por ejemplo, Kinzler en un trabajo en el que estudió este tipo de interacciones, encontró que las EPS de *A. ferrooxidans* jugaban el papel de ayudar a consolidar la adhesión de la bacteria a sustratos sólidos (partículas de pirita) y de concentrar localmente la presencia de Fe(III), lo que se traducía en un aumento sustancial de la velocidad de ataque químico al mineral (Kinzler *et al.*, 2003). Además, los autores de dicho trabajo encontraron que las EPS de esta bacteria pueden retener Fe(III) en su estructura a través de la formación de complejos de este catión con ácidos urónicos, entre otras sustancias poliméricas extracelulares. Estos resultados fueron confirmados posteriormente por Sand y Gehrke (Sand and Gehrke, 2006) en un trabajo realizado en condiciones similares, en el que corroboraron la especial aptitud de estas EPS en la captación de Fe(III) desde el medio, a través de la formación de complejos con algunos de los polímeros que las constituyen.

Algunos trabajos muestran que sistemas en los que cohabitan ambos tipos de bacterias pueden provocar sinergias que potencian determinados comportamientos, tales como “secuestrar” Fe desde el medio. Un ejemplo de esto es el estudio de Sand en sistemas en los que crecen simultáneamente *Leptospirillum ferrooxidans* y *Acidiphilium sp.* Si bien *L. ferrooxidans* es distinta a *A. ferrooxidans*, su similitud genética hace que su comportamiento sea generalmente comparable (Sand *et al.*, 2001). En el trabajo, los autores encontraron que la presencia de *Acidiphilium* aumentaba la tendencia de generación de EPS de *L. ferrooxidans* a través de un mecanismo desconocido – posiblemente por simbiosis bacteriana - lo que redundaba tanto en un aumento de la tendencia a la captación de Fe(III) desde el medio, como en la posibilidad de que las EPS actúen como agentes de nucleación de sustancias sólidas de Fe, tales como jarositas u otros hidroxisulfatos de hierro.

De esta manera, se requiere entonces profundizar en el mecanismo en el que las EPS bacterianas interactúan con el Fe en disolución, a través de la adsorción de dicho metal tanto en presencia como en ausencia de soportes de carbono, cuyos fundamentos se discuten a continuación en el Apartado 1.3.3. Este problema podría representarse como el estudio de un sistema trifásico en el que sus fases individuales serían los soportes de carbono, las EPS bacterianas y el Fe en disolución, quienes interrelacionarían según el esquema que se muestra en la figura 1.8.

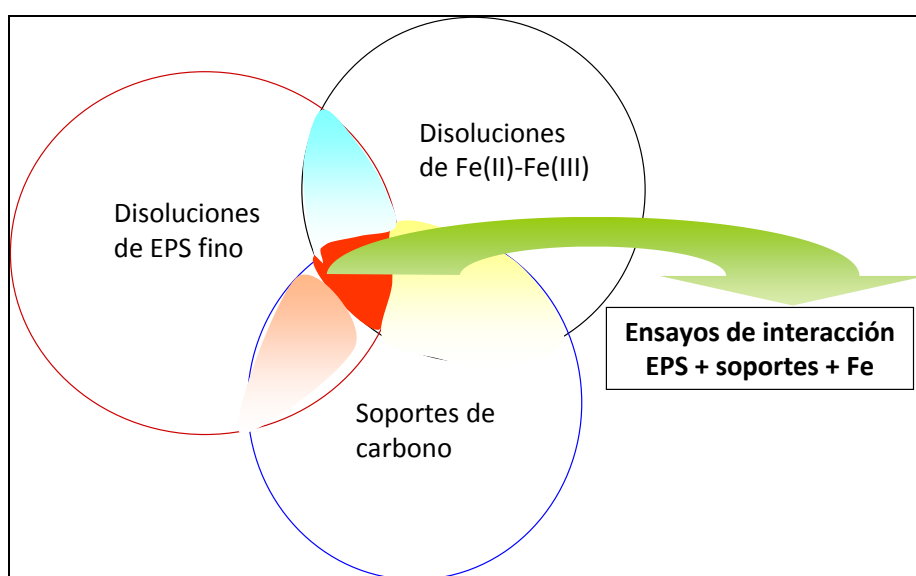


Figura 1.8 Esquema ilustrativo del sistema trifásico a estudiar.

1.3.3.1 Bioadsorción de Fe por EPS

El proceso por el que una biomasa que realiza la adsorción de un determinado metal, encontrándose ésta metabólicamente inactiva como es el caso de las EPS bacterianas, ha sido tradicionalmente denominado bioadsorción (Volesky, 2003), por lo que este será el término también utilizado en este documento.

La utilización de biomasa (vivas o muertas) en la captación de metales pesados, principalmente desde disoluciones diluidas, es uno de los campos en los que se ha venido trabajando, cada vez con mayor interés, en los últimos años. En este sentido, Gadd en una reciente y exhaustiva revisión bibliográfica muestra que, en la última década, el número de publicaciones, registradas por la *ISI Web of Science*, relativas a

bioadsorción ha aumentado de alrededor de 20 en el año 1999 a poco más de 400 en el pasado 2007 (Gadd, 2009).

Aunque el enfoque de los estudios de la bioadsorción de hierro por parte de las EPS sea totalmente distinto al que se la ha venido dando a la bioadsorción en general, más bien dirigida a la descontaminación de efluentes líquidos con metales pesados, los fundamentos de ambos procesos son los mismos. Por este motivo, a continuación, se presenta un análisis somero de sus aspectos más relevantes.

1.3.3.2 Isotermas de adsorción

Con el fin de poder cuantificar el proceso de adsorción, se recurre al cálculo de determinados parámetros, mediante el ajuste de los datos experimentales a una isoterma de adsorción. Esta se puede definir como la relación de equilibrio entre la concentración de adsorbato en la fase fluida y la concentración de adsorbente a una temperatura determinada (Volesky and Holan, 2008). De entre todas las isotermas de adsorción propuestas, las más referenciadas en la bibliografía han sido las de los modelos de Langmuir y Freundlich, ambos con base teórica diferente, tal y como se describe a continuación.

Modelo de Langmuir

Es el único modelo que permite obtener las constantes necesarias, para definir los equilibrios químicos entre el metal y la biomasa. Está basado en los siguientes supuestos:

- Antes de la interacción con el adsorbato, se encuentran disponibles todos los centros activos de la biomasa.
- Todos los centros activos tienen idéntica capacidad de adsorción.
- Cada adsorbato se une exclusivamente a un único centro activo.

El modelo de Langmuir puede ser representado de la forma siguiente:

$$q_e = \frac{q_{\max} C_e}{K + C_e} \quad \text{o bien} \quad q_e = \frac{q_{\max} b C_e}{1 + b C_e} \quad [1.1]$$

INTRODUCCION

En estas expresiones, la descripción de los parámetros se indica a continuación:

- q_e : capacidad de adsorción de la biomasa en el equilibrio (mg metal adsorbido/g peso seco de adsorbente).
- q_{max} : capacidad máxima de adsorción; representa la cantidad de metal adsorbido correspondiente a la saturación de los sitios de captación del adsorbente (mg metal adsorbido/g peso seco de adsorbente).
- C_e : concentración del metal en equilibrio en la disolución (mg/L).
- b : constante de equilibrio de la reacción biomasa-metal (L/mg). Esta constante establece la relación velocidad de adsorción/desorción, es decir, es una medida de la afinidad entre el metal y la biomasa.
- K : constante de Langmuir (mg/L), equivalente al inverso de la constante de equilibrio b . Su valor corresponde a la concentración del metal a la cual el valor de q_e es exactamente la mitad que el de q_{max} .

La ecuación de Langmuir puede ser linealizada de la siguiente forma con el fin de facilitar su representación gráfica:

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{C_e}{q_{max}} + \frac{K}{q_{max}} \quad [1.2]$$

De este modo, representando $\frac{C_e}{q_e}$ frente a C_e se puede obtener, a partir de la pendiente de la recta, el valor de q_{max} y con el valor de la ordenada se obtiene el de la constante K y por lo tanto el de b .

A su vez, la capacidad de adsorción q_e se determina en los experimentos de bioadsorción gracias a la siguiente ecuación:

$$q_e = \frac{C_e (V_{adsorb} + V_{metal})}{C_{adsorb} V_{metal}} \quad [1.3]$$

INTRODUCCION

En esta expresión, los diferentes parámetros representan lo siguiente:

q_e : capacidad de bioadsorción de la biomasa (mg/g-EPS).

C_e : concentración del metal en equilibrio en la disolución (mg/L).

C_{adsorb} : concentración de biomasa adsorbente (mg/L).

V_{metal} : volumen del metal en la disolución (mL).

V_{adsorb} : volumen de adsorbente en la disolución de (mL).

Modelo de Freundlich

Es un modelo matemático empírico el cual supone que no existe saturación del adsorbente, por lo que no hay un valor límite para C_e . También considera que cada centro activo puede tener diferente capacidad de adsorción, así como que el proceso puede tener lugar en varias etapas (Volesky, 2004). La expresión de este modelo es:

$$q_e = K_e C_e^{1/n} \quad [1.4]$$

En este caso, los parámetros de la ecuación representan:

q_e : cantidad de metal adsorbido en las condiciones de equilibrio (mg metal adsorbido/g peso seco adsorbente).

K, n : constantes de Freundlich. Son características del sistema y representan una medida de la capacidad (K) y de la intensidad (n) en la adsorción del metal por parte de la biosustancia.

Para determinar los parámetros de este modelo también se puede recurrir a la linealización de la ecuación [1.4] que toma la forma:

$$\log(q_e) = \log(K) + \frac{1}{n} \log(C_e) \quad [1.5]$$

Análogamente al caso anterior, representando $\log(q_e)$ en función de $\log(C_e)$ se puede obtener una línea recta que permite calcular la constante n a partir de su pendiente y, a la vez, el parámetro K con la ordenada en el origen.

INTRODUCCION

A continuación, en la tabla 1.6 se recopilan las capacidades de adsorción máxima de diversas biomásas (vivas y muertas), para diferentes metales. De la tabla se puede apreciar la amplia dispersión en la adsorción de los metales en función de las diferentes biomásas estudiadas. Por ejemplo, en el caso de algunos cultivos bacterianos vivos, la captación de Cr puede variar desde un valor cercano a 5 mg/g biomasa cuando se usan cultivos de bacterias cromo-reductoras (Quintelas *et al.*, 2008), hasta un valor de 200 mg/g cuando se usan cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* (Pérez *et al.*, 2007); es decir, se constata una diferencia de aproximadamente 40 veces en la captación realizada en condiciones similares. Por su parte, en el caso particular de adsorción de Fe, en la literatura se informan cantidades que van desde 15 mg/g cuando se usa almidón (Bustard and McHale, 1998), hasta 122 mg/g cuando se usa biomasa muerta de la bacteria *Streptomyces rimosus* (Selatnia *et al.*, 2004).

INTRODUCCION

Tabla 1.6 Capacidad de bioadsorción de diferentes metales pesados por distintos tipos de biomasa

Metal	Tipo de biomasa	q _{máx} (mg/g)	Referencia
Fe ³⁺	Cultivos de <i>Bacillus subtilis</i>	107	Brierley (1993)
Fe ³⁺	Biomasa de <i>Streptomyces rimosus</i>	122	Selatnia et al (2004)
Fe, Ag	Biomasa de almidón	15, 59	Bustard y McHale (1998)
Cr ⁶⁺	Cultivos de bacterias cromo-reductoras	4 - 6	Quintelas et al (2008)
Cr ³⁺	Cultivos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	200	R. Pérez et al (2007)
Cr ³⁺	Alginatos	112	Ibáñez et al (2004)
Cd ²⁺	Cultivos de <i>Pseudomonas putida</i>	6	Ueshima et al (2008)
Cu ²⁺	Cultivos de <i>Paenibacillus polymyxa</i>	150	Prado et al (2005)
Cu ²⁺	Cultivos de <i>Cyanospira capsulata</i>	115	De Philippis et al (2007)
U ⁶⁺	Cultivos de <i>Synechococcus elongatus</i>	124	Acharya et al (2009)
U ⁶⁺	Biomasa de <i>Sargassum fluitans</i>	560	Yang y Volesky (1999)
U ⁶⁺	Biomasa de <i>Catenella repens</i>	303	Bhat et al (2008)
Zn	Biomasa de <i>Pseudomonas putida</i>	47	Toner et al (2006)
Zn	Biomasa de <i>Rhizopus arrhizus</i>	56	Fourest y Roux (1992)
Pb ²⁺	Residuos de trigo (hidrolizados)	99	Tan and Xiao (2008)
Pb ²⁺	Residuos de té	73	Ahluwalia y Goyal (2005)
Ni ²⁺ , Co ²⁺	Lodos anaeróbicos	12, 14 ^(a)	van Hullebusch et al (2006)
Zn ²⁺ , Cu ²⁺	Cultivos de <i>Pseudomonas putida</i>	18, 22	Chen et al (2008)
Pb ²⁺ , Cu ²⁺ Ni ²⁺	Biomasa de remolacha	60, 30 12 ^(a)	Gérente et al (200)
Pb ²⁺ , Cu ²⁺ Zn ²⁺	Biomasa de mulch	76, 23 12 ^(a)	Jang et al (2005)
Cu ²⁺ , Cr ³⁺ Ni ²⁺	Cultivos de <i>Cyanothecce sp.</i>	200, 190 60 ^(a)	Micheletti et al (2008)
Cd ²⁺ , Cr ⁶⁺ Fe ³⁺ , Ni ²⁺	Biofilms de <i>Escherichia coli</i>	10, 5 17, 7 ^(a)	Quintelas et al (2009)

^(a) los valores corresponden a cada uno de los elementos indicados, respectivamente

INTRODUCCION

En el caso de que las biomasas empleadas sean sustancias poliméricas extracelulares, la literatura recoge una cierta cantidad de trabajos, de los cuales algunos de ellos se presentan en la tabla 1.7. De dicha tabla se puede observar que existe una amplia dispersión en las cantidades de metales retenidas por este tipo de sustancias, incluso más acentuadas que en el caso anterior. Por ejemplo, la captación de Cd por las EPS de *Paenibacillus jamilae* alcanzó 21 mg/g (Morillo *et al.*, 2008), cifra que aumentó a 2720 mg/g con EPS de bacterias sulfato-reductoras (Zhang *et al.*, 2006); es decir, se constata una diferencia de más de 130 veces en la adsorción del mismo metal por sustancias similares. Estas diferencias se pueden relacionar con las distintas condiciones de trabajo utilizadas en cada caso, como tipo (o tipos) de microorganismo(s) que los genera, condiciones de crecimiento o métodos de extracción de las EPS utilizados, entre otros factores.

INTRODUCCION

Tabla 1.7 Capacidades de bioadsorción de diferentes metales pesados por distintos tipos de EPS

Metal	Tipo de biomasa	q _{máx} (mg/g)	Referencia
Fe ³⁺	EPS de bacteria <i>Bacillus subtilis</i>	200	Beveridge y Murray (1976)
Fe ³⁺	EPS de bacteria <i>Bacillus licheniformis</i>	323	McLean <i>et al</i> (1990)
Cd ²⁺	EPS de bacterias sulfato-reductoras	2720	Zhang <i>et al</i> (2006)
Cu ²⁺	EPS de bacteria <i>Paenibacillus polymyxa</i>	1600	Prado <i>et al</i> (2005)
Cu ²⁺	EPS de bacteria <i>Cyanospira capsulata</i>	20	De Philippis <i>et al</i> (2007)
Cu ²⁺	EPS de bacteria <i>Bacillus sp.</i> F19	90	Zheng <i>et al</i> (2008)
Cu ²⁺	EPS de bacteria <i>Marinobacter sp.</i>	33	Bhaskar y Bhosle (2006)
Mn ²⁺	EPS de cianobacteria <i>Anabaena spiroides</i>	9	Souza <i>et al</i> (2005)
Cr ⁶⁺	EPS de cianobacteria <i>Lyngbya putealis</i>	157	Kiran y Kaushik (2008)
Th ⁴⁺	EPS de bacteria <i>Bradyrhizobium</i>	0.8 ^(b)	Kiran y Kaushik (2008)
Pb ²⁺ , Zn ²⁺	EPS de hongo <i>Pestalotiopsis sp.</i>	120, 60 ^(a)	Moon <i>et al</i> (2006)
Pb ²⁺ , Co ²⁺ Cd ²⁺	EPS de bacteria <i>Paenibacillus jamilae</i>	303, 30 21 ^(a)	Morillo <i>et al</i> (2008)
Cd ²⁺ , Cu ²⁺ Zn ²⁺	EPS de bacteria <i>Paenibacillus polymyxa</i>	2630, 2456 3033 ^(a)	Salles <i>et al</i> (2005)
Pb ²⁺ , Zn ²⁺ Ni ²⁺	EPS de <i>Ensifer melliloti</i>	110, 94 54 ^(a)	Lakzian <i>et al</i> (2008)
Zn ²⁺ , Cr ³⁺ Cd ²⁺ , Co ²⁺	EPS de lodos activados	1480, 830 900, 1100 ^(a)	Liu <i>et al</i> (2001)

^(a) los valores corresponden a cada uno de los elementos indicados, respectivamente; ^(b) mol/mol (Th/EPS)

En cualquier caso, se puede concluir que este tipo de sustancias, independientemente del microorganismo o método de extracción utilizado, son aptas para retener metales en general, y hierro en particular, a partir de disoluciones acuosas que las contengan.

1.3.3.3 Mecanismos implicados en el proceso de bioadsorción

Como se ha mencionado, la bioadsorción puede entenderse como un “secuestro” de iones metálicos por una biomasa metabólicamente inactiva (Volesky and Holan, 2008). Este secuestro o captación puede ocurrir, además de por eventuales reacciones de

INTRODUCCION

óxido-reducción en el bioadsorbente, por una combinación de mecanismos de naturaleza física o química, entre los que se pueden mencionar:

- **Mecanismos químicos:** quimisorción por intercambio iónico, complejación, coordinación química y quelación.
- **Mecanismos físicos:** adsorción física y microprecipitación.

Los mecanismos específicos que actúan en la captura de un determinado metal son difíciles de identificar, debido a la variada cantidad de grupos funcionales que pueden actuar en la captación. Más aún, un mismo grupo puede actuar de forma distinta, por ejemplo, el grupo carboxilo podría retener al catión metálico complejándolo o mediante atracción electrostática, lo que implica que varios mecanismos contribuirían al proceso, a menudo, de forma combinada.

En general, los mecanismos más relevantes en la bioadsorción de metales son el **intercambio iónico**, la **adsorción** y la **microprecipitación** (Volesky, 2003), los cuales están basados en interacciones sorbato/sorbente o soluto/solvente, las que, a su vez, están relacionadas con alguna combinación de diferentes tipos de enlaces, ya sean **covalentes**, **electrostáticos** y de **Van der Waals**, respectivamente. Algunas de sus características son las siguientes:

Intercambio iónico: es una reacción química reversible en la cual un ión proveniente de la disolución se intercambia con otro del mismo signo pero contenido en la biomasa. Es el mecanismo predominante en la captura de cationes bivalentes del tipo Me^{2+} por biomasa de algas (Volesky, 2003).

Adsorción: es un término que implica la adherencia a una superficie sólida a través de fenómenos físicos (adsorción física) o a través de enlaces químicos (quimisorción). La adsorción física no es específica y se basa en fuerzas de atracción que son relativamente débiles. En cuanto a la quimisorción, es claramente específica y se caracteriza porque involucra fuerzas mucho mayores que las que ocurren en procesos de adsorción físicos. Ejemplos de aquella son complejación de metales y quelación.

INTRODUCCION

Microprecipitación: ocurre cuando la solubilidad del metal alcanza su nivel límite en la disolución. Puede ser especialmente relevante en forma puntual debido a cambios locales de concentración o acidez. Al ser localizada, la microprecipitación puede hacer de agente de nucleación preferencial para una precipitación adicional del metal.

Por tanto la capacidad de metal captado depende no sólo de la cantidad de biosorbente sino, también, del tipo y concentración del metal de interés, además de factores físico-químicos del sistema tales como: temperatura de la disolución, pH, fuerza iónica e interferencia con otros iones presentes.

1.4 Justificación del trabajo

1.4.1 Objetivos

La alta dependencia energética de España del exterior la hace sumamente vulnerable a las fluctuaciones del escenario internacional. Además, la mayoritaria proporción en el consumo de combustibles fósiles configura un escenario de alta contribución a la contaminación ambiental y dificulta los programas de reducción de emisiones contaminantes.

En este contexto, la Comunidad Autónoma de Madrid ha auspiciado el desarrollo, por parte de un consorcio de Centros de Investigación y Universidades de la propia Comunidad, del ya comentado nuevo sistema bacteriano de generación de energía. Este consorcio está constituido por seis grupos de trabajo correspondientes a otros tantos centros, incluyendo al Grupo de Biohidrometalurgia de la Universidad Complutense, que es donde se ha realizado el presente Trabajo de Investigación.

Como ya se mencionó anteriormente, el nuevo sistema de generación de energía en desarrollo consiste en una pila de combustible microbiana (PCM) que permite la obtención directa de energía eléctrica a partir de la energía química almacenada en compuestos orgánicos, todo ello asistido por el metabolismo de dos especies bacterianas - *Acidiphilium 3.2up(5)* y *Acidithiobacillus ferrooxidans* - nativas del ecosistema del Río Tinto (Huelva). Aunque estas bacterias han sido previamente estudiadas en cuanto a sus propiedades de adhesión superficial (Fernández *et al.*, 2004), es necesario conocer más detalladamente las variables involucradas en su adhesión a los electrodos de carbono.

De acuerdo con lo anterior, el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral se ha centrado en el estudio de los fenómenos involucrados en la interacción entre la superficie de los electrodos de carbono, las EPS generadas por las células bacterianas

INTRODUCCION

en estudio y el hierro contenido en la disolución. Todo ello puede concretarse en los siguientes objetivos parciales:

- **Caracterización de los cultivos puros de *Acidiphilium 3.2Sup(5)* y *Acidithiobacillus ferrooxidans*, crecidos con y sin soportes de carbono.** El estudio se llevará a cabo mediante el control del crecimiento de dichas bacterias en frascos agitados, a través de la cuantificación de la población, acidez y potencial redox durante su crecimiento.
- **Determinación del mejor método de extracción de sustancias poliméricas extracelulares de cultivos puros de bacterias *Acidiphilium 3.2Sup(5)* y *Acidithiobacillus ferrooxidans*.** Para ello, se aplicarán una serie de métodos de extracción de EPS, recogidos en la literatura como los más habituales para esta clase de cultivos.
- **Caracterización de la interrelación entre sustancias poliméricas extracelulares de A. 3.2Sup(5) y el hierro.** Para ello, se realizarán estudios de interacción entre EPS de esta bacteria y disoluciones de Fe (II) y Fe(III), tanto en presencia como en ausencia de soportes de carbono. La captación de Fe por las EPS se modelará a través del ajuste de los resultados experimentales a modelos matemáticos.
- **Caracterización de las EPS extraídas con y sin Fe.** La caracterización se realizará en primera instancia a través de la determinación de su morfología y tipo de adherencia superficial por medio de técnicas microscópicas y, en segundo lugar, a través de la determinación de su estructura identificando sus grupos funcionales más representativos así como los más directamente implicados en la retención de hierro. Además, en este último caso de EPS cargadas con Fe se determinará, también, su composición elemental, su contenido de especies, cristalinas o amorfas, y el estado de oxidación del Fe.
- **Propuesta de un mecanismo de interacción EPS-Fe.** Finalmente y a partir de los datos recogidos en los anteriores estudios, se intentará desarrollar un modelo que represente lo más fielmente posible el mecanismo a través del cual

interaccionan las EPS de la bacteria *A. 3.2Sup(5)* con el Fe en estados de oxidación (II) y (III) en disoluciones ácidas.

1.4.2 Plan de trabajo

Para poder cubrir los objetivos anteriormente planteados se trabajará de acuerdo con un diseño en la investigación a realizar según la planificación siguiente:

- 1) En primer lugar se procederá a crecer cultivos de las bacterias con las que se realizará la investigación, *A. 3.2Sup(5)* y *A. ferrooxidans*, tanto en ausencia como con presencia de soportes, en condiciones tales que aseguren su crecimiento y homogeneidad durante el trabajo. Estos cultivos se caracterizarán a través de la cuantificación de su población y medición de su acidez y potencial redox.
- 2) A continuación, se procederá a determinar el mejor método de extracción de las EPS de las bacterias en estudio, considerando como óptimo aquel que logre combinar la máxima extracción de las EPS con el mínimo grado de lisis celular. Para ello se aplicarán cinco métodos (EDTA, NaOH, centrifugación, calentamiento y resina de intercambio iónico), caracterizando las EPS obtenidas por cada uno de ellos a través de la determinación cuantitativa de sus contenidos de proteínas y carbohidratos (según los métodos de Lowry y Antrona, respectivamente) y del grado cualitativo de lisis celular (por espectroscopia de ultravioleta visible UV-Vis y población bacteriana). Asimismo se procederá a la caracterización, a nivel molecular, de las EPS utilizando espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) y valoración ácido-base, con el fin de determinar sus grupos funcionales.
- 3) Una vez seleccionado el mejor método de extracción de las EPS, se procederá a la realización de los ensayos de interacción entre estas sustancias y el hierro contenido en disoluciones en estados de oxidación (II), (III) y en mezclas de ambos cationes, determinando, en primer lugar, la cinética de adsorción y el tiempo de saturación de las EPS. Posteriormente, se determinarán las isothermas

de adsorción de Fe por parte de las EPS, según los modelos de Langmuir y Freundlich, a partir de disoluciones con diferentes concentraciones iniciales del metal.

- 4) Asimismo, en este caso también se procederá a la caracterización, a nivel molecular, de las EPS conteniendo Fe a través de espectroscopia de infrarrojo, con el fin de determinar los grupos funcionales de la biomasa que intervienen en la bioadsorción. Además, se analizarán estas sustancias en cuanto a sus aspectos morfológicos por microscopia electrónica de barrido (SEM), composición elemental por microanálisis (EDX), contenido de especies cristalinas o amorfas por difracción de rayos X (DRX) y estado de oxidación de los átomos de Fe en dichas especies por espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS).
- 5) Finalmente, se acometerá el desarrollo de un modelo que intente representar el mecanismo a través del cual las sustancias poliméricas extracelulares adsorben al Fe, en sus estados de oxidación (II) y (III), por medio de un análisis comparativo de sus estructuras sin y con Fe. Todo ello se complementará con la información recogida con el trazado de las curvas de valoración ácido-base y de análisis de la especiación del Fe en disoluciones ácidas. Una vez diseñado un posible mecanismo, se intentará validarlo combinando los datos que aportaron los análisis de la evolución de la acidez de los sistemas de adsorción, los análisis de composición elemental obtenidos por EDX, de las especies registrados por DRX y de la determinación de los estados de oxidación del Fe en las mismas por XPS.

MATERIALES Y METODOS

2.1 Crecimiento de cultivos bacterianos

Los cultivos bacterianos empleados corresponden a aquellos, que hasta el momento, han sido los utilizados en el desarrollo de la pila microbiana en el que se enmarca este trabajo. Específicamente, según ya ha sido descrito en el apartado 1.1.2, se trata de las cepas *Acidiphilium 3.2Sup(5)* y *Acidiphilium Berrocal* del género *Acidiphilium spp.* y otra de la bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans sp.*, todas nativas del ecosistema del Río Tinto (Huelva). Las citadas cepas fueron facilitadas por los Drs. R. Amils y M. Malki del Centro de Biología Molecular (CBM) dependiente de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM) y del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) (Madrid, España).

Por otra parte, como también se ha descrito en el mencionado apartado 1.1.2, una de las características de la bacteria *A. 3.2 Sup(5)* que la hacen de interés, es su capacidad de respirar aeróbicamente con Fe(III) en el ecosistema del que proviene (Malki *et al.*, 2006), actividad que es, a su vez, complementada por el metabolismo de la bacteria *A. ferrooxidans*, la cual tiene la reconocida facultad de oxidar aeróbicamente Fe(II) (Gehrke *et al.*, 1998; Harneit *et al.*, 2006; Mousavi *et al.*, 2007). Por este motivo, también se procedió al crecimiento de cultivos mixtos de ambas bacterias.

2.1.1 Crecimiento de cultivos puros en condiciones planctónicas

En primera instancia, se llevó a cabo el crecimiento de las bacterias en estudio en condiciones planctónicas, es decir, sin la presencia de ningún sustrato sólido en el sistema, de acuerdo con las condiciones de cultivo que se describen en los siguientes apartados.

2.1.1.1 Crecimiento de bacterias *Acidiphillium spp.*

El cultivo de estas bacterias se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 y 500 mL (figura 2.1), agitados a 150 rpm en una incubadora orbital New Brunswick Edison, fijando la temperatura en 30 °C. El medio de cultivo fue el denominado Medio CBM (González-Toril *et al.*, 2006), que tiene la composición dada en la tabla 2.1. El pH del medio se ajustó a 2.5 con H₂SO₄ (Panreac PRS) 50% (v/v), antes de su esterilización a 0.5 atm utilizando un autoclave Selecta Autotester-E, durante 30 min. Posteriormente, también se llevó a cabo el estudio de la posibilidad de crecimiento de estas bacterias considerando el efecto del cambio de acidez del medio y fijando, en este caso, el valor de pH en 3.0.



Figura 2.1 Aspecto que presentaron los cultivos puros de *A. 3.2Sup(5)* en la etapa de máximo crecimiento.

Componente	Concentración (mg/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	2000
KCl	100
MgSO ₄ *7H ₂ O	250
K ₂ HPO ₄	250
Ca(NO ₃)*4H ₂ O	10
Glucosa	1000
Extracto de levadura	100

El crecimiento de las cepas se realizó en condiciones estrictas de esterilidad, lo que permitió que los cultivos se mantuvieran siempre homogéneos en cuanto a sus características fenotípicas. Esto se corroboró a partir del crecimiento de las bacterias en placa Petri de 9 cm y medio sólido, el cual se preparó combinando el medio base CBM y agarosa con una proporción 1:1 (v/v), la siembra se efectuó con una espátula de microbiología. La figura 2.2 muestra dos fotografías de colonias de *A. 3.2Sup(5)* obtenidas tras 72 y 96 h de incubación, respectivamente, a 30°C en una estufa Raypa Trade, en las que se aprecia la homogeneidad de las colonias formadas por la cepa, lo que evidencia que el cultivo mantuvo las necesarias condiciones de pureza durante su utilización a lo largo del trabajo experimental (Johnson *et al.*, 1987; Johnson, 1995).

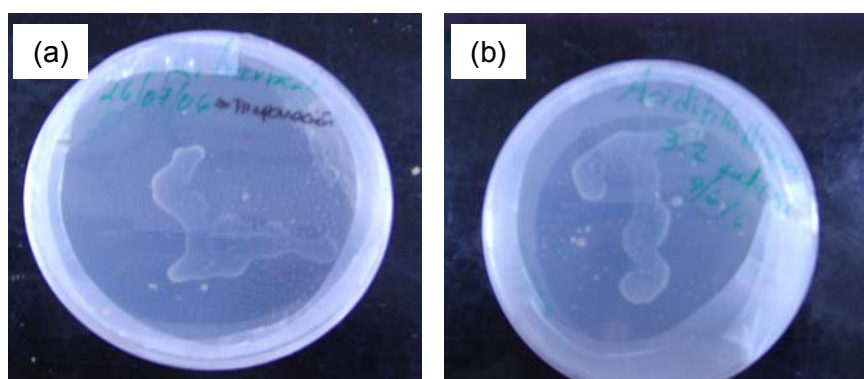


Figura 2.2 Placas Petri conteniendo colonias de *A. 3.2Sup(5)* en diferentes tiempos de crecimiento: (a) 72 h y (b) 96 h.

Una vez crecidos los cultivos, se realizó la extracción de las EPS al término de la etapa de máxima actividad celular que, generalmente, se alcanzaba en el intervalo comprendido entre las 72 y 96 h.

2.1.1.2 Crecimiento de bacterias *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Las células se cultivaron de forma análoga al caso anterior, es decir, en matraces Erlenmeyer de 250 y 500 mL, agitados a 150 rpm y a una temperatura de 30 °C (figura 2.3). El medio utilizado, en este caso, fue el propuesto por Mackintosh (Mackintosh, 1978), debido a que contiene elementos, a nivel de trazas, que han demostrado tener óptimos resultados en el crecimiento en este tipo de microorganismos (González-Toril *et al.*, 2006). La composición del medio se indica en la Tabla 2.2.



Figura 2.3 Aspecto que presentaron los cultivos puros de *A. ferrooxidans* en la etapa de crecimiento máximo.

Tabla 2.2 Composición Medio Mackintosh

Sal Base	
Especie	Concentración (mg/L)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	132
KH_2PO_4	27
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	53
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	250

Fuente de Energía	
Especie	Concentración (g/L)
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	400

Elementos Traza	
Especie	Concentración (mg/L)
$\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	62
ZnCl_2	68
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	64
H_3BO_3	31
Na_2MoO_4	10
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	67

El pH de las disoluciones de sales base y de los elementos traza se ajustó a 1.8, mientras que la disolución de sulfato ferroso se preparó a pH 1.2. Dicho ajuste se

MATERIALES Y METODOS

realizó usando H_2SO_4 50% (v/v). Las tres disoluciones se esterilizaron, por separado, a 120 °C durante 30 min. El medio final se preparó mezclando, bajo condiciones estériles, 950 mL de la sal base, 50 mL de la fuente energética y 1 mL de la disolución de elementos traza.

Es necesario indicar que, hasta el momento, no se ha logrado crecer estas bacterias en medio sólido, a pesar de los intentos realizados. Esta circunstancia ratifica las dificultades de crecimiento de este tipo de bacterias en dicho medio (Johnson *et al.*, 1987; Johnson and McGinness, 1991; Johnson, 1995). Sin embargo, la aplicación de estrictas condiciones de esterilidad en el cultivo permitieron asegurar la permanencia de las condiciones de pureza adecuada de la estirpe con la que se trabajó. Esto ha podido corroborarse mediante un constante seguimiento, por microscopía óptica, del cultivo constatándose que éste mantenía inalteradas sus características fenotípicas. La figura 2.4 muestra micrografías de células de esta bacteria y de *A. 3.2Sup(5)*, en las que se aprecia la morfología tipo bacilo típica de ambas bacterias.

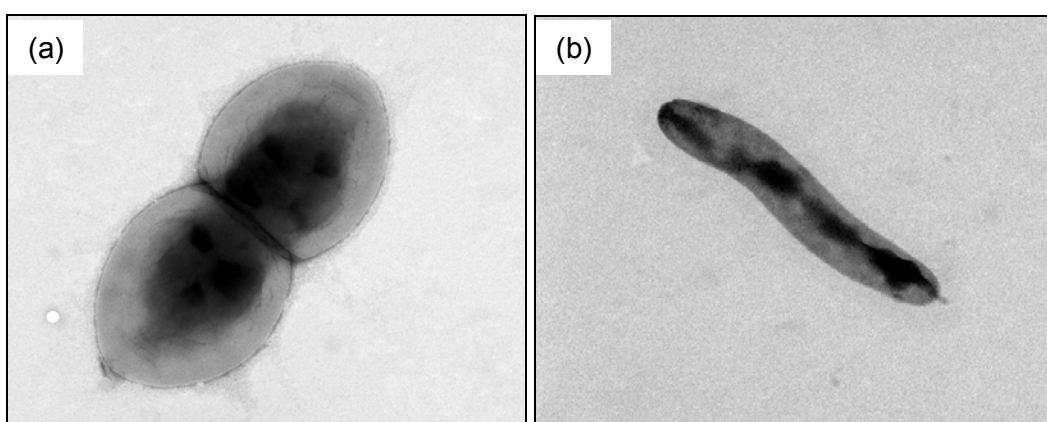


Figura 2.4 Micrografías TEM de células de: (a) *A. 3.2Sup(5)*, X 50.000 y (b) *A. ferrooxidans*, X 40.000.

La extracción de las EPS se realizó al término de la etapa de máxima actividad celular de las bacterias (96 h) que, al igual que en el caso anterior, esta bacteria la alcanzaba entre las 72 y 96 h de crecimiento, aproximadamente.

2.1.2 Crecimiento de cultivos puros sobre soportes sólidos

Debido a la particular característica de las células de *A. 3.2Sup(5)* de transferir electrones directamente a electrodos de carbono (Malki *et al.*, 2008), se crecieron cultivos de estos microorganismos en presencia de soportes sólidos de este material, con el objeto de caracterizar su comportamiento bajo estas condiciones. Los soportes utilizados fueron fieltro de carbono y discos de grafito. Además, también se crecieron cultivos, en condiciones similares, de *A. ferroxidans*, por ser ambas bacterias necesarias para implementar la pila de combustible en desarrollo.

El fieltro utilizado fue suministrado por el Dr. M. Malki del Centro de Biología Molecular (CBM), y fue añadido a los cultivos en forma de discos de 2 cm de radio y 1 cm de espesor (figura 2.5). Este material consistía en una base relativamente maciza de carbono, que según se aprecia en la figura 2.5(a), se encontraba a su vez recubierta de una capa superficial de una densa red de filamentos haciendo que el material se caracterizara por tener una baja densidad y alta porosidad. Además, la micrografía 2.5(b) muestra que los filamentos estaban formados, a su vez, por un conjunto de microcilindros, entre los que se generaba un volumen elevado de huecos. Estas características se traducen en que este soporte ofrecía una gran superficie específica a las células, maximizando, así, las probabilidades de adherencia bacteriana y, por tanto, de efectividad en la transferencia electrónica.

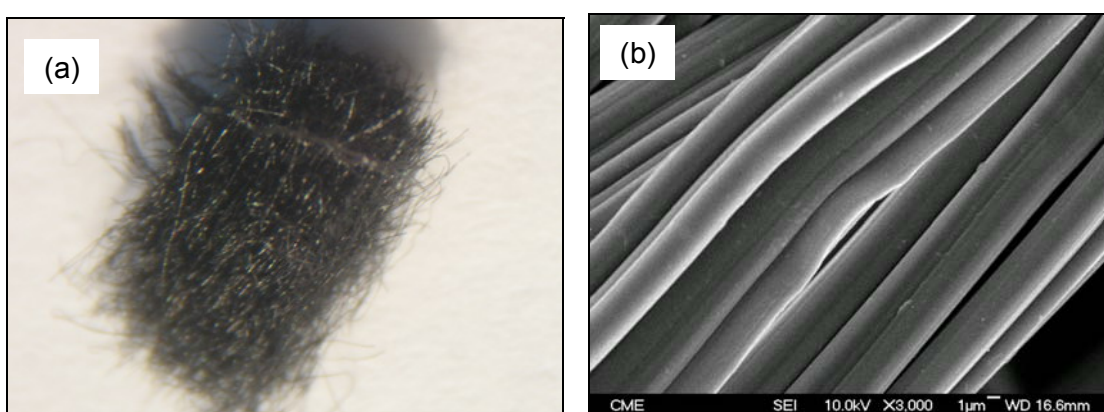


Figura 2.5 (a) Soporte de fieltro de carbono usado (X 1); (b) Micrografía FE-SEM de los filamentos del fieltro (X 3.000).

Por su parte, el grafito fue utilizado en forma de discos de 0.5 cm de diámetro y 1.0 cm de espesor, cortados a partir de cilindros de mayor longitud. Este material presentaba una consistencia rígida y una significativa rugosidad superficial (figura 2.6). Este factor era relevante ya que se ha demostrado que las bacterias acidófilas, como las utilizadas en este estudio, tienden a adherirse de forma preferencial en las imperfecciones de las superficies (Gehrke *et al.*, 1998; Harneit *et al.*, 2006).

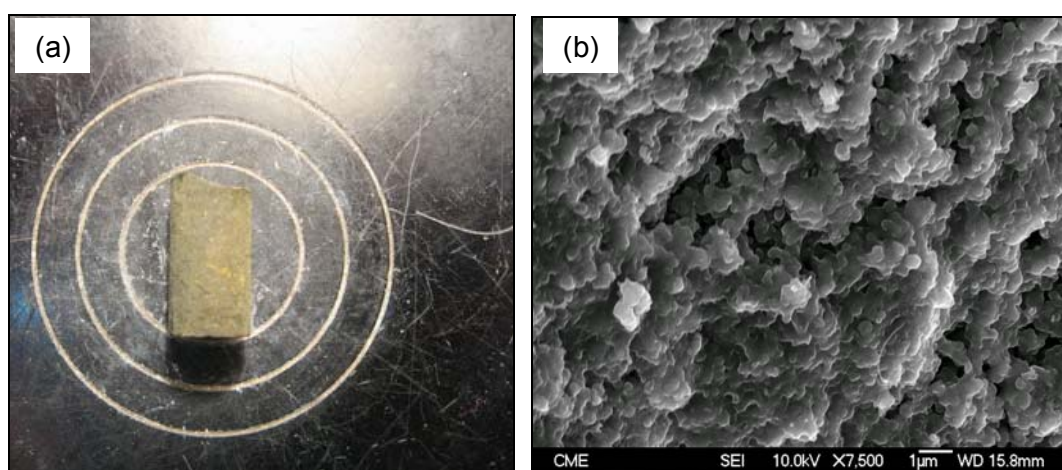


Figura 2.6 (a) Imagen de parte de uno de los cilindros de grafito usados (X 1); (b) Micrografía FE-SEM de la superficie de un disco de grafito (X 7.500).

En los cultivos de ambas bacterias se usaron los mismos medios y condiciones descritos anteriormente, con la única diferencia de que a cada uno de los pases del cultivo se les añadieron dos soportes de cada material (fieltro y grafito). Los objetivos de trabajo fueron, por un lado, evaluar el efecto de la edad del cultivo sobre la composición de las EPS obtenidas en estas condiciones y, por otro, estudiar el tipo de relación que las bacterias eran capaces de establecer con las superficies de ambos tipos de soportes.

Para cubrir el primer objetivo, se realizó una extracción de EPS a partir de dichos cultivos, a diferentes tiempos de crecimiento, 96 y 216 h, que correspondían a los tiempos de término de la fase de crecimiento exponencial y a la mitad de la fase estacionaria de la población de cada cultivo, respectivamente. Por su parte, la visualización del efecto del tiempo en la interrelación bacterias-soportes se realizó a través de un estudio de microscopía de barrido por emisión de campo (FE-SEM) de los soportes. Finalmente, las EPS extraídas a las 96 h se relacionaron con aquellas

extraídas de cultivos crecidos en ausencia de soportes sólidos, lo que permitió evaluar la influencia de estos en la composición bioquímica de las EPS.

La figura 2.7 muestra el aspecto que presentaban los cultivos, con los que se realizó este estudio, en dos fases de crecimiento: aproximadamente al inicio (24 horas de inoculado el cultivo) y al término (a las 96 horas) de la fase de crecimiento exponencial. En la imagen (a) de la citada figura, los frascos de la derecha, que corresponden a cultivos de *A. 3.2Sup(5)*, presentaban una mayor turbidez producto de la mayor cinética de crecimiento de *A. 3.2Sup(5)* con respecto a *A. ferrooxidans*. Por su parte, en la imagen (b) se aprecia el descenso en los contenidos de los frascos debido a los volúmenes de cultivo que tuvieron que ser utilizados en las extracciones de las correspondientes EPS.

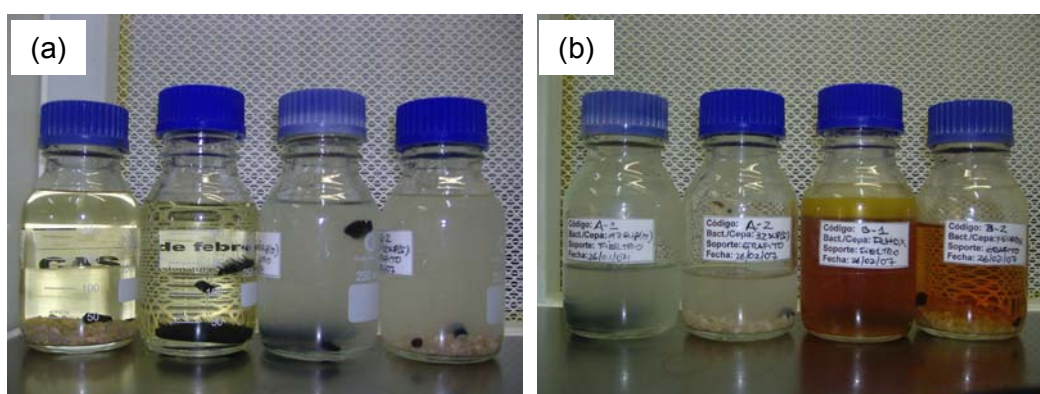


Figura 2.7 Cultivos de *A. 3.2Sup(5)* y *A. ferrooxidans* con soportes de fieltro de carbono y láminas de grafito a distintos tiempos de crecimiento. (a) 24 h; (b) 96 h.

2.1.3 Crecimiento de cultivos mixtos

Los cultivos mixtos se obtuvieron agregando inóculos de *A. 3.2Sup(5)* y *A. ferrooxidans* a matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían un medio de cultivo CBM modificado. Los inóculos se prepararon usando una relación volumétrica 1:1 entre cultivos de ambas bacterias, mientras que las condiciones de agitación y temperatura fueron similares a las utilizadas en el caso del crecimiento de los cultivos puros, es decir, 150 rpm de agitación y 30 °C de temperatura. La figura 2.8 muestra pases de dichos cultivos mixtos en distintas etapas de crecimiento.

El medio CBM modificado se preparó con el medio CBM estándar, usado en el crecimiento de *A. 3.2Sup(5)*, al que se le agregaron cantidades de Fe(II) y/o Fe(III) de tal modo que el contenido de hierro en la disolución ascendía a 4.0 g/L, es decir, la misma concentración de Fe(II) que, habitualmente, contiene el medio Mackinstoh utilizado en el crecimiento de *A. ferrooxidans*. De esta manera, se otorgó a las células de ambas bacterias la concentración de sales, nutrientes y fuentes energéticas que requieren para su crecimiento. A lo largo de la incubación de estos cultivos se medía, periódicamente, su contenido de Fe(II), potencial redox (E_h), acidez (pH), conductividad iónica (I) y población (cél/mL).



Figura 2.8 Aspecto que presentaban los cultivos mixtos de *A. 3.2Sup(5)* y *A. ferrooxidans* en etapas de: (a) crecimiento exponencial y (b) estabilización.

Finalmente y, al igual que en el caso de los cultivos puros, también se crecieron cultivos mixtos en presencia de soportes de carbono, utilizando condiciones similares a las descritas en el apartado 2.1.2.

2.2 Descripción de los métodos utilizados en la extracción de EPS

La selección del procedimiento más adecuado para la extracción de las EPS se realizó a partir de la evaluación de cinco métodos, seleccionados a partir de la revisión bibliográfica desarrollada en el apartado 1.3.2, por ser los mejor fundamentados más frecuentemente utilizados en la extracción de EPS a partir de cultivos de este tipo. Específicamente, fueron dos métodos químicos (EDTA y NaOH), dos físicos (centrifugación y calentamiento) y uno físico-químico (resina de intercambio iónico).

Estos métodos fueron aplicados a la extracción de las EPS de cultivos de la cepa *A. 3.2Sup(5)*, por ser la bacteria de fundamental interés en este trabajo, crecidos tanto en presencia como en ausencia de soportes de carbono. Dichos métodos se aplicaron, también, a cultivos de la bacteria *A. Berrocal*, para efectos de comprobación de los resultados obtenidos con la primera bacteria. A continuación, se concretan las condiciones de trabajo utilizadas con cada uno de ellos.

2.2.1 Extracción por centrifugación

Esta técnica se utilizó como medio de control, es decir, con el fin de disponer de una referencia del contenido de carbohidratos y proteínas de cada cultivo. En este caso, el procedimiento específico seguido fue el siguiente: una vez transcurrido el tiempo definido para la extracción, muestras de 40 mL de cada cultivo puro en estudio, se centrifugaron directamente (sin pre-concentración ni lavado) a 14.000 rpm (20.817 g), durante 20 min y a 4°C en una centrifuga Eppendorf modelo 5804 R V.6 (Liu and Fang, 2002). A continuación, las células del cultivo centrifugado se separaron del sobrenadante por filtración mediante un filtro Millipore de 0,22 µm. El filtrado obtenido constituyó la disolución de EPS crudo, la cual fue, posteriormente, dializada (con el propósito de eliminar los metabolitos y las sales de bajo peso molecular) usando una membrana de diálisis Pierce Slide-A-Lyzer de 3500 MWCO en un volumen de 1 L de agua destilada, durante 24 horas y a 4°C (Comte *et al.*, 2006). La disolución de EPS

resultante fue finalmente almacenada a 4°C hasta que fuera usada para realizar los análisis químicos de los componentes.

2.2.2 Extracción con EDTA

Un volumen de 40 mL de cada cultivo fue mezclado (sin agitación) con una disolución de la sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético dihidratada, EDTA (Panreac, PA), al 2% en peso, considerando una relación de 3.2 g de EDTA por cada gramo de peso seco (PS) de células (Sheng *et al.*, 2005). El tiempo de reacción del EDTA con la disolución fue de 3 horas a 4°C, al cabo de las cuales la disolución resultante se centrifugó y filtró en las mismas condiciones indicadas en el apartado anterior.

2.2.3 Extracción con NaOH

Este método fue muy similar al anterior ya que en la práctica consistió en dejar interaccionar al cultivo bacteriano con el reactivo químico, en condiciones estáticas, durante 3 horas y a 4 °C (Sheng *et al.*, 2005). Más concretamente, se mezclaron 40 mL del cultivo con 8 mL de una disolución de NaOH 1 N (Panreac, PRS). Transcurrido el tiempo indicado, la disolución final fue centrifugada y filtrada, siguiendo también el procedimiento comentado anteriormente.

2.2.4 Extracción con resina de intercambio iónico

Se usó una resina Dowex Marathon C (Sigma-Aldrich), en forma sódica y granulometría de 20-50 mallas. La dosis de resina utilizada fue de 70 g por cada gramo de peso seco de células y un volumen de 40 mL de cada cultivo (Frölund *et al.*, 1996). La suspensión de la resina en el citado volumen se agitó durante 2 horas, a 600 rpm y a 4°C, para, a continuación, centrifugar y filtrar según la misma metodología que en casos anteriores.

2.2.5 Extracción por calentamiento

También, un volumen de 40 mL de cada cultivo fue calentado en un autoclave Selecta, modelo Autotester-E, a 70°C y 1 bar de presión, durante 1 hora (Schmidt and Ahring, 1994). Trascurrido el tiempo de calentamiento, el cultivo también fue centrifugado y filtrado.

Las técnicas anteriormente descritas se resumen en el esquema de la figura 2.9.

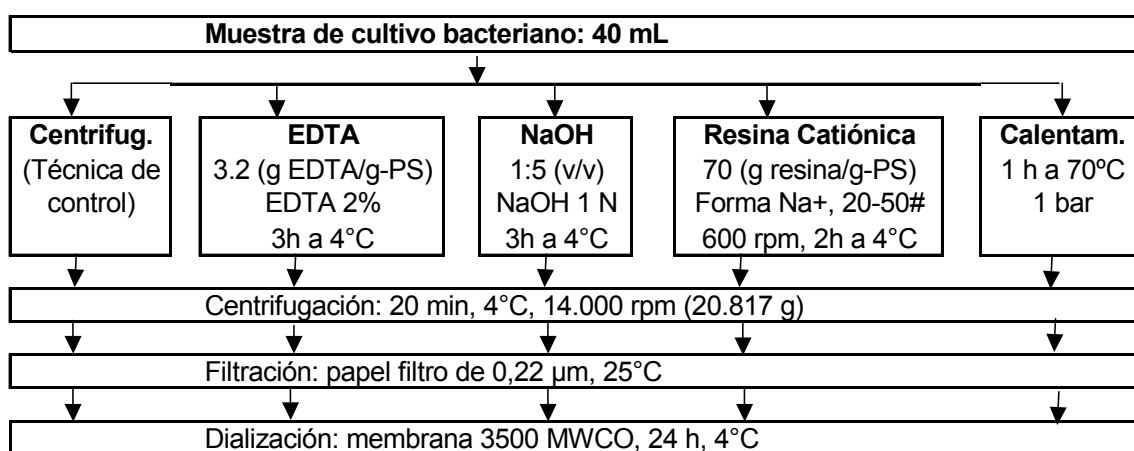


Figura 2.9 Esquema general de los métodos usados en la extracción de EPS.

2.3 Caracterización bioquímica de las EPS

2.3.1 Análisis de proteínas

El contenido de proteínas fue determinado usando el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). En él se utiliza albúmina de suero de bovino (BSA) como estándar (Sigma-Aldrich TP0300). El procedimiento consistió en agregar 1.0 mL de la muestra en análisis a 1.0 mL de reactivo de Lowry, manteniendo la mezcla estática durante 20 min, y agregar, a continuación, 0.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu. Al cabo de 30 min se midió la absorbancia de la mezcla a 750 nm en un espectrofotómetro de UV-Vis Biochrom, modelo Libra S11.

2.3.2 Análisis de carbohidratos

Se determinaron mediante el método de Antrona en la versión propuesta por Trevelyan (Trevelyan *et al.*, 1952), usando glucosa como estándar. Este método consistió en disolver 0.2 g de antrona en 100 mL de una disolución al 79% en H₂SO₄ (Panreac, PRS). Posteriormente, se preparó una disolución final mezclando 600 µL de cada muestra a analizar y 3.0 mL de reactivo de antrona, la mezcla se calentó a 90°C durante 10 minutos. Al cabo de este tiempo, se dejó enfriar la disolución, a temperatura ambiente, para medir la absorbancia de ésta a 660 nm en un espectrofotómetro de UV-Vis Biochrom, modelo Libra S11.

2.4 Ensayos de interacción de las EPS con hierro

Para los ensayos de interacción entre las EPS y el hierro, se utilizaron, específicamente, sustancias poliméricas extracelulares extraídas de cultivos puros de *A. 3.2Sup(5)* crecidos en el medio CBM estándar, es decir, en ausencia de Fe. Se estudiaron estas EPS debido a que de las bacterias que se utilizarían en la pila de combustible, *A. 3.2Sup(5)* y *A. ferrooxidans*, ambas con una actividad metabólica sustancialmente diferente, la primera conformaría la gran mayoría (superior al 90%) de la población bacteriana del sistema. Por lo tanto, las EPS que se liberarían al medio serían generadas esencialmente por la bacteria *A. 3.2Sup(5)*, lo que significa que, en la práctica, serían su EPS las que estarían interactuando con el Fe contenido en la disolución. Además, como el medio de cultivo de esta bacteria carece de hierro, estas sustancias no contienen este elemento, por lo que podrán reflejar más fielmente el tipo de interacción que sustancias de este tipo pueden establecer con dicho metal.

La caracterización de la capacidad de captación de Fe por parte de las mencionadas EPS, se realizó a través de la determinación de las correspondientes isothermas de adsorción. Para ello se realizaron diferentes ensayos de interacción entre estas exosustancias y disoluciones de hierro en sus estados de oxidación (II) y (III). La extracción de las EPS se realizó utilizando el método de EDTA 2(%), y el de centrifugación como método de control, por proporcionar éste unas EPS que servían como referencia.

El procedimiento consistió en combinar alícuotas de EPS con distintos volúmenes de disoluciones de Fe en las que el metal estaba en su totalidad o en forma de Fe(II), o de Fe(III), o con ambos estados de oxidación, de manera que se analizaron tres posibilidades distintas: EPS con Fe(II), EPS con Fe(III) y EPS con una mezcla de Fe(II) y Fe(III). El volumen de la disolución de hierro añadido se calculó en función del volumen de EPS disponible y de la concentración inicial del metal en el respectivo ensayo. El esquema general de trabajo se muestra en la figura 2.10.

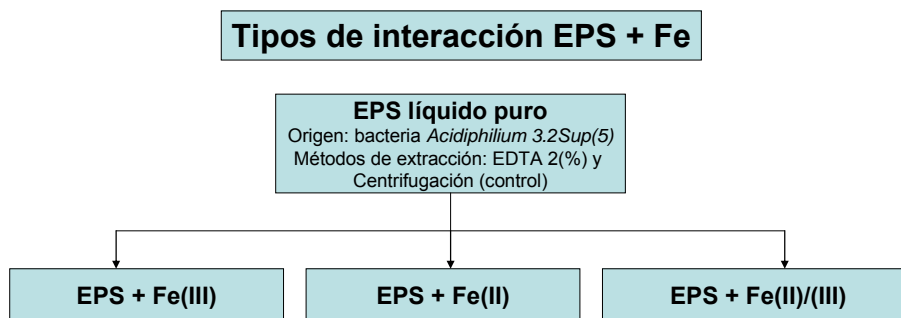


Figura 2.10 Esquema de trabajo de los ensayos de interacción EPS y disoluciones de Fe.

No obstante, los procedimientos específicos en cada caso fueron distintos. Con el objetivo de evitar la oxidación química del Fe(II), en los ensayos de interacción entre los exopolímeros y las disoluciones en las que había hierro ferroso, éstos se realizaron anaeróbicamente. Por su parte, los experimentos realizados entre EPS y disoluciones de Fe(III) se realizaron aeróbicamente. Con el objeto de explicar, más detalladamente, estas diferencias, a continuación se describe el procedimiento específico seguido para cada tipo de interacción de las disoluciones de hierro con las EPS.

2.4.1 Interacción de las EPS con Fe (III)

En primer lugar se determinó la cinética de captación de Fe(III) por parte de las EPS de *Acidiphilium 3.2Sup(5)* extraídas por el método de EDTA 2%. Estos experimentos sirvieron para determinar el tiempo de saturación en Fe(III) de estas sustancias, el cual se correspondía con el tiempo de equilibrio, por lo que dicho intervalo de tiempo fue el utilizado, posteriormente, en la determinación de las isothermas de captación tanto del propio Fe(III), como de Fe(II) y de la mezcla Fe(II)/Fe(III).

En cuanto a las condiciones experimentales utilizadas en los ensayos, siempre en ausencia de agitación, los períodos de tiempo considerados fueron: 30, 60 y 180 min, mientras que fueron diferentes las concentraciones iniciales del hierro en las disoluciones empleadas, según el tipo de experimentación realizada. Las alícuotas de EPS utilizadas variaron entre 5 y 20 mL, mientras que la cantidad de disolución de Fe(III) añadida estuvo en función de la respectiva concentración inicial, utilizando para ello una disolución madre de sulfato férrico hidratado, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (99.9%,

Panreac), preparada con una concentración de 4.0 g/L y ajustada a pH = 2.0 con H₂SO₄ al 50% (v/v).

En cada ensayo, una vez transcurrido el tiempo de interacción correspondiente, la disolución resultante fue dializada con el propósito de purificar la mezcla de EPS con el Fe(III) captado. Para ello, se utilizó una membrana de diálisis (Slide-a-Lyzer, Pierce) de 3500 MWCO y un volumen de H₂O destilada 50 veces mayor que el volumen total resultante de la mezcla de las exosustancias y la disolución de Fe. La diálisis se realizó agitando a 180 rpm, a una temperatura de 4 °C durante 24 h, período de tiempo tras el cual se disponía de la mezcla de [EPS + Fe(III)] ya purificada. La figura 2.11 muestra un esquema ilustrativo del protocolo utilizado en este tipo de experimentos.

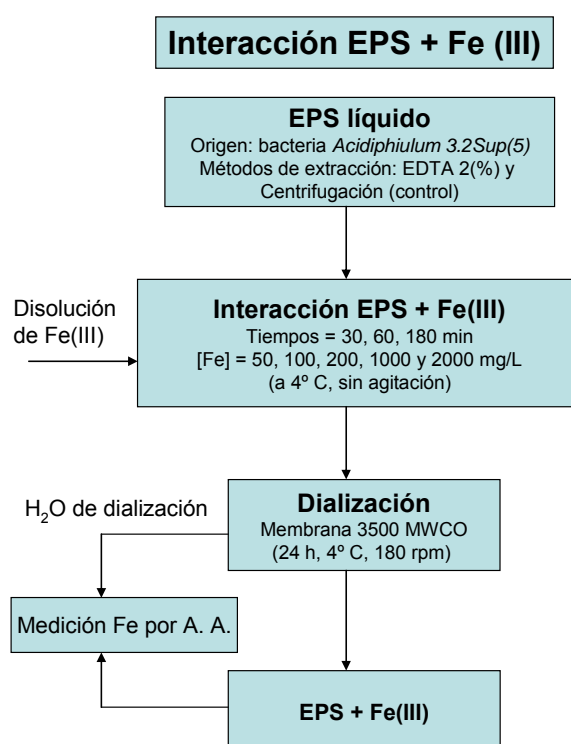


Figura 2.11 Esquema ilustrativo del protocolo de interacción EPS + Fe(III).

El control de los experimentos, que permitía cuantificar la captación de Fe por parte de las EPS, se realizó efectuando un balance del metal; para ello, se analizó, por un lado, el hierro contenido en el agua acidulada procedente de la diálisis y, por otro, se determinó el Fe retenido por los exopolisacáridos. La suma de ambas cantidades se

relacionó con el Fe total añadido al sistema. En todos los casos, los balances del metal se cerraron con un grado de fiabilidad dado por una desviación estándar de $\pm 5.3\%$. Los análisis se efectuaron por duplicado mediante la técnica de espectroscopia de absorción atómica utilizando un equipo Perkin-Elmer, modelo 1100B.

Adicionalmente, en este caso, también, se efectuaron ensayos que permitieran evaluar el impacto en el sistema de la presencia de un soporte sólido, bien fieltro de carbono o bien rodillos de grafito, agregándolo a las mezclas de sustancias poliméricas extracelulares y disoluciones de hierro. En ambos casos, el soporte respectivo se añadió al fondo del recipiente, al que posteriormente, se agregaron los volúmenes correspondientes de las EPS y disolución de Fe. El fieltro fue utilizado en forma de discos de 2 cm de radio y 1 cm de espesor, mientras que el grafito fue añadido en forma de rodillos de 0,5 cm de radio y 1 cm de espesor. Posteriormente, se procedió de igual manera a la indicada anteriormente.

2.4.2 Interacción de las EPS con Fe(II) y con mezclas de Fe(II) y Fe(III)

Del mismo modo que en el caso anterior, se realizaron ensayos de interacción de las EPS con Fe(II) y con mezclas de Fe(II) y Fe(III). Ambos tipos de experimentos fueron realizados de forma similar a los descritos anteriormente, con la diferencia de que éstos se llevaron a cabo bajo estrictas condiciones de anaerobiosis, para evitar la posibilidad de oxidación ambiental del ión ferroso.

En forma análoga al caso anterior, el Fe(II) se añadió a partir de una solución madre de sulfato ferroso hidratado, $\text{Fe}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (99.9%, Panreac), preparada bajo atmósfera anaeróbica, a una concentración de 4.0 g/L y ajustada a $\text{pH} = 2.0$. Estas condiciones se lograron burbujeando la disolución con una mezcla de N_2/CO_2 (80/20%, suministrada por Air Liquide), con el fin de eliminar el oxígeno disuelto que, inicialmente, pudiera contener. El agua destilada utilizada fue también previamente desoxigenada por la misma mezcla de gases, al igual que la disolución de H_2SO_4 utilizada en el ajuste de la acidez.

MATERIALES Y METODOS

De igual modo, las condiciones de anaerobiosis, durante la interacción entre los exopolímeros y los cationes de hierro, se consiguieron haciendo pasar, durante todo el tiempo de experimentación, la citada corriente gaseosa. Los ensayos de interacción se mantuvieron durante 1 h para asegurar la saturación de las EPS con Fe, dicho período de tiempo fue determinado anteriormente con el protocolo descrito para el Fe(III). A continuación, la mezcla de las EPS con Fe fue introducida en un casete de diálisis (Slide-a-Lyzer, Pierce) de 3500 MWCO. La dialización se realizó en condiciones similares a las anteriores (24 h a 180 rpm y 4°C), usando H₂O destilada en la misma proporción que en el estudio anterior (50:1 con respecto al volumen total). La figura 2.12 muestra imágenes del tipo de jarra empleada para mantener el ambiente anaeróbico y de un casete de dialización.

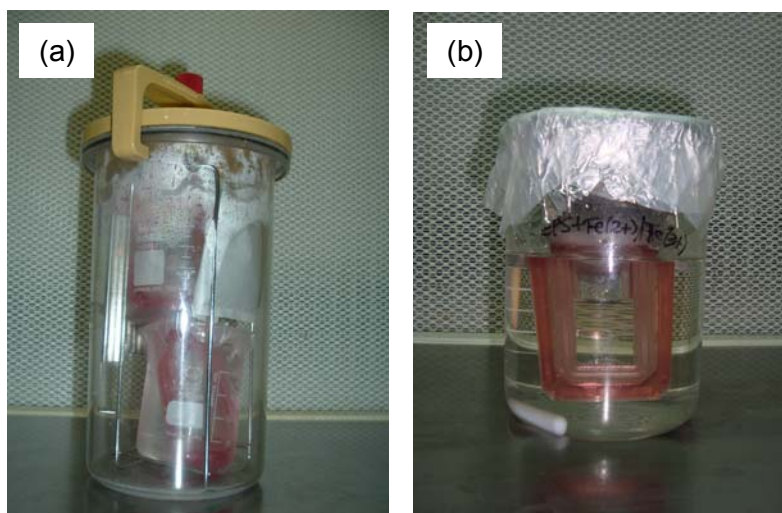


Figura 2.12 (a) Modelo de jarra empleada para el trabajo y (b) casete conteniendo EPS + Fe en condiciones anaerobias.

Por su parte, las condiciones anóxicas durante la dialización se mantuvieron agregando un generador de atmósfera anaeróbica (GENbox, Biomérieux) al recipiente sellado que contenía las casetes en dialización. Los balances de hierro, para el seguimiento de los experimentos, se determinaron de forma análoga a la descrita anteriormente. La figura 2.13 muestra un esquema del procedimiento experimental llevado a cabo.

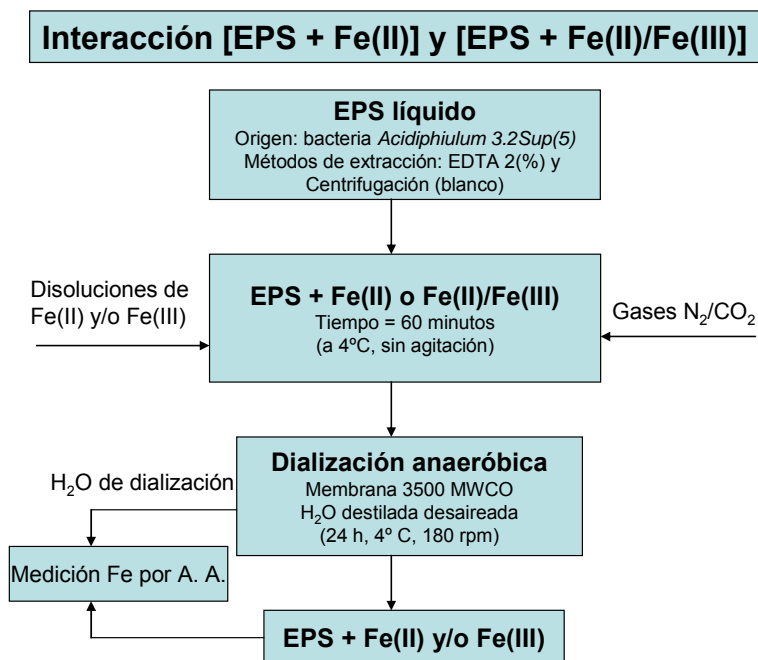


Figura 2.13 Esquema ilustrativo del protocolo de interacción EPS + Fe(II) y EPS + Fe(II)/Fe(III).

2.5 Técnicas analíticas

2.5.1 Determinación de Fe(II) y Fe total

El contenido de Fe^{2+} retenido en las EPS tras los ensayos de interacción de éstos con las disoluciones de Fe(II) y mezclas de Fe(II)/Fe(III), se determinó mediante el método de la ferrozina (Lovley and Phillips, 1986). La disolución de ferrozina se preparó a una concentración de 1.0 g/L en un buffer de HEPES (*N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid*) a 50 mM, ajustada a pH 7.0 con NaOH 3.0 M. El procedimiento en la medición fue el siguiente: 100 μL de muestra fueron diluidos en 5 mL de HCl 0.5 N, formando, así, una disolución muy ácida para inhibir la posible oxidación química del catión ferroso, a la que se le agregó, después, 3.0 mL de la disolución de ferrozina, midiendo entonces la absorbancia de esta disolución final a 562 nm en un espectrómetro UV-Visible Biochrom, modelo Libra S11.

Por su parte, el Fe total se determinó mediante espectrofotometría utilizando un equipo Perkin-Elmer, modelo AAnalyst 400.

2.5.2 Valoración ácido-base

Este estudio tuvo como objetivo determinar la constante de acidez (K_a) de las EPS la cual, a su vez, condiciona su comportamiento en función del valor del pH del sistema. El conocimiento del valor de esta constante permite determinar que grupos funcionales, con comportamiento ácido-base, están presentes en la biomasa, los cuales pueden ser potenciales centros activos de bioadsorción.

Las EPS analizadas fueron las extraídas por los métodos de EDTA y centrifugación, por ser las que, también, fueron las utilizadas en los ensayos de bioadsorción. Para esto, 5 mL de disolución de cada EPS, previamente purificada por dialización, fueron dispuestos en un frasco abierto y en agitación en placa magnética. El pH de las

disoluciones de EPS fue el natural, es decir, el que tenían las propias exosustancias después de la extracción, el cual se encontraba en un rango de 2.4 a 2.6, lo que aseguraba que sus grupos funcionales se encontraban totalmente protonados. A partir de este valor inicial de pH, se procedió a valorar mediante adición de sucesivas alícuotas de 100 μ L de una disolución de NaOH 0.1 M, midiendo el valor de pH resultante tras cada adición.

2.5.3 Espectroscopia de ultravioleta visible (UV-Vis)

Con el objetivo de determinar, cualitativamente, el grado de impacto sobre las células de las técnicas de extracción usadas, se procedió a la determinación de los correspondientes espectros UV-Visible de diversas muestras de los cultivos bacterianos utilizados, antes y después de ser sometidos a la extracción de las sustancias poliméricas extracelulares. Además, para complementar esta información, también se obtuvieron los espectros UV-Visible de las disoluciones de EPS obtenidas tras dicha extracción.

El procedimiento, seguido para todos los métodos de extracción, fue el siguiente: se tomó una muestra de 5 mL del cultivo **antes** de la extracción, dicha muestra fue vertida sobre la cubeta de un espectrómetro UV-Visible Biochrom, modelo Libra S11 y, a continuación, se realizó la medición del espectro de absorción en toda la banda de longitud de onda del equipo (de 325 a 825 nm). Posteriormente, con estos datos, se construyeron las curvas de absorbancia en función de la longitud de onda.

Del mismo modo se procedió para el cultivo **después** de la extracción. Es decir, se tomó igualmente una muestra de 5 mL del cultivo tratado a la cual, a continuación, se le determinó el espectro UV de forma análoga. El registro, así determinado, pudo compararse con el obtenido anteriormente. Una tercera medición, tomada en similares condiciones a las anteriores, se realizó con una muestra de la disolución de EPS producto de la extracción.

2.5.4 Espectroscopia de infrarrojo mediante transformada de Fourier (FTIR)

Esta técnica se utilizó con el fin de profundizar en el estudio del mecanismo de unión del Fe a las EPS, debido a que esta técnica es capaz de identificar los grupos funcionales responsables de dicha unión. Con este objetivo, se analizaron EPS de A. 3.2Sup(5) extraídas por EDTA y centrifugación, tanto cargadas con el metal (obtenidas con los ensayos de bioadsorción de Fe en las condiciones antes descritas), como puras, es decir, exentas de Fe.

La caracterización de las EPS mediante esta técnica se realizó a través de la liofilización de volúmenes de entre 28 y 42 mL de ambos tipos de EPS (cargados y puros), durante 48 horas y a $-58\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 80 mTorr, en un liofilizador Virtis SciLab, condiciones con las que se generaron EPS sólidas en cantidades que variaron entre 14.7 y 21.2 mg. Posteriormente, se determinó el espectro IR en cada caso a partir de una mezcla preparada con 1 mg de EPS y 170 mg de KBr (Panreac, PRS), utilizando un espectrómetro Nicolet Magna 750, que permitió obtener los correspondientes espectros de transmitancia en función de longitudes de onda comprendidas entre 400 y 4000 cm^{-1} , con una resolución de 4 cm^{-1} . La corrección de la línea base así como la identificación de las bandas fueron realizadas mediante la aplicación informática OMNIC E.S.P. de Nicolet.

2.5.5 Espectroscopia por difracción de rayos X (DRX)

Esta técnica se utilizó con dos objetivos: complementar los análisis por EDX realizados a los EPS sólidos, con el fin de determinar la posible presencia de especies cristalinas en estas sustancias y, además, estudiar el mecanismo de la precipitación del Fe sobre los soportes de carbono.

Para ello, las EPS a analizar fueron molidas y homogeneizadas previamente en un mortero de ágata, mientras que los soportes fueron analizados directamente. Se utilizó, en ambos casos, un difractómetro Philips X'pert-MPD con ánodo de Cu. Las

mediciones se realizaron a una longitud de onda Cu-K α = 1,5406 Å y con un barrido de 1 h entre 5° y 85°. La identificación de las fases cristalinas presentes en las muestras se realizó por comparación, utilizando la base de datos del *International Centre for Diffraction Data* (ICDD, Newtown Square, Pennsylvania).

2.5.6 Espectroscopia por fotoemisión de electrones (XPS)

Esta técnica se aplicó con el fin de conocer la especiación y los estados de oxidación del hierro en las EPS. Para ello la muestra de EPS sólida fue diseminada sobre soportes de tántalo y analizada directamente por un espectrofotómetro de emisión de electrones Specs Labs dotado de un analizador Phoibos 150. Las mediciones se realizaron manteniendo un vacío en el equipo de, al menos, 1.0×10^{-9} mbar. El instrumento fue calibrado con respecto al pico de Au4f_{7/2} a una energía de 84.0 eV. Todos los espectros fueron obtenidos con una resolución de 0.5 eV. Las energías de los espectros fueron obtenidas usando como referencia el espectro del C1s a 285.0 eV. Finalmente, los registros obtenidos fueron modelados mediante un ajuste de tipo Gaussiano-Lorentziano, usando una línea base tipo Shirley.

2.5.7 Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

El objetivo de utilizar esta técnica fue el de intentar constatar la posible generación de sustancias poliméricas por parte de las células de *A. 3.2Sup(5)* y *A. ferrooxidans* y, además, profundizar en el conocimiento de la morfología y aspecto que pudieran presentar estas sustancias al ser exudadas por las células.

Las muestras de células a analizar se tomaron, en condiciones de esterilidad, directamente de los cultivos y no fueron sometidas a ningún proceso de deshidratación o de otro tipo que las pudiera alterar. Para ello, alícuotas de 2.5 mL de cultivo fueron diluidas en agua destilada acidulada a un volumen final de 25 mL, con el fin de disminuir la concentración celular y facilitar la observación microscópica. Una vez

obtenida esta disolución, se realizó el teñido de las células usando acetato de uranil al 2%, durante 30 min, para poder ser observadas con un microscopio JEOL JSM 6430T.

2.5.8 Microscopia electrónica de barrido (SEM) y microanálisis por dispersión de energías rayos X (EDS)

En el curso del trabajo experimental realizado, esta técnica se utilizó con dos objetivos: caracterizar la interacción entre los cationes de hierro y la superficie de los soportes de carbono y, además, identificar los cambios morfológicos sufridos por las EPS al captar los cationes de hierro. En ambos casos, el estudio se acompañó de microanálisis (EDX) lo que permitió obtener una información semicuantitativa de los elementos presentes en las muestras.

Los análisis se realizaron siguiendo la siguiente secuencia: cada una de las muestras de los soportes (o de las EPS según el caso) seleccionadas, se recubrieron por vaporización con una capa conductora de oro y fueron posteriormente analizadas utilizando un microscopio SEM (JEOL JSM-6330 F) a un voltaje de aceleración de 20 kV, que, a su vez, tenía acoplado un sistema de microanálisis químico por dispersión de energías de rayos X (EDS). Se utilizó un recubrimiento de oro y no de grafito para no perturbar el análisis elemental de la muestra orgánica.

2.5.9 Microscopia electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM)

Con el fin de estudiar el rol que jugaban las EPS de *A. 3.2Sup(5)* y *A. ferrooxidans* en el fenómeno de adhesión celular a los soportes, se analizaron, mediante esta técnica, soportes de carbono que habían sido puestos en contacto con ambas bacterias. Esto se realizó añadiendo soportes (de fieltro y grafito) en cultivos agitados de ambas bacterias, que fueron, sucesivamente, retirados en períodos de tiempo diferentes, con

el objetivo de evaluar la magnitud y morfología de cada uno de los sistemas soporte-células-EPS en función del tiempo.

La preparación de las muestras fue la siguiente: con cada cultivo y una vez transcurrido el tiempo seleccionado, el soporte a analizar fue retirado bajo condiciones de esterilidad, para, seguidamente, ser sometido a un tratamiento de deshidratación progresiva con acetona (Panreac PRS), sumergiéndolo, en primer lugar, en una disolución en agua al 30% (v/v) y, después, en otra al 50% (v/v) durante 15 min cada vez, y, a continuación, dejándolo inmerso toda la noche en una disolución al 70% (v/v). Transcurrido este período, el soporte se sumergió nuevamente, 15 min más, en otras disoluciones de acetona, esta vez, al 90% y 100% (v/v), respectivamente, tras lo cual las muestras se secaron mediante la técnica de punto crítico en un equipo Balzers CPD 030 con CO₂ como líquido de transición. Posteriormente, las muestras se recubrieron, por vaporización, con una capa conductora de grafito, para ser analizadas en un microscopio JEOL JSM-6330 F a un voltaje de aceleración de 20 kV.

RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Cinética y propiedades de los cultivos bacterianos

En primer lugar, se acometió la tarea de cultivar las cepas bacterianas con las que se realizarían los diferentes ensayos del estudio, bajo condiciones de crecimiento en laboratorio. Las bacterias cultivadas fueron, como se ha mencionado en el apartado 2.1, las cepas 3.2Sup(5) y Berrocal de la bacteria *Acidiphilium* y la bacteria *A. ferrooxidans*, que se crecieron en cultivos puros de cada una de ellas, tanto en condiciones planctónicas como en presencia de soportes de carbono. Los cultivos así generados fueron los utilizados posteriormente en la evaluación de los diferentes métodos de extracción de las EPS y en la obtención de las EPS necesarias para los ensayos de adsorción.

3.1.1 Crecimiento de bacterias sin soporte

Las bacterias en estudio mostraron, para cultivos crecidos en condiciones similares, una cinética de crecimiento exponencial hasta los tres o cuatro primeros días, aproximadamente, a partir de los cuales se alcanzó el período de estabilización. Sin embargo, en cuanto a la población de los cultivos, las dos cepas de la bacteria heterótrofa *Acidiphilium spp.* exhibieron una mayor tasa de crecimiento alcanzando, en el mismo período de tiempo, una cantidad de células 10 a 20 veces mayor que la de la bacteria autótrofa *A. ferrooxidans*. Como ilustración de estos hechos, la figura 3.1 muestra la cinética de crecimiento de cuatro cultivos de las bacterias señaladas, incubados en las mismas condiciones de temperatura (30°C), agitación (150 rpm) e inóculo (5% v/v).

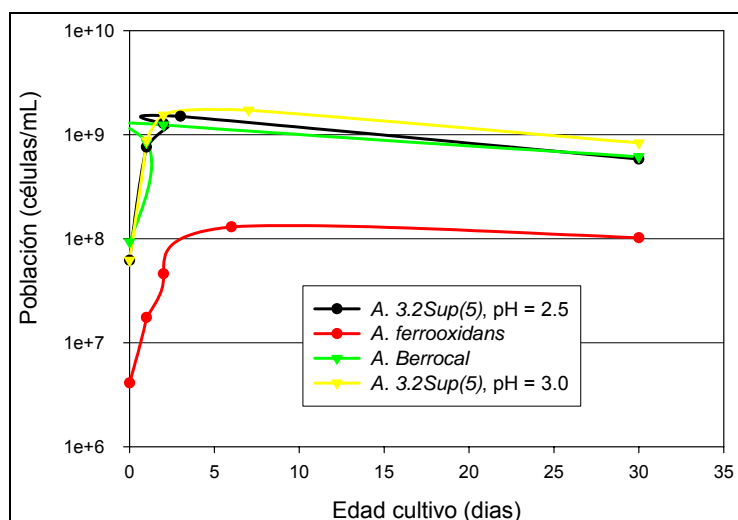


Figura 3.1 Cinética de crecimiento bacteriano sin soporte sólido.

Más concretamente, con la figura 3.1 se aprecia que, bajo condiciones de cultivo equivalentes, la bacteria *A. 3.2Sup(5)* alcanzó, entre los 5 y 10 días, poblaciones máximas variando entre 1.28 y 1.50×10^9 cél/mL, mientras que la cepa *Berrocal* registró poblaciones de $1.08 - 1.24 \times 10^9$ cél/mL. Por su parte, los cultivos de *A. ferrooxidans* lograron poblaciones máximas de células de $1.03 - 1.31 \times 10^8$ cél/mL en el mismo intervalo de tiempo. Estas cinéticas de crecimiento resultan ser concordantes con las reportadas en la literatura para ambos tipos de bacterias acidófilas en fase planctónica (Gehrke *et al.*, 1998; Cabrera *et al.*, 2005; Daoud and Karamanev, 2006; Mousavi *et al.*, 2007).

Por otro lado, como el tamaño de las células de las bacterias en estudio es similar, las bacterias *Acidiphilium spp.* lógicamente generaron, para un tiempo determinado y condiciones de cultivo equivalentes, 10 a 20 veces más biomasa que los cultivos de *A. ferrooxidans*. Esto se puede comprobar en la figura 3.2 que muestra que en los períodos de máximo crecimiento de la población del cultivo, esto es, entre los 3 y 10 primeros días de incubación, la cantidad de biomasa obtenida de las bacterias *Acidiphilium spp.* – crecidas tanto a pH 2.5 como a 3.0 – fluctuó entre 0.25 y 0.35 g/L, mientras que en el caso de *A. ferrooxidans* no se llegaron a superar los 0.02 y 0.03 g/L, resultados que también están en concordancia con las características de comportamiento atribuidas a este tipo de bacterias (Bergey *et al.*, 1994).

RESULTADOS Y DISCUSION

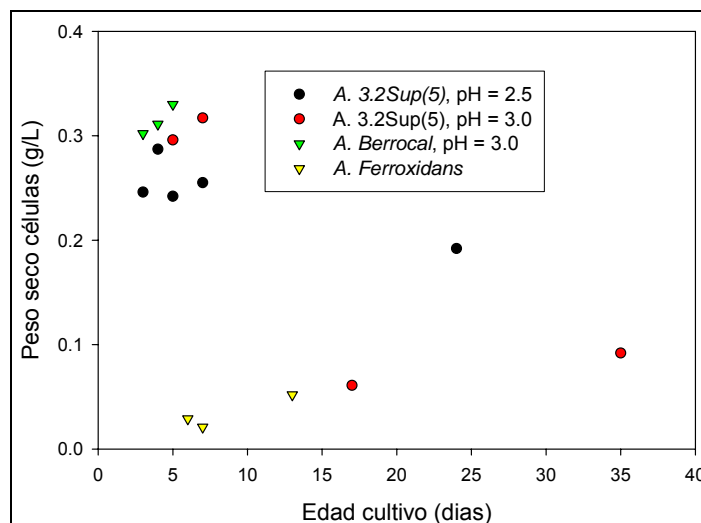


Figura 3.2 Generación de biomasa por bacterias *Acidiphilium spp.* y *A. ferrooxidans*.

La más baja generación de biomasa que presentaron los cultivos puros de *A. ferrooxidans* dificultó la obtención de la suficiente cantidad de las EPS necesarias para realizar la determinación de sus componentes y estructura, lo que se subsanó con el crecimiento en mayores volúmenes de esta bacteria con relación a los requeridos para *Acidiphilium spp.*

Además del estudio relativo a la población bacteriana, también se analizó, para estos cultivos, la evolución del nivel de acidez y del potencial de reducción (figura 3.3).

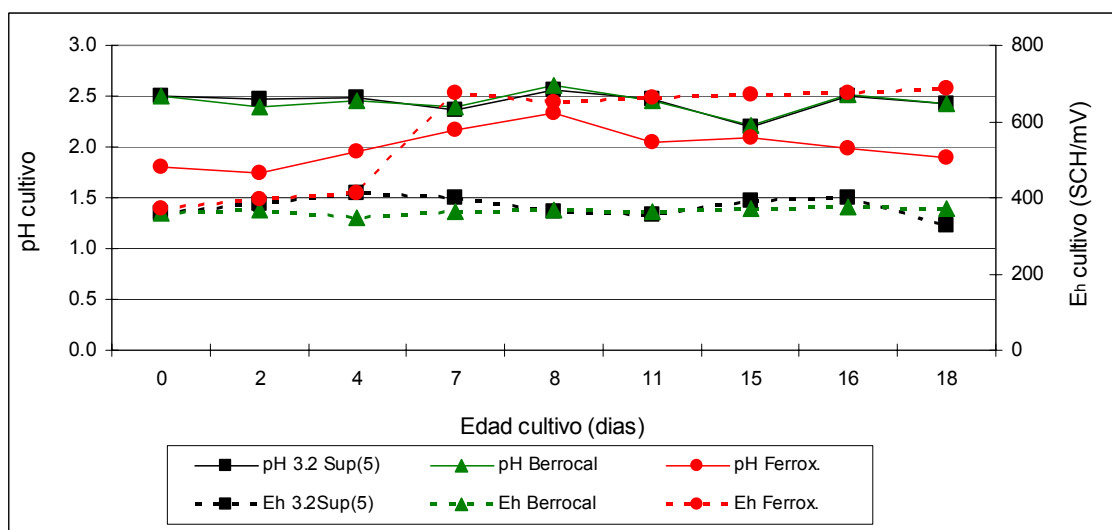


Figura 3.3 Evolución del nivel de acidez (pH) y del potencial redox (E_h) en cultivos sin soporte sólido.

Con dicha figura se observa que la acidez de las cepas *Acidiphilium*, 3.2Sup(5) y *Berrocal*, se mantuvo aproximadamente constante en el valor del medio de partida (pH 2.5), denotando que en el proceso de oxidación de la glucosa no se verifican procesos de hidrólisis, o de otro tipo, que afecten a la presencia de protones en el medio. En el caso de *A. ferrooxidans* se apreció un aumento del pH durante los primeros días del cultivo hasta llegar a valores cercanos a 2.2 – 2.3, para, posteriormente, descender y situarse en valores próximos a los del medio de partida (pH 1.8). Este comportamiento se puede atribuir, en lo referente al aumento inicial de la acidez, al consumo de protones asociado a la captación por el oxígeno de los electrones generados en la oxidación del Fe(II), mientras que el posterior descenso se puede atribuir a los procesos de hidrólisis del Fe(III) con la formación en la disolución de especies del tipo $\text{Fe}(\text{OH})_x^{(3-x)+}$ o bien como hidroxisulfatos del citado catión. Estos resultados son similares, por ejemplo, a los publicados por Mousavi que mostró el mismo comportamiento de la acidez en la biooxidación de Fe^{2+} por una cepa de la bacteria *A. ferrooxidans* nativa de Kerman, Irán (Mousavi *et al.*, 2007).

En cuanto a la evolución del potencial, el crecimiento de las cepas de *Acidiphilium spp.* no registró variaciones a lo largo del tiempo, lo que indicó la ausencia de procesos de oxido-reducción en el medio. Esto contrasta con el fuerte aumento del potencial que presentó el cultivo de *A. ferrooxidans*, el cual se elevó de los aproximadamente 376 – 370 mV iniciales hasta situarse en valores de entre 660 – 670 mV a las 144 horas, resultados que son prácticamente coincidentes a los encontrados por Meruane y Vargas (Meruane and Vargas, 2003), Daoud y Karamanev (Daoud and Karamanev, 2006) y Mousavi (Mousavi *et al.*, 2007) en estudios similares de biooxidación de Fe^{2+} por *A. ferrooxidans*., en los que, además, muestran que a estos valores de potencial redox, a partir de 48 h de edad del cultivo, la conversión del Fe(II) inicial fue prácticamente total a Fe(III).

3.1.2 Crecimiento de bacterias con soporte

Como se describió previamente, los soportes utilizados fueron un fieltro de carbono de alta porosidad y grafito sólido en placas. Las curvas cinéticas que cuantifican el crecimiento de la población bacteriana sobre dichos soportes, se muestran en la figura

RESULTADOS Y DISCUSION

3.4, a partir de la cual se constata que la dinámica de crecimiento de las células no registró una variación significativa, exhibiendo casi el mismo comportamiento que en el caso de los cultivos crecidos sin soporte sólido.

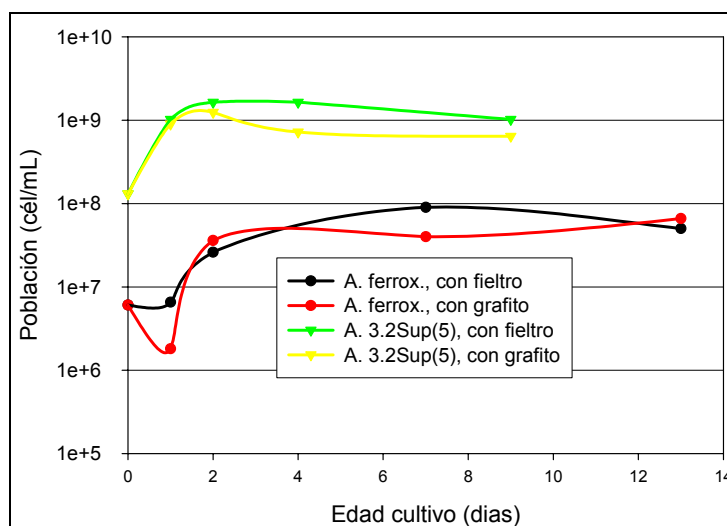


Figura 3.4 Cinética de crecimiento bacteriano con soportes de fieltro de carbono y grafito.

Lo anterior significa que la presencia de los soportes no condicionó en forma cuantitativamente apreciable la evolución de la población celular planctónica, lo que puede atribuirse a que la cantidad de células que se adhieren a los soportes no es una cantidad importante en relación al total de la población celular. Al respecto, se puede mencionar que Upadhyayula en un trabajo en el que estudió la adhesión de células de *Bacillus subtilis* a soportes sólidos, encontró densidades superficiales de 10^9 y 10^{10} células/m², para cerámicos y carbón activado, respectivamente (Upadhyayula *et al.*, 2009). Como las dimensiones de, por ejemplo, los discos de grafito son de 1 cm de diámetro y 2 cm de largo, aún considerando la máxima densidad de adhesión superficial por parte de las células de *A. ferrooxidans* (que es a su vez la bacteria que menor cantidad produce), la cantidad adherida supondría menos del 0.05 % del total de las células contenidas en el cultivo, variación realmente indetectable en la práctica.

En el seguimiento del nivel de acidez y del potencial redox, también se obtuvieron comportamientos similares; es decir, estas magnitudes no modificaron sustantivamente sus valores con respecto a los presentados en cultivos crecidos sin soporte, como se puede apreciar en la figura 3.5.

RESULTADOS Y DISCUSION

En efecto, la bacteria *A. 3.2Sup(5)* - crecida con los dos soportes - tuvo un comportamiento similar al reflejado en la figura 3.3, es decir, su acidez se mantuvo en torno a 2.5 y su potencial redox en valores entre 350 y 400 mV. En cuanto al comportamiento de los cultivos de *A. ferroxidans*, su nivel de acidez fue muy similar al observado cuando fue crecido sin soporte, esto es, presentó el mismo aumento inicial y posterior descenso del valor de pH, mientras que el potencial redox alcanzó los mismos valores de entre 650 y 700 mV al cabo de, aproximadamente, 7 días.

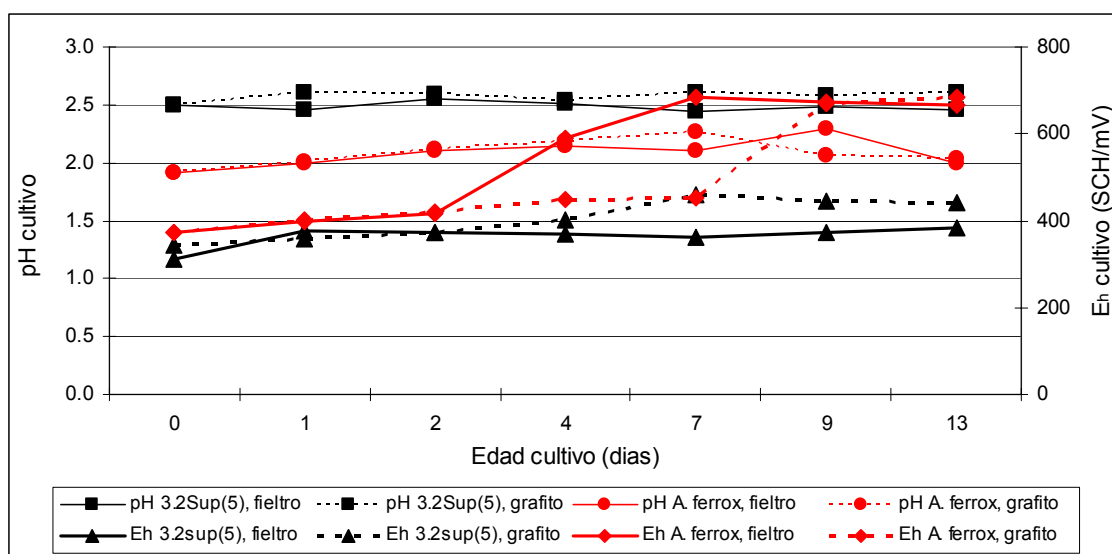


Figura 3.5 Evolución del nivel de acidez (pH) y del potencial redox (E_h) en cultivos con soporte sólido.

3.2 Extracción y análisis de las EPS de bacterias acidófilas

La necesidad de obtener sustancias poliméricas extracelulares, para la realización de los estudios de interacción entre estas sustancias y disoluciones de cationes de Fe(II) y Fe(III), planteaba la necesidad básica de solventar, adecuadamente, la obtención de este tipo de sustancias. Este aspecto era clave ya que se ha encontrado que la metodología de extracción influye decisivamente tanto en la cantidad como en la calidad de las sustancias extraídas. Para discernir este aspecto, a continuación se muestran los resultados encontrados en la evaluación de cinco métodos de extracción: dos que usan reactivos químicos (EDTA y NaOH), otros dos que usan principios físicos (calentamiento y centrifugación) y un método físico-químico combinado (resina de intercambio iónico con agitación). La extracción se aplicó a cultivos puros de dos cepas de la bacteria *Acidiphilium* (3.2Sup(5) y *Berrocal*) y a otra de la bacteria *A. ferrooxidans*, crecidas en ausencia y presencia de soportes sólidos de carbono. Una vez extraídas, las EPS fueron caracterizadas por sus contenidos de carbohidratos y proteínas. El grado de lisis celular provocado por cada método fue evaluado por medidas de espectroscopia UV-Vis y por la relación entre contenidos de proteínas y carbohidratos. El impacto de la metodología de extracción en la estructura de las sustancias se determinó por espectroscopia de infrarrojo FT-IR. La morfología de las EPS exudadas por las células se analizó a través de microscopia de transmisión TEM. La visualización de las EPS y sus redes de interrelación con las bacterias y soportes de carbono, se realizó por microscopia de barrido FE-SEM.

3.2.1 Composición bioquímica de las EPS extraídas

3.2.1.1 EPS extraídas de cultivos planctónicos

A continuación, se muestran los resultados de las extracciones de exopolímeros realizadas en todos los casos, en la etapa de máximo crecimiento de los cultivos, concretamente a las 96 horas de incubación de los mismos. En primer lugar, la tabla

RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 muestra los resultados obtenidos con cultivos de *A. 3.2Sup(5)* crecidos a pH 2.5 y 3.0.

Tabla 3.1 Composición de EPS

Cultivos de *Acidiphilium 3.2Sup(5)* crecidos sin soporte sólido

Método de extracción	pH	en mg g ⁻¹ PS de células			
		Proteínas	Carbohidratos	Total	Prot/Carboh
Centrifugación	2.5	224.0	609.0	833.0	0.37
	3.0	284.7	634.8	919.5	0.45
EDTA	2.5	194.3	541.6	735.9	0.36
	3.0	330.0	155.2	485.2	2.13
NaOH	2.5	191.6	430.2	621.8	0.45
	3.0	291.2	230.2	521.4	1.26
Resina	2.5	n. d.	n. d.		
	3.0	97.1	378.4	475.5	0.26
Calentamiento	2.5	226.5	586.3	812.8	0.39
	3.0	n. d.	n. d.		

PS = peso seco; n. d. = no determinado

En primer lugar, se puede apreciar que las cantidades de EPS obtenidas varían significativamente para ambos valores de pH de crecimiento y en función de la técnica de extracción aplicada. Por ejemplo, para el caso de un cultivo crecido a pH 3.0, la cantidad de EPS obtenida varió entre un mínimo de 475,5 mg/g-PS al utilizar una resina de intercambio iónico, hasta un máximo de 919,5 mg/g-PS cuando se aplicó sólo una separación mecánica por centrifugación. Esto podría sugerir que la última técnica es más adecuada, ya que parece extraer una mayor cantidad de EPS, pero la alta proporción de proteínas encontrada - un 45% - podría indicar un significativo grado de lisis celular al aplicarse la centrifugación, es decir, que alguna fracción de las proteínas determinadas no perteneciera realmente a las EPS sino que fueran producto de la ruptura de células activas.

Otro aspecto importante a destacar es que las cantidades relativas de proteínas y carbohidratos obtenidos en cada extracción fueron muy distintas y, además, dependieron claramente del tipo de técnica de extracción utilizada. En efecto, nuevamente, para el caso de cultivos crecidos a pH 3.0, la cantidad de proteínas varió de un mínimo de 97,1 mg/g-PS, obtenido cuando se aplicó una resina de intercambio

RESULTADOS Y DISCUSION

iónico, a un máximo de 330,0 mg/g-PS, medido cuando el método utilizado fue la extracción con EDTA. Es decir, se obtuvieron 3,4 veces más proteínas al aplicar la extracción con EDTA que al usar una resina. Sin embargo, este comportamiento no se repitió para el caso de los carbohidratos, ya que las cantidades determinadas resultaron ser 378,4 y 155,2 mg/g-PS, respectivamente, es decir, la extracción de carbohidratos con EDTA alcanzó sólo el 41% de la obtenida con una resina de intercambio iónico.

Este comportamiento dispar se refleja en la relación de proteínas a carbohidratos que presentaron ambas EPS, que ascendió a 2,13 para el caso de la extracción con EDTA y a 0,26 para la extracción con resina; es decir, en el primer caso hay proporcionalmente 8,2 veces más proteínas que en el segundo. Este ejemplo pone de manifiesto el impacto que la técnica de extracción tiene sobre la composición de las EPS obtenidas.

Estos resultados están en la misma línea que otros publicados en la literatura para cultivos puros. Sheng y colaboradores, por ejemplo, aplicaron técnicas de extracción con EDTA y NaOH, en dosis similares a las de este trabajo, a cultivos puros de la bacteria *Rhodopseudomonas acidófila* (Sheng *et al.*, 2005). Sus resultados mostraron que la extracción de las EPS dependió claramente del método, ya que obtuvieron cantidades tan distintas como 12,9 mg/g-PS con una extracción por centrifugación, 70,3 mg/g-PS en el caso del EDTA y 159,2 mg/g-PS con el uso de NaOH. Además, encontraron que cada una de estas EPS tenían composiciones muy diferentes, lo que se reflejaba en las relaciones de proteínas a carbohidratos que resultaron ser de 1.5, 9.0 y 16.4, respectivamente.

En general, de estos resultados se puede deducir que los métodos que más EPS extrajeron, a partir de cultivos de *A. 3.2Sup(5)*, fueron centrifugación, calentamiento y extracción con EDTA, en ese orden. Sin embargo, como las EPS tuvieron relaciones de proteínas/carbohidratos levemente superiores para los dos primeros métodos, la extracción con EDTA podría ser la más recomendada, ya que combinaría una alta extracción con una baja tasa de lisis celular. Se debe recurrir, no obstante, a un análisis adicional para discernir sobre el grado de lisis celular sufrido durante la

RESULTADOS Y DISCUSION

extracción y, así, poder hacer una recomendación más rigurosa en cuanto al mejor método de extracción. Este análisis se presentará en el apartado 3.1.3.

Partiendo de otra de las células en estudio, *Acidiphilium Berrocal*, a continuación, se muestran los resultados (tabla 3.2).

Tabla 3.2 Composición de EPS

Cultivos de *Acidiphilium Berrocal* crecidos sin soporte sólido (pH = 2,5)

Método de extracción	en mg g ⁻¹ PS de células			
	Proteínas	Carbohidratos	Total	Prot/Carboh
Centrifugación	189.1	68.8	257.9	2.75
EDTA	130.4	117.2	247.6	1.11
NaOH	117.4	30.4	147.8	3.86
Resina	32.6	11.9	11.9	2.74
Calentamiento	167.4	54.9	222.3	3.05

PS = peso seco

En este caso, destaca el hecho de que las cantidades de EPS extraídas fueron, en promedio, significativamente más bajas que las registradas para el caso de la cepa 3.2Sup(5). El descenso fue del 69, 66, 76 y 73 % para la centrifugación, la extracción con EDTA, con NaOH y el calentamiento, respectivamente. Es decir, estas bacterias aportaron, aproximadamente, sólo una tercera parte de las EPS que aportó la cepa 3.2Sup(5). En cuanto a la composición, se aprecian variaciones más acentuadas que en el caso anterior en cuanto a las cantidades relativas de proteínas y carbohidratos contenidos, ya que la relación entre ambos fluctuó entre 1,11, para la extracción con EDTA, y 3,86, para la extracción con NaOH. En este caso, el empleo de EDTA también sería el más recomendable ya que combina la casi mayor extracción (muy cercana a la primera), con la significativamente menor cantidad relativa de proteínas.

3.2.1.2 EPS extraídas de cultivos crecidos con soportes

Para evaluar el efecto de la presencia de un soporte sólido en la generación, composición e influencia en la adhesión bacteriana de las EPS, se realizaron extracciones usando EDTA y una resina de intercambio iónico a un cultivo de *A. 3.2Sup(5)* crecido en presencia de soportes de carbono (fieltro y grafito). Estas

RESULTADOS Y DISCUSION

técnicas se seleccionaron debido a que fueron las que mejores resultados exhibieron en la extracción a partir de cultivos sin soporte. Las extracciones se realizaron a las 96 y 216 horas de comenzada la incubación del cultivo y los resultados se presentan en las tablas 3.3 y 3.4, respectivamente.

Tabla 3.3 Composición de EPS (cultivos crecidos durante 96 h con soportes)

Método de extracción	Soporte	en mg g ⁻¹ PS de células			
		Proteínas	Carbohidratos	Total	Prot/Carboh
EDTA	A	130.9	254.9	385.8	0.51
	B	106.7	254.9	361.6	0.42
Resina	A	120.0	246.0	366.0	0.49
	B	280.0	496.7	776.7	0.56

A: fieltro de carbono; B: grafito

De la tabla 3.3 se puede concluir que a una edad del cultivo de 96 horas, y usando como soporte tanto fieltro como grafito, ambas técnicas no tuvieron un impacto significativo en la composición de las exosustancias, dado que la relación proteínas/carbohidratos osciló entre 0,4 y 0,6. De igual forma, puede comprobarse que ambas técnicas extrajeran cantidades similares de EPS, registrándose, para los dos soportes, cantidades en torno a los 370 mg/ g-PS, excepto para la extracción con resina usando grafito como soporte, caso en el que se determinó un contenido total de EPS de 776,5 mg/g-PS.

Tabla 3.4 Composición de EPS (cultivos crecidos durante 216 h con soportes)

Método de extracción	Soporte	en mg g ⁻¹ PS de células			
		Proteínas	Carbohidratos	Total	Prot/Carboh
EDTA	A	174.5	119.4	293.9	1.46
	B	120.0	104.6	224.6	1.15
Resina	A	87.3	60.6	147.9	1.44
	B	186.7	150.3	337.0	1.24

A: fieltro de carbono; B: grafito

RESULTADOS Y DISCUSION

Cuando la edad del cultivo fue de 216 horas, los resultados sufrieron importantes variaciones en relación con los obtenidos con menor tiempo de incubación. La primera fue que las cantidades de EPS extraídas disminuyeron en todos los ensayos realizados, y en función de la técnica de extracción utilizada. Para el caso del EDTA, la cantidad de EPS obtenida disminuyó un 23,8% usando fieltro y un 37,9% usando grafito. Con el empleo de la resina, las cantidades extraídas descendieron de forma más acentuada, concretándose dicho descenso entre el 56,6%, con el empleo de grafito, y el 59,6%, con el de fieltro. La segunda variación registrada fue que la composición de las EPS cambió de manera significativa, pasando de valores promedios de en torno a 0,5, para la relación de proteínas a carbohidratos y 96 horas de cultivo, a valores de entre 1,1 y 1,5 con 216 horas.

Debe destacarse que estos resultados, en los que se obtienen cantidades y composiciones distintas de EPS en función de la técnica de extracción aplicada, no sólo es típica en cultivos puros, sino que también se ha reportado con frecuencia para cultivos de las más distintas características. La tabla 3.5 muestra los resultados de una serie de trabajos, con diferentes medios, en la que se aprecia la dispersión de los resultados encontrados.

Por ejemplo, la citada tabla contiene resultados tan dispares como los obtenidos por Brown y Lester, quienes encontraron extracciones de EPS con lodos activados que variaron en un mínimo de 6 mg/g-PS, obtenido por centrifugación, hasta una cantidad máxima de 611 mg/g-PS, extraída por NaOH; es decir, hubo una variación de casi dos órdenes de magnitud en la cantidad de las EPS extraídas con el mismo medio, pero con distinto método (Brown and Lester, 1980).

Además, en la misma tabla se puede observar que en otro estudio con el mismo tipo de cultivo (lodos activados), Comte y colaboradores, obtuvieron una extracción de 640 mg/g-PS de EPS usando también un método de centrifugación (Comte *et al.*, 2006). Es decir, lograron una cantidad muy similar a la reportada por Brown y Lester, pero con una composición muy distinta ya que obtuvieron una relación proteínas/carbohidratos de 1,9 frente a la de 6,1 indicada en el primer trabajo. Todas estas consideraciones ponen de manifiesto la importancia de la selección de la técnica de extracción más adecuada.

RESULTADOS Y DISCUSION

Tabla 3.5 Algunos resultados de extracción de EPS recogidos en la literatura

Medio estudiado	Técnicas de extracción	EPS total (mg/g-VSS)	Prot/Carboh	Referencia
Cultivo puro de <i>Rhodopseudomonas acidófila</i> ^(a)	Centrifugación	12.9	1.5	Sheng et al (2006)
	EDTA	70.3	9.0	
	NaOH	159.2	16.4	
Ca	lentamiento	71.6	3.7	
Cultivo puro de <i>Klebsiella aerogenes</i> ^(a)	Centrifugación	179	1.9	Brown and Lester (1980)
	EDTA	n.d.	n.d.	
	NaOH	332	13.0	
	Calentamiento	233	1.0	
Lodos activados EDT	Centrifugación	640	1.9	Comte et al (2006)
	A	n.d.	n.d.	
	NaOH (con formaldehído)	337	2.0	
	Resina	611	2.3	
Lodos activados aeróbicos	Centrifugación	25.7	1.0	Liu and Fang (2002)
	EDTA	146.8	1.8	
	NaOH (con formaldehído)	164.9	1.3	
	Resina	57.8	1.4	
Lodos activados aeróbicos	NaOH	131	4.4	Frolund et al (1996)
	Calentamiento	121	15.1	
	Resina	423	5.1	
Lodos activados EDT	Centrifugación	6	6.1	Brown and Lester (1980)
	A	140	7.7	
	NaOH	611	7.9	
	Calentamiento	96	4.9	

^(a) Resultados en mg g⁻¹ de peso seco de células; n.d. = no determinado

3.2.2 Análisis de lisis celular

Otro aspecto ya mencionado e importante a determinar es la cuantificación del impacto de la técnica de extracción en el grado de lisis celular; es decir, cómo afecta la técnica aplicada a la estabilidad de la célula. Esto es importante ya que lo que se quiere analizar es la composición y estructura de las sustancias extracelulares, por lo que se debe impedir la contaminación de éstas con sustancias intracelulares producto de su ruptura, lo que distorsionaría los resultados y conclusiones sobre las EPS obtenidas (Wingender *et al.*, 1999; Liu and Fang, 2003; Gadd, 2009).

Para cumplir con lo anterior, se recurrió a la obtención de los espectros UV-Visible de los cultivos, antes y después de la extracción de las EPS. Esta determinación se basa

RESULTADOS Y DISCUSION

en el hecho de que si una significativa fracción de las células fueran destruidas (lisadas) durante la extracción de las EPS, la menor densidad poblacional se traduciría en una apreciable disminución de los espectros de absorción de luz ultravioleta (Jiang *et al.*, 2004). Esta metodología de análisis, en virtud de sus características no destructivas, simplicidad y rapidez, se ha establecido como una herramienta efectiva para discernir sobre el grado de lisis que provoca la aplicación de un determinado método de extracción de EPS, tal y como lo demuestran los trabajos de este tipo publicados por Sheng con cultivos puros de la bacteria *Rhodopseudomonas acidophila* (Sheng *et al.*, 2005), de Jahn y Nielsen en cultivos *batch* de *Pseudomonas putida* (Jahn and Nielsen, 1995) y Sesay en el tratamiento de aguas residuales (Sesay *et al.*, 2006), entre otros.

A continuación, la figura 3.6 muestra los espectros UV-Vis de cultivos de *A. 3.2Sup(5)* antes y después de la extracción por distintos métodos.

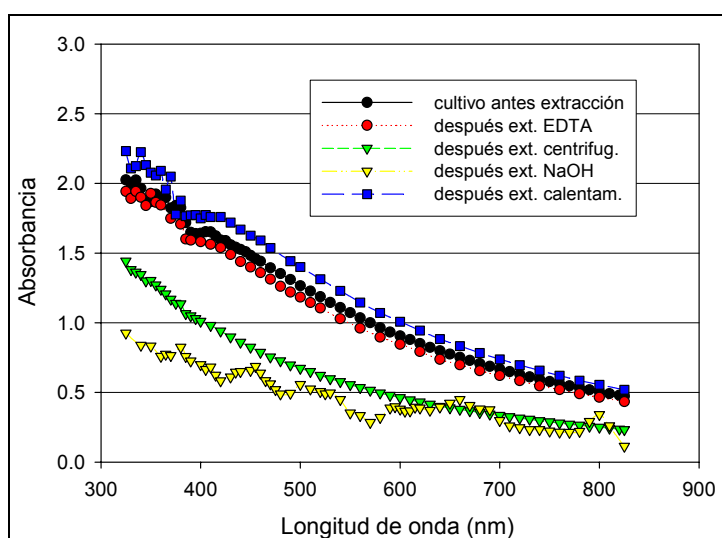


Figura 3.6 Espectros UV-Vis de cultivos puros de *A. 3.2Sup(5)* antes y después de la extracción de EPS con distintos métodos.

En primer lugar, con la figura 3.6 se aprecia que la turbidez de las suspensiones cambiaba una vez realizada la extracción de las EPS dependiendo del método utilizado. Por ejemplo, con la citada figura se comprueba que la intensidad de las bandas de los espectros antes y después de la extracción con EDTA y por calentamiento, se mantuvo prácticamente inalterada, es decir, la turbidez del cultivo no

RESULTADOS Y DISCUSION

fue modificada sustancialmente. Esto quiere decir que el cultivo bacteriano no sufrió alteraciones significativas al realizarse la extracción.

Por el contrario, una vez efectuadas las extracciones con centrifugación y, especialmente, con NaOH, se obtuvieron espectros con bandas de significativa menor intensidad que antes de la extracción, lo que se podría atribuir a que la aplicación de estos métodos provocó una disminución en la densidad celular de los cultivos como consecuencia de fenómenos de lisis. En el caso del cultivo tratado por centrifugación, la menor absorbancia se debería a que las células se habrían agrupado en el *pellet* producido, lo que se traduciría en que el cultivo sometido a la extracción sólo contenía, además de las sustancias extracelulares liberadas, una fracción de las células iniciales. Por su parte, en la extracción con NaOH, el significativo descenso en la densidad celular puede atribuirse a que el cambio de acidez en el medio afectó la estabilidad de la estructura de la superficie celular, induciendo a un alto grado de lisis. Un resultado similar a este es el encontrado por Brown y Lester en la extracción de EPS, por este método, a partir de cultivos puros de *Klebsiella aerogenes* (Brown and Lester, 1980), trabajo en el que se ñalan que el uso de este reactivo provocó un alto grado de lisis como consecuencia de la degradación de la membrana celular.

Este procedimiento de comparación de los espectros de turbidez, se realizó también para el caso de cultivos de la bacteria *A. Berrocal*, obteniéndose los resultados que se muestran a continuación (figura 3.7).

Con la figura 3.7 se aprecia, incluso de forma aún más nítida que para el caso anterior, que los espectros del cultivo de *A. Berrocal*, antes y después de la extracción con EDTA, son prácticamente coincidentes ratificando así la casi nula interferencia del método en la densidad poblacional del cultivo bacteriano. De igual forma, se aprecia que la extracción con resina provocó un muy suave impacto en el espectro del cultivo, presentando las mismas bandas características que la del cultivo sin tratar. En cuanto a los espectros obtenidos tras la aplicación de los otros métodos, se comprueba como, claramente, aparecen distorsionados con relación al del cultivo antes de la extracción, en menor medida para la centrifugación y el calentamiento y en mucho mayor grado para el caso de la extracción con NaOH, al igual que ocurrió con la cepa *A. 3.2Sup(5)*.

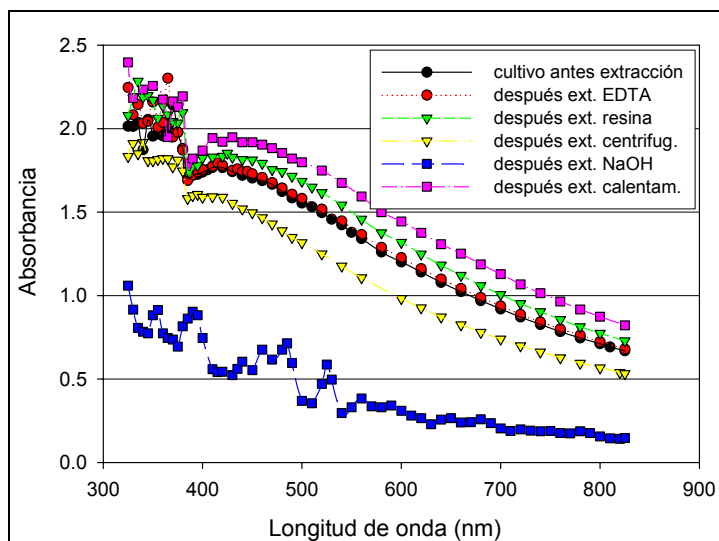


Figura 3.7 Espectros UV-Vis de cultivos puros de *A. Berrocal* antes y después de la extracción de las EPS con distintos métodos.

De todo lo anterior, se puede concluir que el método de extracción con EDTA es el que menor alteración provoca en la turbidez del cultivo, seguido por los métodos de extracción por calentamiento y resina. A su vez, se concluye que los métodos de extracción por centrifugación y, especialmente, con NaOH son los que mayor alteración provocan en el cultivo. Ahora bien, como la turbidez está asociada a la densidad poblacional (Jiang *et al.*, 2004), se puede afirmar que el primer método provocó una menor destrucción de células y, por tanto, una menor variación en la densidad poblacional, al contrario que el caso con NaOH que provocó el mayor grado de degradación celular. Estas aseveraciones fueron confirmadas a partir de la medición de la población de células activas, antes y después de la extracción con cada método, mediante el recuento de las células por microscopía óptica utilizando un microscopio Olympus BX 40 y un hematocitómetro tipo Thoma (tabla 3.6).

Tabla 3.6 Variación de la población de cultivos de *A. 3.2Sup(5)*

Método de extracción	Población después de la extracción (células/mL)	Variación (%)
Cultivo sin tratar	2.36E+09	
EDTA	2.12E+09	89.8%
Calentamiento	1.32E+09	55.9%
Centrifugación	1.62E+09	68.6%
NaOH	2.52E+08	10.7%

De la tabla 3.6 se aprecia que el cultivo sometido a una extracción con EDTA sufrió la menor pérdida de células activas con respecto al cultivo puro sin tratar. En efecto, después de la extracción, el conteo de las células remanentes alcanzó una cifra de 2.12×10^9 cel/mL, concentración que corresponde, prácticamente, al 90% de la población inicialmente presente en el cultivo. Esto permite confirmar que la extracción con EDTA no afecta sustancialmente a las células. Al contrario, la observación microscópica de un cultivo tratado con NaOH reveló que la acción de este reactivo provocó un fuerte descenso en la presencia de células activas, haciendo que la concentración final obtenida – 2.52×10^8 cel/mL – fuera sólo la décima parte de la inicial, confirmando que esta técnica es la que más fuertemente afecta la estabilidad del cultivo durante la extracción. Por su parte, las concentraciones obtenidas para los cultivos tratados por calentamiento y centrifugación mostraron también significativos descensos en las densidades de población, aunque sin llegar a los extremos que presenta la aplicación de NaOH, lo cual está en sintonía con los espectros UV intermedios que generan.

De todo lo anterior, se puede concluir que el método de extracción con EDTA es el que menor lisis celular provoca, seguido por los métodos de extracción por calentamiento y resina. A su vez, se concluye que los métodos de extracción por centrifugación y, especialmente, con NaOH, son los que más afectan al cultivo. Estos resultados ratifican los obtenidos anteriormente a partir de los contenidos relativos de proteínas y carbohidratos en las EPS.

3.2.3 Caracterización morfológica de células y EPS por TEM

La microscopia TEM permitió conocer, con algo más de detalle, la interrelación entre las células y las sustancias poliméricas extracelulares que ellas mismas generan. En este sentido, las figuras 3.8 y 3.9 muestran a células individuales y aisladas de las bacterias *A. 3.2Sup(5)* y *A. ferrooxidans*, respectivamente.

En primer lugar, en la figura 3.8 se observa una bacteria *A. 3.2Sup(5)*. En las micrografías se aprecia claramente que estas células son capaces de exudar

RESULTADOS Y DISCUSION

sustancias, presumiblemente poliméricas, que cubren parcialmente su superficie con una distribución aleatoria. Estas sustancias, como se visualiza claramente en la figura, de color blanquecino y aspecto gelatinoso, aparecen en la parte superior de la célula y, particularmente, se observa una especie de “nube” que emerge del extremo derecho de la célula. Esta “nube”, en la que se constata la presencia de filamentos internos, tiene una forma más o menos esférica y está conformada, al igual que los restantes tejidos, por distintas sustancias poliméricas exudadas por la propia bacteria.

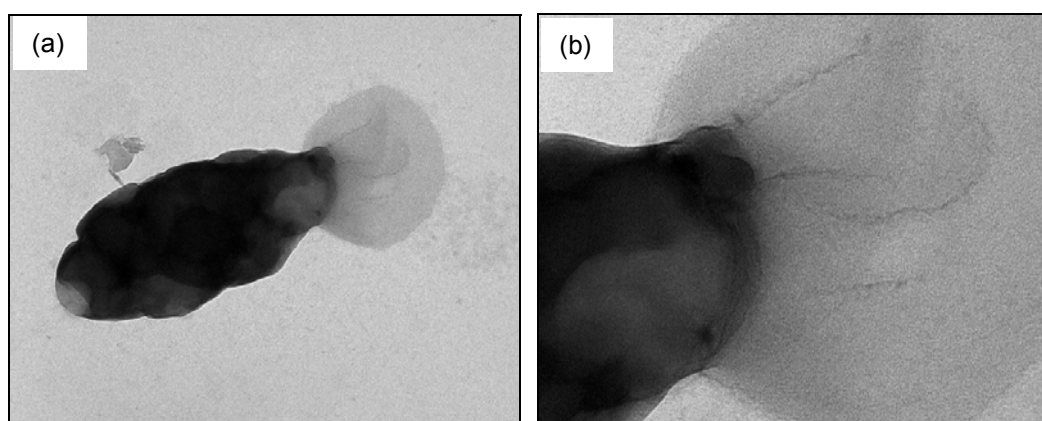


Figura 3.8 Micrografías TEM de: (a) una célula de *A. 3.2Sup(5)* a X 80.000 y (b) detalle de la “nube” de EPS (X 250.000).

En el caso de la “nube”, se puede precisar que estas sustancias corresponderían al tipo de EPS denominadas *bound EPS*, que se han definido como exosustancias ligadas directamente a la superficie de las células, mientras que el “gel” que sobrenada en la parte superior de la célula correspondería al denominado *soluble EPS* (Laspidou and Rittmann, 2002). Según los análisis químicos mencionados anteriormente, estas sustancias están constituidas, en este caso, principalmente, por proteínas y carbohidratos, las cuales están ligadas a la célula, principalmente, a través de enlaces electrostáticos y covalentes (Wingender *et al.*, 1999).

Por su parte, la figura 3.9 muestra dos micrografías de células de *A. ferrooxidans* de similar tamaño, pero con la diferencia de que una se encuentra rodeada de sustancias extracelulares, mientras que la otra no. En efecto, la figura 3.9(a) muestra una célula con su forma típica de bacilo y libre de sustancias extracelulares, mientras que 3.9(b) muestra a una célula dotada de un flagelo y que presenta, a lo largo de su superficie externa, una capa discontinua de sustancias poliméricas extracelulares.

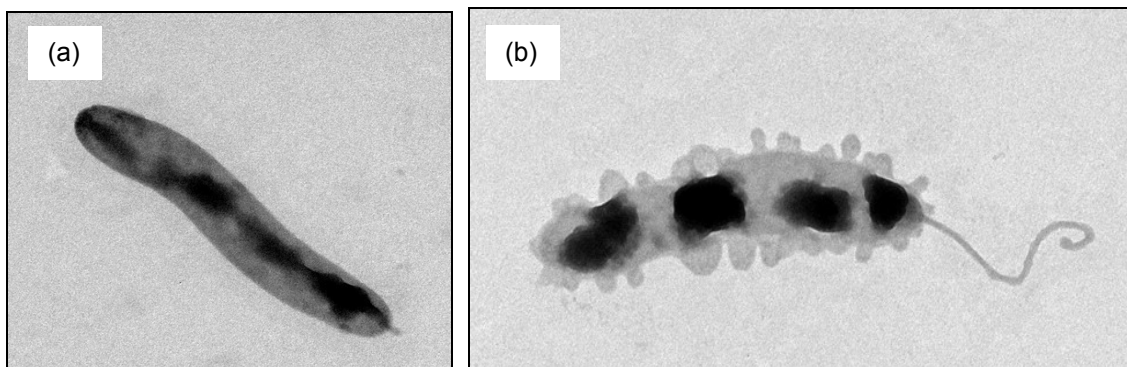


Figura 3.9 Micrografías TEM de bacterias *A. ferrooxidans*: (a) célula individual libre de EPS (X 40.000); (b) célula individual con EPS (X 50.000).

La micrografía 3.9(b) pone de manifiesto que, en este caso, las sustancias exocelulares tienen un aspecto más compacto y denso que en el de la célula de *A. 3.2Sup(5)*, expuesta en la figura 3.9. Además, se aprecia que la cantidad de las EPS que recubre la célula es relativamente mayor, lo que podría corresponder, además de a las EPS, a sales de Fe provenientes del medio, que precipitan sobre la superficie celular.

3.2.4 Caracterización de la estructura de las EPS por FTIR

Un aspecto relevante en el estudio de estas sustancias es el de evaluar el impacto del método de extracción sobre su estructura, es decir, sobre la composición de los grupos funcionales que la constituyen. En efecto, en la literatura se ha encontrado que el método de extracción tiene, en algunos casos, un efecto decisivo en la estructura del exopolímero extraído (Omoike and Chorover, 2004; Comte *et al.*, 2006), modificándolo sustantivamente en función de las condiciones, en el caso de los métodos físicos, o de los reactivos, en el caso de los métodos químicos. Este aspecto es relevante ya que la composición y tipo de grupos funcionales presentes influye, de forma decisiva, en la capacidad de interacción de estas sustancias con los cationes metálicos presentes en el medio (Volesky, 2003).

Para la identificación de los grupos funcionales en las EPS, se ha recurrido a la espectroscopía de infrarrojo mediante transformada de Fourier (FTIR) (Schmitt and Flemming, 1998; Pretsch *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2004; Sheng *et al.*, 2006), debido a

RESULTADOS Y DISCUSION

la capacidad que muestran estos compuestos orgánicos de absorber energía electromagnética en la región infrarroja del espectro.

Este tipo de radiación no tiene suficiente energía para ocasionar la excitación de los electrones, aunque sí la necesaria para que los átomos y grupos de átomos vibren en torno a sus enlaces covalentes. Esta vibración la realizan a frecuencias determinadas por lo que estos tipos de enlaces tienen niveles de energía específicos. La excitación ocurre cuando el compuesto adsorbe radiación infrarroja en una determinada energía, o sea, de una longitud de onda o frecuencia específica lo cual se traduce en picos o bandas de absorción en un espectro. La frecuencia de una vibración y, por tanto, su localización en el espectro suele estar relacionada con la masa de los átomos enlazados y la relativa rigidez del enlace: los enlaces múltiples son más rígidos que los dobles y éstos, a su vez, más rígidos que los sencillos. Por su parte, la intensidad de la absorción depende de la repetición de un grupo concreto y de la polaridad del enlace; el más polarizado da mayor intensidad en la absorción.

Para la determinación del tipo de enlace químico entre los átomos (grupos funcionales) de una molécula suele hacerse una correlación entre éstos y las frecuencias (en cm^{-1}) a las que es previsible la aparición de las bandas de absorción de cada uno de ellos, sin olvidar que los enlaces próximos pueden modificarlas ligeramente. De todo lo anterior, se puede concluir que esta técnica es adecuada para identificar los grupos funcionales de los polímeros aunque se debe tener en cuenta que moléculas presentes en bajas cantidades en la disolución de EPS, tales como lípidos o ácidos nucleicos, son difíciles de detectar a través de esta metodología.

Debido a que las células de la cepa *A. 3.2Sup(5)* son las que más interesan en el marco del proyecto en el que se desarrolla esta Tesis, a continuación se presenta un análisis en cuanto al efecto del impacto que el método de extracción tiene sobre la estructura de las sustancias exopoliméricas obtenidas. Este análisis se basa en la obtención de los espectros infrarrojo de las EPS de esta bacteria y en determinar si se produce una variación en sus grupos funcionales en función del método de extracción.

3.2.4.1 Influencia del método de extracción

Para discernir este aspecto, se determinó la estructura de las EPS de cultivos puros de la bacteria *A. 3.2Sup(5)*, extraídas por el método que ha mostrado los mejores resultados en cuanto a cantidad y calidad de las sustancias extraídas (EDTA). Este espectro se comparó con una referencia dada por unas EPS extraídas por centrifugación, lo que permite visualizar el impacto de la adición del reactivo químico durante la extracción. La figura 3.10 muestra los respectivos espectros.

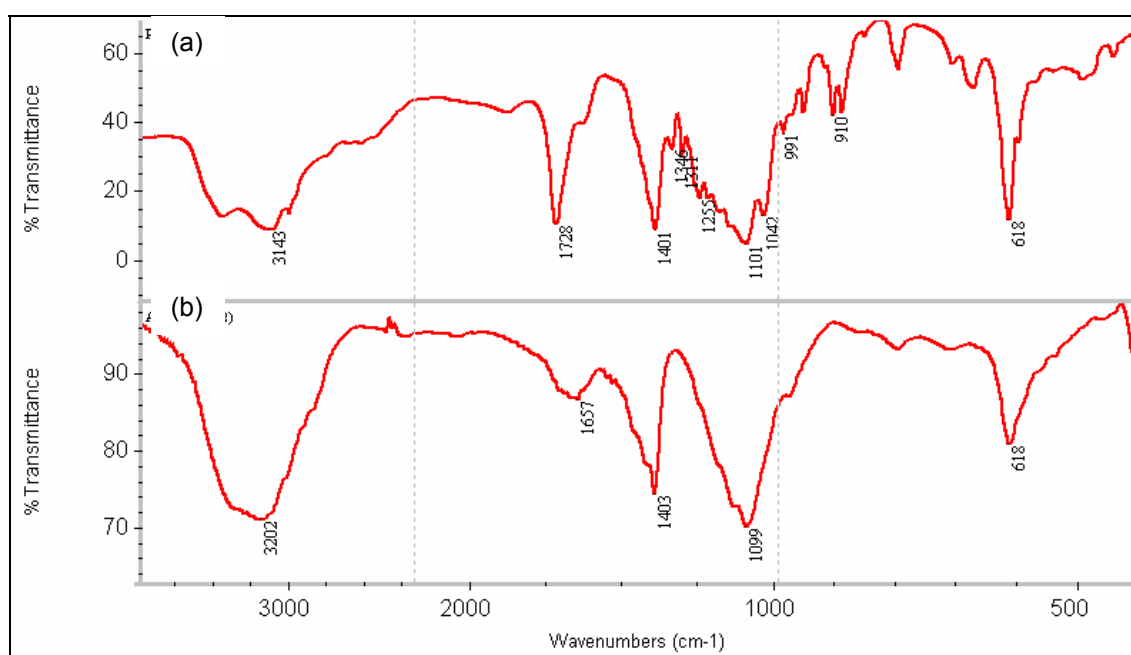


Figura 3.10 Espectros FTIR de EPS de la bacteria *A. 3.2Sup(5)* extraídas por los métodos de: (a) EDTA y (b) centrifugación.

En primer lugar, con dicha figura se puede apreciar que ambos espectros son relativamente distintos. En efecto, en el caso del espectro de las EPS extraídas por centrifugación, se puede observar que éste es relativamente más simple, caracterizándose por presentar bandas de baja intensidad en torno a valores de 3200, 1400, 1100 y 620 cm^{-1} , que a su vez son casi coincidentes con algunas de las que muestra el espectro de las EPS extraídas por EDTA. La primera banda, en torno a 3200 cm^{-1} , se puede atribuir a la tensión simétrica O-H en compuestos poliméricos (Comte *et al.*, 2006), aunque de igual manera podría corresponder a un cierto contenido de agua residual o bien a humedad atmosférica captada durante el tratamiento de la muestra (Pretsch *et al.*, 2003). Por su parte, las bandas en torno a 1400 y 1100 cm^{-1} son típicas tanto de la vibración de tensión del grupo funcional C=O,

RESULTADOS Y DISCUSION

propio del grupo carboxilato, como de la vibración de tensión del grupo O-H, correspondientes ambos a la presencia de los polisacáridos ya detectados en los análisis químicos (Comte *et al.*, 2006). Finalmente, la banda a 620 cm^{-1} indica la presencia de grupos funcionales tipo sulfuro o fosfato.

Por su parte, el espectro de las EPS extraídas con EDTA muestra bandas estrechas y pronunciadas a valores de 1100 , 1400 y 1728 cm^{-1} . Las dos primeras bandas se pueden considerar coincidentes con aquellas que aparecen en el espectro de las EPS extraídas por centrifugación y atribuidas entonces a la presencia de los grupos hidroxilo y carboxilatos, respectivamente. Por su parte, la pronunciada banda a 1728 cm^{-1} podría corresponder a la tensión asimétrica de $\text{C}=\text{O}$ en grupos carboxílicos, producto de la protonación de oxalatos residuales provenientes del reactivo (EDTA) usado en la extracción (Comte *et al.*, 2006). Finalmente, este espectro muestra, a longitudes de onda menores a 1000 cm^{-1} , la presencia de una mayor cantidad de bandas, tanto en cantidad como en intensidad, que se podrían atribuir a la presencia e interacción de grupos funcionales de P y S, provenientes del ADN celular y de los medios de cultivo respectivos (Guibaud *et al.*, 2003).

Del análisis anterior se podría concluir, entonces, que la estructura de las exosustancias extraídas por el método de EDTA difiere de aquellas extraídas por centrifugación, esencialmente por una mayor presencia de grupos carboxilos provenientes de contenidos residuales de este reactivo en las EPS, por lo que sería de esperar que estas sustancias se relacionen de una manera distinta en los procesos de bioadsorción de metales, en general, y del hierro, en particular. Este comportamiento se abordará en el apartado 3.3.2 de la presente memoria.

3.2.4.2 Influencia del tiempo de crecimiento del cultivo

Para discernir este aspecto se realizó la obtención de EPS de cultivos puros cosechados al cabo de 7 y 14 días. Como se mostró en el apartado 3.1, la población de *A. 3.2Sup(5)* llega a la etapa de estabilización en un período aproximado de 3 a 4 días (normalmente, entre 70 y 90 horas), en donde se alcanza una densidad celular de entre $3.0\text{-}5.0 \times 10^9$ cél/mL. Es en este período cuando la bacteria presenta su máxima actividad y es en el que se realizan todas las extracciones de exopolímeros. Esta etapa de estabilización dura, regularmente, entre 3 y 22 días (apartado 3.1),

RESULTADOS Y DISCUSION

correspondiéndose con el período donde la tasa de renovación celular es aproximadamente similar a la de la lisis celular. El virtual efecto del envejecimiento del cultivo en la estructura se determinó analizando las EPS obtenidas en el momento de alcanzarse la máxima actividad bacteriana (72 h) y antes de llegar a la mitad de dicho período, es decir, unos 9 días de incubación (216 h) (figura 3.11). En este momento la presencia de células lisadas aún no suele ser significativa con respecto a las activas, haciendo que los exopolímeros intracelulares liberados no afecten sustancialmente el contenido de estas sustancias en el cultivo. La técnica usada en la extracción fue la de control, es decir, la centrifugación pura en las condiciones indicadas en el apartado 2.2.1.

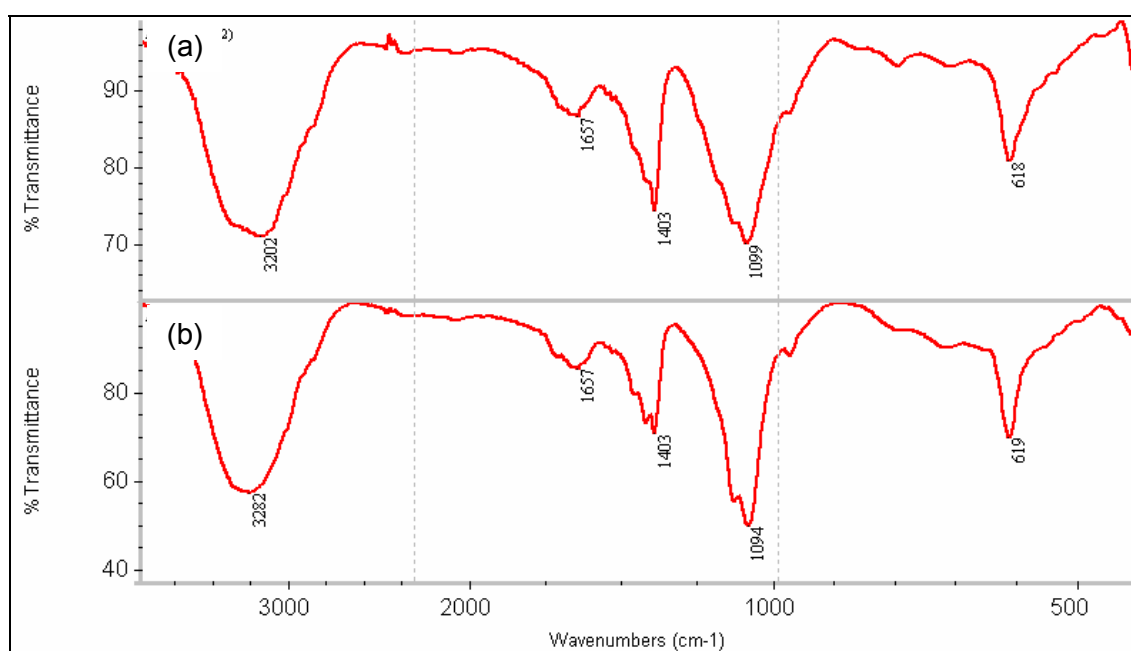


Figura 3.11 Espectros FTIR de las EPS, extraídas por centrifugación, de cultivos puros de *A. 3.2Sup(5)* crecidos por un tiempo de: (a) 72 h y (b) 216 h.

La figura 3.11 muestra que ambos espectros tienen algunas bandas muy similares a valores de longitudes de onda en torno a 3200 y 1090 cm^{-1} , que ya han sido identificadas anteriormente y que se pueden atribuir a la tensión simétrica del grupo hidroxilo (-OH) en los compuestos poliméricos que tienen estas sustancias, como se ha ratificado con los análisis bioquímicos. Además, ambos presentan bandas coincidentes en longitudes de onda de 1657 y 1403 cm^{-1} que son típicas del puente C-O en el grupo carboxílico, mientras que la banda casi coincidente en torno a 620 cm^{-1}

podría adjudicarse a distintos grupos funcionales tipo sulfuro o fosfato (Compte *et al.*, 2006).

En general, de la similitud de los espectros de la figura 3.12 se puede concluir que el cambio en la edad del cultivo no afecta sustancialmente a la estructura del exopolisacárido. Esto es relevante ya que implica que el comportamiento de estas sustancias frente a la presencia de cationes metálicos puede ser aproximadamente constante en el tiempo, es decir, que en el caso de una eventual pila de combustible basada en el metabolismo de esta especie, sus exopolímeros mantendrían su estructura y, por lo tanto, su comportamiento en la interacción frente a cationes metálicos como, por ejemplo, los de hierro presentes en el sistema.

3.2.5 Caracterización por FE-SEM de la adhesión bacteriana a los soportes

Se utilizó esta técnica debido a que, como se ha recogido de la literatura, es una de las que mejores resultados aporta en cuanto a la nitidez de sus imágenes a altos aumentos (Bos *et al.*, 1999; Friedrich *et al.*, 2004; Beech *et al.*, 2005; Videla and Herrera, 2005; Lei *et al.*, 2009), lo que permitiría descubrir, más en profundidad, el tipo de interrelación que establecen las células y sus EPS con la superficie de los soportes de carbono. En primera instancia, se muestran imágenes de los soportes en blanco, es decir, antes de que fueran puestos en contacto con los cultivos, y, posteriormente, imágenes de los soportes que habían estado sumergidos durante un tiempo en dichos cultivos.

3.2.5.1 Soportes en blanco

En este caso, la figura 3.12 muestra dos micrografías del fieltro de carbono, mientras que la figura 3.13 contiene dos micrografías de la superficie de un disco de grafito.

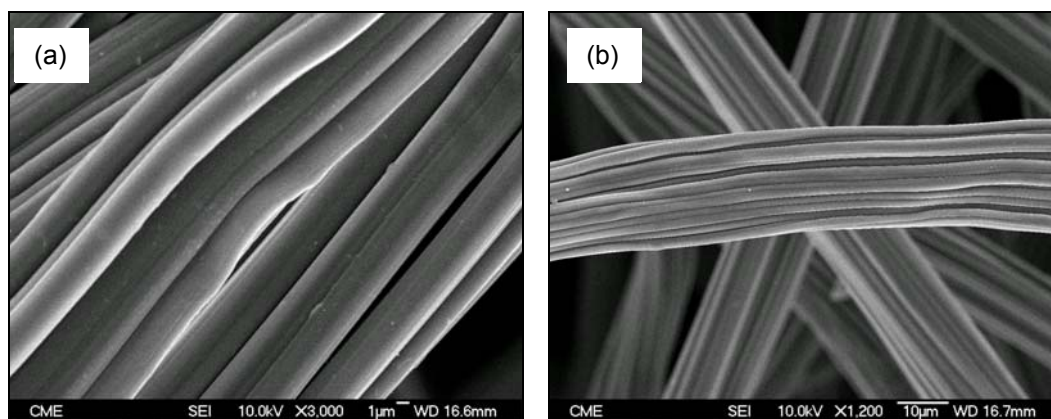


Figura 3.12 Micrografías FE-SEM del fieltro de carbono sin utilizar a: (a) X 1.200 y (b) X 3.000.

La micrografía 3.12(a) muestra que el fieltro estaba constituido por una densa red de filamentos homogéneos, con un diámetro de aproximadamente 20 μm , uniformes, presumiblemente, de forma mecánica. Por su parte, la micrografía 3.12(b) muestra, con más detalle, que los filamentos estaban, a su vez, constituidos por un conjunto de entre 4 a 6 microfibras cuyo diámetro era cercano a los 3 μm , los cuales al agruparse generan una amplia red de hendiduras, que otorga una elevada área específica. Esta característica hace del fieltro un material especialmente adecuado para ser utilizado como electrodo en una pila de combustible microbiana (Friedrich *et al.*, 2004). Más adelante, se observará que estas cavidades se constituyeron en lugares preferenciales para el crecimiento de las comunidades microbianas.

En cuanto al grafito utilizado, las micrografías de la figura 3.13 muestran que la superficie de este material presentaba una importante irregularidad superficial. En particular, en la micrografía 3.13(a) se detecta una superficie con alta rugosidad y una apreciable cantidad de poros, lo que se hace más patente en la micrografía 3.13(b).

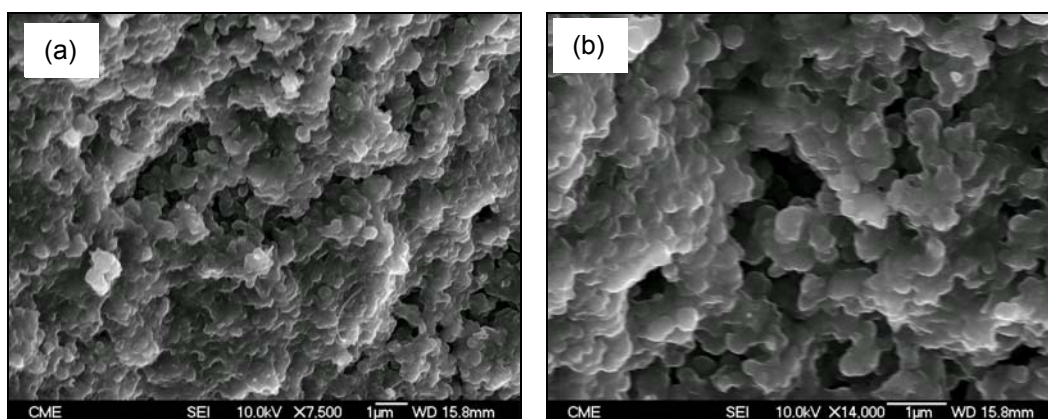


Figura 3.13 Micrografías FE-SEM de la superficie de láminas de grafito a distintos aumentos: (a) X 7.500 y (b) X 14.000.

Estas imperfecciones del material resultan ser relevantes en las propiedades de adhesión superficial de las células, ya que se ha reportado que, en general, los microorganismos tienen una marcada tendencia a situarse sobre dichas irregularidades superficiales (Gehrke *et al.*, 1998; Harneit *et al.*, 2006; Sand and Gehrke, 2006; Ghauri *et al.*, 2007).

3.2.5.2 Adhesión de bacterias *A. 3.2Sup(5)* sobre fieltro de carbono

En primer lugar, se muestran micrografías que muestran la adhesión de células de *A. 3.2Sup(5)* sobre filamentos de fieltro de carbono, a dos edades de crecimiento del cultivo: 144 y 216 horas (figura 3.14). Estos tiempos se seleccionaron debido a que correspondían, aproximadamente, al primer y segundo tercio del período de estabilización en la población de esta bacteria.

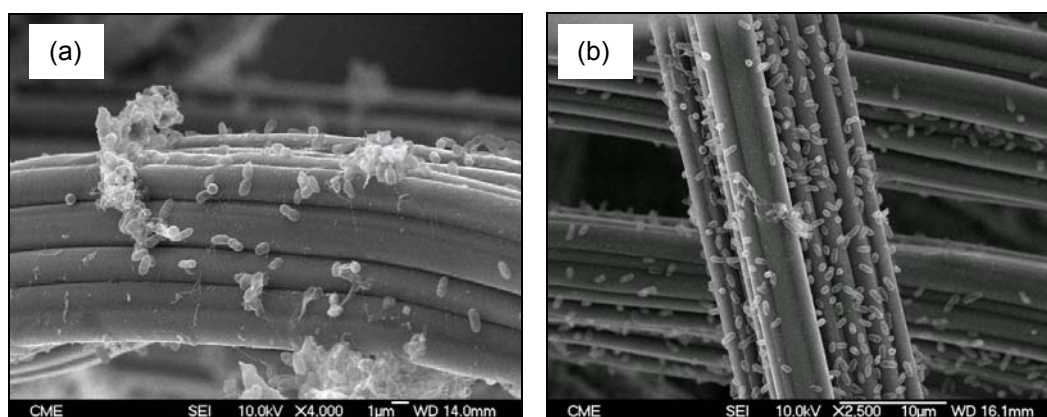


Figura 3.14 Micrografías FE-SEM de células adheridas al fieltro de carbono para un tiempo de crecimiento del cultivo de: (a) 144 horas (X 4.000) y (b) 216 horas (X 2.500).

RESULTADOS Y DISCUSION

Con la figura 3.14(a) - correspondiente a un cultivo crecido durante 144 horas - se observa un cierto grado de adhesión celular sobre el filamento y la presencia de cúmulos de sustancias poliméricas extracelulares. Por su parte, la figura 3.14(b) - correspondiente a un cultivo crecido durante 216 horas - muestra claramente un apreciable grado de cubrimiento superficial del soporte por parte de las bacterias, destacando el que las células han colonizado preferentemente los espacios entre los microfilamentos.

En cuanto al grado de generación de EPS, el análisis microscópico permitió determinar que, a las 144 horas, las bacterias adheridas a los filamentos se encuentran en una etapa inicial de generación de estas sustancias, micrografía 3.14(a). Esto se aprecia con más detalle en las micrografías de la figura 3.15, las que, además de confirmar la tendencia de las células para adherirse entre los intersticios de los microfilamentos, muestran la incipiente formación de cúmulos y redes de exopolímeros, distribuidos aleatoriamente sobre la superficie de los filamentos.

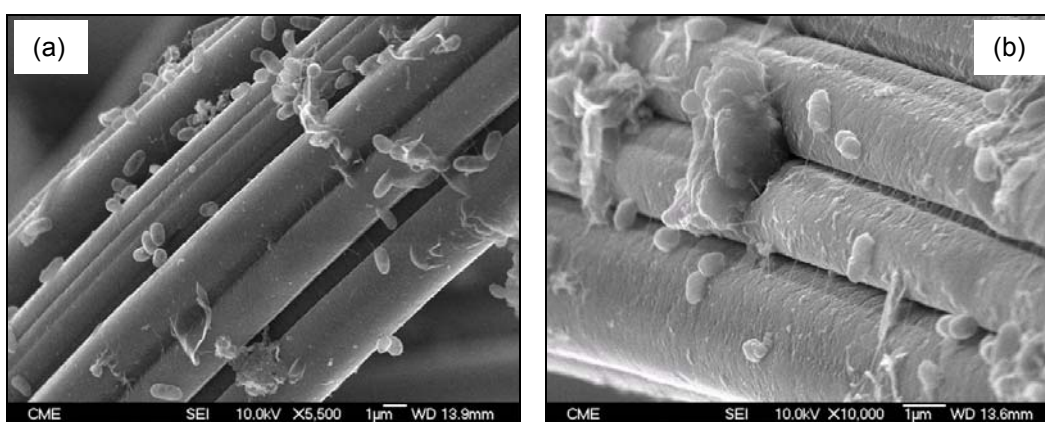


Figura 3.15 Micrografías FE-SEM de células y EPS de *A. 3.2Sup(5)*, con 144 horas de cultivo, adheridos sobre fieltro: (a) X 5.500 y (b) X 10.000.

La formación de estas redes de EPS se acentuó con el paso del tiempo, lo que se verifica en las micrografías de la figura 3.16, obtenidas a las 216 horas de cultivo. La micrografía 3.16(a) muestra la fuerte tendencia de las células a agruparse entre los microfilamentos. Por su parte, la figura 3.16(b) permite apreciar claramente una red, que presenta un aspecto tipo gel, formada por EPS que envuelven a un conjunto de células sobre el sustrato sólido. Este comportamiento ha sido recogido en la bibliografía constatándose la formación de conglomerados de células y micropartículas

(biopelículas), que generan unas condiciones adecuadas para el desarrollo de la comunidad celular (Bos *et al.*, 1999; Wingender *et al.*, 1999; Frankel and Bazylinski, 2003; Liu and Fang, 2003).

Es frecuente encontrar en la literatura trabajos en los que, como este caso, se localizan células íntimamente relacionadas con sus propias EPS. Por ejemplo, Aguilera mostró que las células del alga *Chlorella* se rodeaban de sus propias EPS al desarrollar una biopelícula sobre un lecho mineral en ambientes ácidos (Aguilera *et al.*, 2008). De igual manera, Deo constató que la interacción electrostática de células de la bacteria *Paenabacillus polymixa* con la superficie de hematita (Fe_2O_3) y corindón ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$) fue suplementada en el tiempo por la producción de una sobrecapa de EPS que hacía más fuerte la fijación (Deo *et al.*, 2001).

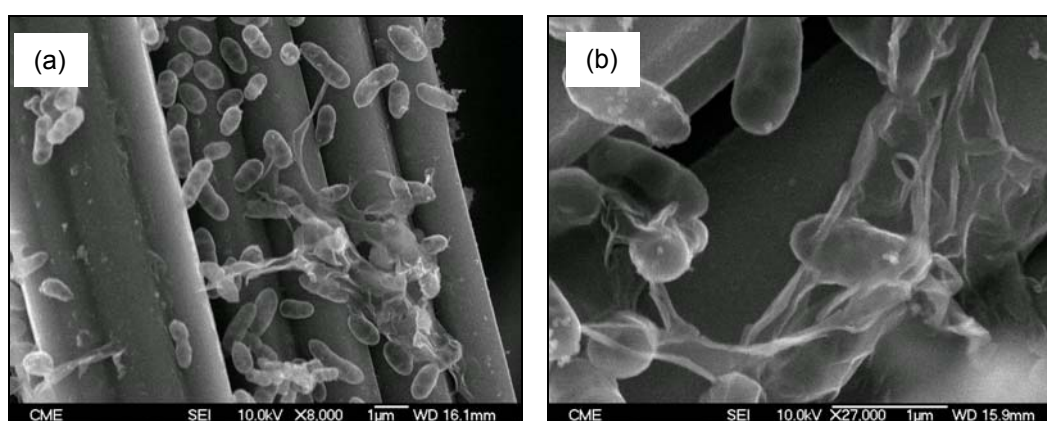


Figura 3.16 Micrografías FE-SEM de células y EPS de *A. 3.2Sup(5)* adheridos, con 216 horas de cultivo, sobre fieltro de carbono: (a) X 8.000 y (b) X 27.000.

3.2.5.3 Adhesión de bacterias *A. 3.2Sup(5)* sobre grafito

En cuanto a la adhesión de estas células sobre grafito, a continuación se muestran los resultados a partir de las figuras 3.17 y 3.18. Se observó que las células tendían a alojarse entre los poros de la superficie del grafito, comportamiento que se ha detectado en otros sistemas tanto naturales, como en el alga *Chlorella* (Aguilera *et al.*, 2008), como sintéticos, caso al que corresponde la adhesión de la bacteria *Bacillus subtilis* sobre soportes de carbón activado y cerámicos (Upadhyayula *et al.*, 2009).

Este tipo de comportamiento en la adhesión provocó que la nitidez de las micrografías no fuera la adecuada lo que dificultó la interpretación de las mismas. Para solucionar

RESULTADOS Y DISCUSION

este problema las imágenes obtenidas con este soporte fueron sometidas a un tratamiento con el software AutoCAD Architecture (Autodesk Inc., San Rafael, CA, USA), que consistió en una coloración diferenciada tanto del soporte como de las células.

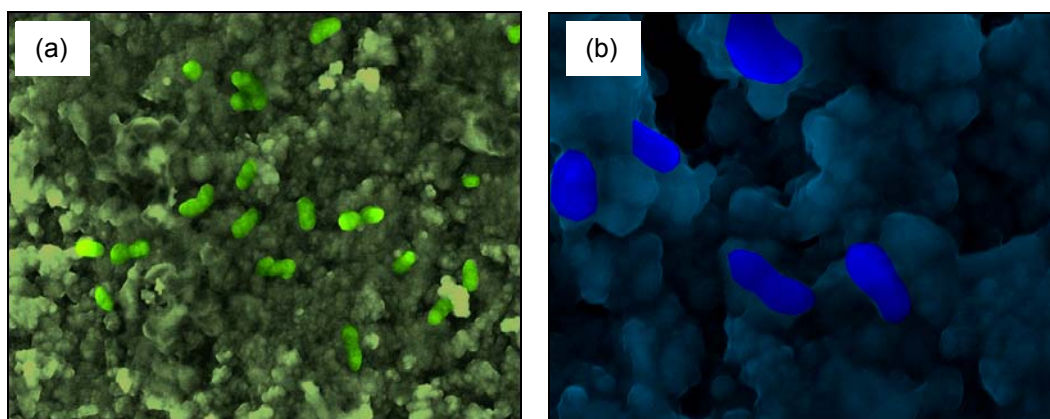


Figura 3.17 Micrografías FE-SEM de células y EPS de *A. 3.2Sup(5)*, con 216 horas de cultivo, adheridos sobre grafito: (a) X 5.000 y (b) X 16.000.

La micrografía 3.17(a) muestra una cierta cantidad de células, destacadas en color verde, alojadas entre las rugosidades de la superficie. Algunas de éstas se aprecian con más detalle en la micrografía 3.17(b), en este caso de color azul, creciendo entre los poros del material, comportamiento que también ha sido observado en el crecimiento de cultivos de *Acidiphilium spp.* sobre partículas de pirita (FeS_2) e hidrosulfatos de Fe (Ghauri *et al.*, 2007).

El efecto del paso del tiempo en la adhesión de las células sobre el grafito, se puede discutir con la figura 3.18. En primer lugar, la micrografía 3.18(a) muestra que el envejecimiento del cultivo se tradujo en la generación de una compleja red de tejidos de sustancias exopoliméricas sobre la superficie de las láminas de grafito, además de un significativo aumento en la cantidad de células (teñidas en este caso de color amarillo) alojadas entre los poros, lo que es atribuible a la mayor población presente en el cultivo. Por su parte, la micrografía 3.18(b) muestra con detalle la alta densidad de bacterias adheridas a la superficie, formando verdaderos “racimos” de células en los poros y rugosidades del material.

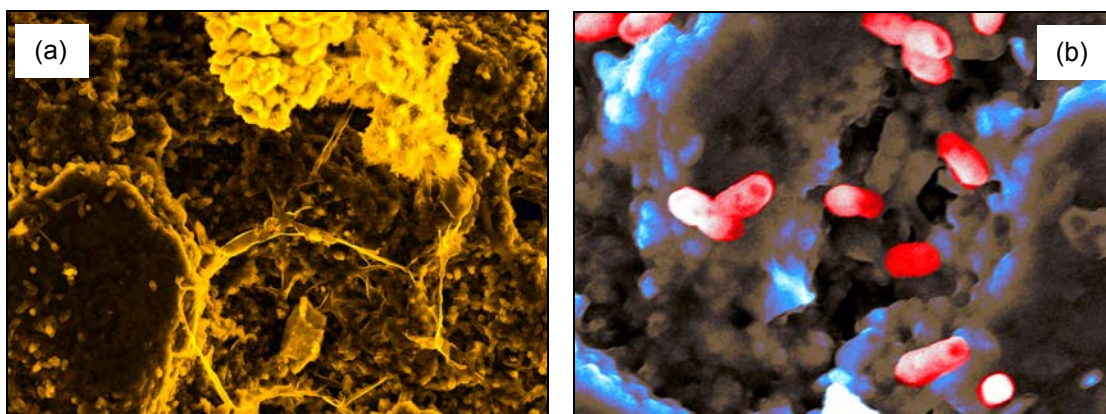


Figura 3.18 Micrografías FE-SEM de células y EPS de *A. 3.2Sup(5)*, con 216 horas de cultivo, adheridos sobre grafito: (a) X 2.000 y (b) X 10.000.

3.2.5.4 Adhesión de bacterias *A. ferrooxidans* sobre fieltro de carbono

Un estudio similar al anterior fue realizado para las células de *A. ferrooxidans*, cuyo metabolismo resulta complementario al de la bacteria *A. 3.2Sup(5)*, tal como se ha descrito en el apartado 1.2 de la presente memoria. Las condiciones de trabajo fueron, por tanto, las mismas que en el caso anterior como, también, lo fueron las edades de crecimiento del cultivo utilizadas (144 y 216 horas).

En la micrografía 3.19(a) se observan algunas bacterias adheridas a los filamentos, mientras que, más en detalle, la micrografía 3.19(b) muestra algunas células adheridas entre los filamentos, además de una sustancia tipo gel constituida por exopolímeros. En general, con la figura 3.19 se aprecia, claramente, la menor cantidad de células de esta bacteria adheridas a los filamentos a esta edad del cultivo en relación a la bacteria *A. 3.2Sup(5)* (figura 3.15), lo cual está, lógicamente, relacionado con la menor densidad de población que genera esta bacteria.

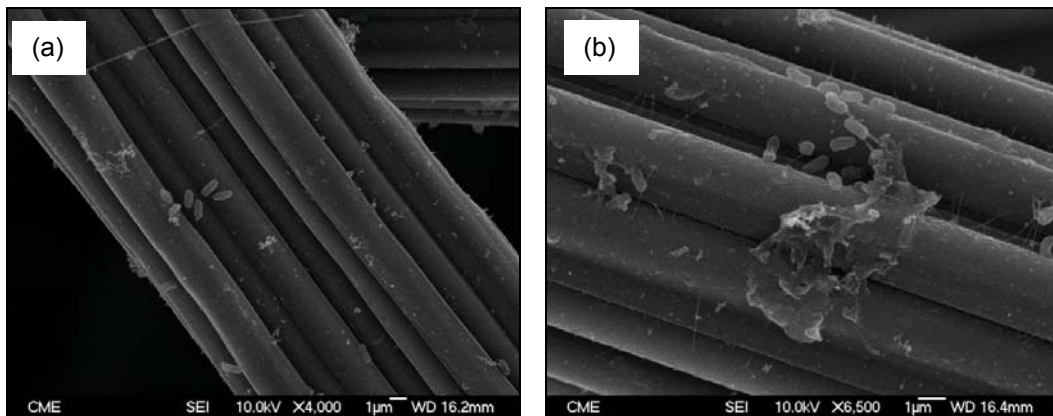


Figura 3.19 Micrografías FE-SEM de células y EPS de *A. ferrooxidans*, con 144 horas de cultivo, adheridas sobre fieltro de carbono: (a) X 4.000 y (b) X 6.500.

Con este cultivo, el efecto del tiempo se manifestó principalmente en la formación de abundante cantidad de precipitados sobre los filamentos (figura 3.20), presumiblemente como consecuencia de la cristalización de compuestos de Fe(III), ión que aparece en el sistema como producto de la acción metabólica de estas bacterias sobre los iones ferrosos añadidos al medio como fuente de energía.

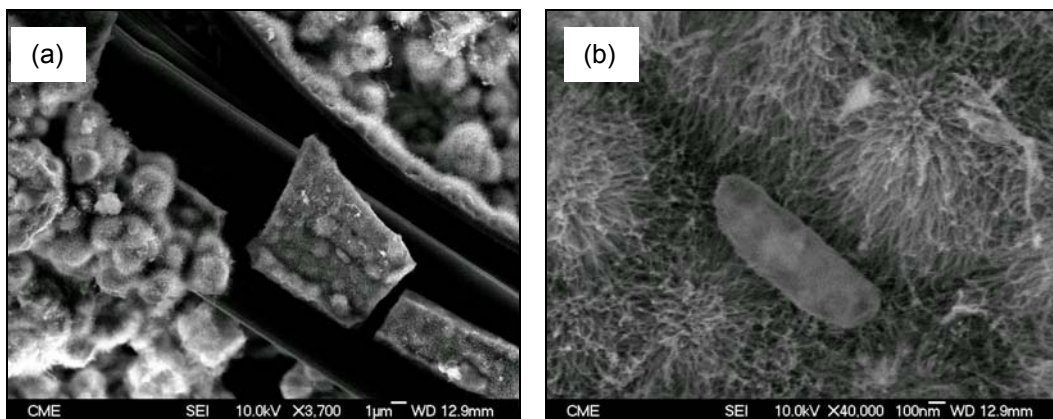


Figura 3.20 Micrografías FE-SEM de células y EPS de *A. ferrooxidans*, con 216 horas de cultivo, adheridas sobre fieltro de carbono: (a) X 3.700 y (b) X 40.000

La formación de estos compuestos se puede apreciar claramente en la micrografía 3.20(a), en la que se observa un filamento de carbono casi completamente cubierto por partículas sólidas que podrían corresponder a hidróxidos de Fe(III) o bien a algún tipo de jarositas producidas por precipitación a partir de las sales del medio. La micrografía 3.20(b) muestra un detalle de una bacteria alojada entre las dendritas de los precipitados en formación sobre el filamento.

3.2.5.5 Adhesión de bacterias *A. ferrooxidans* sobre grafito

El comportamiento de estas células frente al grafito, se puede inferir a partir de las figuras 3.21 y 3.22, las cuales presentan el crecimiento de esta bacteria sobre este soporte a tiempos de cultivo de 144 y 216 horas, respectivamente.

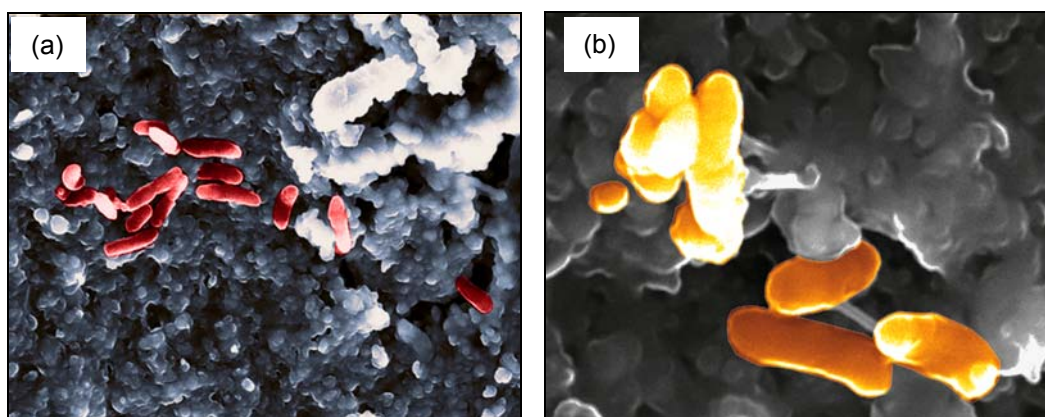


Figura 3.21 Micrografías FE-SEM de células y EPS de *A. ferrooxidans*, con 144 horas de cultivo, adheridas sobre grafito: (a) X 6.500 y (b) X 30.000.

En primera instancia, la micrografía 3.21(a) revela la presencia de bacilos de esta bacteria (de color rojo), también en una menor cantidad en relación a la adhesión de las células *A. 3.2Sup(5)* a esta misma edad del cultivo. Por su parte, la micrografía 3.21(b) muestra un detalle de algunas células (de color naranja), alojadas en poros, intercomunicadas a través de sustancias xopoliméricas. Estos resultados son similares a los publicados por Harneit y por Kinzler en sendos trabajos en los que estudiaron la interacción entre algunas cepas de *A. ferrooxidans* y la superficie de partículas de pirita (Kinzler *et al.*, 2003; Harneit *et al.*, 2006).

Con este soporte, al igual que con el otro material ensayado, el paso del tiempo se reflejó principalmente en la formación de precipitados, presumiblemente de Fe, sobre la superficie del grafito. En este caso, los precipitados se distribuyeron casi por toda la superficie de las láminas, creciendo de forma preferencial a partir de las irregularidades de la superficie que actuaron como núcleos de precipitación (Sand *et al.*, 2001). Como es de esperar, el envejecimiento del cultivo se tradujo en una mayor tasa de adherencia celular como consecuencia del crecimiento poblacional, lo que se aprecia claramente en la figura 3.22(a) que muestra una gran cantidad de bacterias (de color verde) alojadas entre los precipitados en formación, mientras que en la

RESULTADOS Y DISCUSION

micrografía 3.22(b) se aprecia, con más detalle, células (de color naranja) creciendo o intercomunicadas sobre el grafito.

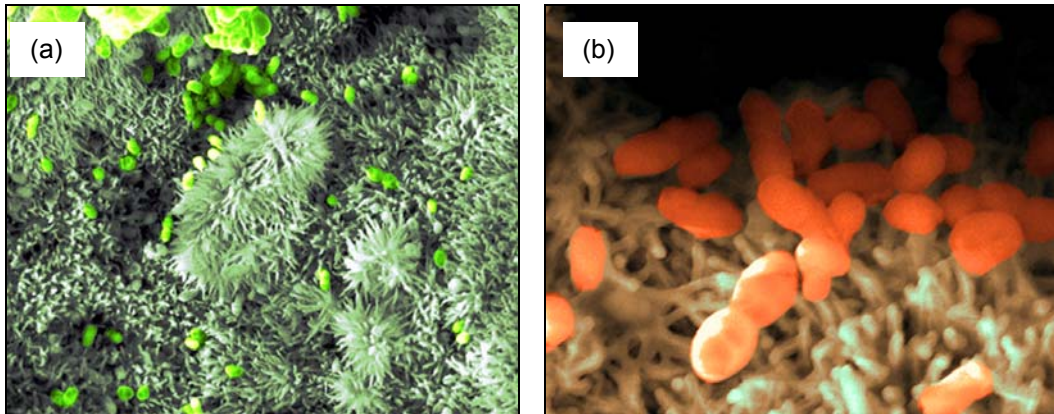


Figura 3.2.2 Micrografías FE-SEM de células y EPS de *A. ferrooxidans*, con 216 horas de cultivo, adheridas sobre grafito: (a) X 4.000 y (b) X 16.000

3.3 Adsorción de Fe(III) por las EPS de *A. 3.2Sup(5)*

3.3.1 Cinética de adsorción

El estudio para la caracterización de la capacidad de captación de Fe por parte de las exosustancias de la bacteria *Acidiphilium 3.2Sup(5)*, se inició con la determinación de las curvas cinéticas de adsorción. Esto se realizó con el fin de determinar el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio, es decir, el tiempo con el cual las exosustancias consiguen sus máximos niveles de captación del metal. Este tiempo fue el que, posteriormente, se utilizó en el trazado de las isotermas de adsorción del metal por las EPS tanto en ausencia como en presencia de soportes

Las curvas cinéticas (figura 3.23) se obtuvieron graficando la relación entre los valores de capacidad de captación del catión por parte de las EPS (expresados en mg metal/g biomasa) y el tiempo de interacción entre ellas y el metal. Las exosustancias utilizadas se extrajeron con el método de referencia elegido en este trabajo – EDTA - determinado en el apartado 3.2 de la presente memoria. Las concentraciones iniciales de Fe(III) en la disolución fueron 50, 100 y 200 mg/L y los tiempos de interacción fueron 30, 60 y 180 min.

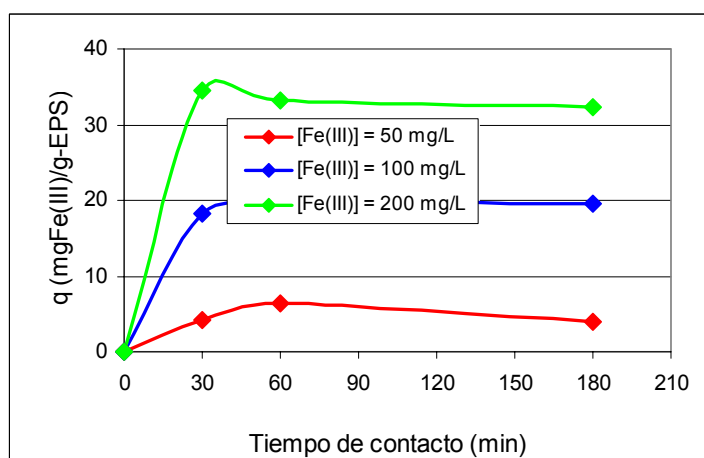


Figura 3.23 Curvas cinéticas de captación de Fe(III) por las EPS de *A. 3.2Sup(5)* extraídas con EDTA.

RESULTADOS Y DISCUSION

Con la figura 3.23 se aprecia que la capacidad de adsorción dependió de la cantidad de Fe disponible en el sistema. Tomando como referencia un tiempo de 60 minutos de interacción EPS-Fe(III), se observa como los niveles de retención del metal aumentaron progresivamente desde aproximadamente 6 mg de Fe(III) por gramo de EPS en un sistema donde la concentración del ión férrico era de 50 mg/L, hasta valores cercanos a 20 y 33 mg Fe(III)/g EPS para el caso de concentraciones metálicas de 100 y 200 mg/L, respectivamente. Este comportamiento se puede atribuir a que al haber más iones férricos en la disolución, también fue mayor el número de lugares activos ocupados.

Además de lo anterior, con la figura 3.23 se puede observar, también, que la cantidad de Fe(III) absorbida, para cada una de las concentraciones, se hizo relativamente constante a partir de 60 minutos, habiéndose ya retenido sobre la biomasa la mayor parte del metal en los 30 primeros minutos. Esto significa que el proceso de captación fue muy rápido, y con 60 minutos de interacción entre las EPS y la disolución de hierro ya se había establecido el equilibrio, por lo que la capacidad de adsorción no se vio aumentada con tiempos de interacción mayores.

Estos resultados se encuentran dentro de rangos similares a los encontrados en la literatura. Por ejemplo, Micheletti informa de tiempos de equilibrio de 30 minutos en un estudio de captación de Cu(II), Pb(II) y Cr(III) por parte de EPS de 9 cepas de cianobacterias *Cyanothece spp.* y *Cyanospira capsulata* (Micheletti *et al.*, 2008). Un tiempo muy similar al anterior, 25 minutos, es el reportado por Morillo como tiempo de equilibrio en la captación de Pb(II) por EPS de la bacteria *Paenibacillus jamilae* (Morillo *et al.*, 2008). Por su parte, Bhaskar y Bohle determinaron tiempos de equilibrio de 110 y 120 minutos en un estudio sobre captación de Pb(II) y Cu(II) por EPS de la bacteria *Marinobacter sp.*, respectivamente (Bhaskar and Bhosle, 2006). Finalmente, una cinética algo más rápida fue la encontrada por Zheng, en un trabajo en el que informan un tiempo de equilibrio de 10 minutos en la absorción de Cu(II) por parte de EPS de la bacteria *Bacillus sp. F19* (Zheng *et al.*, 2008).

Por todo lo anterior, la conclusión a la que se llegó con esta experimentación preliminar fue que un tiempo de interacción de **60 minutos** garantiza, para una concentración de Fe dada, la máxima captación del Fe por parte de las sustancias

poliméricas extracelulares en estudio. Por lo tanto, este fue el tiempo que se utilizó en los ensayos posteriores conducentes a la determinación de las isothermas de adsorción de Fe(III).

3.3.2 Isothermas de adsorción de Fe(III)

Una vez determinado el tiempo de equilibrio, el trabajo de laboratorio se orientó hacia la obtención de las isothermas de captación de Fe(III), para lo que se utilizaron alícuotas de EPS extraídas por EDTA y las correspondientes disoluciones de Fe(III). Adicionalmente, se realizaron ensayos similares con EPS extraídas por el método de control (cen trifugación), para evaluar la influencia del método de extracción en la adsorción.

Mediante el trazado de las isothermas de adsorción se buscó, por un lado, determinar como la capacidad de adsorción de la biomasa se veía influenciada por la concentración del metal en la disolución y por el método de extracción de las EPS y, por otro, poder cuantificar el proceso mediante la aplicación de los modelos matemáticos de Langmuir y Freundlich, que permiten obtener los parámetros de adsorción. Dichos modelos, como se ha mencionado anteriormente, han sido los más utilizados en la interpretación de este tipo de procesos tal y como se refleja en numerosos trabajos bibliográficos (Gérente *et al.*, 2000; Prado *et al.*, 2005; Moon *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; De-Philippis *et al.*, 2007; Quintelas *et al.*, 2008; Tan and Xiao, 2008).

3.3.2.1 Isothermas de adsorción de Fe(III) por EPS extraídas por EDTA

En este caso, se realizaron seis ensayos de adsorción de Fe(III) por parte de EPS de *Acidiphilium 3.2Sup(5)*, extraídas a través del método con EDTA, variando la concentración metálica inicial (50, 100, 200, 1000 y 2000 mg/L) y durante un tiempo de 1 h, lo que aseguraba las condiciones de equilibrio. Posteriormente, se calculó la capacidad de adsorción q_e correspondiente a cada uno de los ensayos mediante la ecuación [1.3] y los resultados se representaron frente a la concentración de equilibrio C_e (figura 3.24).

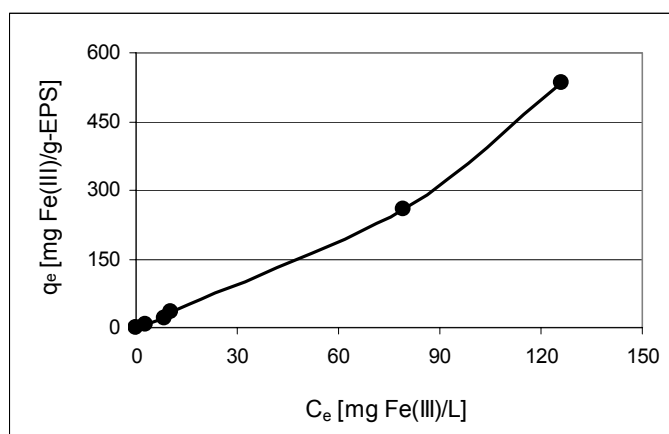


Figura 3.25 Isoterma de captación de Fe(III) por las EPS de *A. 3.2Sup(5)* extraídas por el método de EDTA.

De la citada figura se observa que a medida que aumentaba la concentración metálica, las sustancias poliméricas exudadas por las células de *A. 3.2Sup(5)* fueron capaces de captar una cantidad creciente de hierro. Esta tendencia puso de manifiesto que estas EPS no alcanzaron la saturación de sus grupos funcionales, por lo menos en el rango de concentraciones metálicas estudiadas, lo que reveló que la captación de Fe por estos exopolímeros respondía a reacciones físico-químicas complejas (Zhang *et al.*, 2006).

Este tipo de comportamiento podría ser acorde con las hipótesis del modelo de Freundlich que supone que no existe saturación de la biomasa y, por lo tanto, no hay valor límite en la capacidad de adsorción. Así pues, se pretendió comprobar si los resultados experimentales se ajustaban con exactitud al modelo linealizado de Freundlich, llegándose al trazado de la figura 3.25 de la que se extrajeron los datos que aparecen en la tabla 3.7 donde se observa que el coeficiente de regresión del modelo tiene un valor muy cercano a la unidad ($R^2 = 0.99$), lo que significa que los resultados se ajustaron en buena aproximación a los principios que postula dicho modelo.

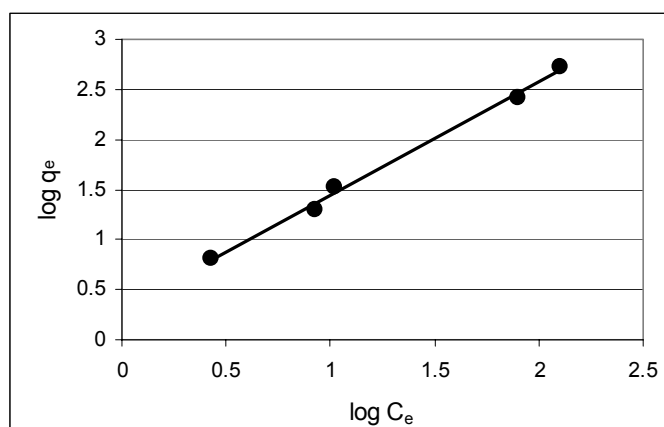


Figura 3.25 Isoterma de Freundlich de captación de Fe(III) por las EPS de A. 3.2Sup(5) extraídas por el método de EDTA.

Tabla 3.7 Constantes de Freundlich
Adsorción de Fe(III) por EPS extraídas con EDTA

K (mg ^{1-1/n} L ^{1/n} g ⁻¹)	1/n	R ²
2.031	1.134	0.99

Son numerosas las referencias bibliográficas que informan de estudios con resultados similares al analizado en este caso. Por ejemplo, McLean también encontró que la adsorción de Fe(III) por parte de polímeros capsulares de *Bacillus licheniformis* fue creciente con la concentración de hierro con una captación, en condiciones de equilibrio, que cumpliría con las condiciones del modelo de Freundlich (McLean *et al.*, 1990). Un resultado similar fue publicado en un trabajo de Aksu en el que muestra que la adsorción de este catión, y de Cr(VI), por parte de biomasa de *Chlorella vulgaris* cumple con las condiciones de este modelo (Aksu *et al.*, 1997). En el caso de otros metales, se cuenta con los trabajos de, por ejemplo, Zhang que informa un comportamiento ajustado al modelo de Freundlich en la captación de Cd²⁺ por parte de EPS extraídas de bacterias sulfato-reductoras (Zhang *et al.*, 2006), mientras que Moon reporta un comportamiento similar en la captación de Pb²⁺ y Zn²⁺ por parte de EPS del hongo *Pestalotiopsis sp.* (Moon *et al.*, 2006), al igual que Freire-Nordi que encontraron el mismo comportamiento en la adsorción de Mn²⁺ por parte de EPS de la cianobacteria *Anabaena spiroides* (Freire-Nordi *et al.*, 2005).

Sin embargo, en la bibliografía también se encuentran estudios en los que la utilización de sustancias exopoliméricas, como bioadsorbente, genera resultados que se ajustan

más adecuadamente al clásico modelo de Langmuir descrito anteriormente. Tal es el caso, por ejemplo, de la captación de Cu^{2+} por parte de las EPS de bacterias *Paenibacillus polymyxa* (Prado *et al.*, 2005), *Cyanospira capsulata* (De-Philippis *et al.*, 2007) y *Bacillus sp. F19* (Zheng *et al.*, 2008), respectivamente.

Además de lo anterior, la tabla 3.7 muestra que los valores de K y $(1/n)$ obtenidos, 2.031 y 1.134, respectivamente, fueron relativamente altos en relación a los informados con frecuencia en literatura (Freire-Nordi *et al.*, 2005; Moon *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Kiran and Kaushik, 2008), lo que es un reflejo de la alta aptitud en la capacidad de captación de Fe^{3+} por parte de estas sustancias, con respecto a otros resultados obtenidos con sustancias similares.

3.3.2.2 Isotermas de adsorción de Fe(III) por EPS extraídas por centrifugación

El comportamiento en la captación de Fe(III) por parte de estas EPS comentado en el apartado anterior, pudo estar condicionado por la presencia en los exopolímeros de contenidos residuales del reactivo usado en la extracción (EDTA). Este aminoácido, comúnmente sintetizado a escala industrial, contiene cuatro grupos carboxílicos y dos aminos, que lo convierten en un reactivo de muy buenas aptitudes quelantes. En la práctica, es ampliamente usado en la captación de iones metálicos di y trivalentes, formando complejos muy estables, especialmente, con Fe(III) , Pb(II) , Co(III) , Mn(II) y Cu(II) (Holleman and Wiberg, 2001). Por este motivo, se realizaron ensayos adicionales para discernir sobre el efecto que su utilización pudiera haber tenido en la capacidad de captación encontrada del exopolímero.

Para ello, se procedió a la determinación de la isoterma de adsorción de Fe(III) por parte de unas EPS extraídas ahora por centrifugación, método adoptado como control. Este método tiene la característica de que al no precisar la utilización de un reactivo químico, como es el caso del EDTA, ya que realiza la extracción sólo por el efecto físico de la acción de la fuerza centrífuga sobre la célula, es imposible que deje en los EPS ningún residuo que pudiera interferir en el proceso de adsorción. De este modo, la captación del metal por parte de las EPS extraídas por este método podría atribuirse, únicamente, a la actividad de los grupos funcionales del propio exopolímero. Además, como se ha visto, tanto en la literatura (Brown and Lester, 1980; Liu and

RESULTADOS Y DISCUSION

Fang, 2002b; Comte *et al.*, 2006) como en este trabajo (apartado 3.2.2), dicho método induce un relativamente bajo grado de lisis celular.

La isoterma de captación se determinó realizando tres ensayos, usando EPS extraídas por centrifugación bajo las condiciones anteriormente descritas. Las concentraciones iniciales de Fe(III) en la disolución fueron 200, 1000 y 2000 mg/L y el tiempo de interacción fue de 60 min. La isoterma así obtenida se muestra en la figura 3.26, la cual incluye, además, la obtenida usando las EPS extraídas por EDTA. Con ella se aprecia que las EPS extraídas por centrifugación, al igual que las extraídas por EDTA, muestran valores de capacidades de adsorción, q_e , que iban aumentando con la concentración del metal en equilibrio. Además, se observa que las EPS extraídas por EDTA mostraron una mayor capacidad de retención del metal que las extraídas por centrifugación, lo que permite sugerir que este método de extracción produjo unas EPS más adecuadas para la captación de Fe(III).

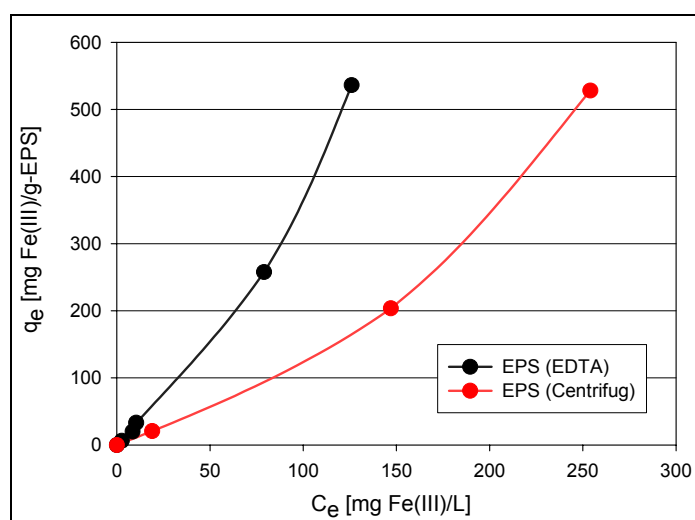


Figura 3.26 Isotermas de adsorción de Fe(III) por las EPS de *A. 3.2Sup(5)* extraídas por los métodos de EDTA y centrifugación.

Como se ha visto anteriormente, este tipo de comportamiento podría ser acorde con las hipótesis del modelo de Freundlich, por lo que, a continuación, estos resultados experimentales se ajustaron a dicho modelo en forma linealizada para comprobar su grado de ajuste (figura 3.27). Los parámetros correspondientes se muestran en la tabla 3.8.

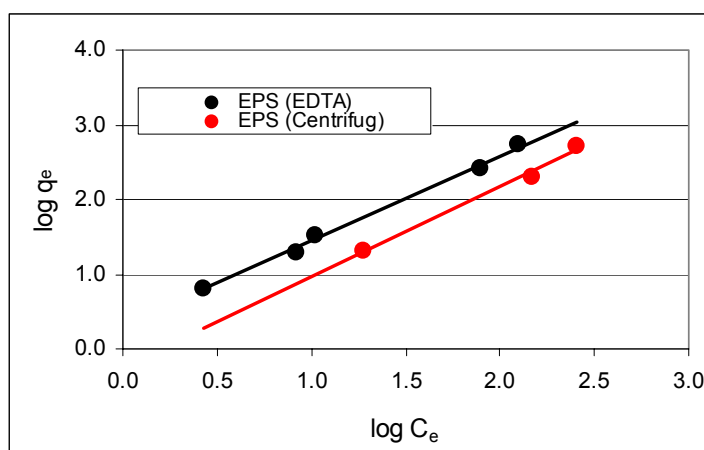


Figura 3.27 Isotermas de Freundlich de adsorción de Fe (III) por las EPS de A. 3.2Sup(5) extraídas por los métodos de EDTA y centrifugación.

Tabla 3.8 Constantes de Freundlich
Adsorción de Fe(III) por las EPS según el método extracción

Método	K (mg ^{1-1/n} L ^{1/n} g ⁻¹)	1/n	R ²
EDTA	2.031	1.134	0.99
Centrifugación	0.567	1.214	0.99

En primer lugar, de la tabla 3.8 se puede observar que los resultados de la adsorción de Fe(III) por las EPS extraídas por centrifugación tuvieron, al igual que ocurrió con las extraídas por EDTA, un muy buen ajuste con el modelo de Freundlich ($R^2 = 0.99$), lo que implica que la adsorción en este caso, también, cumplió con los postulados de dicho modelo. Además, con la citada tabla se puede observar que las constantes de Freundlich, calculadas para cada caso, tuvieron magnitudes que reflejaron el diferente comportamiento en la adsorción que presentaron ambas sustancias. Aunque los valores del parámetro ($1/n$), que mide la intensidad en la adsorción, fueron relativamente similares en ambos casos, la constante K, que mide la capacidad de captación de las exosustancias, fue mucho mayor en el caso de las exosustancias obtenidas por EDTA ($K = 2.031$), que en el de las extraídas por centrifugación ($K = 0.567$), reflejándose así numéricamente el diferente comportamiento observado en la figura 3.26.

Esta diferencia en la capacidad de captación podría atribuirse a la diferente estructura de las EPS extraídas por EDTA en relación a las extraídas por centrifugación, que como se discutió en el apartado 3.2, se debería a la eventual presencia en estas

exosustancias de residuos del reactivo utilizado en la extracción (EDTA), el que por sus conocidas aptitudes quelantes podrían intervenir de forma adicional en la captación del metal. Este aspecto se abordará más adelante en el apartado 3.3.3.

3.3.3 Caracterización de las EPS puras y con Fe(III)

Una vez constatado que las exosustancias extraídas, tanto por EDTA como por centrifugación, eran capaces de captar ión férrico, se decidió profundizar más en el estudio de estos procesos con su caracterización química y morfológica. Para ello, se recurrió a la liofilización durante 48 h a -56°C y a 1.2×10^{-6} Torr, de volúmenes conocidos tanto de EPS puras, que sirven como referencia, como de EPS conteniendo Fe(III), obtenidas de un ensayo de bioadsorción en el que la concentración inicial fue de 1000 mg/L de Fe(III) y el tiempo de interacción de 1 h. La caracterización de estos liófilos se realizó a través de un análisis superficial por microscopía electrónica de barrido (SEM), que incorporaba un microanálisis elemental por dispersión de energías de rayos X (EDX).

La figura 3.28 muestra micrografías SEM de liófilos de EPS puras, extraídas por EDTA y centrifugación, antes y después de haber captado Fe(III). En primer lugar, con la figura se puede apreciar como las EPS cambiaban de aspecto cuando captaban el hierro. En ambos casos, la fijación del hierro hizo que las EPS pasasen a tener un aspecto más compacto (imágenes b y d) que el que presentaba en ausencia del metal (imágenes a y c), esto es, las micrografías reflejan como la adsorción transformó superficialmente a las exosustancias haciéndolas más pastosas. El hierro, por tanto, influyó en la morfología del liófilo provocando también, posiblemente, modificaciones en su estructura.

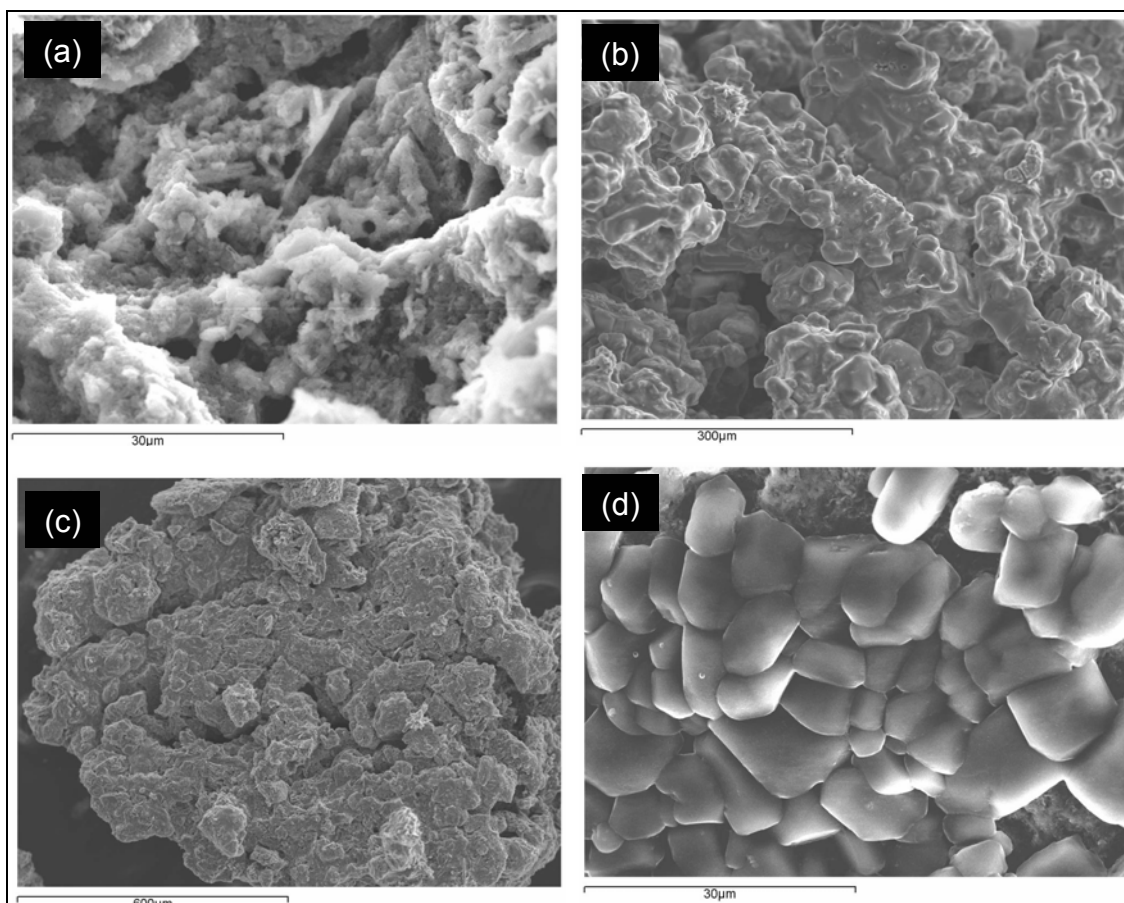


Figura 3.28 Micrografías SEM de EPS de *A. 3.2Sup(5)* extraídas por centrifugación: (a) sin Fe(III), (b) con Fe(III) y extraídas por EDTA: (c) sin Fe(III), (d) con Fe(III).

Adicionalmente, cuando se procedió a la realización del microanálisis EDS, en primer lugar para las EPS extraídas por centrifugación (figura 3.29), se comprobó que se producían nuevos cambios en la superficie de las exosustancias (micrografías a y b), en este caso asociadas al bajo punto de fusión de los polímeros orgánicos en estudio (Shackelford and Güemes, 1998). En cualquier caso, los resultados de dicho microanálisis (figura 3.29a) revelaron, claramente, la presencia de hierro lo que permitió confirmar los resultados obtenidos con los ensayos de adsorción. Otros elementos detectados, además de la presencia lógica de C y O, fueron el S, que provenía de la sal sulfatada que sirvió como aporte de hierro al sistema, y de K cuyo origen estaba en el medio con el que se cultivó el microorganismo.

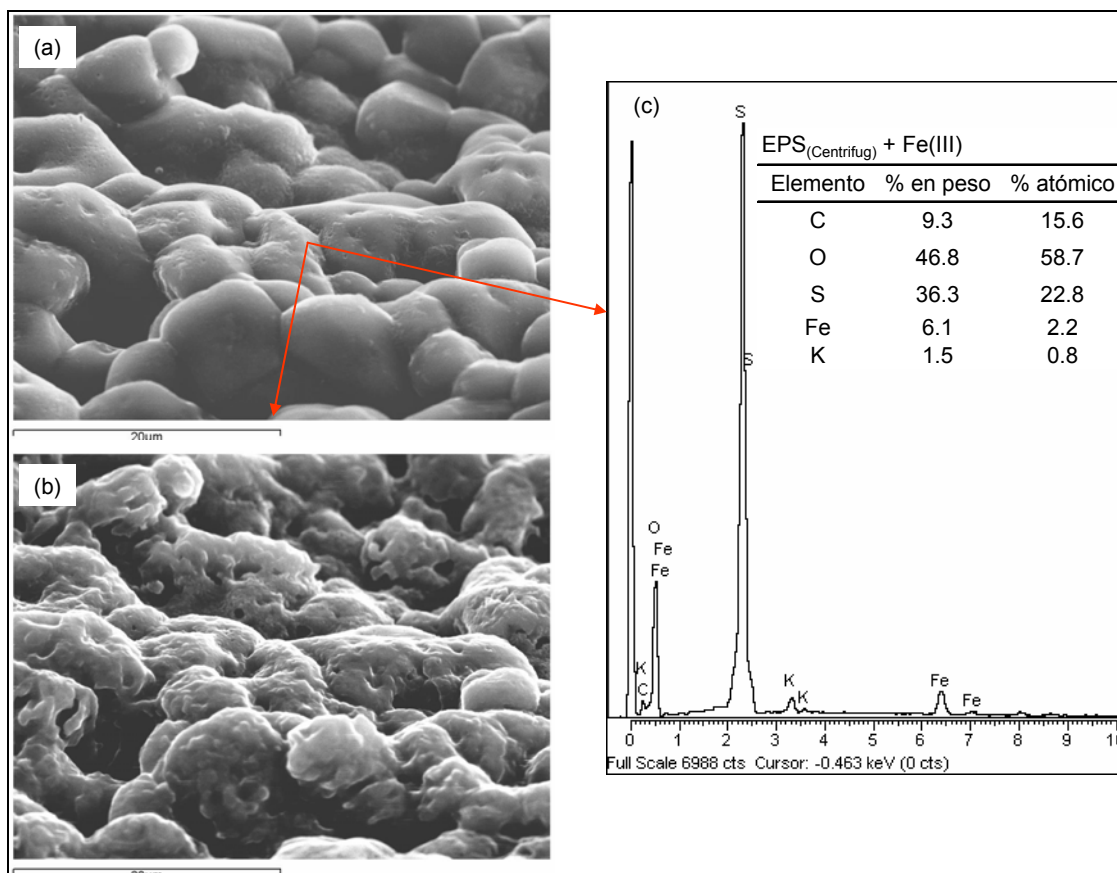


Figura 3.29 Micrografías SEM de EPS extraídas por centrifugación conteniendo Fe(III): (a) antes y (b) después del microanálisis; (c) espectro EDX.

Un análisis similar se realizó para el caso de las EPS extraídas por EDTA y cargadas con Fe (figura 3.30). La micrografía muestra más claramente el aspecto pastoso y gelatinoso de las EPS cargadas con Fe. En cuanto a la cuantificación elemental, se puede observar que la presencia de Fe resulta ser de un 12.7% en peso, mayor que la determinada para las EPS extraídas por centrifugación (6.1%), lo que está en línea con los resultados encontrado en los ensayos de adsorción.

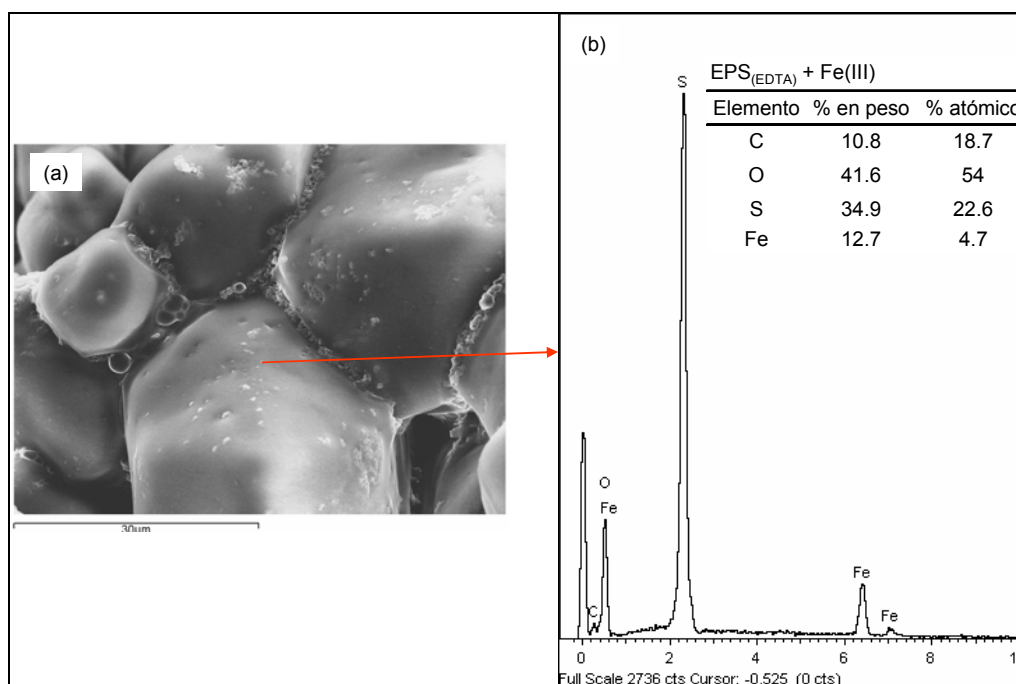


Figura 3.30 (a) Micrografía SEM de EPS extraídas por EDTA conteniendo Fe(III) antes del microanálisis; (b) espectro EDS correspondiente.

3.3.4 Adsorción de Fe(III) en presencia de soportes

Como se ha mencionado anteriormente, la pila de energía propuesta requerirá a la presencia simultánea, además de las EPS y cationes de Fe, de un electrodo de carbono, cuya superficie serviría en la práctica como soporte para el desarrollo de una biopelícula. Por este motivo, era necesario realizar un estudio adicional en el que se evaluaba la influencia de los soportes de carbono (fieltro y grafito) en la capacidad de adsorción de Fe(III) por parte de las EPS de la bacteria *A. 3.2Sup(5)*.

3.3.4.1 Isotermas de adsorción

Para el trazado de las isotermas de adsorción se utilizaron EPS de *A. 3.2Sup(5)* extraídas con EDTA. Las concentraciones iniciales fueron 50, 100, 200, 1000 y 2000 mg Fe(III)/L y, al igual que en casos anteriores, manteniendo la interacción de EPS-Fe durante 1h. Los resultados se muestran en la figura 3.31, que además incluye como referencia los valores de q_e obtenidos en los ensayos sin soporte a las mismas concentraciones iniciales.

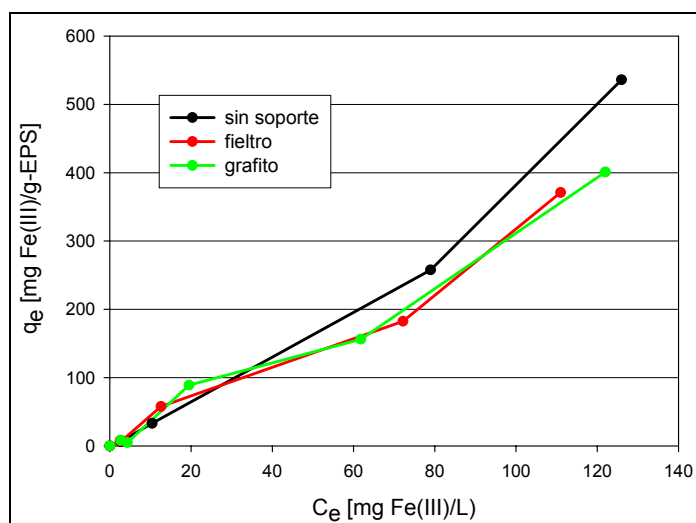


Figura 3.31 Isotermas de captación de Fe(III) por las EPS de *A. 3.2Sup(5)*, extraídas con EDTA, en sistemas sin y con soportes (fieltro de carbono y láminas de grafito).

La figura 3.31 muestra, en primer lugar, que las EPS mantuvieron, en presencia de ambos soportes, la misma tendencia de aumentar la adsorción de Fe(III) con el aumento de la concentración del metal en equilibrio, lo que significa que la presencia de un soporte no influyó en la capacidad de saturación de las EPS.

Un segundo aspecto que se puede apreciar con la citada figura es que, en función de la concentración de equilibrio del metal en el sistema, se observan dos tipos de comportamiento en cuanto a la capacidad de adsorción de las EPS. En un primer rango, desde 0 hasta 30 mg Fe(III)/L, se llegó a valores similares del coeficiente de adsorción q_e en los tres casos, la tendencia de dichos valores cambió con concentraciones metálicas en equilibrio mayores, puesto que con la citada figura se comprueba como los valores de q_e en los sistemas con soportes fueron, además de muy similares entre sí, claramente inferiores que aquellos obtenidos con las EPS en ausencia de soportes. Este comportamiento podría atribuirse a que, en ambos casos, una cierta fracción del Fe contenido en la disolución podría interactuar con la superficie del soporte provocando, por ejemplo, la formación de microprecipitados lo cual disminuiría la cantidad del Fe disponible para ser captado por las EPS. Este aspecto se analizará más adelante.

Anteriormente se comprobó que la adsorción de Fe(III) en ausencia de soportes cumplía claramente con los postulados del modelo de Freundlich, por lo que era de

RESULTADOS Y DISCUSION

esperar que las curvas de adsorción de las EPS en presencia de soportes, que tenían el mismo trazado, fueran también adecuadamente representadas por dicho modelo. Para verificar esto los datos de las isothermas de la figura 3.31 se ajustaron al modelo linealizado de Freundlich (figura 3.32) y sus parámetros se recogen en la tabla 3.9. Tales resultados corroboraron dicha hipótesis, aunque el grado de ajuste observado sin soporte fue ligeramente superior, fueron, también, muy aceptables los valores de R^2 utilizando soportes. En cualquier caso, con fieltro hubo un mayor ajuste ($R^2 = 0.98$) que con grafito ($R^2 = 0.94$)

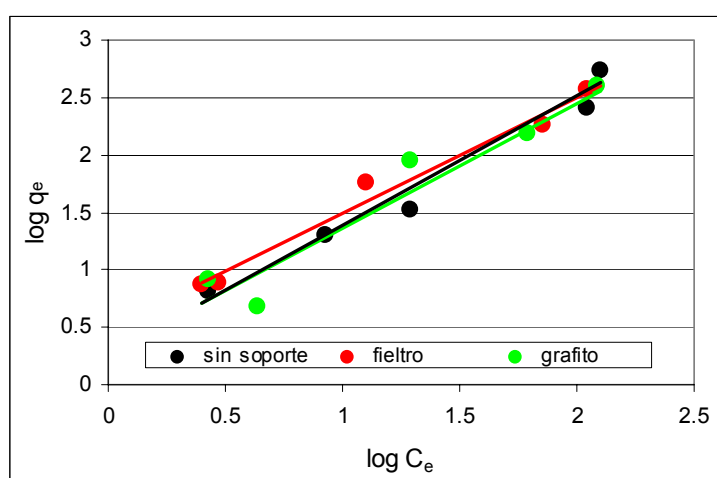


Figura 3.32 Isothermas de Freundlich de adsorción de Fe(III) por las EPS de *A. 3.2Sup(5)* en ausencia y presencia de soportes sólidos.

Tabla 3.9 Constantes de Freundlich
Adsorción de Fe(III) por EPS extraídas por EDTA

Tipo soporte	K ($\text{mg}^{1-1/n} \text{L}^{1/n} \text{g}^{-1}$)	1/n	R^2
Sin soporte	2.031	1.134	0.99
Fieltro	3.050	1.009	0.98
Grafito	1.833	1.127	0.94

3.3.4.2 Análisis de la influencia del soporte en la captación de hierro

En párrafos anteriores se planteó la posibilidad de que la presencia del soporte de carbono pudiera promover la eliminación del hierro de la disolución. Al respecto, en la literatura se ha publicado que soportes de este elemento, tales como el carbón activado, pueden adsorber hierro y otros metales pesados en cantidades que varían entre 0.05 y 0.15 mM de metal por gramo de carbón (Fuks *et al.*, 2006). Por ejemplo,

Johnson y Yang encontraron que añadiendo un 2% en peso de carbón activado a disoluciones de cobre que contenían hierro, podían inducir la hidrólisis y precipitación de hierro y, por tanto, su eliminación (Johnson and Yang, 1975). Además, en la literatura se encuentran trabajos que muestran que la superficie de materiales de carbono también pueden producir la adhesión bacteriana, según lo muestra el trabajo de Upadhyayula que estudió la cinética de adsorción superficial de células de *Bacillus subtilis* sobre nanotubos de carbono y carbón activado (Upadhyayula *et al.*, 2009).

Para dilucidar esta problemática, se realizaron nuevos ensayos en los que se pusieron en contacto soportes de fieltro y grafito con disoluciones de Fe(III), en ausencia y en presencia de EPS. Posteriormente, estos soportes fueron analizados superficialmente por microscopía SEM, por espectroscopía EDS y DRX.

(a) Sistema soporte-Fe. Las condiciones en las que se realizaron estos ensayos fueron las mismas que las usadas en las pruebas de adsorción en cuanto a las dimensiones de los soportes y el tiempo de interacción (1 h); la concentración del metal fue de 1000 mg/L. Las figuras 3.33 y 3.34 muestran los resultados obtenidos cuando se usó el fieltro y el grafito, respectivamente.

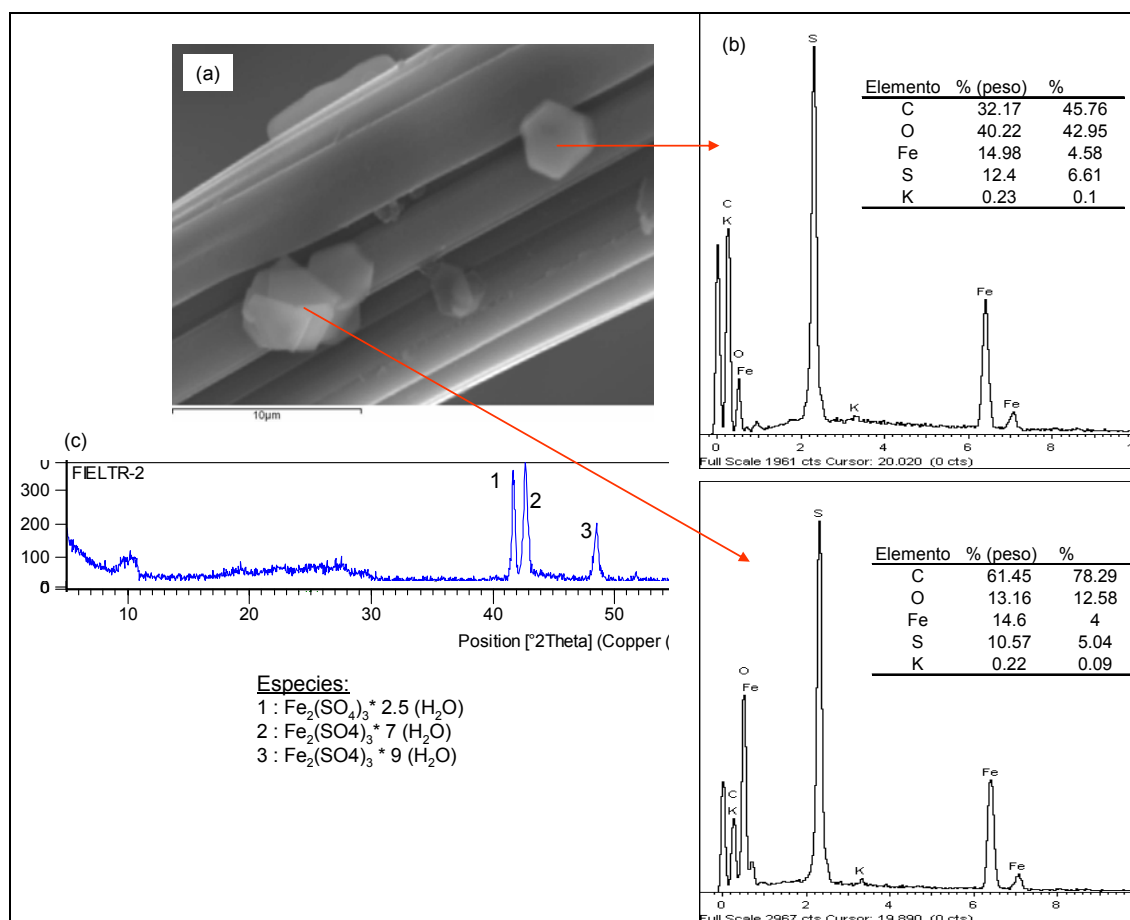


Figura 3.33 (a) Micrografía SEM de filamentos de l so porte de fie ltr o de carbono con la presencia de precipitados; (b) espectro EDX y (c) espectro DRX.

La micrografía 3.33(a) muestra la presencia de algunos cristales sobre la superficie de los filamentos del filtro de carbono, el microanálisis EDX a dos de ellos (registros 3.33b) confirmó la presencia de altos contenidos de Fe. Además de la lógica presencia del C (debido al propio soporte) se registraron también altos contenidos de S y O, por lo que sería lógico pensar que tales precipitados pudieran corresponder a sales férricas formadas a partir del sulfato de hierro agregado al sistema. Para confirmar esta posibilidad, se analizaron dichos precipitados por difracción de rayos (DRX) constatándose que se trataba de distintos tipos de sulfatos férricos hidratados.

De igual manera, cuando se utilizaron soportes de grafito, también se observó por SEM, la formación de precipitados sobre su superficie (figura 3.34).

RESULTADOS Y DISCUSION

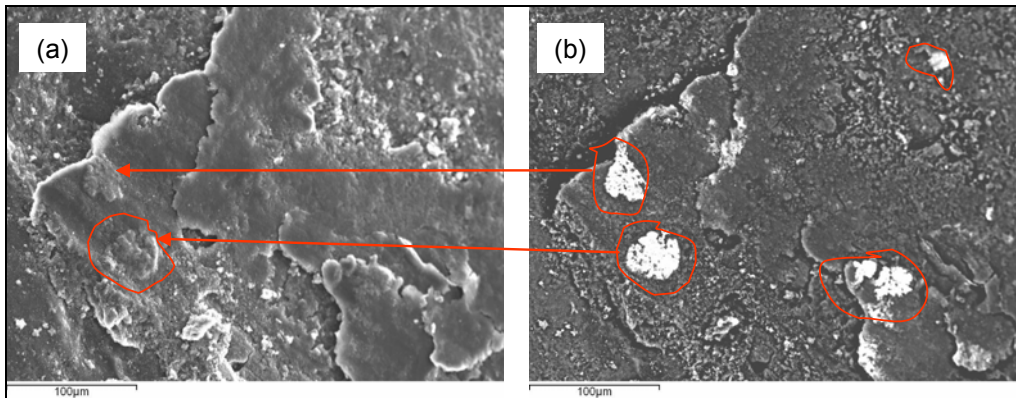


Figura 3.34 Micrografías SEM de la superficie de un soporte de grafito obtenidas por: (a) flujo de electrones secundarios y (b) retrodifusión de electrones.

De forma análoga al caso anterior, a uno de los precipitados de la superficie, identificado con un círculo en la micrografía (a) de la citada figura, se le realizó un análisis por EDX y DRX. Los resultados se muestran en la figura 3.35, donde también se incluye una micrografía ampliada del mencionado precipitado. Puede observarse que dicho precipitado contenía un importante porcentaje en peso de Fe, lo cual confirmó que el grafito, también, indujo a la retirada de parte del hierro de la disolución. La presencia, además del C que corresponde al propio soporte, de S y O estaría indicando que la partícula analizada podría corresponder a un hidrosulfato de hierro, lo que se corroboró con el espectro DRX.

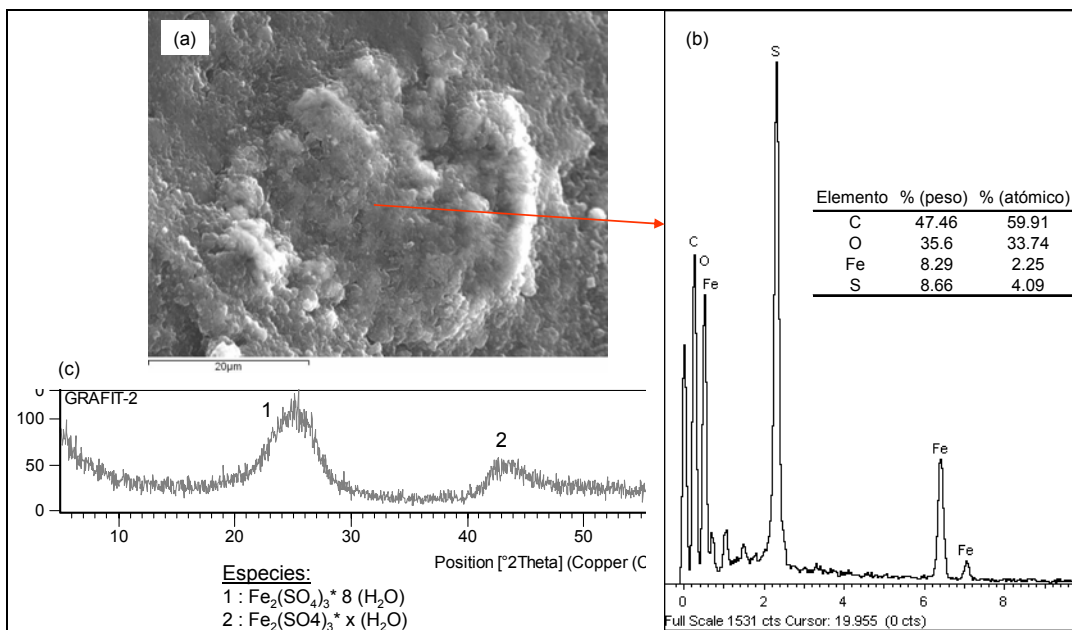


Figura 3.35 (a) Micrografía SEM de un precipitado formado en la superficie de un soporte de grafito; (b) espectro EDX y (c) espectro DRX.

RESULTADOS Y DISCUSION

Una vez confirmado que ambos soportes interactuaron con el hierro contenido en la disolución, habría que averiguar si este comportamiento se mantenía en el sistema soporte-EPS-Fe y, por tanto, condicionaba los resultados de los ensayos de adsorción.

(b) Sistema soporte-EPS-Fe. En este caso, fueron analizados soportes de fieltro y grafito, que habían permanecido sumergidos en el medio durante los ensayos de adsorción en los que la concentración de ión férrico inicial fue de 1000 mg/L. La figura 3.37 muestra los resultados correspondientes al soporte de fieltro; en ella se observa que al igual que ocurrió en ausencia de EPS, también se formaron precipitados, especialmente localizados entre los intersticios de los filamentos, cuyo espectro EDS reveló un significativo contenido, además de C, de Fe, S y O (figura 3.36).

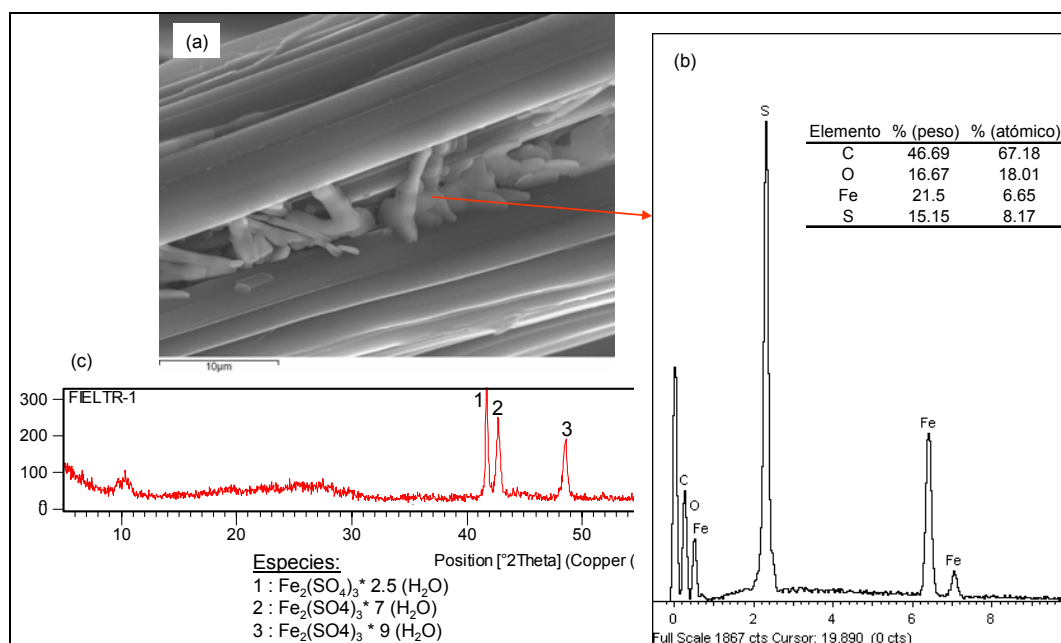


Figura 3.36 (a) Micrografía SEM de un precipitado formado en la superficie de un soporte de grafito; (b) espectro EDX y (c) espectro DRX.

La hipótesis de que en este caso, también, se trataba de hidrosulfatos fue confirmada por el análisis DRX. Estos resultados indican, entonces, que el fieltro interactuaba con el metal aún, incluso, en presencia de las exosustancias.

También se realizó la caracterización de un soporte de grafito utilizado en un ensayo de adsorción realizado en las mismas condiciones empleadas con el fieltro (figura 3.37).

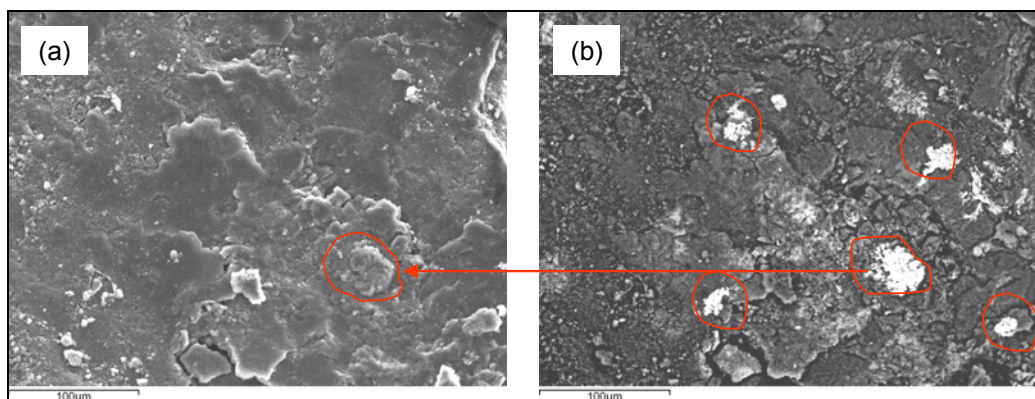


Figura 3.37 Micrografías SEM de la superficie de un soporte de grafito obtenidas por: (a) flujo de electrones secundarios y (b) retrodifusión de electrones.

Las micrografías de la citada figura muestran la presencia de precipitados sobre la superficie del grafito, cuyo posible contenido metálico se reveló más claramente por retrodifusión de electrones (figura 3.37b). El detalle de uno de ellos aparece en la micrografía de la figura 3.38(a), cuyo análisis por EDX (figura 3.38b) reveló un alto contenido en peso de Fe, S y O; el espectro DRX (figura 3.38c), nuevamente, confirmó que se trataba de hidrosulfatos férricos hidratados poco cristalinos.

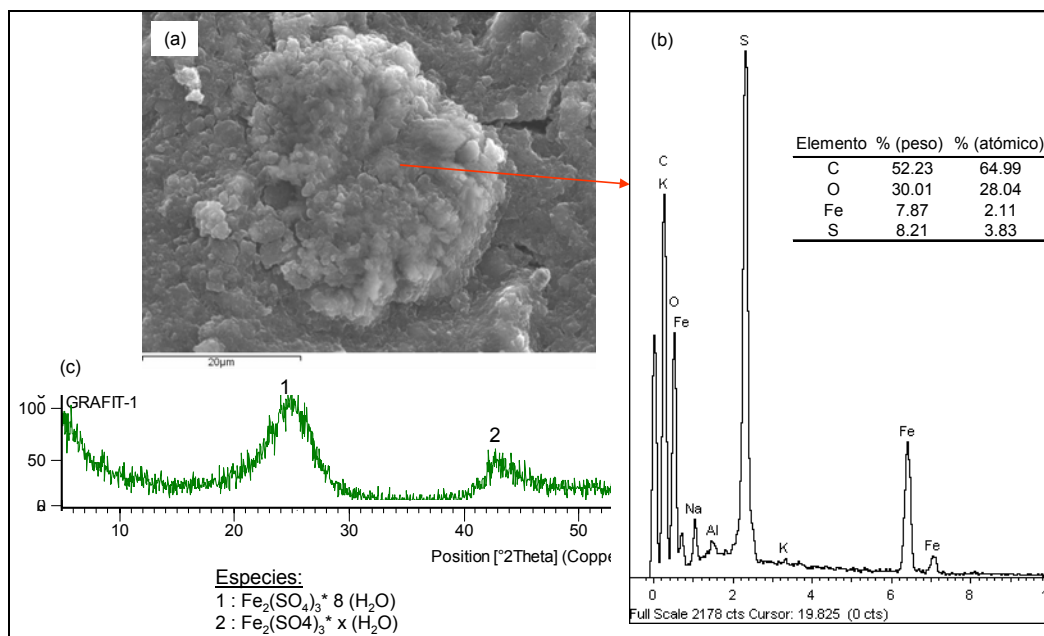


Figura 3.38 (a) Micrografía SEM de un precipitado formado en la superficie de un soporte de grafito; (b) espectro EDX y (c) espectro DRX del precipitado.

De los análisis anteriores se puede confirmar que ambos soportes, efectivamente, interactuaron con el hierro contenido en la disolución provocando la formación de

hidrosulfatos más o menos cristalinos, que se distribuyen espaciadamente en la superficie de cada soporte, según se puede apreciar de las figuras 3.33 y 3.36, en el caso del fielitro, y 3.34 y 3.37, en el caso del grafito, respectivamente. Además, de dichas figuras se puede observar que los precipitados se formaron preferencialmente en los intersticios de las microfibras y en irregularidades superficiales del grafito, respectivamente, replicando resultados de estudios similares publicados en la literatura (Kinzler et al., 2003; Friedrich et al., 2004; Sand and Gehrke, 2006).

La confirmación de que ocurre una interacción soporte-Fe validaría, entonces, la hipótesis que la relativamente menor captación del metal mostrada por las EPS en los ensayos en presencia de soportes en relación a los sin soporte (figura 3.31), se debió a una menor disponibilidad del metal en la disolución y no a un cambio en el comportamiento en la interacción entre las exosustancias y el metal.

3.3.5 Caracterización de los centros activos de la bioadsorción de Fe(III)

Una manera de averiguar el tipo de interrelación que se establece entre las sustancias exopoliméricas y los cationes de hierro es mediante el análisis de su estructura con y sin contenido del metal. Para ello se recurrió a la determinación de los grupos funcionales involucrados en la captación metálica. En este sentido, son numerosos los grupos que se han descrito como centros activos en la retención de iones metálicos: hidroxilo, carboxilo, amina, amida, sulfonato y fosfonato, entre otros (Volesky, 2003). Para su identificación, se recurrió, nuevamente, a la espectroscopía de infrarrojo mediante transformada de Fourier (FTIR) debido a que se cuenta con una amplia disponibilidad de referencias sobre el empleo de esta técnica, lo cual facilita enormemente la interpretación de los resultados (Schmitt and Flemming, 1998; Omoike and Chorover, 2004; Kang et al., 2006; Parikh and Chorover, 2006). Además, su utilización permitirá comparar la estructura de las sustancias poliméricas extracelulares antes de la interacción, ya determinada en el apartado 3.2, con la que tuvieron después de la captación metálica, lo que facilitaría la identificación de los grupos funcionales presentes responsables de ello.

La información publicada en la literatura recoge que el principal mecanismo involucrado en la captación de Fe por biomasas de *Sargassum sp.* (Figueira *et al.*, 1999), de *Streptomyces rimosus* (Selatnia *et al.*, 2004) o *Acidiphilium cryptum* (Bilgin *et al.*, 2004), entre otras, es el intercambio de los protones asociados a los grupos funcionales involucrados y, dado que el enlace que se establece entre el metal y el grupo funcional puede ser más débil que el establecido entre el grupo funcional y el hidrógeno, la energía necesaria para excitarlo en el primer caso sería menor que en el segundo. Por esta razón, el pico del espectro de infrarrojos correspondiente al grupo funcional unido al metal se presentaría desplazado a la derecha con respecto al original, es decir, hacia zonas de menor longitud de onda. De este modo, con el fin de determinar el o los grupos funcionales responsables de la unión con el hierro, bastaría, en este caso, con comparar el espectro de la biomasa sin el metal adsorbido con el de la biomasa con el metal adsorbido, verificando los posibles desplazamientos.

3.3.5.1 Espectros FTIR de EPS extraídas por EDTA

En primer lugar, la figura 3.39 muestra los espectros de infrarrojo de sustancias exopoliméricas, extraídas con el uso de EDTA, con y sin contenidos de Fe(III); lógicamente, el de las EPS puras, ya presentado en la figura 3.10, también aquí se incluye como referencia para poder determinar el impacto producido con la incorporación del metal en su estructura.

En primera instancia, con la figura 3.39 se puede observar que aunque ambos espectros muestran algunas bandas coincidentes, en el espectro de las EPS con Fe(III) se registran ciertos desplazamientos en una serie de bandas concretas que se pueden atribuir a la interacción de los grupos funcionales de las exosustancias con el metal. En este sentido, se pueden mencionar las bandas presentes en el espectro de las EPS puras a 1728 y 1101 cm^{-1} , las cuales aparecen desplazadas a la derecha en el correspondiente a las EPS con el hierro (a 1716 y 1073 cm^{-1} , respectivamente). Estas bandas son adjudicadas normalmente en la literatura a la vibración asimétrica de estiramiento del enlace C=O en el grupo carboxílico (Schmitt and Flemming, 1998; Guibaud *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2004; Parikh and Chorover, 2006) y a la vibración de estiramiento del grupo hidroxilo -O-H (Jiang *et al.*, 2004; Omoike and Chorover, 2004; Comte *et al.*, 2006; Tan and Xiao, 2008), respectivamente. Su desplazamiento

RESULTADOS Y DISCUSION

confirmaría la participación preferente de estos grupos funcionales en la unión del metal. De hecho, en la literatura son frecuentes los autores que involucran a estos grupos en la captación metálica por este tipo de biomasa (Smith and Ferris, 2003; Selatnia *et al.*, 2004; Fuks *et al.*, 2006; Tian, 2008; Ueshima *et al.*, 2008; Acharya *et al.*, 2009).

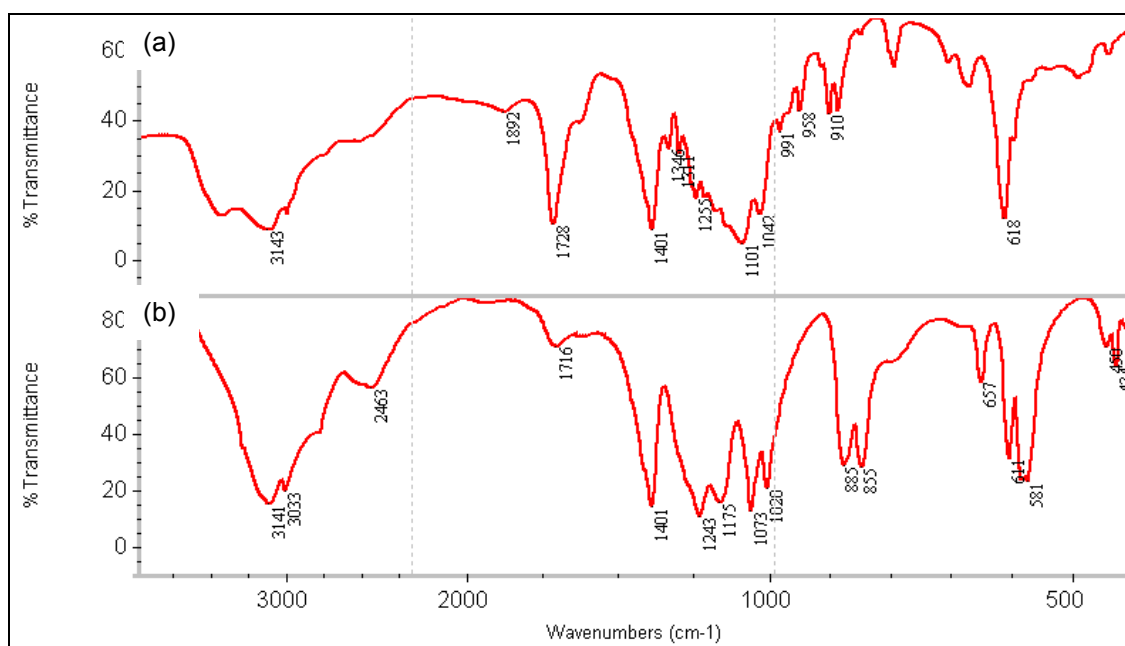


Figura 3.39 Espectros FTIR de EPS extraídas con EDTA de cultivos de *A. 3.2Sup(5)*: (a) EPS puras y (b) [EPS + Fe(III)].

Normalmente, el grupo carboxílico (-COOH) o alguno de sus derivados como los carboxilatos (-COO⁻), presentan dos picos en los espectros infrarrojo: uno en el rango de 1600 a 1800 cm⁻¹, que hace referencia a la vibración del enlace C=O, y otro, en torno a 1400 cm⁻¹, que hace referencia a la vibración de deformación del enlace C-O en el grupo carboxilato. Un menor tamaño de este segundo pico indicaría una mayor relación carboxilo/carboxilato, mientras que con un tamaño mayor reflejaría una mayor proporción de carboxilatos en relación a la de carboxilos. Con la figura 3.40 se aprecia que ambos picos pasan de una intensidad parecida en el caso de las exosustancias puras (similar proporción de ambos grupos), a una en la que la intensidad del pico que hace referencia al grupo carboxilo se hace mucho menos intensa (menor proporción relativa de carboxilos), lo que puede considerarse como una prueba adicional de la interacción de este grupo en la captación del metal.

RESULTADOS Y DISCUSION

Una banda muy interesante, aunque de una relativa baja intensidad, es la que aparece en el espectro con contenido de Fe(III) a una frecuencia de 1243 cm^{-1} . Esta banda se puede asociar a la vibración de deformación de C=O en el grupo carboxílico o a la vibración de tensión de -OH en fenoles, los cuales serían indicadores de la presencia en los exopolímeros de ácidos orgánicos y sustancias húmicas (Guibaud *et al.*, 2003). Esta banda también se puede adjudicar a otro tipo de sustancias, tales como los ácidos nucleicos provenientes de las células lisadas en la extracción de las EPS. Específicamente, para polímeros similares a los de este caso, dicha banda puede corresponder al estiramiento asimétrico de P=O en el grupo fosfonato (PO_2^-), que habría interactuado con el Fe (Omoike and Chorover, 2004).

En la zona característica del espectro, es decir, a una frecuencia inferior a 1000 cm^{-1} , se aprecia que en las EPS con Fe aparecen dos picos en el rango de $855\text{ a }885\text{ cm}^{-1}$, que podrían corresponder al desplazamiento de las bandas que aparecen en el rango de $910\text{ a }920\text{ cm}^{-1}$ en el caso de las EPS puras. Aunque en este rango de frecuencias las bandas son, normalmente, difíciles de adjudicar, la frecuencia e intensidad de estos picos permiten, en este caso, atribuirlos a la presencia de ésteres de S ($\text{S-OR}'$); donde R' es una cadena orgánica que habría, también, interactuado con el metal. Un resultado similar es informado por Fourest y Volesky en un trabajo en el que muestran la importante capacidad de este grupo activo (y de los alginatos) en la bioadsorción de metales pesados usando biomasa de *Sargassum sp.* (Fourest and Volesky, 1995). Específicamente, en cuanto a la relación del grupo sulfonato con el Fe, destacan los resultados publicados en un trabajo de Figueira que muestra la fuerte actividad de este grupo, proveniente de biomasa de *Sargassum fluitans*, en la formación de complejos de Fe(II) y Fe(III) (Figueira *et al.*, 1999).

Por su parte, las bandas presentes en la denominada región de polisacáridos del espectro ($1000\text{ a }1100\text{ cm}^{-1}$), relacionadas con sustancias extracelulares como representativas de la vibración de estiramiento del enlace C-O en el grupo éter (C-O-C) y en el grupo C-O-P, muestran una cierta modificación que pudiera indicar que estos grupos podrían haber estado implicados en la captación del metal (Schmitt and Flemming, 1998; Omoike and Chorover, 2004, 2006); sin embargo, no se observan desplazamientos significativos por lo que podría pensarse que no intervinieron directamente en el proceso de adsorción.

RESULTADOS Y DISCUSION

Finalmente, en ambos espectros se aprecian bandas en el rango entre 3140 y 3180 cm^{-1} , que son típicas de los espectros de este tipo de sustancias y se pueden atribuir a la vibración de estiramiento del grupo $-\text{O}-\text{H}$, correspondiente a polisacáridos o bien a ciertos contenidos de humedad residual en los exopolímeros (Schmitt and Flemming, 1998; Omoike and Chorover, 2004; Comte *et al.*, 2006).

En resumen, del análisis anterior se podría concluir que la captación de Fe(III) por parte de las EPS extraídas por EDTA, fue realizada esencialmente a través del grupo funcional carboxilo, con la mediación adicional de los grupos fosfonatos y sulfonatos. La magnitud de la participación de cada uno de estos grupos en la captación total, dependería de la concentración de cada uno de ellos en la biomasa, lo cual se abordará en el apartado 3.3.6. Las principales bandas de los espectros antes analizados se resumen en la tabla 3.10.

Tabla 3.10 Principales bandas de espectros $\text{EPS}_{(\text{EDTA})}$ sin y con Fe(III)

Banda (cm^{-1})	Asignación y descripción de las bandas
1720 - 1740	ν_{as} de $\text{C}=\text{O}$ en grupo carboxílico
1400 - 1410	δ_{s} de $\text{C}-\text{O}$ en carboxilatos
1230 - 1260	ν_{as} de $\text{P}=\text{O}$ de grupo fosfonato
850 - 890	ν_{s} $\text{S}-\text{O}$ en ésteres de S ($\text{S}-\text{OR}$)

ν_{s} , vibración tensión simét.; ν_{as} vibración tensión asimét.; δ_{s} , vibración deformación

Como se ha mencionado, en la literatura se encuentran trabajos que recogen la participación del grupo carboxilo en la captación de metales pesados, en general, y de hierro, en particular, a través de la formación de diferentes productos que varían en función del tipo de biomasa. Por ejemplo, Smith y Ferris informan que este grupo fue el principal responsable de la captación de Fe(III) por parte de células de *Shewanella putrefaciens* a través de la formación de hidróxidos en su superficie (Smith and Ferris, 2003). Por su parte, Corzo encontró que este grupo estuvo involucrado en la formación de carboxilatos de Fe(III) por parte de las EPS de *Bradyrhizobium Chamaecytisus* (Corzo *et al.*, 1994); resultados similares fueron los encontrados por Figueira, utilizando biomasa de *Sargassum fluitans* (Figueira *et al.*, 1999) y por Selatnia, con biomasa de la bacteria *Streptomyces rimosus* (Selatnia *et al.*, 2004). En cuanto a otros metales, Acharya encontró que este grupo, junto las amidas, fueron los principales

responsables de la captación de uranio (VI) por parte de cultivos de *Synechococcus elongatus* a través de la formación de carbonatos hidratados (Acharya *et al.*, 2009).

3.3.5.2 Espectros FTIR de EPS extraídas por centrifugación

Como ya se ha visto, uno de los principales grupos funcionales involucrados en la captación del hierro fue el grupo carboxilato asociado a la desprotonación del grupo carboxílico. En el caso de la extracción con EDTA, este grupo pudo provenir, además del propio exopolímero, de contenidos residuales del propio reactivo (EDTA) que no hubieran sido totalmente eliminados en la purificación por dialización. De esta manera, el uso de este método de extracción podría haber influido decisivamente en el tipo de interacción establecido entre el exopolímero y el catión de hierro. Para analizar este aspecto, la figura 3.40 muestra los espectros de infrarrojo de exopolímeros conteniendo Fe(III), considerando los dos métodos de extracción evaluados: EDTA y centrifugación.

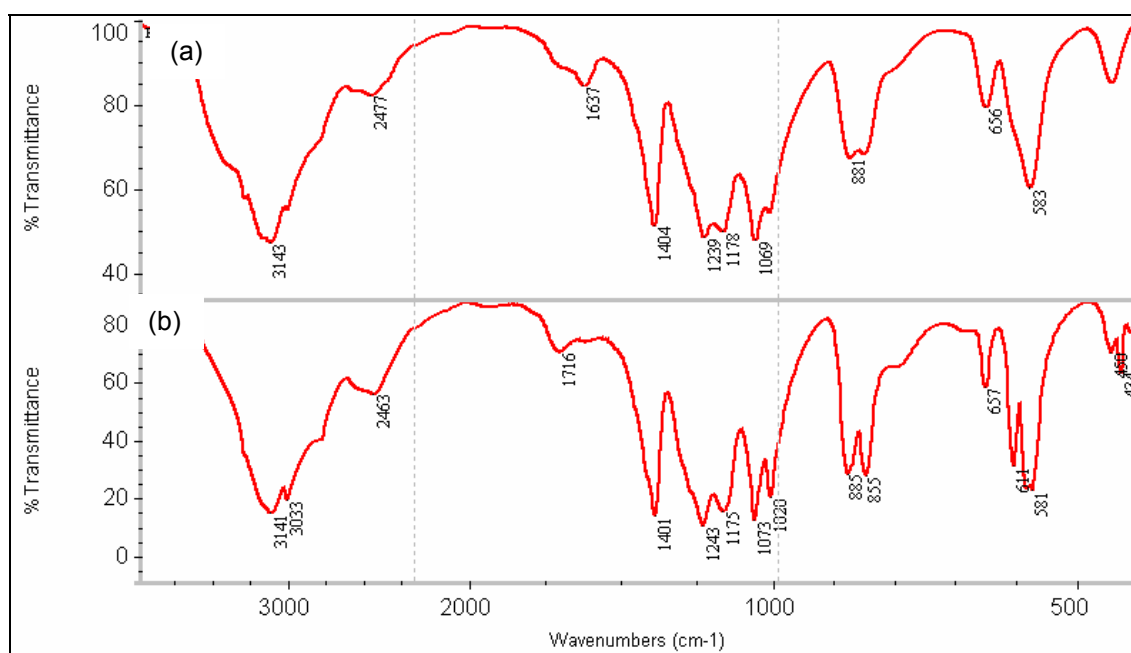


Figura 3.40 Espectros FTIR de EPS con Fe(III) extraídas por: (a) centrifugación y (b) EDTA.

La figura 3.40 permite apreciar que los espectros presentaron bandas similares pero con intensidades distintas. En efecto, en ambos casos se observa la presencia de bandas en valores de 3140 (grupo hidroxilo -OH), 1400 (grupo carboxilato -COO⁻), 1240 (grupo fosfonato P O₂⁻), 1070 (grupo -C-O-C) y 850-880 cm⁻¹ (grupo sulfonato S-OR'). La ligera diferencia detectada en el espectro está en la región de los

polisacáridos, que en el caso de las EPS extraídas por EDTA conteniendo Fe(III) aparece una banda de baja intensidad a 1020 cm^{-1} que no se registra en las de las EPS extraídas por centrifugación; estos cambios no hacen pensar que sean debidos al fenómeno de la captación del metal sino más bien a una manifestación específica de los polisacáridos contenidos en estas exosustancias.

En general, la similitud entre ambos espectros se puede interpretar en términos de que una eventual presencia adicional de residuos de carboxilatos provenientes del EDTA en los exopolímeros, no afectó al tipo de interrelación que se establecía entre estas sustancias y los cationes de hierro, ya que no parece cambiar, sustancialmente, la estructura de las exosustancias conteniendo a este metal. Lo anterior podría sugerir que la captación de Fe(III) por ellas se realizó, esencialmente, a través de los mismos grupos funcionales (carboxilos, fosfonato y sulfonato).

3.3.6 Valoración ácido-base de las EPS

La determinación del comportamiento ácido-base de una biomasa puede aportar información muy relevante en relación con el mecanismo de captación de los cationes metálicos por parte de ésta, ya que permite valorar la posibilidad de intercambio entre los protones liberados por ella y los cationes metálicos presentes en disolución. Todo ello está relacionado con la disociación ácida progresiva de los grupos funcionales y, por tanto, de sus constantes de ionización. En función de éstas, se pueden distinguir tres tipos de comportamiento ácido (Naja and Mustin, 2005):

- (i) Grupos ácidos fuertes: atribuidos a la presencia de una importante disociación a $\text{pH} < 4$, tales como los grupos fosfónico y sulfonato.
- (ii) Grupos ácidos débiles: entre los que puede destacarse el grupo carboxilo y algunos grupos proteínicos, disociables entre $\text{pH} 3$ y 6 , aproximadamente.
- (iii) Grupos ácidos muy débiles: tales como los grupos fenólicos y amino, disociables sólo a $\text{pH} > 7$.

RESULTADOS Y DISCUSION

Con el análisis realizado por espectroscopia de infrarrojo, se determinó que los grupos de la biomasa que tenían una participación más importante en la captación del hierro, fueron los carboxilos y sulfonatos. Debido a la presencia de estos grupos, se podía considerar que la biomasa pudiera tener propiedades de ácido, variando entre fuerte y débil, por lo que podría ser valorada mediante una base.

La disociación parcial de un ácido en disolución se puede expresar según la ecuación siguiente:



La constante de equilibrio de esta reacción se relaciona con el pH a través de la ecuación de Henderson-Hasselbalch, a partir de la cual se puede calcular el pK_a con los valores de pH, tal y como se muestra a continuación:

$$K_a = \frac{[\text{A}^-][\text{H}^+]}{[\text{HA}]} \Rightarrow \log K_a = \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} + \log [\text{H}^+] \quad [3.2]$$

$$-\log [\text{H}^+] = -\log K_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad [3.3]$$

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad [3.4]$$

De este modo, cuando la concentración de la biomasa desprotonada (A^-) es igual a la de la protonada (HA), lo que se conoce como punto de semiequivalencia, su cociente sería igual a la unidad, por lo que es posible afirmar que el pK_a coincide con el pH en dicho punto. No obstante, habría que calcular, en primer lugar, el punto de equivalencia que se sitúa en el punto de inflexión de la curva de valoración, a partir del cual ya se puede conocer el punto de semiequivalencia que corresponde a la posición en la curva en la cual el volumen de valorante es la mitad que el del punto de equivalencia. El pH correspondiente a este punto de semiequivalencia coincidiría en valor numérico con el del pK_a .

RESULTADOS Y DISCUSION

Las figuras 3.41 y 3.42 muestran las curvas de valoración de las EPS extraídas por los métodos de EDTA y centrifugación, respectivamente. En cada caso puede observarse tanto la evolución del pH cuando se fueron añadiendo alícuotas de NaOH 0.1 M sobre 5.0 mL de la disolución de EPS purificada por dialización, como los valores que iba teniendo la pendiente de la curva de valoración obtenida.

En primer lugar, en la figura 3.41 se aprecia que el punto de inflexión de la curva, que se corresponde con el de la máxima pendiente, se situaba en un valor de pH de 7.2, el cual correspondería al punto de equivalencia de las EPS extraídas por EDTA. Este punto se consiguió con un gasto volumétrico de valorante de 220 μL , por lo que el punto de semiequivalencia se lograría con la mitad de este volumen, es decir, con 110 μL . El pH en este punto de semiequivalencia tenía un valor aproximado de 3.05, el cual correspondería, a su vez, con el valor del pK_a de estas EPS.

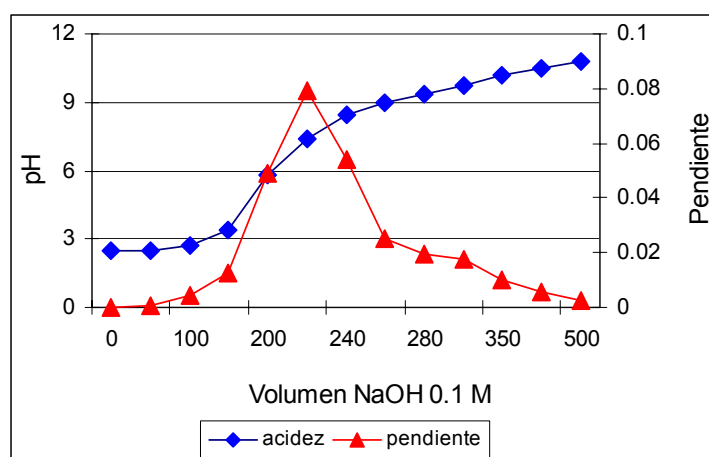


Figura 3.41 Curva de valoración ácido-base de EPS extraídas con EDTA.

Por su parte, en la figura 3.42 el punto de inflexión de la curva se encontraba en torno a un valor de pH de 8.5, el que correspondería al punto de equivalencia de las EPS extraídas por centrifugación. El gasto de valorante en este caso fue de 180 μL , por lo que el punto de semiequivalencia se lograría con un volumen de 90 μL , para el que el pH, y por tanto el pK_a de esta biomasa, tuvo un valor en torno a 2.95.

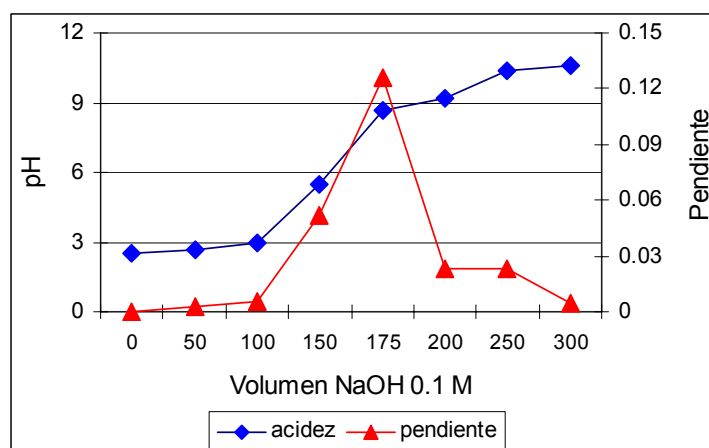


Figura 3.42 Curva de valoración ácido-base de EPS extraídas por centrifugación.

Los valores de pK_a - cercanos a 3.0 - determinados para ambos tipos de EPS, son usualmente adjudicados, en la literatura, al grupo carboxilo. Por ejemplo, Ueshima et al. en una valoración de EPS obtenidas por medio de una extracción enzimática de cultivos de *Pseudomonas putida*, determinó que el pK_a del grupo carboxilo se encontraba en torno a 3.2 (Ueshima et al., 2008). Por su parte, Smith y Ferris en un estudio con EPS extraídas de cultivos de *Shewanella putrefaciens* obtuvieron, para este grupo funcional, un valor de pK_a cercano a 3.3 (Smith and Ferris, 2003). Un valor algo superior a los anteriores es el informado por Liu y Fang quienes llegaron, para EPS extraídas por centrifugación desde una biopelícula de bacterias sulfatoreductoras, a un valor de pK_a de 4.0 (Liu and Fang, 2002a). Por otro lado, en un estudio relacionado con la adsorción de Cd y Pb por la superficie de células de *Acidiphilium angustum*, bacteria del mismo género que *Acidiphilium 3.2Sup(5)*, Ginn y Fein encontraron un pK_a del grupo carboxilo de 3.1 (Ginn and Fein, 2008). Todos estos valores de pK_a se encuentran dentro del rango que Volesky, en un texto clásico en la materia, atribuye como representativo para este grupo funcional (pK_a entre 1.7 y 4.7) (Volesky, 2003).

De la discusión anterior parece razonable concluir entonces que, independientemente del método de extracción, las EPS obtenidas de cultivos puros de *A. 3.2Sup(5)* estaban constituidas mayoritariamente por el grupo carboxilo.

3.3.7 Especiación de Fe(III) en las condiciones del sistema

En la literatura se puede encontrar una gran cantidad de trabajos que abordan la especiación del hierro en sistemas acuosos (Beverskog and Puigdomenech, 1996; Meruane and Vargas, 2003; Casas *et al.*, 2005; Génin *et al.*, 2006), aunque la gran mayoría de estos corresponden a sistemas netamente químicos, es decir, representan a sistemas abióticos en los que la evolución de las propiedades es atribuible sólo a cambios físico-químicos de origen inorgánico. Sin embargo, no son tan frecuentes los estudios de especiación en sistemas bioquímicos como los de este trabajo, es decir, sistemas en los que participen microorganismos y/o sus metabolitos, lo que dificulta, de alguna manera, la interpretación de los resultados obtenidos.

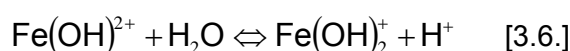
El hierro aparece en disoluciones acuosas ácidas, principalmente, en estados de oxidación (II) y (III) (Daoud and Karamanev, 2006; Mousavi *et al.*, 2007) y se puede presentar como iones libres (Fe^{2+} , Fe^{3+}) y como complejos hidrolizados. La concentración de estas especies es fuertemente dependiente de la composición y la temperatura de la disolución, ya que en función de estos parámetros se pueden formar una gran cantidad de precipitados tales como: óxidos, hidróxidos, jarositas e hidroxisulfatos en general (Holleman and Wiberg, 2001; Génin *et al.*, 2006).

Para sistemas ácidos como los de este trabajo, en los que el hierro se agrega como sulfato hidratado, los complejos más probables que se pueden formar a partir de los iones mayoritarios (Fe^{3+} , H^+ y SO_4^{2-}) son los siguientes: HSO_4^- , $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2^-$ y FeSO_4^+ (Holleman and Wiberg, 2001). Otros posibles complejos que se podrían formar entre el anión bisulfato y el catión de hierro, tales como FeHSO_4^+ y FeHSO_4^{2+} , no son demasiado probables según la información bibliográfica. Por ejemplo, Tremaine al estudiar el sistema $\text{Fe-H}_2\text{O-H}_2\text{SO}_4$ por medio de espectroscopia Raman, no encontró evidencia de que hubiera una interrelación entre el HSO_4^- y los cationes de hierro, concluyendo que el anión bisulfato no es un anión complejante de este metal (Tremaine *et al.*, 2004). Estos resultados fueron posteriormente confirmados por Casas en un trabajo en el que estudió la especiación de Fe(II) y Fe(III) en un sistema acuoso ácido (Casas *et al.*, 2005).

RESULTADOS Y DISCUSION

De esta manera, el catión férrico podría encontrarse en el sistema como ión libre que, a su vez, podría estar parcialmente hidrolizado o bien como un complejo de sulfato. Al respecto, se puede comentar que Casas, en el trabajo antes mencionado, encontró que las especies predominantes en una disolución con concentraciones de Fe^{3+} inferiores a 2.0 g/L, fueron el protón libre H^+ , el anión bisulfato HSO_4^- y el catión férrico; además, el citado trabajo también plantea la posible formación del complejo $\text{FeH}(\text{SO}_4)_{2(\text{aq})}$ pero sólo a partir de concentraciones de Fe^{3+} superiores a 10.0 g/L (Casas *et al.*, 2005); lo que excede claramente a los valores utilizados en los ensayos del presente estudio (concentración inicial de 1.0 g/L de Fe^{3+}).

En medio ácido, el ión férrico se puede mantener en disolución, aunque con un aumento en el pH tiende a hidrolizarse rápidamente, según la secuencia indicada por las ecuaciones [3.5], [3.6] y [3.7] de más adelante. El hidróxido férrico, $\text{Fe}(\text{OH})_3$, precipita a partir de valores de pH cercanos a 3.5, acentuándose este tipo de comportamiento en la medida en que la acidez del sistema se acerca a la neutralidad, condición en la que el catión se encontraría masivamente precipitado, ya sea como hidróxido o, dependiendo de la composición del sistema, como jarosita u otro tipo de oxihidrosulfato.



En este caso, para las condiciones de trabajo utilizadas, es decir, pH entre 2.0 y 2.3 y concentraciones de hierro de 1.0 g/L (o 0.018 M) de Fe(III), en la literatura se recogen publicaciones que informan que el hierro se encontraría hidrolizado preferencialmente como $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$. Por ejemplo, Tuner y Miles plantean que a concentraciones de hierro en el rango de 0.1 a 10 g/L de Fe^{3+} , la única reacción de hidrólisis a considerar sería la de formación de $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ (Turner and Miles, 1957). Por su parte, Stefansson en un trabajo en el que también se estudiaba la hidrólisis de Fe(III) en sistemas con baja concentración de hierro férrico, entre 0.001 y 0.1 M y a temperatura ambiente, encontró que en el rango de pH de 2.0 a 2.5, el catión se encontraba principalmente como $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ y en menor medida como Fe^{3+} libre (Stefansson, 2007).

Por todo lo anterior, se puede, razonablemente, concluir que en las condiciones en las que se realizaron los ensayos de adsorción, el hierro se encontraría preferentemente hidrolizado como $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$, forma bajo la cual sería con la que interactuaría con los grupos funcionales del exopolímero.

3.3.8 Mecanismo de adsorción de Fe(III) por las EPS

A continuación, se plantea el desarrollo y formulación del eventual mecanismo que pudiera regir la captación del Fe(III) por parte de los exopolímeros de la bacteria A. 3.2Sup(5). Este objetivo requiere, en primera instancia, recopilar los antecedentes analizados en los apartados anteriores.

En resumen, hasta el momento se ha logrado dilucidar una serie de aspectos en cuanto a la relación que se establece entre las EPS y el catión de Fe(III). En primer lugar, con los análisis por espectroscopia de infrarrojo, se ha determinado que el carboxilo era uno de los principales grupos funcionales que estuvo involucrado en la captación del Fe(III). Posteriormente, gracias a la construcción de las curvas de valoración de las EPS, se ha determinado que éste es el principal grupo activo presente en la biomasa. Finalmente, de acuerdo con la revisión bibliográfica y en función de las condiciones de concentración de hierro, acidez y temperatura en las que se realizaron los ensayos de adsorción, puede pensarse que el estado más probable en el que se encontraría el hierro en la disolución es la forma parcialmente hidrolizada ($\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$). Por todo lo anterior, es razonable pensar que la interacción entre las EPS y el catión de Fe(III) podría estar mediada por estos factores, es decir, por el grupo carboxilo y el catión $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$.

Por otro lado, con los ensayos de interacción EPS-Fe(III) se constató que, además de la adsorción de una cierta fracción de este metal por parte de las EPS, al término de los mismos se registraba un aumento de la acidez en la disolución. Esto se aprecia en la figura 3.43 que muestra la variación de la acidez final, con respecto a la inicial, para los ensayos realizados a las concentraciones iniciales de 200, 1000 y 2000 mg/L de Fe(III).

RESULTADOS Y DISCUSION

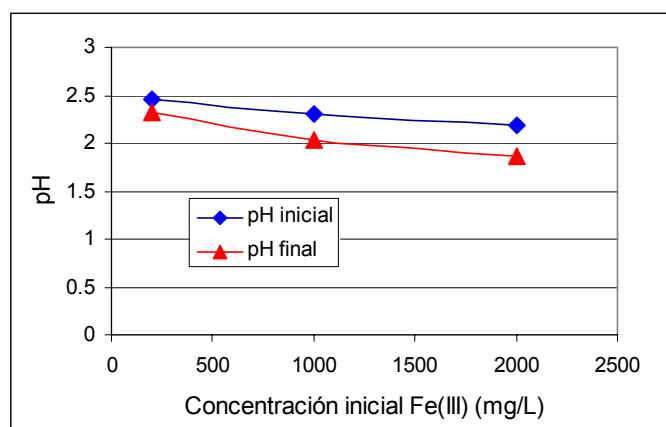


Figura 3.43 Variación de la acidez de la disolución EPS-Fe(III) con respecto a la concentración inicial de hierro.

De la figura 3.43 se deduce que, efectivamente, el valor de pH de la disolución de las EPS con el hierro fue menor al término que al inicio de la interacción, lo que implica que durante la adsorción del metal por parte de las EPS se produjo un traspaso de protones desde la biomasa a la disolución, por lo que se puede, razonablemente, suponer que éstos provenían de la desprotonación de los grupos carboxilos. Por otro lado, este aumento de la acidez puede relacionarse con la cantidad de Fe(III) adsorbida por las EPS durante la interacción (figura 3.44), lo que aportaría información relativa a la estequiometría de la reacción entre el grupo activo y el catión metálico.

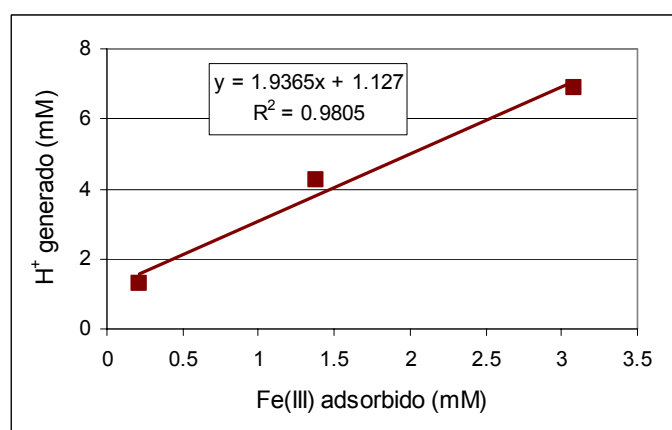


Figura 3.44 Variación de la cantidad de protones generados con la cantidad de Fe(III) adsorbido en la interacción.

La figura 3.44 indica que la cantidad de protones aumentó linealmente con la cantidad de hierro (III) adsorbido por las EPS, por lo que los datos fueron modelados mediante una regresión lineal, cuyos resultados se incluyen en la citada figura. La ecuación

RESULTADOS Y DISCUSION

obtenida mostró un muy buen ajuste con los datos experimentales ($R^2 = 0.98$), por lo que se podría establecer que la pendiente de la ecuación, con un valor de 1.94, representa adecuadamente la relación que existía entre las concentraciones de protones y de hierro. A partir de esta premisa, se puede establecer, por tanto, que la relación molar entre la cantidad de protones generados y la de cationes de hierro consumidos en la interacción era igual a 2.0.

Se ha dicho que un posible origen de los protones, liberados a la disolución desde la biomasa, podría corresponder a la disociación del grupo carboxilo RCOOH (siendo R una cadena del exopolisacárido) y, por tanto, el anión carboxilato, RCOO^- , sería quién interactuaría con el catión de hierro. Según se ha publicado, esta disociación es muy frecuente debido a que el grupo carboxilo tiene tendencia a liberar su protón para generar, así, el anión carboxilato más estable, el cual quedaría en condiciones de interactuar con el o los cationes presentes en el medio (Fox and Whitesell, 1997).

El grupo carboxilo se produce cuando coinciden sobre el mismo átomo de carbono un grupo hidroxilo ($-\text{OH}$) y un carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) y tiene la estructura que se muestra en la figura 3.45.

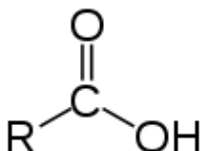


Figura 3.45 Estructura del grupo funcional carboxilo.

Este grupo es el componente principal de los llamados ácidos carboxílicos. Sus propiedades ácidas son debidas a que los dos átomos de oxígeno, al ser electronegativos, tienden a atraer a los electrones del átomo de hidrógeno, con lo que se debilita el enlace C-H y es más fácil que se libere el correspondiente protón. El anión resultante, R-COO^- , más estable, es la base conjugada del ácido carboxílico y su carga eléctrica negativa se distribuye simétricamente entre los dos átomos de oxígeno, es decir, se deslocaliza por lo que los dos enlaces carbono-oxígeno adquieren un carácter de enlace parcialmente doble (figura 3.46).

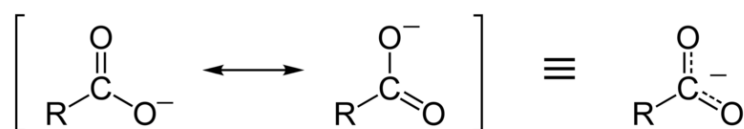


Figura 3.46 Esquema de la deslocalización de cargas en el grupo carboxilato.

En literatura se ha establecido que este anión, según muestra la figura 3.47, puede interactuar con un catión metálico mediante la formación de enlaces monodentados, bidentados o tipo puente, que pueden ser, a su vez, simétricos o asimétricos (Nakamoto, 1997).

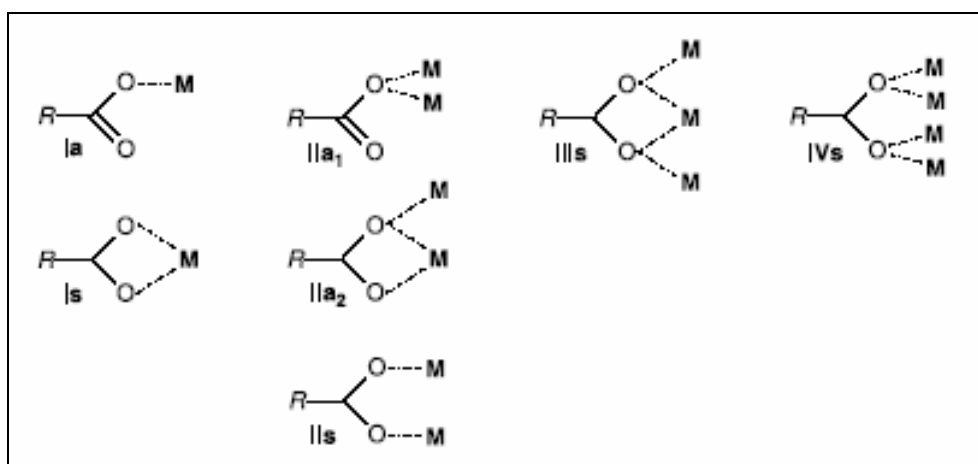


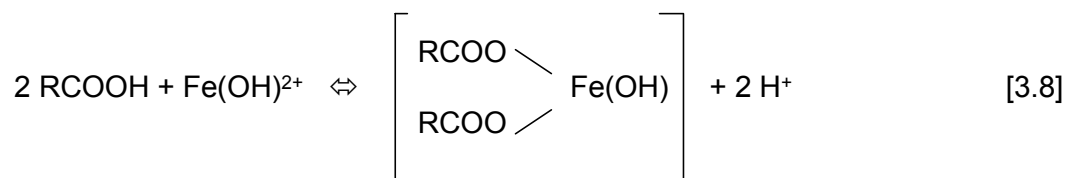
Figura 3.47 Diferentes tipos de interacción entre el grupo carboxilato y un catión metálico M. (I, II, III y IV indican el número de cationes metálicos; a y s señalan un tipo de enlace: asimétrico o simétrico, respectivamente).

En este caso y considerando la relación molar entre la cantidad de protones generados y la de cationes de hierro adsorbidos, determinada anteriormente, sería esperable que la interacción involucrase a dos grupos carboxilato por cada átomo de hierro. Ahora bien, la manera de interactuar con el catión podría deducirse a partir de la diferencia entre los valores, en el espectro de infrarrojo de las EPS con Fe(III), de las bandas que reflejan la vibración de tensión de los enlaces (C=O) y (C-O) en el grupo carboxilo. Esto es posible debido a que se ha encontrado que la distancia entre ambas bandas está relacionada con la simetría relativa del mencionado grupo y refleja la naturaleza de la coordinación del enlace (Atwood and Steed, 2004). En este caso, las mencionadas bandas, ya analizadas en el apartado 3.3.5, aparecen a valores de 1716 cm^{-1} , para el caso de la tensión simétrica del enlace (C=O) en el grupo carboxilo y a 1401 cm^{-1} , para el caso de la tensión asimétrica del enlace (C-O) en el grupo

RESULTADOS Y DISCUSION

carboxilato, respectivamente. La diferencia de ambos valores, 315 cm^{-1} , es sensiblemente menor que los más de 500 cm^{-1} que presentan algunas sustancias tales como biomasa de *Sargassum fluitans* (Figueira *et al.*, 1999) y alginitados calcificados (Fuks *et al.*, 2006), y se considera típica de la formación de quelatos bidentados por parte de este grupo.

De esta manera y, considerando todos los aspectos antes analizados, un posible mecanismo de interacción entre las EPS de *A. 3.2Sup(5)* y los cationes de Fe(III) sería la formación de un quelato bidentado entre el grupo carboxilato COO^- , proveniente de la desprotonación del grupo carboxílico RCOOH de esta biomasa y el catión de hierro parcialmente hidrolizado $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$, según la reacción siguiente:



La constante de equilibrio de esta reacción se puede escribir como:

$$K = \frac{[\text{H}^+]^2}{[\text{Fe}^{3+}]} \quad [3.9]$$

Donde $[\text{H}^+]$ y $[\text{Fe}^{3+}]$ representan las concentraciones (en mol/L) de protones liberados y de hierro férrico involucrado en la reacción, respectivamente. La constante de equilibrio se puede calcular, reemplazando en la ecuación [3.9], los valores de las concentraciones de estos cationes (ya representados en la figura 3.44), que fueron obtenidos en los ensayos de interacción realizados a las concentraciones iniciales de 200, 1000 y 2000 mg de Fe(III)/L. Los valores calculados de $\log K$ se muestran en la tabla 3.11.

RESULTADOS Y DISCUSION

Tabla 3.11 Constante de la reacción de interacción EPS-Fe(III)

Concentración inicial Fe(III) (mg/L)	Log K
200	0.88
1000	1.12
2000	1.19

De los valores de la tabla anterior se puede estimar un valor promedio de $\log K = 1.06 \pm 0.16$, el cual indicaría que la reacción de interacción [3.8] sería reversible. Esta característica en la captación del Fe(III) significaría, en la práctica, que la adsorción de este catión por las EPS de A. 3.2Sup(5) no sería definitiva y podría, en caso de ser necesario, recuperarse desde estas sustancias mediante algún procedimiento diseñado para el efecto.

El mecanismo de interacción propuesto se traduciría en que cada átomo de Fe estaría asociado a dos grupos carboxilatos COO^- , que combinados darían lugar a un oxalato de fórmula $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$. Este ligando posee la estructura que muestra la figura 3.48 y tiene la conocida capacidad de coordinar metales a través de enlaces mono o bidentados (Chaiyapoom, 2004). Un ejemplo de la capacidad quelante de este grupo es, por ejemplo, la precipitación de oxalato de itrio $[\text{Y}_2(\text{C}_2\text{O}_4)_3]$ a partir de la adición de ácido oxálico a disoluciones concentradas de Y provenientes de extracción por disolventes (Konishi *et al.*, 1998).

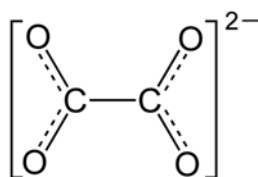


Figura 3.48 Estructura del ligando oxalato.

De esta manera, una posible estructura que se podría tener la interacción entre el dicarboxilato (u oxalato) y el hierro parcialmente hidrolizado podría ser la que se muestra en la figura 3.49.

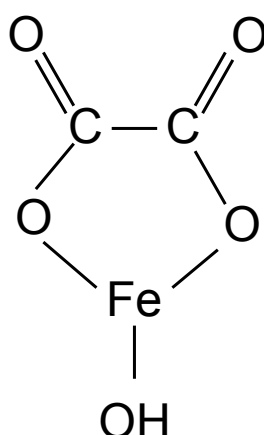


Figura 3.49 Estructura propuesta del dicarboxilato (oxalato) bidentado de Fe(III) hidrolizado.

Una posible manera de validar este mecanismo de interacción sería a través de un análisis por DRX de las especies presentes en los liófilos de las EPS conteniendo Fe. El correspondiente espectro se muestra en la figura 3.50.

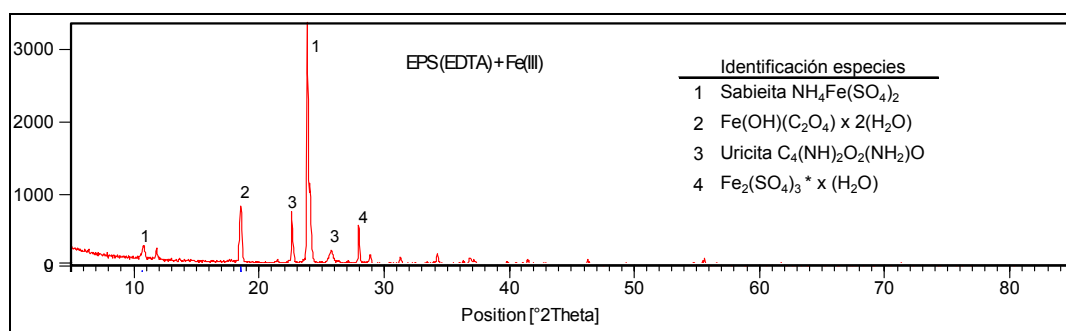


Figura 3.50 Espectro DRX de las EPS de A. 3.2Sup(5) extraídas por EDTA cargadas con Fe(III).

Entre las especies detectadas destaca la de un oxalato de Fe(III) hidroxihidratado de fórmula $[\text{Fe}(\text{OH})(\text{C}_2\text{O}_4) \times 2\text{H}_2\text{O}]$, cuya presencia confirmaría, entonces, el mecanismo de interacción antes propuesto debido a que coincide con la estequiometría de la reacción [3.8]. Además, el citado espectro muestra la presencia de especies orgánicas que no contienen Fe, tales como la uricita $[\text{C}_4(\text{NH})_2\text{O}_2(\text{NH}_2)\text{O}]$, cuyo origen se podría atribuir a las proteínas contenidas en las EPS. Por último, en el análisis por difracción de rayos X también se detectaron otros compuestos de hierro como el sulfato férrico $[\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \times x\text{H}_2\text{O}]$ y la sabieita $[\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$, que se formarían durante el proceso de deshidratación asociado a la liofilización de las disoluciones de las EPS conteniendo al Fe(III).

RESULTADOS Y DISCUSION

En la literatura se encuentran algunos estudios con resultados que avalarían los aquí presentados. Por ejemplo, resultados coincidentes con los anteriormente comentados son los del trabajo realizado por Corzo en el que muestra que los xopolisacáridos, especialmente, de *Bradyrhizobium Chamaecytisus*, y, en menor medida, de *Bradyrhizobium japonicum*, fueron capaces de captar Fe^{3+} a través de un mecanismo basado en la quelación bidentada, por parte del grupo carboxilato de los polisacáridos, de cationes de Fe^{3+} parcialmente hidrolizados como $Fe(OH)^{2+}$ (Corzo *et al.*, 1994). De igual forma, un resultado en esta misma línea es el publicado por Figueira de un estudio en el que encontró que la captación de $Fe(III)$ por parte de biomasa de *Sargassum fluitans* fue realizada por medio de una quelación bidentada del citado catión por el grupo carboxilo (Figueira *et al.*, 1999).

3.4 Adsorción de Fe(II) y Fe(III) por EPS de *A. 3.2Sup(5)*

Como se ha mencionado en el apartado 1.1.2.3, la pila de combustible microbiana en estudio basa su funcionamiento en la actividad metabólica de las bacterias *A. 3.2Sup(5)* y *A. ferrooxidans* en presencia de hierro y en condiciones ácidas y aeróbicas (Malki *et al.*, 2008). Esto se traduce en que en el sistema se encontrarían, por lo menos durante un determinado período de tiempo, cationes Fe(II) y Fe(III) simultáneamente (Malki *et al.*, 2006) por lo que se consideró, también, necesario estudiar el tipo de interrelación que se pudiera establecer entre las EPS de *A. 3.2Sup(5)* tanto con disoluciones de Fe(II) como con disoluciones de Fe(II) y Fe(III).

3.4.1 Isotermas de adsorción de Fe(II)

La obtención de las isotermas de adsorción de Fe(II) se realizó de forma análoga a la de las de Fe(III), es decir, se combinaron alícuotas de EPS extraídas con EDTA y por centrifugación con disoluciones de Fe(II). Sin embargo, los ensayos se realizaron en atmósfera anaerobia debido a la fuerte tendencia a la oxidación que tiene este catión en presencia de oxígeno (Bilgin *et al.*, 2004). Un ejemplo, en este sentido, es el trabajo de McLean, con el que mostró cómo durante la interacción del Fe(II) con sustancias capsulares de *Bacillus licheniformis*, aquel se oxidaba aeróbicamente a Fe(III) en períodos de tiempo comprendidos entre 5 y 10 minutos (McLean *et al.*, 1992).

3.4.1.1 Isoterma de adsorción de Fe(II) por EPS extraídas por EDTA

En este caso, se realizaron tres ensayos de captación de Fe(II) en los que las concentraciones metálicas iniciales fueron: 200, 1000 y 2000 mg/L, manteniendo la interacción EPS-Fe(II) durante 1 h; el trazado de la isoterma (figura 3.51) se realizó de manera análoga a los casos anteriores, representando la capacidad de adsorción, q_e , frente a la concentración de equilibrio C_e . La citada figura muestra, también, la isoterma de adsorción de Fe(III), con el objeto de poder analizar la influencia del estado de oxidación del metal. Se comprueba que los valores de los coeficientes de

RESULTADOS Y DISCUSION

adsorción de Fe(II) y de Fe(III) fueron bastante similares entre sí, lo que sugiere que las EPS extraídas por EDTA interactuaron de forma muy parecida con los cationes de hierro, independientemente del estado de oxidación en que se encontraron. No obstante, al menos en un cierto rango de concentraciones de equilibrio, las EPS mostraron una leve tendencia a una mayor captación de Fe(II), lo que podría atribuirse a fenómenos estéricos de los cationes de Fe(III) parcialmente hidratados como $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$, debido a su alta tendencia a hidrolizarse (Morel and Hering, 1993; Harris, 2007).

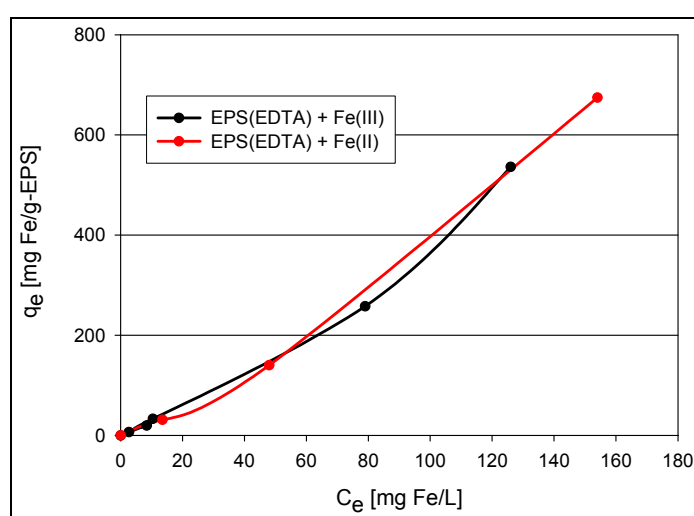


Figura 3.51 Isotermas de adsorción de Fe(II) y Fe(III) por las EPS de *A. 3.2Sup(5)* extraídas con EDTA.

Lamentablemente, en la literatura no se cuenta con mucha información con respecto a la influencia del estado de oxidación del Fe sobre la capacidad de adsorción de una determinada sustancia. Un trabajo en este sentido es el de McLean con el que comprobó que el estado de oxidación del Fe tenía, al contrario que en este caso, una influencia decisiva sobre la capacidad de adsorción por parte de las EPS de *Bacillus subtilis*, de modo que ésta ascendía a 323 mg/g-EPS cuando las exosustancias adsorbían Fe(III) y se situaba en 12.3 mg/g-EPS cuando adsorbían Fe(II) (McLean *et al.*, 1992).

Adicionalmente, la figura 3.51 muestra que la captación de Fe(II), al igual que en el caso del Fe(III), siguió un comportamiento linealmente proporcional con la concentración del metal en equilibrio, lo que indujo a suponer que la adsorción del ión

RESULTADOS Y DISCUSION

ferroso también podría representarse adecuadamente por el modelo de Freundlich. Esto se hizo trazando la figura 3.52 que muestra los resultados experimentales anteriores ajustados a dicho modelo.

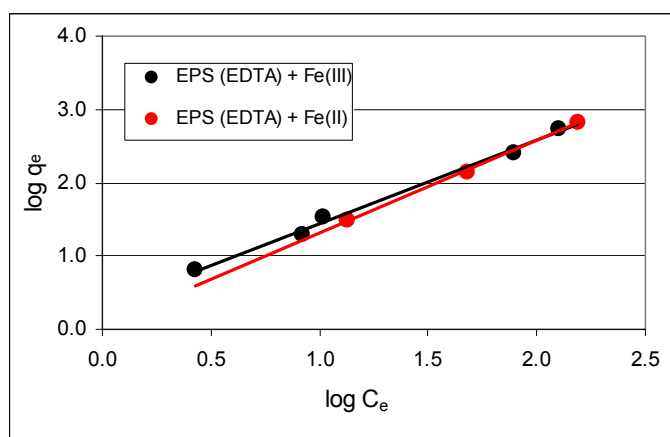


Figura 3.52 Isothermas linealizadas de Freundlich de la captación de Fe(II) y Fe(III) por las EPS de A. 3.2Sup(5) extraídas por el método de EDTA.

Tabla 3.12 Constantes de Freundlich
Adsorción de Fe por EPS extraídas por EDTA

Sistema	K (mg ^{1-1/n} L ^{1/n} g ⁻¹)	1/n	R ²
EPS + Fe(III)	2.031	1.134	0.99
EPS + Fe(II)	1.136	1.263	0.99

Con los correspondientes parámetros, recogidos en la tabla 3.12, se puede comprobar que la adsorción del catión ferroso cumplió, con el mismo grado de ajuste que la del catión férrico ($R^2 = 0.99$), los postulados del modelo de Freundlich. Sin embargo, los parámetros de la adsorción de ambos cationes presentan ciertas diferencias que pudieran ser consideradas complementarias entre sí: aunque el valor del parámetro K, que mide el grado en la extensión de la captación, fue mayor para el caso de la interacción con el ión férrico con respecto al ferroso (2.031 frente a 1.136, respectivamente), el que mide la intensidad en la interacción ($1/n$), fue mayor para la adsorción del ión ferroso con respecto al del férrico (1.263 frente a 1.134, respectivamente). A la vista de estos resultados pudiera pensarse que el ión férrico tendería a adsorberse en mayor medida que el ferroso, pero sería el ferroso el que lo haría con mayor intensidad; todo ello estaría de acuerdo con el efecto estérico comentado anteriormente. Es decir, el ión férrico sería el que debería adsorberse en

mayor medida pero fue el ión ferroso, de menor volumen, el que, posiblemente, mejor se acopló en los centros activos. Esta hipótesis se avalaría con la similar capacidad de adsorción de ambos cationes que se aprecia de la figura 3.51.

3.4.1.2 Influencia del método de extracción en la adsorción de Fe(II)

También se realizaron los ensayos correspondientes para evaluar el efecto del método de extracción de las EPS sobre su capacidad de captación de Fe(II). Las condiciones experimentales fueron las mismas que las utilizadas en el caso anterior, es decir, las concentraciones metálicas iniciales fueron 200, 1000 y 2000 mg de Fe(II) por litro, el tiempo de interacción de 1 h y la atmósfera anaeróbica, con la diferencia de que, ahora, las EPS usadas fueron extraídas por centrifugación.

La figura 3.53 muestra la isoterma de adsorción de Fe(II) obtenida con este tipo de EPS y también incluye la correspondiente a las EPS extraídas por EDTA. Puede comprobarse que las EPS aumentaron su capacidad de adsorción con la concentración de ión ferroso en equilibrio en la disolución, aunque lo hicieron de forma distinta según el tipo de biomasa.

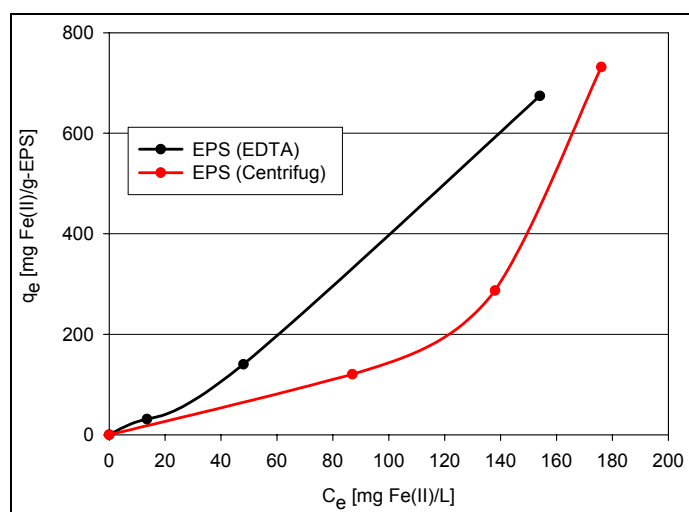


Figura 3.53 Isotermas de captación de Fe(II) por las EPS de *A. 3.2Sup(5)* extraídas por los métodos de EDTA y centrifugación.

En este caso, también, era bastante probable que este tipo de comportamiento cumpliera con los postulados del modelo de Freundlich, cuya versión linealizada se muestra en la figura 3.54 y los parámetros correspondientes en la tabla 3.13.

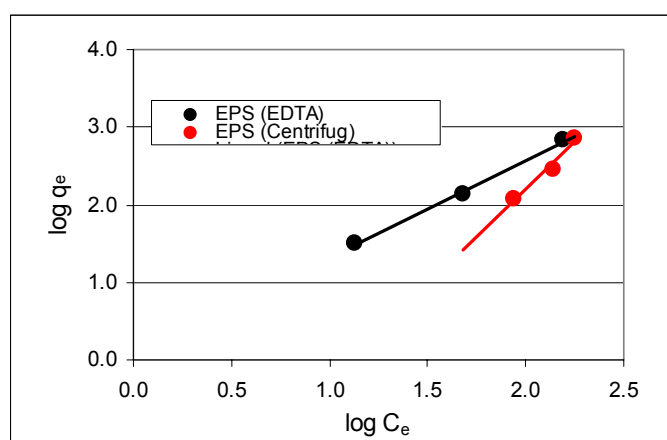


Figura 3.54 Isótermas linealizadas de Freundlich de la captación de Fe(II) por las EPS de A. 3.2Sup(5) extraídas por los métodos de EDTA y centrifugación.

Tabla 3.13 Constantes de Freundlich
Adsorción de Fe(II) según el método de extracción

Método	K (mg ^{1-1/n} L ^{1/n} g ⁻¹)	1/n	R ²
EDTA	1.136	1.263	0.99
Centrifugación	0.0018	2.470	0.99

Los valores de los coeficientes de correlación R^2 de la tabla 3.13 muestran que la captación de Fe(II) por ambos tipos de EPS cumplieron con los postulados del modelo de Freundlich. Además, dicha tabla muestra que si bien el coeficiente K fue superior en el caso de la adsorción de Fe(II) por las EPS extraídas por EDTA, el parámetro (1/n) lo fue en la adsorción por las EPS extraídas por centrifugación, haciendo que la aptitud global en la captación de dicho catión por parte de ambas biomazas fuera relativamente similar.

Esta diferencia en el comportamiento en la adsorción de este catión por parte de ambas sustancias resulta similar a la que presentaron en la adsorción de Fe(III) (figura 3.26) y podría atribuirse, de igual manera, a la eventual presencia de residuos de EDTA en las exosustancias extraídas con este reactivo, que podrían influir de manera adicional en la interacción con el metal.

3.4.2 Isotermas de adsorción simultánea de Fe(II) y Fe(III)

Se ha determinado, hasta el momento, que la adsorción de los cationes Fe(III) y Fe(II), por las EPS de A. 3.2Sup(5) extraídas con EDTA, tuvieron un comportamiento muy similar entre sí y, en ambos casos, la adsorción se caracterizó por una capacidad creciente en función de la concentración metálica en equilibrio y un cumplimiento aceptable de los postulados del modelo de Freundlich. Ahora bien, como en la pila de combustible estas EPS habrían de encontrarse con ambos cationes simultáneamente, también se estudió su capacidad de adsorción de Fe(II) y Fe(III) a la vez.

Los ensayos para llevar a cabo este estudio se realizaron combinando, en atmósfera anaeróbica, alícuotas de EPS extraídas por EDTA con disoluciones que contenían mezclas de Fe(II) y Fe(III). Las concentraciones metálicas iniciales en la mezcla [EPS + Fe] fueron 200, 1000 y 2000 mg de Fe total por litro, las que a su vez estaban constituidas por partes iguales de Fe(II) y Fe(III). La figura 3.55 muestra la isoterma obtenida en este caso, además de las isotermas de captación de Fe(III) y de Fe(II) anteriormente analizadas.

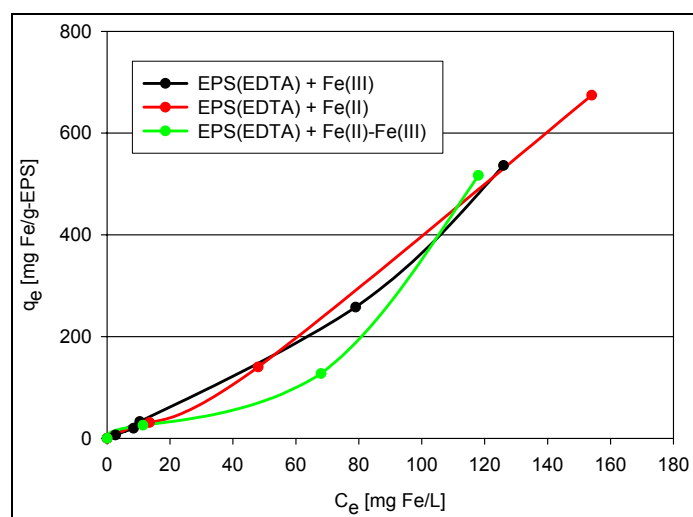


Figura 3.55 Isotermas de la adsorción por separado de Fe(II) y de Fe(III) y simultánea de Fe(II) y Fe(III) por las EPS de A. 3.2Sup(5) extraídas con EDTA.

La citada figura muestra que la adsorción simultánea del Fe en ambos estados de oxidación cumple, al igual que de forma individualizada según el estado de oxidación, con un comportamiento creciente en relación a la concentración en equilibrio del metal

RESULTADOS Y DISCUSION

en la disolución. Como se ha visto, este comportamiento podría representarse a través del modelo de Freundlich (figura 3.56), cuyos parámetros se muestran en la tabla 3.14.

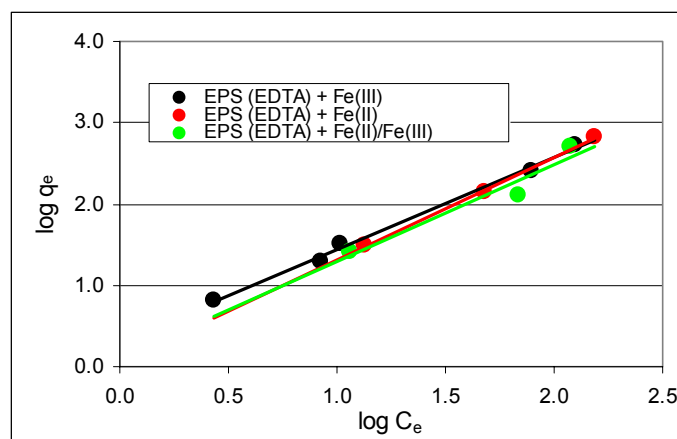


Figura 3.56 Isothermas linealizadas de Freundlich de la adsorción por separado de Fe(II) y de Fe(III) y simultánea de Fe(II) y Fe(III) por las EPS de *A. 3.2Sup(5)* extraídas por EDTA.

Tabla 3.14 Constantes de Freundlich
Adsorción de Fe por EPS extraídas por EDTA

Sistema	K ($\text{mg}^{1-1/n} \text{L}^{1/n} \text{g}^{-1}$)	1/n	R ²
EPS + Fe(III)	2.031	1.134	0.99
EPS + Fe(II)	1.136	1.263	0.99
EPS + Fe(II)/Fe(III)	1.289	1.189	0.96

En la tabla, el valor del coeficiente de regresión lineal correspondiente a la adsorción simultánea de Fe(II) y Fe(III) muestra que, al igual que en los casos anteriores, la captación simultánea de ambos cationes cumplió aceptablemente con los postulados del modelo de Freundlich. Además, se comprueba que las constantes correspondientes a esta adsorción tuvieron valores intermedios a los determinados para la adsorción de Fe(II) o Fe(III) por separado, lo cual podría sugerir que la adsorción simultánea de ambos cationes podría ser el resultado de un compromiso entre los comportamientos de cada uno de ellos.

En resumen, las EPS de la bacteria *A. 3.2Sup(5)* extraídas por EDTA han demostrado tener una clara capacidad para adsorber Fe contenido en disoluciones ácidas y que, además, este comportamiento no se vio influenciado por el estado de oxidación del metal o por las condiciones atmosféricas en las que se realizaron los ensayos.

3.4.3 Caracterización de las EPS con Fe(II) y Fe(III)

A partir de los resultados anteriores, a continuación, se procedió a caracterizar química y morfológicamente las exosustancias una vez efectuadas las respectivas interacciones, de manera análoga a lo realizado en el estudio de la adsorción de Fe(III). Para ello, se recurrió a la liofilización, en condiciones similares a las del mencionado estudio, de volúmenes conocidos de EPS conteniendo ya sea Fe(II) o bien mezclas de Fe(II) y Fe(III), generadas en ensayos en los que la concentración inicial fue de 1000 mg de Fe total/L y el tiempo de interacción de 1 h.

La caracterización se realizó a través de una combinación de las técnicas de análisis superficial de microscopía electrónica de barrido (SEM) y microanálisis elemental por dispersión de energías de rayos X (EDS). En primer lugar, se analizan los resultados obtenidos en la caracterización de las EPS con Fe(II) y posteriormente las que contenían Fe(II) y Fe(III).

La figura 3.57 muestra micrografías SEM de EPS, extraídas por EDTA y centrifugación, conteniendo Fe(II). Con la figura se observa que las sustancias mostraban un aspecto algo diferenciado entre sí, aunque en ambos casos se aprecia una textura compacta similar a la que ya se detectó en estas exosustancias cuando contenían Fe(III), según se pudo apreciar con la figura 3.28.

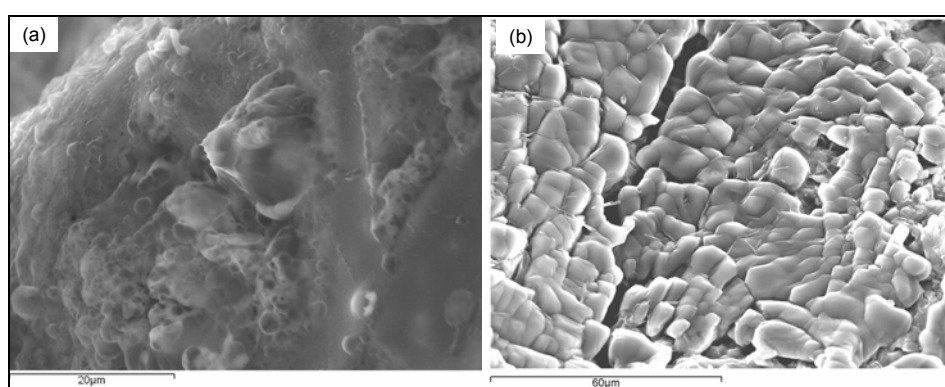


Figura 3.57 Micrografías SEM de EPS de *A. 3.2Sup(5)* conteniendo Fe(II) extraídas por: (a) EDTA y (b) centrifugación.

La caracterización se complementó con el microanálisis por dispersión de energías de rayos X (EDS); en primer lugar, se observó que estas sustancias, al igual que ocurrió

RESULTADOS Y DISCUSION

con las EPS cargadas con Fe(III), también mostraron la tendencia a degradarse al efectuarse dicho microanálisis. Esto se corroboró con las micrografías de la figura 3.58: la imagen (a) muestra la zona seleccionada en estado natural antes del análisis y en la imagen (b) se aprecia una cierta alteración superficial e, incluso, se detecta una gran hendidura localizada en la zona central de la misma.

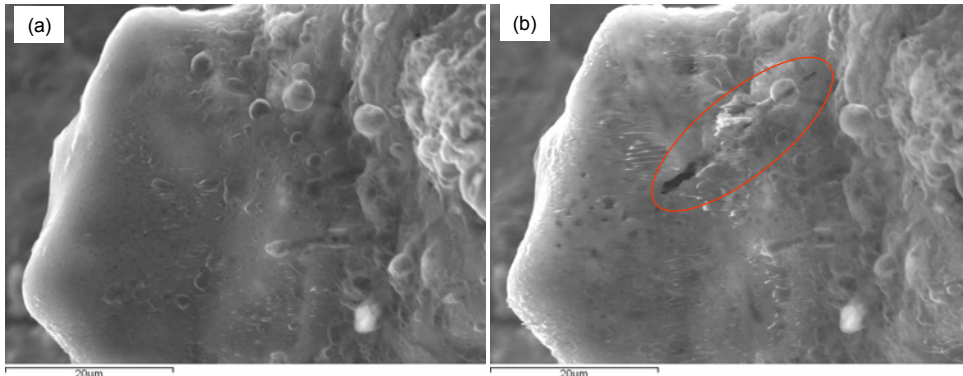


Figura 3.58 Micrografías SEM de EPS de A. 3.2Sup(5) extraídas con EDTA conteniendo Fe(II): (a) antes y (b) después del microanálisis.

El cualquier caso, los resultados del correspondiente microanálisis EDS se muestran en la figura 3.59, que contiene, además, una micrografía SEM de la zona concreta en estudio. El espectro confirmó la presencia de Fe, además de C, S y O, resultados que están en sintonía con los encontrados cuando estas sustancias captaron Fe(III).

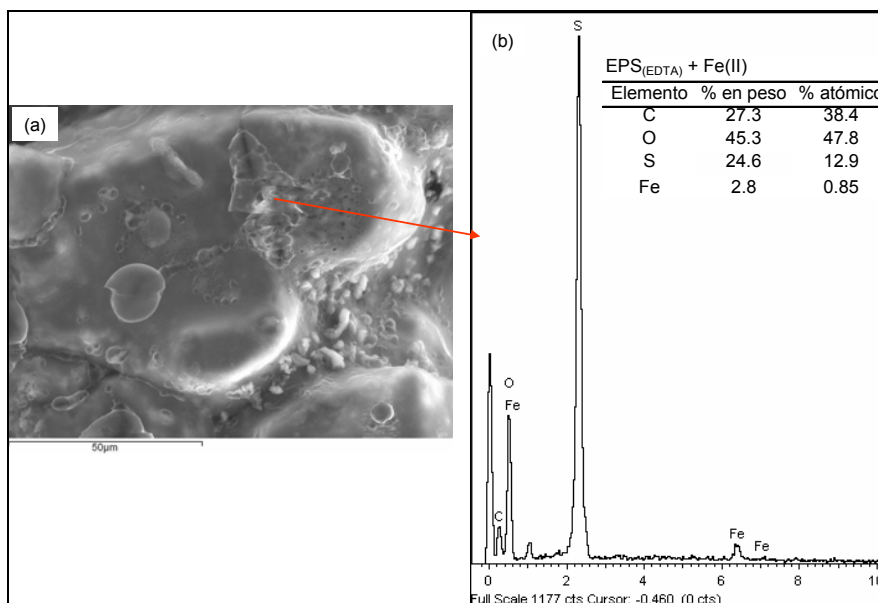


Figura 3.59 (a) Micrografía SEM de EPS extraídas con EDTA conteniendo Fe(II) antes del microanálisis; (b) espectro EDX correspondiente.

RESULTADOS Y DISCUSION

Un análisis similar se realizó en el caso de las EPS extraídas por centrifugación conteniendo Fe(II), obteniéndose los resultados que se muestran en la figura 3.60. Como era de esperar, el espectro EDX muestra la presencia de los mismos elementos que en el caso de las EPS extraídas por EDTA, es decir, Fe, S, C y O, aunque con proporciones de Fe y S algo diferentes.

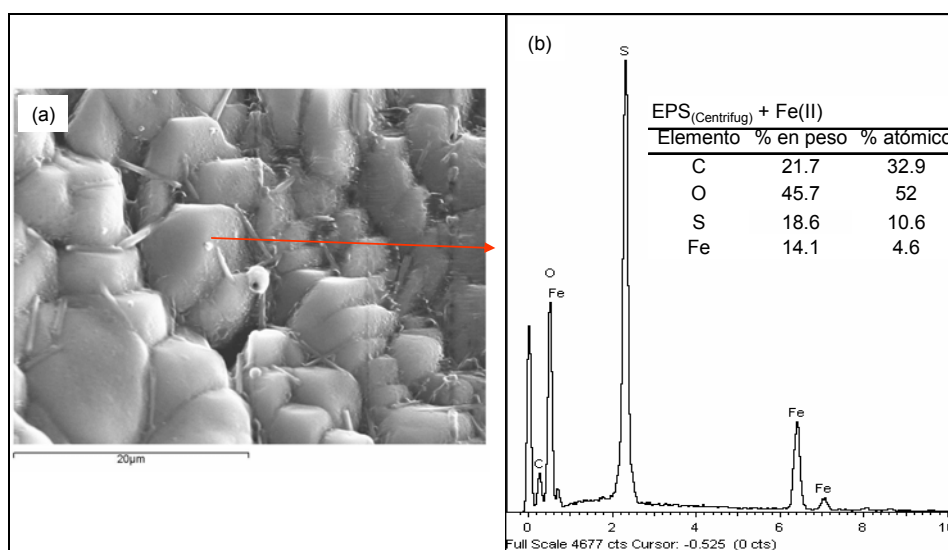


Figura 3.60 (a) Micrografía SEM de EPS extraídas por centrifugación conteniendo Fe(II) antes del microanálisis; (b) espectro EDX correspondiente.

Más concretamente, en el caso de las EPS obtenidas por centrifugación el contenido en peso de Fe fue claramente mayor que el de las EPS obtenidas por extracción con EDTA. Estas diferencias bien podrían atribuirse a los, también, diferentes contenidos en proteínas y carbohidratos de ambos tipos de EPS, según se puede apreciar de la tabla 3.1. Todo ello justificó el, también, más alto valor de capacidad de adsorción registrado con EPS obtenidas por centrifugación en el experimento realizado a 1000 mg de Fe(II)/L, que es el empleado en este estudio microscópico (figura 3.53).

Finalmente, se realizó el mismo estudio a las EPS que adsorbieron simultáneamente Fe(II) y Fe(III). En este caso, también, se observó que estas sustancias tendían a degradarse cuando se efectuaba el análisis EDX, lo que se pone de manifiesto en la figura 3.61, en la que se ha destacado la marca que quedó en la superficie de un gránulo de estas sustancias cargadas con Fe después de realizado dicho análisis.

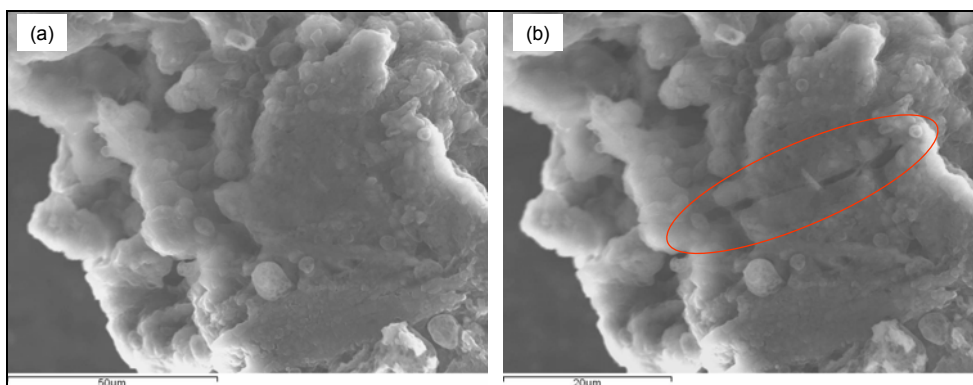


Figura 3.61 Micrografías SEM de EPS extraídas por EDTA conteniendo Fe(II) y Fe(III): (a) antes y (b) después del microanálisis.

Igualmente, estas sustancias fueron sometidas a un análisis por EDX encontrándose los resultados que se muestran en la figura 3.62. El resultado del espectro de la mencionada figura está en línea con los obtenidos cuando estas EPS interaccionaron con Fe(III) o con Fe(II) separadamente, ya que muestra la presencia de contenidos de Fe, C, S y O, similares a dichos casos, lo cual es lógico considerando que las EPS extraídas por EDTA mostraron, en la práctica, el mismo comportamiento en la adsorción de cationes de Fe(II) y Fe(III), tanto cuando se encontraban juntos como separados.

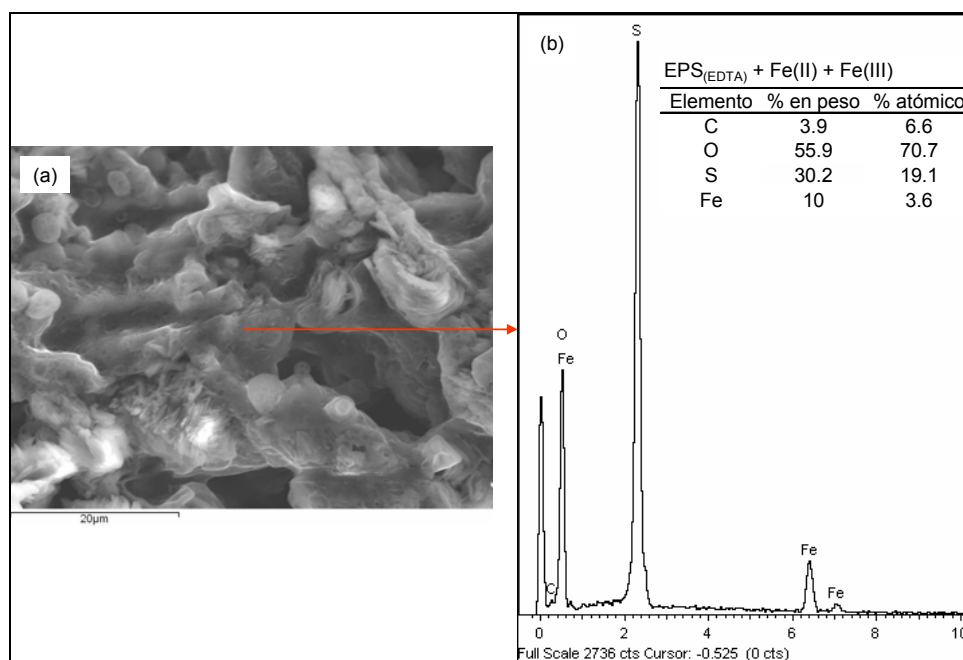


Figura 3.62 (a) Micrografía SEM de EPS extraídas con EDTA conteniendo Fe(II) y Fe(III) antes del microanálisis; (b) espectro EDX correspondiente.

3.4.4 Caracterización de los centros activos en la bioadsorción de Fe(II) y Fe(III)

La caracterización de la biomasa cargada con Fe(II) o con Fe(II) y Fe(III), al igual que en el caso de la adsorción de Fe(III) (apartado 3.3.5), se realizó a través de la identificación de los sitios activos involucrados en la captación metálica por medio de la determinación de los espectros de infrarrojo. En primer lugar, se analizaron las sustancias cargadas sólo con Fe(II) y, posteriormente, las que contenían Fe(II) y Fe(III).

3.4.4.1 Espectros FTIR de EPS conteniendo Fe(II)

En primer lugar, con la figura 3.63 se muestran los espectros de infrarrojo de exosustancias extraídas por EDTA que adsorbieron Fe(II), también se incluye el de las EPS puras con el objeto de localizar las posibles diferencias existentes.

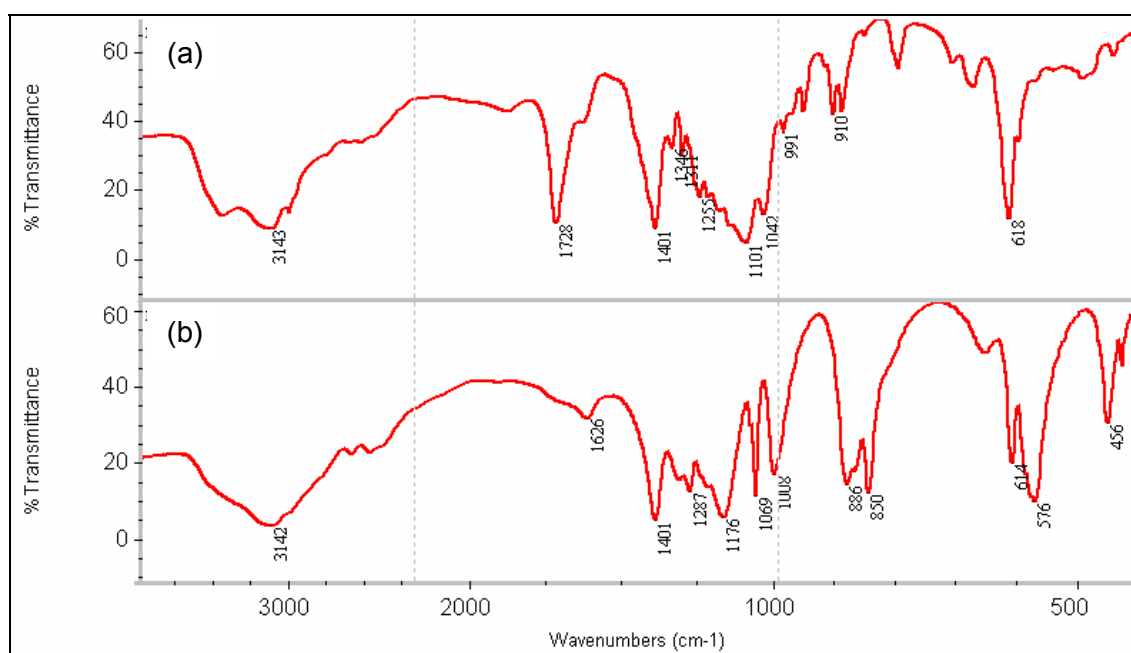


Figura 3.63 Espectros FTIR con EDTA de cultivos de *A. 3.2Sup(5)*: (a) EPS puras y (b) [EPS + Fe(II)].

Como ya se indicó anteriormente, el espectro de infrarrojo de las EPS puras se caracteriza por la presencia de dos bandas principales, una a 1728 y otra a 1401 cm^{-1} , que se atribuyen a la vibración asimétrica de estiramiento del enlace C=O en el carboxilo y a la vibración de deformación del enlace C-O en uno de sus derivados

RESULTADOS Y DISCUSION

(carboxilato), respectivamente (Jiang *et al.*, 2004; Omoike and Chorover, 2004; Parikh and Chorover, 2006; Tan and Xiao, 2008). En este caso, de forma análoga, la primera banda aparece desplazada a la derecha a un valor de 1626 cm^{-1} , lo que se puede considerar como un indicio de la participación del grupo carboxilo en la interacción con el Fe(II). Esto se ve reforzado debido a las intensidades de las bandas que representan a los grupos carboxilo y carboxilato, lo que se puede considerar como una referencia en la concentración relativa de cada uno de ellos: pasa de ser relativamente equivalente (bandas a 1728 y 1401 cm^{-1} , respectivamente, en el espectro de las EPS puras) a que la intensidad de la banda correspondiente al grupo carboxilo sea mucho menor que la correspondiente a la del grupo carboxilato (bandas a 1626 y 1401 cm^{-1} , respectivamente, en el espectro de las EPS cargadas con el metal). Esto indicaría que la concentración relativa del grupo carboxilo, después de la captación del metal, habría disminuido notoriamente; este nuevo dato podría ser considerado como una prueba adicional de la participación del grupo carboxilo en la interacción con el Fe(II).

Otra similitud con el espectro infrarrojo de las EPS con Fe(III) es que en la zona característica de la exosustancia cargada con el metal aparecen dos bandas (a 850 y 886 cm^{-1}) que se pueden atribuir a la interacción del metal con el grupo sulfonato. Este grupo ha jugado un importante papel en la captación tanto de metales pesados, en general, como de hierro, en particular, por parte de, por ejemplo, biomasa del alga *Sargassum sp.* (Fourest and Volesky, 1995; Figueira *et al.*, 1999).

Las bandas en la zona de los polisacáridos, es decir, de 1100 a 1000 cm^{-1} , muestran pequeñas variaciones en sus desplazamientos, por lo que se podría inferir que los grupos a los que se les atribuye (grupos éter o C-O-P) no habrían intervenido directamente en la adsorción del metal.

Finalmente, ambos espectros muestran una banda en torno a 3140 cm^{-1} , banda que generalmente se atribuye a la vibración de estiramiento en el grupo O-H en polisacáridos o bien debido a la humedad de la muestra (Schmitt and Flemming, 1998; Omoike and Chorover, 2006; Sheng *et al.*, 2006).

Del análisis anterior se ha comprobado, por tanto, que uno de los grupos involucrados en la captación del Fe(II) ha sido el carboxilo a través de su variante en forma de

RESULTADOS Y DISCUSION

carboxilato. Como ya se ha mencionado anteriormente, este grupo podría provenir, en parte, de contenidos residuales del reactivo usado en la extracción (EDTA), por lo que, a continuación, se valora esta posibilidad mediante los respectivos espectros de infrarrojo de la estructura de las exosustancias cargadas con hierro (II) considerando ambos métodos de extracción: EDTA y centrifugación (figura 3.64).

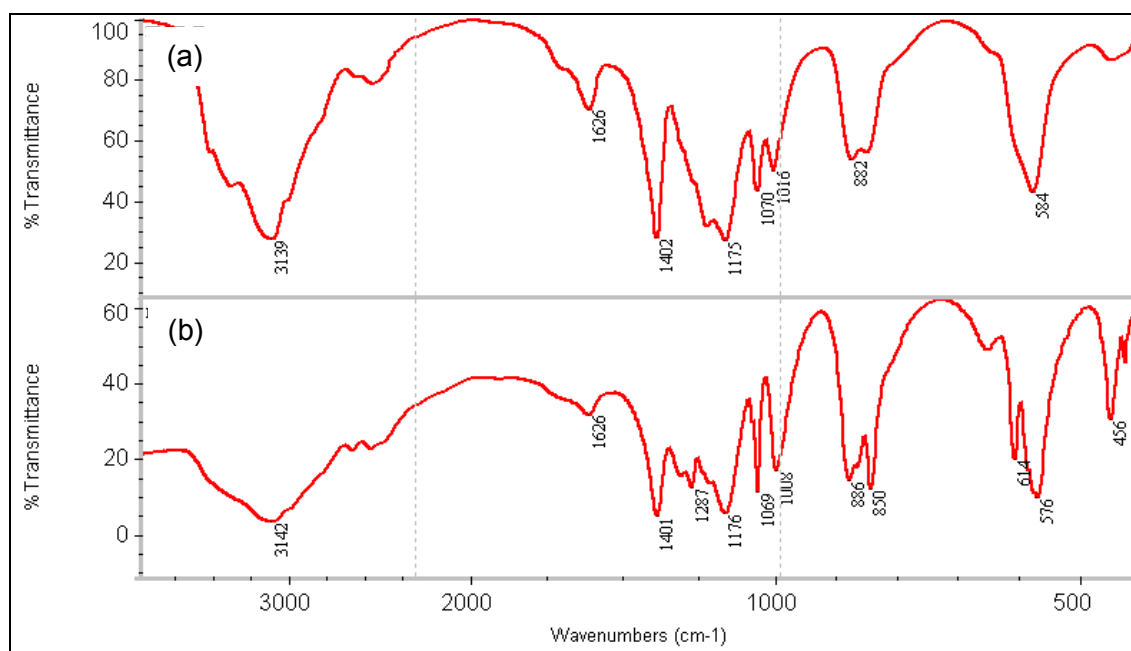


Figura 3.64 Espectros FTIR de EPS con Fe(II) extraídas por: (a) centrifugación y (b) EDTA.

Los espectros obtenidos, correspondientes a ambas exosustancias cargadas con Fe(II), fueron relativamente distintos aunque de igual forma se aprecian algunas bandas coincidentes pero de distinta intensidad. Entre las coincidentes se aprecian bandas en valores en torno a 3140 (grupo hidroxilo $-OH$), 1626 (grupo carboxilo $-COOH$), 1400 (grupo carboxilato $-COO^-$), 1170 (grupo fosfonato PO_2^-), 1070 (grupo C-O-C) y 880 cm^{-1} (grupo sulfonato S-OR').

Al igual que en la captación de Fe(III), la similitud entre los espectros se puede interpretar en términos de que el método de extracción de las sustancias extracelulares no condicionó, significativamente, la manera en la que ambos tipos de EPS interactúan con el Fe(II), haciéndolo a través de los mismos grupos funcionales: carboxilo, sulfonatos y fosfonatos.

3.4.4.2 Espectros FTIR de EPS conteniendo Fe(II) y Fe(III)

Finalmente, la figura 3.65 muestra el espectro de infrarrojo de las EPS de *A. 3.2Sup(5)* extraídas por EDTA que interaccionaron con Fe(II) y Fe(III) simultáneamente, en la que, además, se incluyeron los espectros de las EPS puras y de las EPS cargadas con Fe(III) y con Fe(II) ya analizadas en los apartados anteriores.

Con la citada figura se puede comprobar que, en general, los espectros de los exopolímeros que adsorbieron simultáneamente Fe(II) y Fe(III) (registro d) presenta sólo leves diferencias en relación a los de las EPS conteniendo uno solo de ellos, ya que en dicho espectro aparecen casi las mismas bandas que las registradas cuando contenían los cationes por separado (registros b y c). Son destacables las bandas siguientes: a 1629 cm^{-1} , que, según se ha discutido anteriormente, correspondería al grupo carboxilo; a 1402 cm^{-1} , asociada al grupo carboxilato; a 1069 cm^{-1} , que indicaría la presencia del grupo éter y, por último, las bandas en el rango de $850\text{ a }880\text{ cm}^{-1}$, correspondientes a la zona característica del espectro, que se asocian a la interacción del metal con el grupo sulfonato.

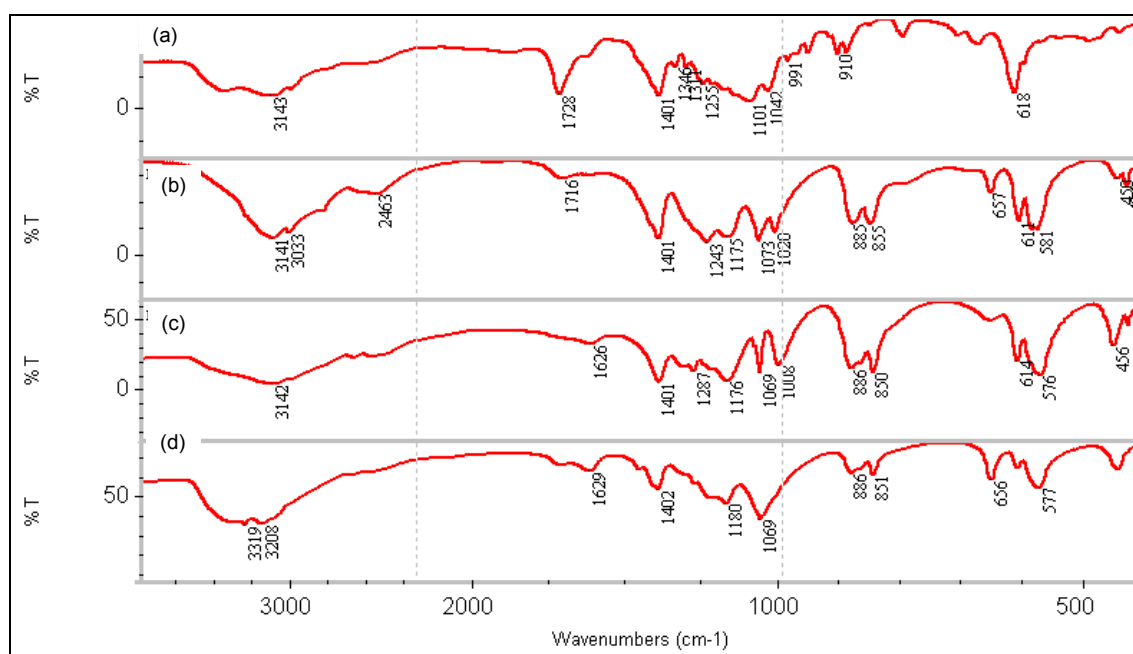


Figura 3.65 Espectros FTIR de EPS extraídas con EDTA de cultivos puros de *A. 3.2Sup(5)*: (a) EPS puras; (b) [EPS + Fe(III)]; (c) [EPS + Fe(II)] y (d) [EPS + Fe(II) y Fe(III)].

Esto sugiere que la interacción entre el polímero y los cationes de hierro en estas condiciones fue, básicamente, el mismo al encontrado en su relación con cada uno de

los cationes por separado. Es decir, cuando estas EPS se encontraron frente a cationes Fe(II) o Fe(III) los capturaron esencialmente de la misma manera e independientemente del estado de oxidación del ión, básicamente, a través de los grupos carboxilos, fosfonatos y sulfonatos, lo cual explicaría, entonces, las prácticamente coincidentes isotermas de adsorción obtenidas anteriormente con ambos cationes.

3.4.5 Especiación de Fe(II) en disoluciones ácidas

La especiación del metal en el sistema es otro de los factores de importancia en la bioadsorción, ya que la magnitud de la interacción puede variar dependiendo de ésta la cual, a su vez, condicionaría la solubilidad y movilidad de la especie metálica.

Ya se discutió anteriormente que el hierro puede presentarse en disoluciones ácidas en los estados de oxidación (II) y (III) tanto como iones libres o como especies hidrolizadas, sin olvidar la posibilidad de formación de complejos. En el caso específico del Fe(II) , éste puede mantenerse como catión libre o, en función de la acidez, hidrolizarse como $\text{FeOH}^+_{(\text{aq})}$ o $\text{Fe(OH)}_{2(\text{aq})}$, especie que a su vez puede precipitar a pH neutro como $\text{Fe(OH)}_{2(\text{s})}$. Por otro lado, cuando el catión se encuentra en un medio sulfato, como en el que se ha trabajado, es posible la formación de sulfatos $\text{FeSO}_{4(\text{aq})}$ y complejos con el anión bisulfato tal como el $\text{FeHSO}^+_{4(\text{aq})}$. Sin embargo, en la literatura se ha publicado que en disoluciones diluidas y a temperatura ambiente, este catión no suele sufrir una hidrólisis relevante en un amplio rango de acidez (pH entre 1 y 5), por lo que más bien suele mantenerse, principalmente, como catión libre (Morel and Hering, 1993; Beverskog and Puigdomenech, 1996; Pettine *et al.*, 1998; Bohn *et al.*, 2001). En cuanto a la formación de complejos, Tremaine mostró a través de estudios por espectroscopia Raman que el catión ferroso no formaba complejos con el anión bisulfato (Tremaine *et al.*, 2004) debido a que dicho anión no presentaba características complejas, mientras que en un estudio similar Casas publicó que la formación de sulfatos acuosos en la disolución era casi despreciable y, en la práctica, el catión ferroso se encontraba libre (Casas *et al.*, 2005).

Por todo lo anterior, se podría suponer que la captación de este catión por parte de las EPS, se realizaría a través de una interacción directa entre sus grupos activos y el catión ferroso libre (Fe^{2+}). Este comportamiento podría ser el que explicara las pequeñas diferencias encontradas en la captación de Fe(II) en relación con la de Fe(III) por las mismas EPS (figura 3.51 y tabla 3.12). Como se ha indicado, el catión férrico estaría en disolución mayoritariamente como una especie hidrolizada (Fe(OH)^{2+}), de mayor volumen, mientras que el ión ferroso, al no estar hidrolizado, tendría un menor tamaño lo cual facilitaría su penetración en la red polimérica de las exosustancias (Quintelas *et al.*, 2009).

3.4.6 Mecanismo de adsorción de Fe(II) por las EPS

De manera análoga al estudio relativo a la adsorción de Fe(III) , a continuación se plantea el desarrollo de un posible mecanismo que intentaría explicar la manera mediante la que el catión ferroso pudiera haber sido captado por las EPS recopilando los principales resultados presentados hasta el momento.

En primer lugar, con los estudios por espectroscopia de infrarrojo, se ha determinado que, al igual que en el caso del Fe(III) , el grupo carboxilo era uno de los principales involucrados en la interacción con este catión. Además, las curvas de valoración de las exosustancias indicaron que el grupo carboxilo era uno de los principales centros activos presentes en las EPS extraídas tanto por EDTA como por centrifugación. Por último, la información recopilada en la literatura, en función de las condiciones de acidez, concentración de Fe(II) y temperatura, ha determinado que lo más probable es que el hierro ferroso se encuentre como catión libre (Fe^{2+}). Adicionalmente, con los ensayos de adsorción se constató, al igual que ocurrió con la captación de Fe(III) , un aumento de la acidez de la disolución EPS- Fe(II) según se puede apreciar a partir de la figura 3.66. En ella, se constata que el valor de pH al término de la interacción, en cada uno de los ensayos, fue inferior al inicial, lo que significa que la biomasa liberó una determinada cantidad de protones en el curso de la captación de los cationes de Fe(II) , por lo que en las reacciones que gobernaron la captación del metal hubo involucrado, necesariamente, un mecanismo de intercambio de protones.

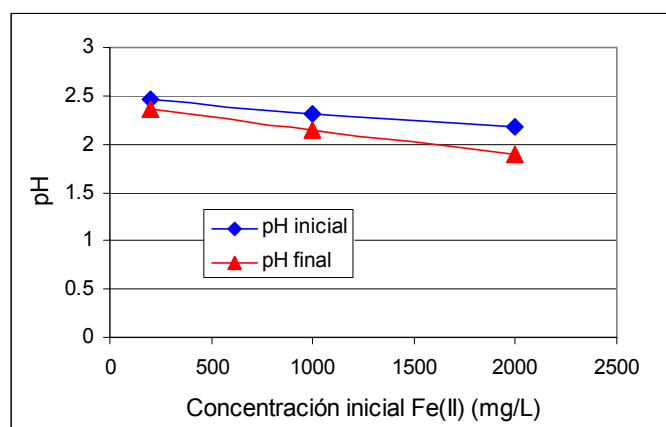


Figura 3.66 Variación de la acidez de la disolución EPS-Fe(II) con respecto a la concentración inicial de hierro.

En la literatura se ha establecido que el intercambio de protones es uno de los principales mecanismos que participan en la captación de metales por las EPS, independientemente del origen de estas sustancias (Rau *et al.*, 2003; Guibaud *et al.*, 2009). Sin embargo, la adsorción del metal por las EPS es un proceso físico-químico complejo en el que, adicionalmente, pueden concurrir otros mecanismos tales como atracción electrostática, intercambio iónico y microprecipitación (Pal and Paul, 2008; Gadd, 2009), por lo que no se puede excluir la posibilidad de que algunos de ellos también actúen y jueguen un cierto papel en la captación. Por ejemplo, Guibaud ha reportado, en una serie de trabajos relacionados con la adsorción de Pb(II) y Cd(II) por parte de EPS de lodos activados y cultivos bacterianos, que el principal mecanismo involucrado fue el intercambio de protones, aunque de igual forma sugirió que, de forma minoritaria, también ocurrieron otros fenómenos como los citados: intercambio iónico con Ca y Mg, atracción electrostática y microprecipitación (Guibaud *et al.*, 2006; Guibaud *et al.*, 2008; Guibaud *et al.*, 2009).

Análogamente al estudio de adsorción del catión férrico, la mencionada cantidad adicional de protones incorporada a la disolución se relacionó con la cantidad de Fe(II) adsorbido por las EPS, tal y como lo muestra la figura 3.67.

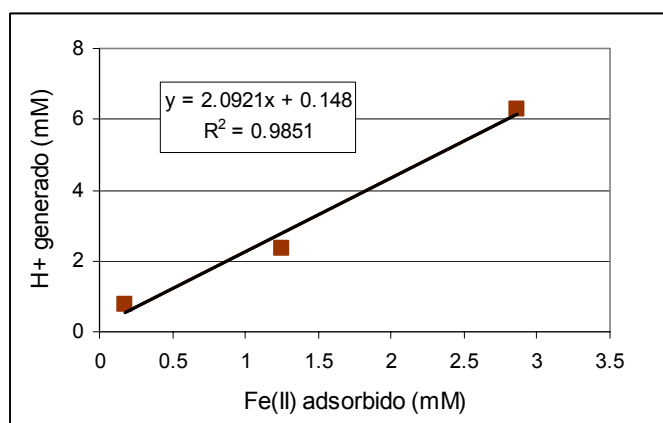


Figura 3.67 Variación de la cantidad de protones generados con la cantidad de Fe(II) adsorbido en la interacción.

Puede comprobarse que la cantidad de protones liberados por la biomasa aumentó en una proporción lineal con la cantidad de Fe(II) adsorbido con un muy buen ajuste de los datos experimentales en la regresión lineal ($R^2 = 0.98$); por lo que el valor de la pendiente, próximo a 2.0, representó, por tanto, adecuadamente, la relación molar que se estableció entre la cantidad de catión ferroso adsorbido por la biomasa y la de protones liberados por ésta.

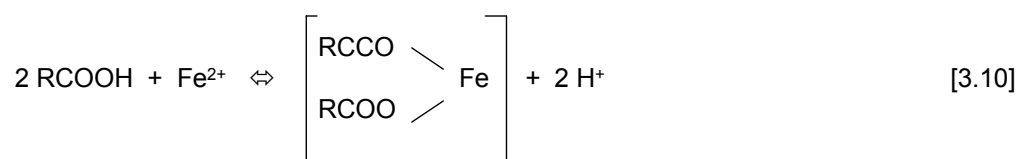
Se ha discutido anteriormente que un posible origen de estos protones podría estar relacionado con el grupo carboxilo, RCOOH , el cual al disociarse generaría los protones, con la consiguiente disminución del pH de la disolución, y liberaría el anión carboxilato, RCOO^- , quien estaría en disposición de interactuar con el catión ferroso. En este caso, según la relación molar determinada entre las cantidades de protones generados y la de cationes ferrosos adsorbidos, parece lógico que la interacción involucrase a dos grupos carboxilato por átomo de hierro.

Para determinar el tipo de interacción establecida se podría recurrir, nuevamente, a calcular la diferencia entre las bandas que representaban, en el correspondiente espectro de infrarrojo (figura 3.64), la vibración de tensión de los enlaces (C=O) y (C-O), respectivamente. En este caso, las mencionadas bandas aparecían a valores de 1626 cm^{-1} , para el caso de la tensión simétrica del enlace (C=O) en el grupo carboxilo, y a 1401 cm^{-1} , para el caso de la tensión asimétrica del enlace (C-O) en el grupo carboxilato, respectivamente. La diferencia, 225 cm^{-1} , fue menor que la obtenida en el caso de la adsorción de Fe(III) por parte de esta misma biomasa, pero, también, cae

RESULTADOS Y DISCUSION

dentro del rango considerado como típico de la formación de quelatos bidentados por parte de los carboxilatos (Figueira *et al.*, 1999; Fuks *et al.*, 2006).

Con estos antecedentes, un posible mecanismo de interacción entre las EPS de A. 3.2Sup(5) y los cationes de Fe(II) podría involucrar a dos grupos carboxilos que captarían, mediante la formación de un quelato bidentado, a un catión ferroso Fe(II) según la reacción siguiente:



La constante de equilibrio de la reacción puede escribirse según la expresión siguiente, donde $[\text{H}^+]$ y $[\text{Fe}^{2+}]$ representan las concentraciones (en mol/L) de protones liberados y de hierro ferroso captado por la biomasa, respectivamente:

$$K = \frac{[\text{H}^+]^2}{[\text{Fe}^{2+}]} \quad [3.10]$$

La magnitud de esta constante puede calcularse reemplazando en la ecuación [3.10], los valores de las concentraciones de estos cationes obtenidos en los ensayos de interacción realizados a las concentraciones iniciales de 200, 1000 y 2000 mg de Fe(II)/L y que ya fueron presentados en la figura 3.67. Los valores calculados de log K se muestran en la tabla 3.15.

Tabla 3.15 Constante de la reacción de interacción EPS-Fe(II)	
Concentración inicial Fe(II) (mg/L)	Log K
200	0.51
1000	0.65
2000	1.14

De los valores de la tabla anterior se puede estimar un valor promedio de log K de 0.77 ± 0.33 , el cual indicaría que, al igual que en el caso del Fe(III), la adsorción del

cación ferroso sería reversible. Esta característica se muestra, en este caso, más acentuada en relación a la del hierro férrico e, implicaría que el hierro ferroso podría desorberse desde las exosustancias en la medida que se generasen las condiciones adecuadas para ello.

El mecanismo de interacción de las EPS con el Fe(II) propuesto implica que la captación de este catión estaría asociada, entonces, a la formación de un dicarboxilato de Fe(II), que podría tener la estructura lineal que se sugiere en la figura 3.68.

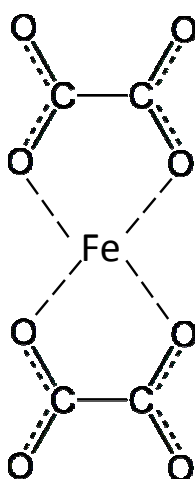


Figura 3.68 Estructura propuesta del dicarboxilato bidentado de Fe(II).

La figura 3.69 muestra el espectro DRX de estas sustancias con una relación de las especies identificadas, entre las que se cuentan el oxalato ferroso ($\text{Fe}_2\text{C}_2\text{O}_4$) y el oxalato ferroso dihidratado ($\text{Fe}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), cuya presencia permitiría validar el mecanismo propuesto por la reacción [3.10].

RESULTADOS Y DISCUSION

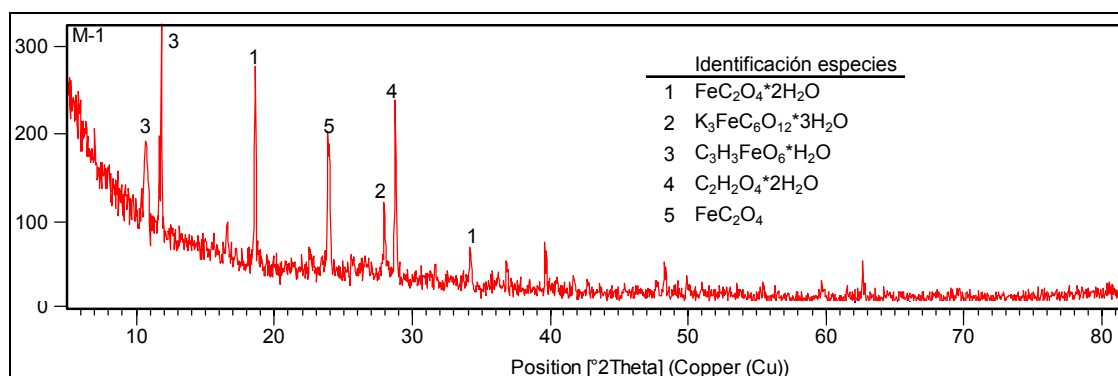


Figura 3.70 Espectro DRX de las EPS de *A. 3.2Sup(5)* extraídas por EDTA cargadas con Fe(II).

Además de los oxalatos de Fe(II) mencionados, el citado espectro muestra la presencia de otras sustancias orgánicas tales como el ácido oxálico dihidratado ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), el formiato de Fe hidratado ($\text{C}_3\text{H}_3\text{FeO}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$) y la mirabilita ($\text{K}_3\text{FeC}_6\text{O}_{12} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), en más baja proporción. En esta última especie, el Fe se encontraría en el estado (III), lo que indica que la muestra sufrió una cierta oxidación que pudo haber ocurrido durante alguna de las etapas de manipulación.

Los resultados anteriores han permitido proponer que la adsorción de Fe(II) por parte de las EPS de *A. 3.2Sup(5)* se haya realizado, principalmente, por la formación de un oxalato bidentado del mencionado catión. Este resultado es muy similar al que se llegó en el estudio de la adsorción de Fe(III), ya que en ambos casos se ha constatado que la interacción con la biomasa ha podido realizarse por medio de un intercambio iónico entre el catión metálico y el grupo funcional carboxilo. Los mecanismos de adsorción de Fe(II) y Fe(III) por parte de la biomasa, tan similares, podrían ser la razón que explique los valores, también, tan coincidentes que mostraron los coeficientes de adsorción.

También se realizó un análisis por DRX a las EPS que adsorbieron ambos cationes en forma simultánea obteniendo el espectro de la figura 3.70, donde se muestra que, en este caso, se formaron aproximadamente las mismas sustancias que cuando las EPS interaccionaron con cada uno de los cationes por separado. Cabe destacar la presencia, además de sulfato férrico, de formiato de Fe y C elemental, y la de oxalatos de Fe(II) y Fe(III), lo que confirmaría que la biomasa interactuó con el Fe en ambos estados de oxidación de la misma forma que lo hizo con cada uno de ellos por

RESULTADOS Y DISCUSION

separado. Un elemento adicional que ayudaría a apoyar este hecho es que en los ensayos con los dos cationes de hierro, también, el pH de la disolución al término de la interacción fue menor que al inicio del ensayo, lo que significaría que el proceso de adsorción estuvo ligado a la liberación de protones por parte de la biomasa.

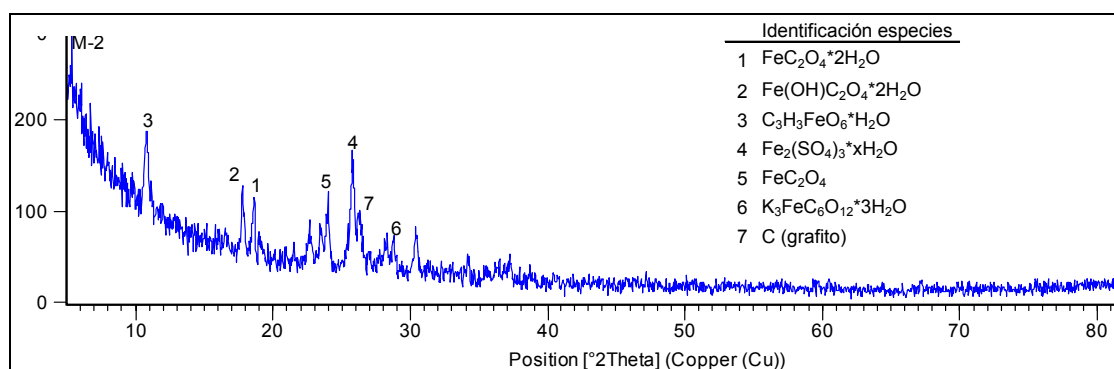


Figura 3.70 Espectro DRX de las EPS de *A. 3.2Sup(5)* extraídas por EDTA cargadas con Fe(II) y Fe(III).

Una vez confirmado que las EPS de *A. 3.2Sup(5)* poseen la capacidad de captar Fe en sus estados de oxidación (II) y (III), la presencia de esta bacteria en la pila de combustible microbiana, se traduciría en que sus EPS se convertirían en lugar preferente para la adsorción del Fe en disolución, lo que podría provocar cambios localizados en la concentración del metal. Esto se acentuaría en las cercanías de los electrodos, cuya biopelícula, al estar constituida mayoritariamente por EPS (Wingender *et al.*, 1999), se convertiría en una fuente de captación de Fe desde el medio, lo que, a su vez podría inducir la precipitación más o menos masiva de especies de hierro sobre estas superficies. Este eventual escenario sería una circunstancia a tener en cuenta considerando que en la operación de la pila se debería contar con la suficiente cantidad de Fe en disolución y que, además, se deberían mantener las condiciones para una adecuada interrelación entre las células bacterianas y los mencionados electrodos de la biopila; todo ello condicionaría el imprescindible intercambio electrónico en la misma.

3.5 Adsorción de Fe por EPS de cultivos mixtos

En los apartados 3.3 y 3.4, se ha determinado que las sustancias poliméricas extracelulares puras de la bacteria *A. 3.2Sup(5)* podían adsorber el Fe presente en disoluciones ácidas de forma independiente de su estado de oxidación; sin embargo, el proceso si se ha demostrado dependiente del método de extracción de las EPS y de la presencia en el medio de un soporte sólido. Adicionalmente, se ha determinado que la interacción de los exopolímeros con los cationes de Fe, se realizaba a través de la formación de quelatos bidentados de dicho metal por parte de dicarboxilatos provenientes de la desprotonación de grupos carboxilos presentes en las exosustancias.

Cabría ahora caracterizar la estructura de las EPS extraídas a partir de cultivos en los que se encuentren simultáneamente las bacterias *A. 3.2Sup(5)* y *A. ferrooxidans*, es decir, exosustancias obtenidas en condiciones que representen, de una manera más rigurosa, al sistema que se quiere implementar en la pila de combustible, ya que la presencia de ambos tipos de microorganismos podrían condicionar tanto la composición como la estructura de las EPS globales. De esta manera, se tendrían que generar unas EPS, que se podrían denominar “mixtas”, a partir de cultivos donde se desarrollaran los dos tipos de bacterias.

Para cumplir este objetivo, en primer lugar se inocularon cultivos mixtos de ambas bacterias en condiciones aeróbicas y en presencia y ausencia de soportes. Una vez crecidos dichos cultivos se procedió a la extracción de las EPS correspondientes utilizando EDTA, obteniendo de este modo las denominadas EPS mixtas. La caracterización de dichas EPS mixtas, se realizó utilizando las mismas técnicas analíticas empleadas anteriormente; adicionalmente, en este caso, también, se recurrió a la espectroscopia XPS con el objeto de profundizar en el análisis elemental y averiguar que posibles especies, tipos de enlace y estados de oxidación presentaba el Fe retenido por ellas. Todo ello permitió establecer las correspondientes similitudes y diferencias con las EPS extraídas, por el mismo método, a partir de *A. 3.2Sup(5)* (EPS_{blanco}).

3.5.1 Cinética y propiedades de cultivos mixtos

Como se ha mencionado, una de las características de interés de la bacteria *A. 3.2 Sup(5)*, es su capacidad de respirar aeróbicamente en presencia de $Fe(III)$ (Malki *et al.*, 2006), lo cual sería, a su vez, complementado en la pila de combustible por el metabolismo de la bacteria *A. ferrooxidans*, que tiene la reconocida facultad de oxidar aeróbicamente $Fe(II)$ (Gehrke *et al.*, 1998; Harnett *et al.*, 2006; Mousavi *et al.*, 2007). Una manera de determinar el crecimiento de ambas especies a través del control de variables que estén directamente relacionadas con la actividad metabólica de las células, por lo que en dicho sistema mixto es fundamental la detección del contenido de $Fe(II)$ en el cultivo.

En esta línea, se prepararon cultivos que estuvieron a su vez constituidos por una relación volumétrica 1:1 de cultivos de ambas bacterias, es decir, se empleó un 2.5% (v/v) de cada tipo de cultivo puro. El medio de cultivo utilizado, denominado CBM Mix, se preparó a partir del medio CBM, usado habitualmente en el crecimiento de la bacteria *A. 3.2 Sup(5)* (González-Toril *et al.*, 2006), suplementado con la adición de hierro que se incorporó en una concentración de 4.0 g/L, en su totalidad como $Fe(II)$, en forma de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, o como $Fe(III)$, agregándolo, en este caso, como sulfato férrico. El crecimiento de los cultivos se siguió midiendo periódicamente su contenido de $Fe(II)$, el potencial redox (E_h), la acidez (pH) y la población bacteriana (cél/mL).

La figura 3.71 muestra la evolución de la población y el pH de uno de dichos cultivos mixtos; se aprecia que se alcanzaba la máxima densidad celular al cabo de 3 o 4 días de incubación, que era el mismo tiempo de crecimiento que exhibieron los cultivos puros de cada una de las bacterias. Además, con la figura se aprecia que la acidez del cultivo se mantuvo prácticamente estable hasta los 7 - 9 días para, después, aumentar notoriamente, lo cual pudo estar relacionado con fenómenos asociados a la presencia del $Fe(III)$, generado por la oxidación bacteriana del $Fe(II)$, tales como la posible hidrólisis del catión férrico y la consecuente formación de oxihidrosulfatos.

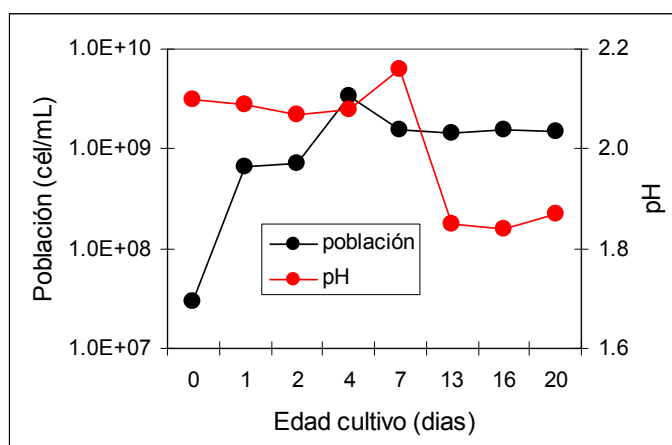


Figura 3.71 Cinética de la densidad poblacional y acidez de un cultivo mixto de *A. 3.2Sup(5)* y *A. ferrooxidans*.

Por su parte, la figura 3.72 muestra la evolución del contenido de Fe(II) y del potencial redox del cultivo mixto anterior y de otro crecido en condiciones de menor disponibilidad energética (4.0 y 2.0 g de Fe(II)/L, respectivamente). De la citada figura se aprecia que para el cultivo de mayor concentración de hierro ferroso ésta fue disminuyendo hasta prácticamente anularse al cabo de 13 días. Dicho descenso fue, a su vez, acompañado por un aumento del potencial redox como consecuencia del aumento del contenido de Fe(III) en la disolución. Este comportamiento fue el mismo, aunque más acelerado, en el caso del cultivo al que se le agregaron sólo 2.0 g de Fe(II)/L, lo cual parece lógico si se considera que para la misma densidad poblacional de *A. ferrooxidans* se disponía, en este caso, de sólo la mitad de fuente de energía.

En definitiva, la especie que comenzó antes su actividad fue *A. ferrooxidans* por disponer en el medio de partida de ión ferroso; cuando dicho ión iba transformándose en ión férrico, *A. 3.2Sup(5)* ya disponía de su fuente de energía para crecer.

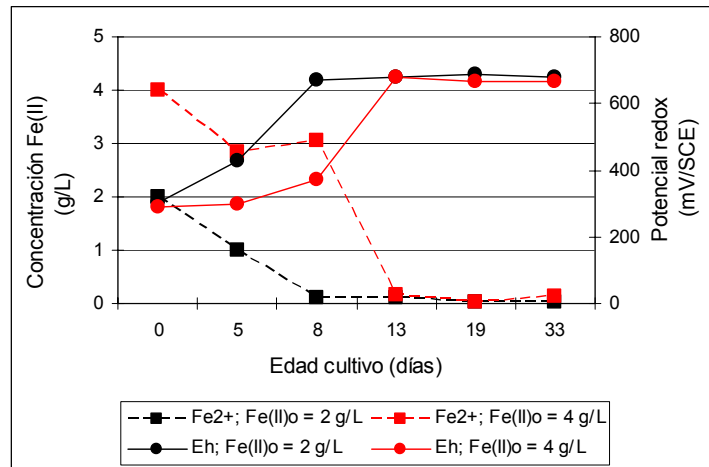


Figura 3.72 Cinética del contenido de Fe(II) y potencial redox (E_h) en cultivos mixtos de *A. 3.2Sup(5)* y *A. ferrooxidans* con concentraciones iniciales de 2 y 4 g de Fe(II)/L.

Para verificar el comportamiento respiratorio de *A. 3.2Sup(5)* en cultivos mixtos y en presencia de Fe(III), se creció un cultivo similar al anterior pero esta vez era el Fe(III) el que inicialmente se agregó al medio de cultivo, también con las concentraciones de 2.0 y 4.0 g/L. Los resultados se muestran en la figura 3.73.

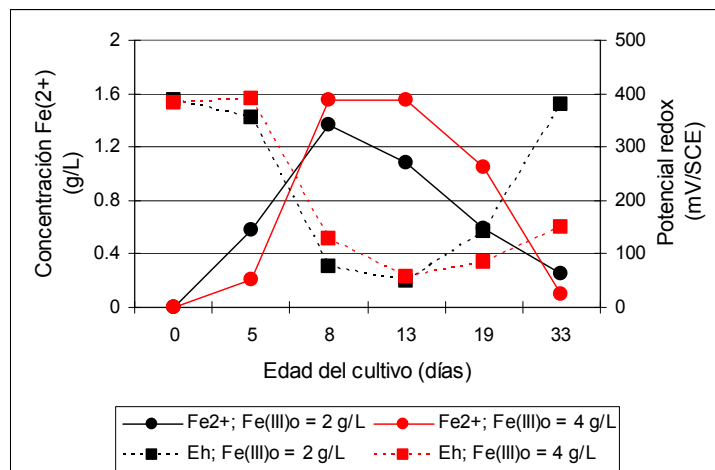


Figura 3.73 Cinética del contenido de Fe(II) y potencial redox (E_h) en cultivos mixtos de *A. 3.2Sup(5)* y *A. ferrooxidans* con concentraciones iniciales de 2 y 4 g de Fe(III)/L.

En este caso, la concentración de Fe(II) y el potencial redox en el cultivo tuvieron un comportamiento inversamente proporcional. En efecto, con la citada figura se puede observar que para ambas concentraciones iniciales de Fe(III), fue a partir del quinto día de incubación cuando se detectó un contenido ya significativo de Fe(II) para, a continuación, aumentar claramente su concentración hasta alcanzar un máximo

superados los 8 días de incubación; posteriormente la concentración de ferroso volvió a disminuir hasta casi desaparecer de la disolución. Este comportamiento fue acompañado paralelamente, en primera instancia, de una disminución en el potencial redox, seguido de un posterior aumento.

Estos resultados demuestran que, en la medida que crecía la población de *A. 3.2Sup(5)*, esta bacteria comenzaría a reducir al Fe(III) inicialmente añadido, al usarlo comoceptor final de electrones, lo que explicaría la creciente concentración de Fe(II) en el cultivo y, por lo tanto, la consecuente disminución del potencial redox del mismo. Posteriormente, aproximadamente alcanzados los días 10 a 13 días de incubación, en la figura 3.73 se observa que el contenido de catión ferroso comenzó a disminuir, lo que indicaría que a partir de este momento se impuso la actividad metabólica de *A. ferrooxidans*, la cual oxidó nuevamente a este catión; dicha actividad se vio reflejada en el aumento paralelo del potencial redox del cultivo.

Los resultados anteriores demostraron que la bacteria *A. 3.2Sup(5)*, efectivamente, tuvo la capacidad de respirar con Fe(III) aeróbicamente, mientras que el Fe(II) generado fue, a su vez, oxidado por la bacteria *A. ferrooxidans*. Estos resultados ratifican el comportamiento de ambas bacterias en su ecosistema de origen (Malki *et al.*, 2006); además, validan el ciclo del hierro propuesto en el diseño conceptual de la pila de combustible microbiana (Malki *et al.*, 2008). Adicionalmente, dichos resultados dejan en evidencia que en un sistema en el que estén involucradas ambas bacterias, como es el de la pila de combustible en desarrollo, las EPS que se vayan generando estarán en permanente contacto con cationes de hierro en sus estados Fe(II) y Fe(III).

Al respecto, cabe destacar que el uso del catión férrico en la cadena de respiración por parte de *A. 3.2Sup(5)* es, al menos, llamativo debido a que en condiciones aeróbicas se ha establecido que el oxígeno molecular (O_2) es termodinámicamente el receptor de electrones más factible, ya que asegura al microorganismo involucrado en su reducción una mayor cantidad de energía que la del Fe(III) (Alvarez and Illman, 2006; Roden, 2006).

3.5.2 Composición química de EPS mixtas

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en la extracción y composición de las EPS de los cultivos mixtos (tabla 3.16), proceso que se realizó en las mismas condiciones que las utilizadas en la extracción de las exo sustancias de los cultivos puros de *A. 3.2Sup(5)* en cuanto a método de extracción (EDTA), condiciones de crecimiento (sin y con soportes), tipo de soportes (fieltro de carbono y discos de grafito) y edad del cultivo (216 h de crecimiento). Obviamente, se seleccionaron estas condiciones debido a que, de esta forma, se podría realizar una adecuada comparación entre las características de ambos tipos de EPS.

Tabla 3.16 Composición de EPS mixtas

Tipo de cultivo	en mg g ⁻¹ PS de células			Prot/Carboh
	Proteínas	Carbohidratos	Total	
Sin soporte	137.0	68.7	205.7	1.99
Fieltro	102.5	74.6	177.1	1.37
Grafito	151.6	96.2	247.8	1.58

PS = peso seco; Prot/Carboh = razón proteínas/carbohidratos

En primer lugar, la tabla 3.16 refleja que la presencia de un soporte afectó de distinta forma la extracción de EPS. Por ejemplo, cuando se usó fieltro de carbono la cantidad de EPS extraída disminuyó con respecto al cultivo planctónico: de 205.7 a 177.1 mg/g-PS; es decir, se consiguió un 14% menos. Por su parte, en el caso del cultivo con grafito, el comportamiento fue inverso ya que la presencia del soporte se tradujo en un aumento en la extracción llegando a 247.8 mg/g-PS (un 18% más). Estas variaciones, sin embargo, no son muy significativas por lo que se puede considerar que la presencia de soportes sólidos no influyó considerablemente en la cantidad de EPS extraídas.

En cuanto a la composición, en la tabla se aprecia que las EPS extraídas presentaron valores de la relación Prot/Carboh que variaban entre 1.4 y 2.0. Cabe plantearse la posibilidad de que estos valores indicaran que podría haberse producido un cierto grado de lisis celular durante las extracciones, en especial, en la realizada con el cultivo sin soporte. Sin embargo, considerando algunos valores de este coeficiente que se recogen en la literatura, los grados de lisis celular encontrados se pueden

considerar poco significativos. Por ejemplo, Sheng *et. al.* reportan un coeficiente igual a 9.0 en la extracción a partir de cultivos de *Rhodopseudomonas acidophila* (Sheng *et al.*, 2005), mientras que Brown y Lester encontraron un coeficiente igual a 7.7 en la extracción de EPS de lodos activados (Brown and Lester, 1980).

Por otro lado, en la tabla también se puede observar que el tipo de soporte no fue un factor influyente en la naturaleza y composición de las EPS mixtas ya que tuvieron factores Prot/Carboh que variaron entre 1.37 (fieltro) y 1.58 (grafito), es decir, una diferencia inferior al 15%.

Estos resultados son similares a los obtenidos con los cultivos puros de *A. 3.2Sup(5)* crecidos, también, en presencia de soportes. En efecto, en la tabla 3.5 se mostraba que las cantidades extraídas a partir de cultivos puros con fieltro y grafito crecidos durante 216 h, fueron 293.9 y 224.6 mg/g -PS, respectivamente, que son muy aproximadas a las obtenidas en este caso. Adicionalmente, dicha tabla mostraba que los respectivos coeficientes Prot/Carboh fueron 1.46 y 1.15, valores que también son muy parecidos a los obtenidos con los cultivos mixtos.

En definitiva, los resultados anteriores han reflejado que las EPS extraídas de cultivos mixtos de *A. 3.2Sup(5)* y *A. ferrooxidans* fueron muy similares en su composición bioquímica a aquellas obtenidas a partir de cultivos puros de *A. 3.2Sup(5)*, por lo que toda la experimentación realizada con ellas podría extrapolarse a las EPS de los cultivos mixtos.

3.5.3 Caracterización morfológica de células y EPS por TEM

Análogamente a lo realizado en el apartado 3.2.3, se recurrió a un estudio por microscopía TEM con el objetivo de intentar profundizar en el conocimiento de la interrelación entre las células y las sustancias poliméricas extracelulares que generan. Con este fin, la figura 3.74 muestra sendas imágenes de células individuales del cultivo mixto en estudio con la morfología bacilar; parece, además, que estuvieran

abundantemente recubiertas por lo que parece ser una capa porosa de posibles precipitados.

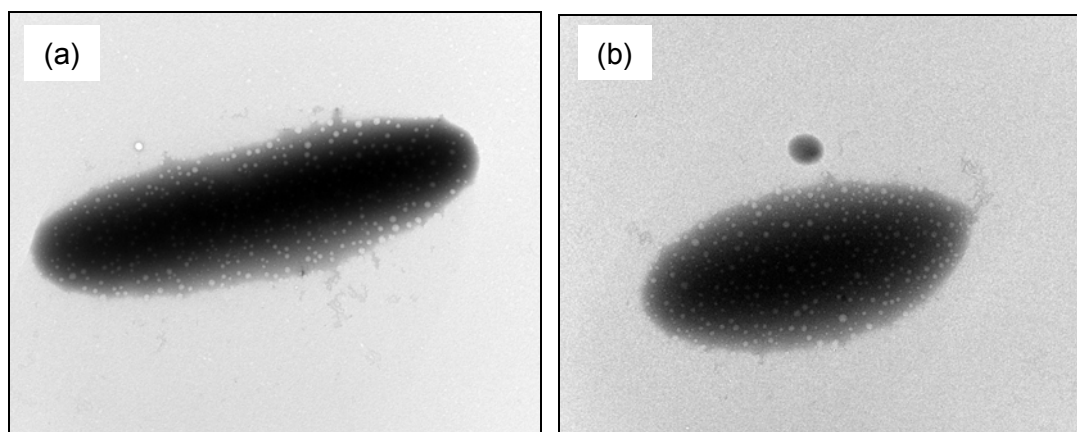


Figura 3.74 Micrografías TEM de células individuales de un cultivo mixto de *A. 3.2Sup(5)* y *A. ferrooxidans* a: (a) X 10.000 y (b) X 12.000.

Con la figura 3.75 se puede apreciar como las bacterias eran capaces de generar EPS, tal como lo hubieran hecho en el caso de los cultivos puros. Concretamente, se aprecia con claridad el momento de la secreción de abundantes cantidades de sustancias rodeando su superficie. En el detalle, a mayor número de aumentos, de la micrografía 3.75(b) se puede observar como se producía la liberación de sustancias por parte de un racimo de células adosadas entre sí.

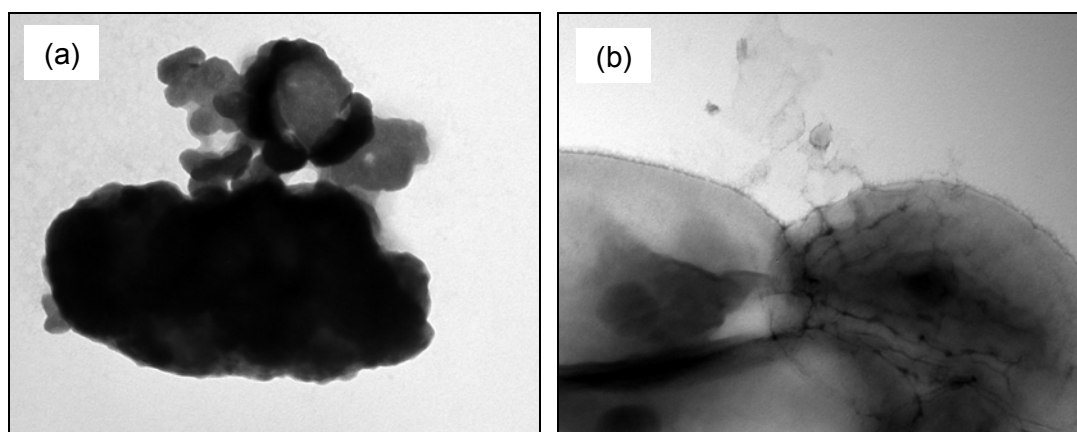


Figura 3.75 Micrografías TEM de células individuales de un cultivo mixto de *A. 3.2Sup(5)* y *A. ferrooxidans* a: (a) X 10.000 y (b) X 100.000.

3.5.4 Caracterización por microscopía FE-SEM

En el caso del cultivo mixto, también se realizó un estudio morfológico con el que se pretendía caracterizar, mediante FE-SEM, el modo de interrelación con los soportes de carbono sumergidos en el medio de cultivo durante el crecimiento. Los soportes utilizados fueron del mismo tipo que los empleados en el caso de los cultivos puros, es decir, fieltro de carbono y discos de grafito. En primer lugar, la figura 3.76 recoge dos micrografías del estado que presentaba el fieltro de carbono a las 216 h de crecimiento del cultivo. Se puede apreciar como los filamentos de fieltro estaban parcialmente recubiertos por una película de productos precipitados, presumiblemente de Fe y, adheridas en ella, multitud de células bacterianas. Estas imágenes recuerdan las que anteriormente se presentaron relativas a los cultivos puros de *A. 3.2Sup(5)* (figura 3.16) o de *A. ferrooxidans* (figura 3.20) con el mismo tiempo de incubación.

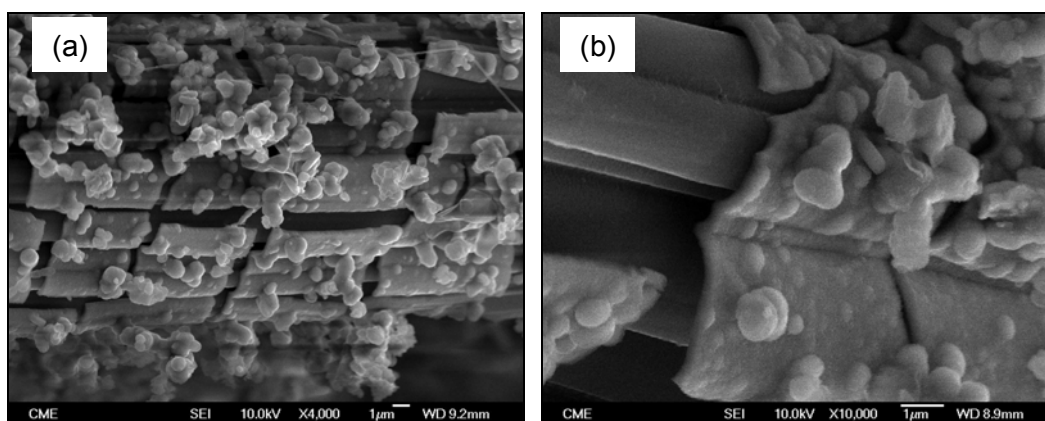


Figura 3.76 Micrografías FE-SEM de EPS y células de cultivos mixtos adheridas sobre fieltro de carbono luego de 216 horas de cultivo. Micrografías obtenidas a: (a) X 2.000 y (b) X 10.000.

Por su parte, la adherencia celular en el caso de soportes de grafito puede analizarse con la figura 3.77. Las micrografías muestran la superficie característica irregular de los discos de grafito, en donde se detecta la presencia de algunos precipitados, también, posiblemente férricos. Sobre ellos, se localizan células adheridas, especialmente, entre los poros y defectos de la superficie (micrografía 3.77a); mientras que, con más detalle, en la micrografía 3.77(b), se identifican células intercomunicadas por conductos que recuerdan a pilis o a algún apéndice similar.

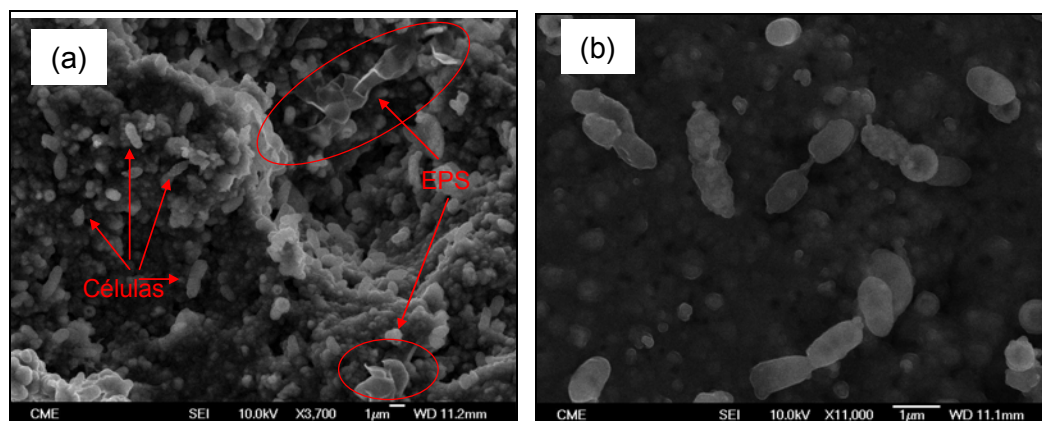


Figura 3.77 Micrografías FE-SEM de EPS y células de cultivos mixtos adheridas sobre láminas de grafito luego de 216 horas de cultivo. Micrografías obtenidas a: (a) X 3.700 y (b) X 11.000.

3.5.5 Caracterización de las EPS mixtas por XPS

Como se ha indicado anteriormente, las EPS que las bacterias del cultivo mixto fueron generando durante su crecimiento, estuvieron continuamente en contacto con el hierro disuelto en el medio de cultivo. Adicionalmente, como ha podido comprobarse con la experimentación discutida en apartados anteriores, dichas EPS han mostrado una clara disposición a retener tanto hierro férrico como ferroso en su estructura. Parece, por tanto, lógico suponer que las exosustancias del cultivo mixto han ido captando hierro durante el proceso de incubación. Por ello, fue necesario caracterizarlas con el objetivo inicial de confirmar que el hierro se encontraba incorporado a los exopolímeros y, posteriormente, de averiguar el mecanismo a través del cual este metal se habría interrelacionado con las EPS, en el caso de encontrarse presente. Para intentar cumplir con estos objetivos, se procedió a analizar estas sustancias por medio de espectroscopia de fotoemisión de electrones (XPS).

Esta técnica puede llevar a cabo un análisis químico elemental de la superficie de la sustancia objeto de estudio, tanto en términos cualitativos (identificación de los elementos presentes en ella), como cuantitativos (medición de la concentración de dichos elementos), además del desplazamiento químico de los átomos, es decir, puede identificar su estado de oxidación y de coordinación. Por todo lo anterior, se estimó que con las posibilidades que esta técnica ofrece se dispondría de una herramienta que permitiera avanzar en el conocimiento de estas sustancias.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se realizó una serie de análisis a EPS extraídas de cultivos mixtos crecidos con ambos tipos de soportes, cuyos resultados se contrastaron con otros similares efectuadas a EPS extraídas de cultivos puros de *A. 3.2Sup(5)*.

En primer lugar, la figura 3.78 muestra el espectro XPS de EPS generadas por cultivos puros de bacterias *A. 3.2Sup(5)* (EPS_{blanco}), crecidas usando el medio estandar CBM, es decir, en ausencia de Fe. El espectro muestra bandas características que se corresponden con la presencia de C, N, O y S, lo cual es lógico considerando los contenidos de proteínas, carbohidratos y sulfatos residuales determinados en estas sustancias en el apartado 3.2.

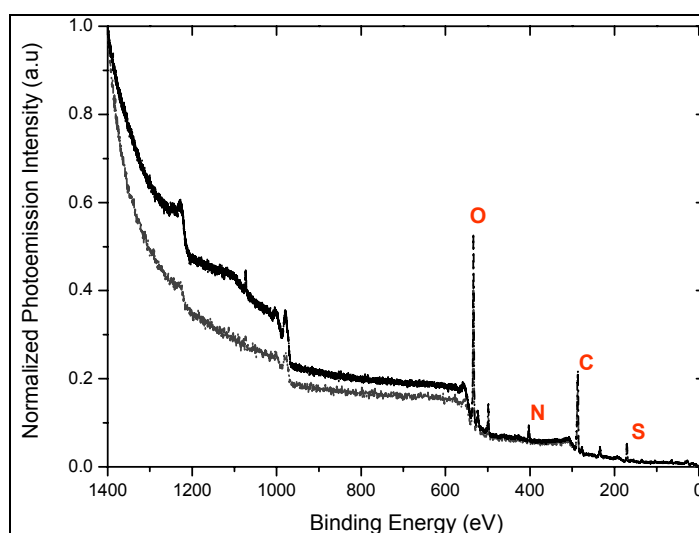


Figura 3.78 Espectro XPS de las EPS de *A. 3.2Sup(5)* extraídas con EDTA.

Por su parte, la figura 3.79 muestra el espectro de las EPS mixtas. Con dicho espectro se aprecia, además de las bandas que señalaban la presencia de C, N, O y S, otra que se relacionó con el Fe, lo que evidenciaba que, como era de esperar, estas sustancias adsorbieron una cierta cantidad de los cationes de dicho metal presentes en el medio de cultivo.

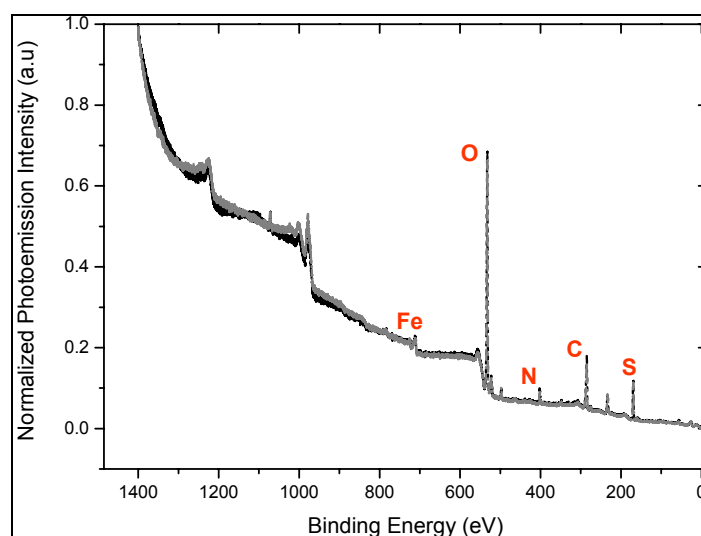


Figura 3.79 Espectro XPS de las EPS del cultivo mixto extraídas con EDTA.

La composición química elemental de las EPS mixtas se muestra en la tabla 3.17, en la que se especifican los contenidos porcentuales. Que se hayan detectado elementos como O, C y N se justifica con los contenidos de proteínas y carbohidratos indicados en la tabla 3.15; el S provendría de las sulfatos de amonio del medio que no fueron eliminados en la diálisis de las EPS. Por último, el Fe habría tenido, también, origen en el medio y podría estar asociado a las cadenas poliméricas o bien formando algún precipitado de óxido o sulfato superficial.

Tabla 3.17 Composición de EPS mixtas

Elemento	(%) peso
O 1s	43.2
C 1s	32.4
N 1s	4.8
S 2p	18.9
Fe 2p	0.8

Para dilucidar este aspecto, a continuación se muestran los espectros XPS de las regiones Fe(2p_{3/2}), C(1s), S(2p_{3/2}), O(1s) y N(1s) de EPS extraídas de cultivos mixtos crecidos en presencia de fieltro (EPS_{fieltro}) y de grafito (EPS_{grafito}). El medio de cultivo utilizado fue el medio CBM estándar al que se le agregó una disolución de FeSO₄·7H₂O de modo que la concentración de Fe(II) fuera de 4.0 g/L. Posteriormente, se presentan, también, los correspondientes a las EPS de un cultivo puro de *A. 3.2Sup(5)*

crecido sin soporte sólido y en un medio de cultivo CBM estándar (EPS_{blanco}) con el objeto de poder efectuar las correspondientes comparaciones, lo cual fue posible debido a que todos los resultados fueron normalizados, lo que permitía que fueran completamente comparables entre sí.

En primer lugar, se muestran en la figura 3.80 los espectros XPS de la región Fe(2p_{3/2}) de EPS mixtas extraídas de cultivos crecidos con fieltro y grafito, donde se comprueba que ambos espectros están constituidos por subespectros que señalan la presencia, en cada caso, de al menos cuatro sustancias de hierro y que, en general, eran similares entre sí, lo que se puede considerar como un indicio de que las sustancias presentes en ambos casos eran las mismas o muy parecidas. Estos espectros normalizados pueden visualizarse simultáneamente en la figura 3.81, con la que se aprecia la relativa similitud entre ambos.

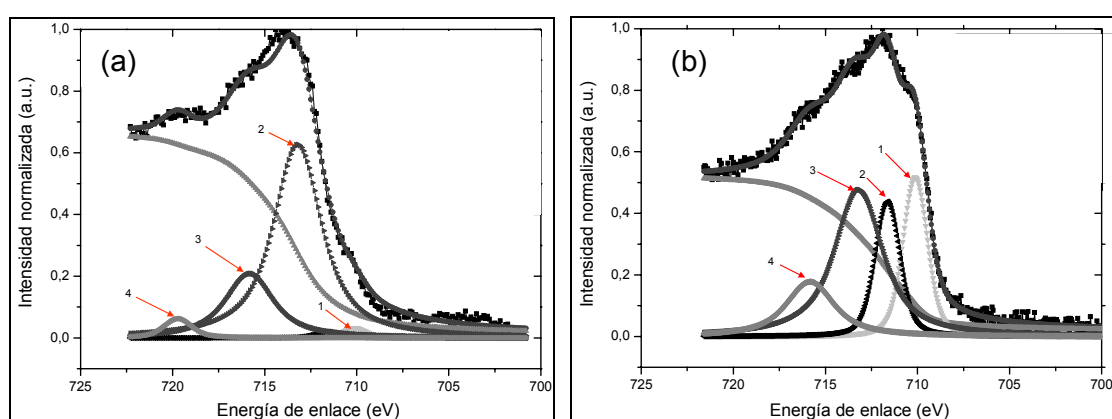


Figura 3.80 Espectro XPS de la región Fe(2p_{3/2}) de EPS extraídas de cultivos mixtos crecidos con: (a) fieltro y (b) grafito.

En particular, en el caso del espectro de las EPS_{fieltro}, se aprecian bandas destacadas a 710.2 eV que se atribuyen al Fe(II) de compuestos que contienen C y O, posiblemente como oxalato de Fe (Wagner *et al.*, 1978); a 713.3 eV, banda que se identifica con el Fe(III) contenido en sulfato férrico (Fe₂(SO₄)₃) (Brion, 1980); y a 715.8 eV, que se adjudica a una mezcla de óxidos del tipo Fe₂O₃/Fe₃O₄ con el Fe, por tanto, en sus estados de oxidación (II) y (III) (Tandon *et al.*, 1985). Además, aparecen bandas a 719.8 eV que, normalmente, se atribuyen a la presencia de Fe(III) satélite (Di-Castro and Ciampi, 1994), que, en este caso, confirmaría la presencia de este catión en la mezcla de óxidos Fe₂O₃/Fe₃O₄ (Yamashita and Hayes, 2008).

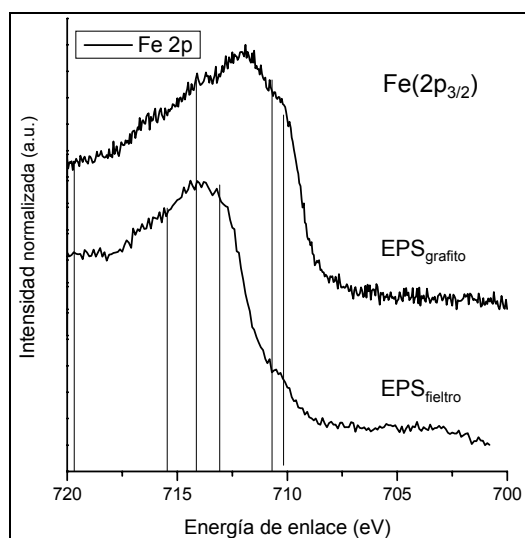


Figura 3.81 Espectros XPS de la región Fe(2p_{3/2}) de las muestras EPS_{filtro} y EPS_{grafito}.

En la tabla 3.18 aparecen recogidos todos estos resultados, constatándose que el hierro aparecía en los estados de oxidación (II) y (III), en forma de sulfatos, óxidos y, posiblemente, oxalatos de Fe. La presencia de ambos cationes en estas sustancias generadas en cultivos mixtos ratifica la hipótesis planteada al comienzo del presente apartado, que indicaba la muy probable incorporación del hierro a las exosustancias generadas en presencia de ambos tipos de cationes.

Tabla 3.18 Región Fe(2p_{3/2}) de espectro XPS de EPS mixtas

Energía de enlace (eV)	Tipo de EPS	Estado de oxidación y especie
710.2	EPS _{filtro} , EPS _{grafito}	Fe ⁽²⁺⁾ en compuesto de Fe, C y O
711.2	EPS _{grafito}	Fe ⁽³⁺⁾ en óxido
713.2	EPS _{filtro}	Fe ⁽³⁺⁾ en sulfato férrico
713.5	EPS _{grafito}	Fe ⁽³⁺⁾ en sulfato férrico
715.8	EPS _{filtro}	Fe ⁽²⁺⁾ y Fe ⁽³⁺⁾ en mezcla de óxidos
716.2	EPS _{grafito}	Fe ⁽²⁺⁾ y Fe ⁽³⁺⁾ en mezcla de óxidos
719.8	EPS _{filtro}	Fe ⁽³⁺⁾ satélite

Estos resultados estarán en concordancia con todo lo expuesto anteriormente en relación con los ensayos de interacción entre el metal y las EPS puras de A. 3.2Sup(5), lo que puede considerarse bastante razonable considerando la importante similitud en la composición bioquímica entre ambos tipos de EPS. Por este motivo, los

RESULTADOS Y DISCUSION

resultados obtenidos en los estudios con los que se analizó la interacción EPS pura s-Fe serían extrapolables a las EPS mixtas-Fe.

Para confirmar ésto, se realizaron nuevos espectros, ahora en la región S($2p_{3/2}$), de estas EPS incluyendo, además, a las de referencia (EPS_{blanco}); todo ello se muestra de forma conjunta en la figura 3.82 donde se comprueba que las tres muestras presentaban un pico simétrico en torno a la misma energía de enlace (tabla 3.19). Específicamente, el pico visualizado en las EPS_{mixtas}, tanto con grafito como con fieltro (a 168.3 y 168.8 eV, respectivamente), confirmaría la presencia de sulfato férrico detectada en el espectro de la región Fe($2p_{3/2}$) de ambas EPS (figura 3.81 y tabla 3.18).

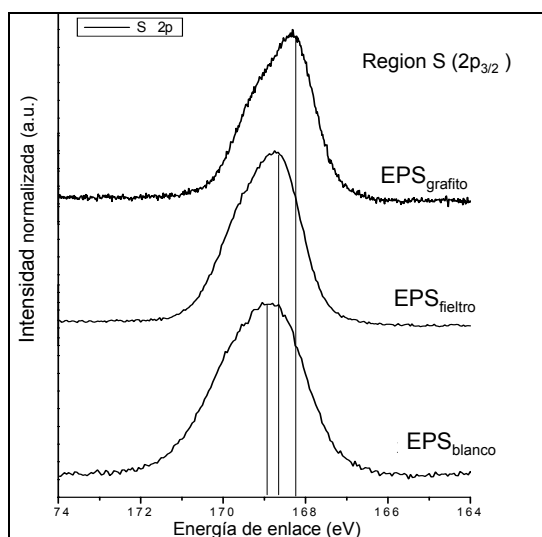


Figura 3.82 Espectros XPS de la región S($2p_{3/2}$) de las muestras EPS_{grafito}, EPS_{fieltro} y EPS_{blanco}.

Tabla 3.19 Región S($2p_{3/2}$) de espectro XPS de EPS puras y mixtas

Energía de enlace (eV)	Tipo de EPS	Tipo de enlace
168.3	EPS _{grafito}	(SO ₄) ²⁻ en sulfato férrico
168.8	EPS _{fieltro}	(SO ₄) ²⁻ en sulfato férrico
169.0	EPS _{blanco}	SO ₄ ²⁻ libre

Por su parte, se detecta la presencia de SO₄²⁻ libre (pico a 169.0 eV) en la muestra EPS_{blanco} que se puede atribuir a sulfato residual proveniente de los sulfatos, en especial de amonio, que constituyen el medio CBM estándar utilizado en el crecimiento de las células.

RESULTADOS Y DISCUSION

De igual forma, se determinó el espectro XPS para el caso del carbono (figura 3.83). Este elemento tiene importancia en el estudio debido a que es un constituyente esencial de la materia orgánica, además de estar presente en el medio de crecimiento en forma de glucosa como fuente de energía y carbono de las células de *A. 3.2Sup(5)* presentes tanto en el cultivo mixto como en el cultivo puro.

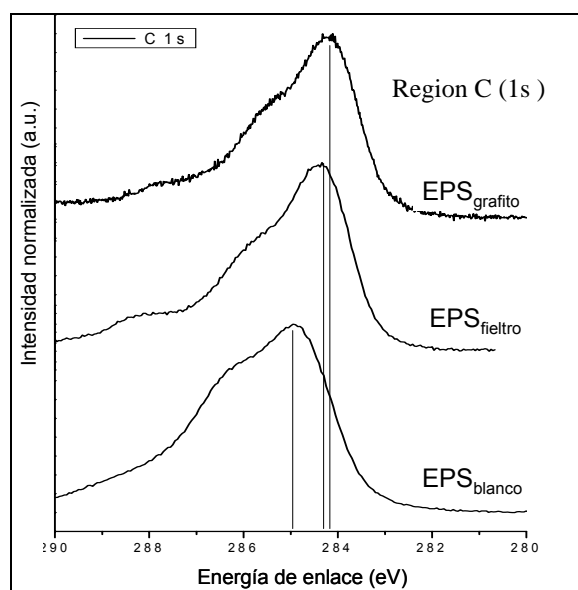


Figura 3.83 Espectros XPS de la región C(1s) de las muestras EPS_{grafito}, EPS_{filtro} y EPS_{blanco}.

Se encuentran bandas a 284.7 y 285.9 eV, que indican la presencia de carbohidratos en las EPS mixtas, y a 286.2 eV, que se correspondería con los contenidos de proteínas en las EPS puras. Estas bandas se resumen en la tabla 3.20.

Energía enlace (eV)	Tipo de EPS	Tipo de enlace
284.7	EPS _{grafito}	C en C-C o C-H
285.9	EPS _{filtro}	C en C-H
286.2	EPS _{blanco}	C en C-O o C-N

Además de los registros anteriores, también se obtuvo el de la región O(1s); la figura 3.84 muestra los espectros correspondientes donde se aprecian curvas nítidas y simétricas en torno a energías de enlace ubicadas en el rango 532-533 eV. En particular, las muestras de EPS_{grafito} y EPS_{blanco} muestran un pico que puede corresponder al enlace C-OH en alcoholes o al grupo C-O-C de sustancias orgánicas

RESULTADOS Y DISCUSION

que pudieran provenir de la glu cosa del medio de cultivo. Además, para la muestra de $\text{EPS}_{\text{filtro}}$, se encuentra un pico a 532.7 eV que es un valor típico del doble enlace carbono-oxígeno, que en este caso representa a los carbo hidratos que constituyen la base del medio de cultivo de las células. Estos valores se presentan en la tabla 3.21.

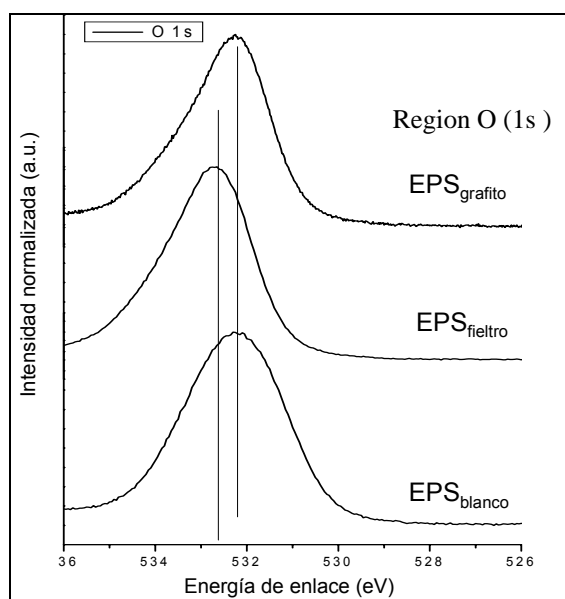


Figura 3.84 Espectros XPS de la región O (1s) de las muestras $\text{EPS}_{\text{grafito}}$, $\text{EPS}_{\text{filtro}}$ y $\text{EPS}_{\text{blanco}}$.

Energía de enlace (eV)	Tipo de EPS	Tipo de enlace
532.2	$\text{EPS}_{\text{filtro}}$, $\text{EPS}_{\text{grafito}}$	C-OH o C-O-C
532.7	$\text{EPS}_{\text{filtro}}$	C=O

Finalmente, se obtuvieron los espectros correspondientes a la región de N(1s) que se muestran en la figura 3.85 y cuyos principales picos se recogen en la tabla 3.22.

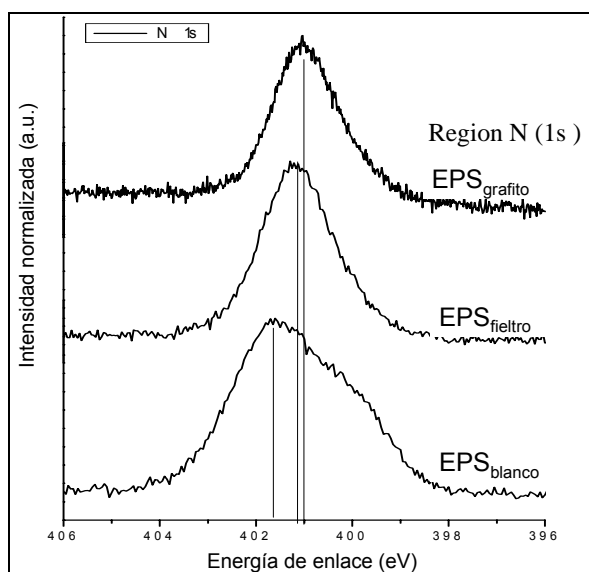


Figura 3.85 Espectros XPS de la región N (1s) de las muestras EPS_{grafito}, EPS_{filtro} y EPS_{blanco}.

Tabla 3.22 Región N(1s) de espectro XPS de EPS puras y mixtas

Energía de enlace (eV)	Tipo de EPS	Tipo de enlace
400.7	EPS _{grafito}	N-H o C-N-H
401.0	EPS _{filtro}	N-O
401.6	EPS _{blanco}	NH ₄ ⁺
401.7	EPS _{blanco}	N-H

De la tabla se aprecia la presencia, en los tres tipos de EPS, de enlaces N-H y N-O que reflejarían la presencia en estas sustancias de amidas y compuestos alifáticos, que se corresponderían con los contenidos de proteínas y carbohidratos detectados en estas sustancias (tabla 3.16) (Pretsch et al., 2003). Además, el espectro de las EPS de referencia (EPS_{blanco}) muestra un pico asociado al amonio (NH₄⁺), lo cual confirmaría la presencia en estas sustancias de residuos de sulfatos de este catión, ya detectadas en el espectro de la región S(2p_{3/2}) (figura 3.82 y tabla 3.19).

3.5.6 Caracterización de los grupos funcionales en las EPS_{mixtas}

La caracterización de la estructura de las EPS mixtas se realizó, tal como se hizo en los casos anteriores, a través del análisis de los espectros de infrarrojo. Como criterio de referencia se utilizó el correspondiente a las EPS puras que habían adsorbido Fe(II)

RESULTADOS Y DISCUSION

y Fe(III); en la medida del grado de coincidencia que pudieran presentar ambos espectros y, tomando en consideración el importante parecido en la composición bioquímica de las EPS mixtas con las EPS puras, se estimó que si los resultados eran más o menos coincidentes podrían extrapolarse los mecanismos de interacción EPS-Fe(II)/Fe(III) propuestos para justificar los establecidos entre ambos cationes y las EPS puras; ambos espectros de infrarrojo aparecen en la figura 3.86.

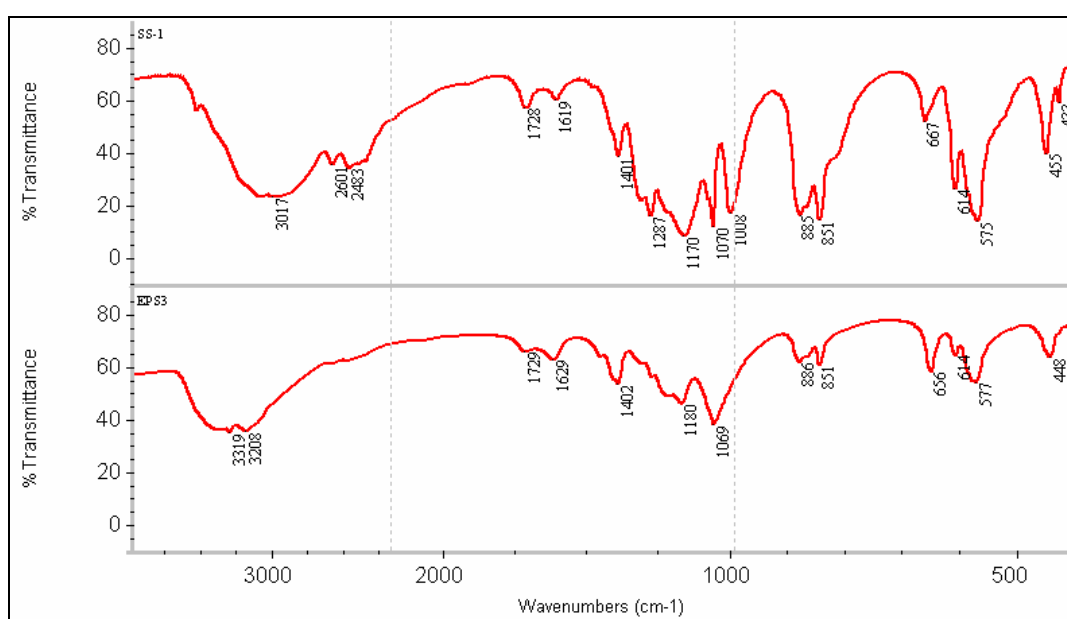


Figura 3.86 Espectros FT IR de EPS conteniendo Fe(II) y Fe(III): (a) cultivos mixtos y (b) A. 3.2Sup(5).

Puede apreciarse que el espectro correspondiente a las EPS mixtas presentó bandas prácticamente coincidentes con el de las EPS puras conteniendo Fe(II) y Fe(III). Entre ellas pueden destacarse las que aparecen a 1729 y 1401 cm^{-1} , características del grupo carboxilo que, como ha sido determinado en los estudios realizados anteriormente con EPS puras, fue el grupo involucrado en la interacción entre estas sustancias y el metal. Concretamente, el primer valor se considera característico de la tensión asimétrica de C=O en carboxilos provenientes de la protonación de los oxalatos residuales del EDTA usado en la extracción (Schmitt and Flemming, 1998), mientras que la banda en torno a 1401 cm^{-1} hace referencia a la vibración de deformación del enlace C-O en el grupo carboxilato (Comte *et al.*, 2007, 2008). Además, en los espectros aparecen otras bandas, también, bastante coincidentes en la zona de los polisacáridos (a 1170 y 1070 cm^{-1}) y otras, idénticas, en la zona a

característica del espectro (a 885 y 851 cm^{-1}). Como ya se discutió, las primeras bandas pueden considerarse como representativas de la vibración de tensión del grupo -OH, correspondiente a los polisacáridos contenidos en las EPS (Comte *et al.*, 2006), mientras que las segundas se pueden adjudicar a la interacción del Fe con el grupo sulfonato (Fourest and Volesky, 1995; Figueira *et al.*, 1999).

Los mencionados espectros presentan, además, otras bandas similares en torno a 3200 cm^{-1} , asignadas normalmente a contenidos de humedad residual en la muestra (Omoike and Chorover, 2004) y algunas otras en una zona de valores de 400 a 600 cm^{-1} , que son, en rigor, difíciles de adjudicar a un compuesto específico (Schmitt and Flemming, 1998; Pretsch *et al.*, 2003).

Las bandas específicas más destacadas que presentaron las EPS mixtas se encuentran en torno a 2600 , 2480 y 1287 cm^{-1} . Sin embargo, se ha establecido que la primera se relaciona, normalmente, a la adsorción de CO_2 ambiental en la muestra (Pretsch *et al.*, 2003), mientras que la segunda se postula como correspondiente a un fuerte enlace de hidrógeno con los EPS (Wierzejewska and Ratajczak, 1997). Por último, la banda a 1287 cm^{-1} se puede adjudicar a la vibración asimétrica del enlace P=O en el grupo fosfonato que habría interactuado con el Fe (Omoike and Chorover, 2004).

En definitiva, el análisis anterior ha puesto de manifiesto que ambos espectros muestran una gran coincidencia entre sí. Ahora bien, con la base del mencionado paralelismo de los espectros sería interesante realizar una serie de consideraciones. El registro de infrarrojo que ha servido de referencia en la figura 3.87 fue el de las EPS puras tras su interacción con el hierro; sin embargo, con anterioridad se contrastó dicho espectro con el de las mismas exosustancias exentas del metal, lo que permitió determinar los grupos funcionales implicados en la incorporación de los iones tanto férricos como ferrosos. No obstante, con las EPS mixtas dicho análisis comparativo no ha sido posible realizarlo debido a que tales sustancias copoliméricas, durante su formación, siempre han estado en contacto con el hierro, por lo que el metal inevitablemente ha ido, paralelamente, siendo adsorbido. Es decir, como un estudio comparativo de las EPS mixtas con y sin hierro (similar al de las EPS puras) no se pudo efectuar, únicamente podría utilizarse como evidencia de la relación de las

RESULTADOS Y DISCUSION

exosustancias mixtas con el hierro la similitud entre las bandas de unas y otras EPS cargadas con el metal.

En cualquier caso, los análisis de XPS de los exopolímeros de los cultivos mixtos demostraron la incorporación del Fe en su estructura, lo que corroboraría los argumentos utilizados en los párrafos anteriores, es decir, el hierro había sido adsorbido en ambos casos de la misma manera, esto es, cada ión férreo habría formado uniones bidentadas con cada dos grupos carboxilos formando oxalatos de Fe(II) y Fe(III).

Un aspecto adicional estudiado fue el efecto de la presencia de los soportes en la estructura de las EPS de los cultivos mixtos. Para ello, se obtuvieron los espectros de infrarrojo de las EPS mixtas extraídas a partir de cultivos crecidos sin soportes, para ser comparados con los de las EPS de bacterias que crecieron en la presencia de fieltro y grafito; se presentan en la figura 3.87.

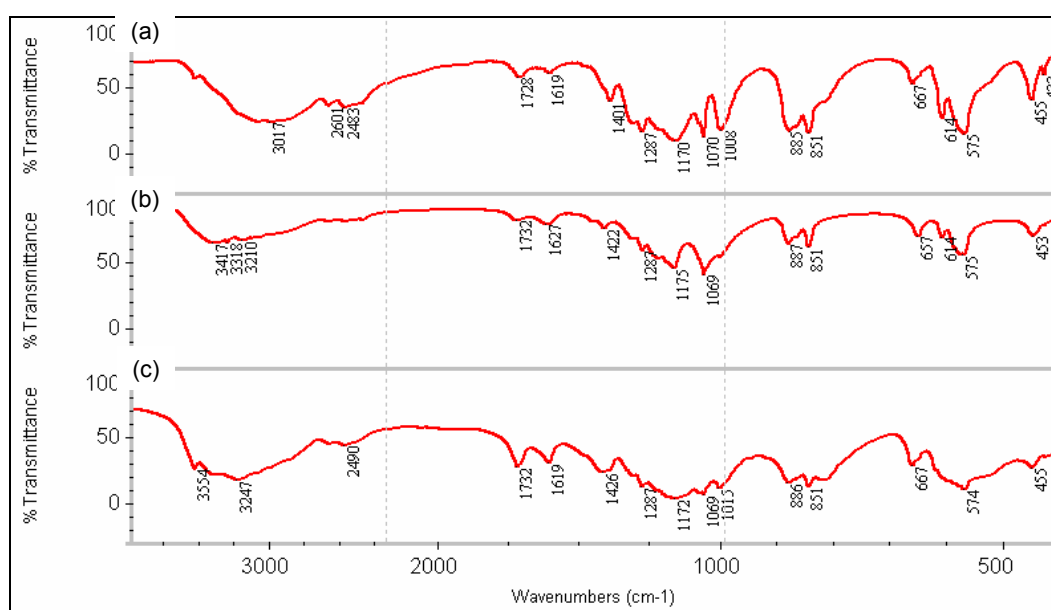


Figura 3.87 Espectros FTIR de EPS extraídas por EDTA desde cultivos mixtos crecidos: (a) sin soporte sólido; (b) con fieltro de carbono y (c) discos de grafito.

En general, los espectros de los tres tipos de EPS mixtos mostraron bandas relativamente similares entre las que destacan las bandas más gruesas a valores entre 3200 y 3500 cm^{-1} , y otras menos pronunciadas y estrechas en la zona característica del espectro (valores en torno a 850 cm^{-1}). Como en anteriores ocasiones, las primeras

RESULTADOS Y DISCUSION

se pueden adjudicar a la humedad retenida en el tratamiento de la muestra (Pretsch *et al.*, 2003), mientras que las segundas pueden corresponder a grupos funcionales de P y S provenientes del ADN celular y del medio de cultivo, respectivamente (Guibaud *et al.*, 2003).

Además, la figura 3.87 recoge otros picos casi coincidentes entre los espectros a valores de 1732, 1619, 1287, 1172 y 1069 cm^{-1} , los cuales han sido interpretados previamente y, en términos generales, representan: la tensión asimétrica de C=O en grupos carboxílicos (Comte *et al.*, 2006); la tensión simétrica de los enlaces C=O y C-N de amidas asociadas con proteínas (Omoike and Chorover, 2006); la vibración asimétrica del enlace P=O (Parikh and Chorover, 2006); y a la vibración de tensión de -OH en los polisacáridos (Comte *et al.*, 2006), respectivamente. La tabla 3.23 muestra un resumen de dichos picos registrados en los espectros.

Tabla 3.23 Principales grupos funcionales en las EPS mixtas (sin/con soportes)

Banda (cm^{-1})	Asignación y descripción de las bandas
3200 - 3500	ν_s de OH en compuestos poliméricos
2600 - 2610	ν_s de C=O en CO_2 atmosférico
1720 - 1740	ν_{as} de COOH en ácidos carboxílicos (grupo carboxílico)
1620 - 1640	ν_s de C=O y C-N de amidas asociadas con proteínas (amida I)
1270 - 1290	ν_{as} de P=O de grupos fosfatos
1160 - 1180	ν_{as} de C-O en ésteres de ácidos carboxílicos
1010 - 1070	ν_s de OH en compuestos poliméricos
< 1000	Grupos funcionales de azufres o fosfatos

ν_s , vibración tensión simét.; ν_{as} vibración tensión asimét.; δ_s , vibración deformación

Sin embargo, a pesar de las similitudes anteriores, se han encontrado algunas diferencias entre los espectros. En primer lugar, los picos a 1401 y 1426 cm^{-1} que presentan las EPS obtenidas con soportes (fieltro y grafito, respectivamente) no aparecen en el espectro de las EPS sin soporte. Estas bandas pueden adjudicarse a la vibración de deformación C-C en alcanos - CH_2 o - CH_3 (Pretsch *et al.*, 2003), lo que indicaría que en el espectro correspondiente su aparición podría estar encubierta por alguna de las otras bandas que presenta dicho espectro. Otra diferencia, pero esta vez a la inversa, corresponde al pico a 1401 cm^{-1} , adjudicado a la vibración de deformación

RESULTADOS Y DISCUSION

del enlace C-O en el grupo carboxilato (Pretsch *et al.*, 2003), que presenta el espectro de las EPS sin soporte, pero que no muestran las EPS obtenidas con soportes, lo cual podría interpretarse como resultado de una interacción más intensa entre el grupo carboxilato y el hierro en el primer caso. La tabla 3.24 muestra un resumen de los picos no coincidentes encontrados en los espectros de las muestras en estudio.

Tabla 3.24 Grupos funcionales no coincidentes en EPS mixtas (sin/con soportes)

Rango (cm ⁻¹)	Soporte	Asignación y descripción de las bandas
1460 - 1470	fieltro	δ_s de C-C en -CH ₂
1420 - 1430	fieltro, grafito	δ_s de C=C en alcanos (-CH ₂ , -CH ₃)
1400 - 1410	sin soporte	δ_s de C-O en carboxilatos
1310 - 1330	fieltro	ν_s y ν_{as} de S=O en el grupo sulfonil R-SO ₂ -SR
1230 - 1250	fieltro	ν_{as} de P=O de grupos fosfatos

ν_s , vibración tensión simét.; ν_{as} vibración tensión asimét.; δ_s , vibración deformación

En resumen, del análisis anterior se puede plantear la posibilidad de que la adición de soportes de carbono a los cultivos mixtos no tuviera impacto en la estructura de las EPS extraídas con estos cultivos y, por lo tanto, no habrían afectado al tipo de relación que estas sustancias pudieran haber establecido con los cationes de Fe. Lo anterior, podría corroborarse con el espectro DRX de las EPS mixtas de la figura 3.89 en el que se aprecia, aproximadamente, los mismos picos que en el correspondiente a las EPS puras conteniendo Fe(II) y Fe(III).

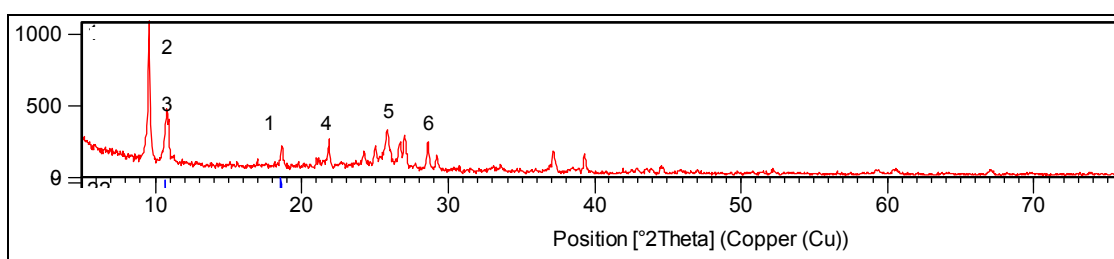


Figura 3.88 Espectro DRX de las EPS mixtas extraídas por EDTA.

Efectivamente, el mencionado espectro DRX indica la presencia en estas sustancias de oxalatos ferrosos ($\text{Fe}_2\text{C}_2\text{O}_4$ y $\text{Fe}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), oxalato férrico como mineralita ($\text{K}_3\text{FeC}_6\text{O}_{12} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), formiato de Fe hidratado ($\text{C}_3\text{H}_3\text{FeO}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$), además de sulfato férrico y romboclasa. Todas estas fases, exceptuando la romboclasa, se encontraban

presentes en las EPS puras que adsorbieron Fe(II) y Fe(III). La relación entre los picos en el espectro y las correspondientes especies se muestra en la tabla 3.25.

Tabla 3.25 Especies en EPS mixtas

1	$\text{FeC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
2	$\text{FeH}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (romboclasa)
3	$\text{C}_3\text{H}_3\text{FeO}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$
4	FeC_2O_4
5	$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$
6	$\text{K}_3\text{FeC}_6\text{O}_{12} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (minguzita)

De esta manera, se confirmaría, entonces, que los mecanismos de interacción antes propuestos para la interacción de EPS puras con los cationes de Fe(III) y de Fe(II) son también válidos para la interacción entre las EPS mixtas y los mencionados cationes en disolución.

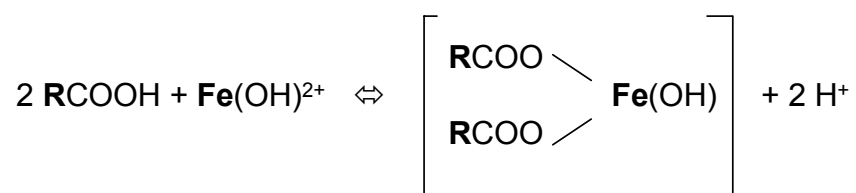
CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

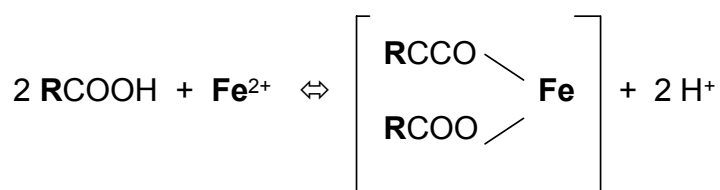
- Las bacterias *Acidiphilium spp.* (*A. 3.2Sup(5)* y *A. Berrocal*) y *A. ferrooxidans* demostraron crecer adecuadamente en cultivos puros de laboratorio fuera de su hábitat natural de procedencia (Rio Tinto, Huelva).
- De todos los métodos de extracción de sustancias poliméricas extracelulares de *Acidiphilium spp.* evaluados, el mejor fue el método de extracción con EDTA debido a que combinó las mayores tasas de extracción de EPS con los menores grado de lisis celular, en todas las condiciones estudiadas. Esto permite asegurar que las EPS extraídas con este método se encuentran relativamente libres de contaminación de sustancias intracelulares y que corresponden, esencialmente, a los exopolímeros producidos por estas bacterias.
- Las EPS extraídas en todos los casos están constituidas, casi en su totalidad, por carbohidratos y proteínas. Este comportamiento se repite en todas las condiciones estudiadas, es decir, para cultivos crecidos tanto en ausencia como en presencia de soportes y para los diferentes tiempos de extracción.
- La estructura de las EPS depende del método de extracción, aunque en los casos analizados las sustancias estarían constituidas principalmente por los grupos funcionales carboxilo e hidroxilo.
- Las células de *A. 3.2Sup(5)* y *A. ferrooxidans* presentan una alta tendencia a adherirse a los soportes estudiados (filtro de carbono y discos de grafito). Esto permite validar a estos materiales como adecuados para ser usados como electrodos en una eventual pila de combustible microbiana que utilice estas bacterias en su ciclo operacional. Además, las células de estas bacterias tienden a adherirse y concentrarse en rugosidades e imperfecciones superficiales y a ser embebidas con el tiempo en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares.
- Las EPS de *A. 3.2Sup(5)* utilizadas en los ensayos de adsorción de los cationes de Fe, extraídas por los métodos de EDTA y centrifugación presentaban un valor de pKa cercano a 3.0, que se corresponde con el de los grupos carboxílicos y que indica, además, que este sería el grupo funcional mayoritario en estas exosustancias.

CONCLUSIONES

- Las EPS de *Acidiphilium spp.*, extraídas con EDTA y centrifugación, demostraron ser capaces de adsorber el Fe, en sus estados de oxidación (II) y (III), contenido en disoluciones ácidas.
- Cada tipo de EPS adsorbió cantidades similares de Fe(II) y de Fe(III), lo que implica que la adsorción del metal por cada una de ellas no se vio afectada por el radio iónico, hidratación o estado de oxidación de cada catión.
- La cantidad de metal adsorbido tendió, para los dos tipos de EPS y disoluciones de Fe usados en los ensayos (de Fe(II), de Fe(III) o de Fe(II) y Fe(III)) a aumentar en función de la concentración, confirmando así que estas sustancias cumplen en la adsorción con los postulados del modelo de Freundlich.
- Los datos de especiación analizados indicaron que los cationes de Fe se encontrarían como catión Fe(II) libre, en el caso del catión ferroso, y parcialmente hidrolizado, como $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$, en el caso del catión férrico.
- El mecanismo de adsorción de Fe(III) consistió en la interacción de dos grupos carboxilos de la biomasa con un catión férrico, parcialmente hidrolizado como $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$, según la reacción:



- Por su parte, el mecanismo de adsorción de Fe(II) consistió, de manera análoga al caso anterior, en la interacción entre dos grupos carboxilos de la biomasa con cada catión ferroso Fe^{2+} , esta vez no hidrolizado, según la reacción:



CONCLUSIONES

- Los valores de log K para cada una de las reacciones de interacción fueron 1.06 ± 0.16 , para el caso de la adsorción de Fe(III), y 0.77 ± 0.33 para el de la adsorción de Fe(II), lo que implica que en ambos casos la interacción EPS-Fe es reversible y que ambos cationes podrían ser recuperados desde las exosustancias.
- Por otro lado, los cultivos mixtos de *A. 3.2Sup(5)* y *A. ferrooxidans* crecieron adecuadamente en medios preparados al efecto a los que se les añadió tanto Fe(II) como Fe(III).
- La bacteria *A. 3.2Sup(5)*, en cultivos mixtos, tuvo la capacidad de respirar aeróbicamente con Fe(III), induciendo la generación de Fe(II), el cual fue nuevamente oxidado por la bacteria *A. ferrooxidans*. Estos resultados dejan en evidencia que en un sistema en el que estén involucradas ambas bacterias, como es el de la pila de combustible en desarrollo, las EPS que vayan generando estarán en permanente contacto con cationes Fe(II) y Fe(III).
- Las EPS extraídas de cultivos mixtos de *A. 3.2Sup(5)* y *A. ferrooxidans* fueron muy similares en su composición bioquímica a aquellas obtenidas de cultivos puros de *A. 3.2Sup(5)*, por lo que los resultados obtenidos hasta ahora con esta última clase de sustancias podrían extrapolarse a las EPS de los cultivos mixtos.
- Las EPS de cultivos mixtos de *A. 3.2Sup(5)* y *A. ferrooxidans* extraídas por EDTA fueron capaces, también, de adsorber Fe contenido en disoluciones ácidas. Esto implica que en la utilización de estas bacterias en la proyectada pila de combustible microbiana, debería considerarse el impacto que estas sustancias podrían tener sobre el contenido de Fe en la disolución, especialmente en las cercanías de los electrodos. Tanto la superficie de los electrodos como la biopelícula que se formaría sobre ellos, se convertirían, en la práctica, en entidades con una importante capacidad de “secuestrar” al metal desde el medio, lo que provocaría un aumento en la concentración local de Fe que indujeran la precipitación de sales del mismo.
- La estructura de las EPS mixtas fue muy similar a las de las EPS puras conteniendo Fe(II) y Fe(III), lo que indicaría que ambas sustancias se relacionarían

CONCLUSIONES

de una manera similar con dichos cationes. Esto viene avalado por la presencia, entre otras sustancias, de oxalatos de Fe(II) y Fe(III) en esta clase de EPS. Los mecanismos de interacción antes propuestos para la interacción de EPS puras con los cationes de Fe(III) y de Fe(II) son también válidos para la interacción entre las EPS mixtas y los mencionados cationes en disolución.

CONCLUSIONES

Acharya, C., Joseph, D. and Apte, S. K. (2009). Uranium sequestration by a marine cyanobacterium, *Synechococcus elongatus* strain BDU/750 42. *Bioresource Technology*, **100**, 2176-2181.

Aguilera, A., Souza-Egipsy, V., San Martín-Uriz, P. and Amils, R. (2008). Extracellular matrix assembly in extreme acidic eukaryotic biofilms and their possible implications in heavy metal adsorption. *Aquat Toxicol*, **88**(4), 257-266.

Ahluwalia, S. S. and Goyal, D. (2005). Removal of heavy metals by waste tea leaves from aqueous solution. *Engineering in Life Sciences*, **5**(2), 158-162.

Aksu, Z., Acikel, U. and Kutsal, T. (1997). Application of multicomponent adsorption isotherms to simultaneous biosorption of iron(III) and chromium(VI) on *C. vulgaris*

Alvarez, P. J. J. and Illman, W. A. (2006). *Bioremediation and natural attenuation*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.

Atwood, J. L. and Steed, J. W. (2004). *Encyclopedia of supramolecular chemistry*. CRC Press, Boca Raton, FL.

Azeredo, J., Oliveira, R. and Lazarova, V. (1998). A new method for extraction of exopolymers from activated sludges. *Water Science and Technology*, **37**(4-5), 367-370.

Beech, I. B., Sunner, J. A. and Hirraoka, K. (2005). Microbe-surface interactions in biofouling and biocorrosion processes. *International Microbiology*, **8**, 157-168.

Bergey, D. H., Holt, J. G. and Krieg, N. R. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore.

Beveridge, T. J. and Murray, G. E. (1976). Uptake and retention of metals by cell walls of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, **127**(3), 1502-1518.

Beverkog, B. and Puigdomenech, I. (1996). Revised Pourbaix diagrams for iron at 25-300°C. *Corrosion Science*, **38**(12), 2121-2135.

Bhaskar, P. V. and Bhosle, N. B. (2006). Bacterial extracellular polymeric substance (EPS): A carrier of heavy metals in the marine food-chain. *Environment International*, **32**(2), 191-198.

Bilgin, A. A., Silverstein, J. and Jenkins, J. D. (2004). Iron respiration by *Acidiphilium cryptum* at pH 5. *FEMS Microbiology Ecology*, **49**, 137-143.

Bohn, H. L., McNeal, B. L. and O'Connor, G. A. (2001). *Soil chemistry*. John Wiley and Sons.

Bos, R., Van-der-Mei, C. and Busscher, H. J. (1999). Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions - its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiology Reviews*, **23**, 179-230.

CONCLUSIONES

Brierley, C. L. and Brierley, J. A. (1993). Immobilization of biomass for industrial application of biosorption. Minerals, Metals & Materials Society. Warrendale, PA.

Brion, D. (1980). Etude par spectroscopie de photoelectrons de la degradation superficielle de FeS₂, CuFeS₂, ZnS et PbS a l'air et dans l'eau. *Applications of Surface Science*, **5**(2), 133-152.

Brown, M. and Lester, J. (1980). Comparison of bacterial extracellular polymer extraction methods. *Applied and Environmental Microbiology*, **40**(2), 179-185.

Bustard, M. and McHale, A. P. (1998). Biosorption of heavy metals by distillery-derived biomass. *Bioprocess Engineering*, **19**(351-353),

Cabrera, G., Gómez, J. M. and 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.

Casas, J. M., Crisóstomo, G. and Cifuentes, L. (2005). Speciation of the Fe(II)-Fe(III)-H₂SO₄-H₂O system at 25 and 50°C. *Hydrometallurgy*, **80**, 254-264.

Chaiyapoom, L. (2004) Synthesis and characterization of products from oxalate complexes of chromium and aluminium, Prince of Songkla University, Songkla, Thailandia.

Chaudhuri, S. and Lovley, D. (2003). Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nature Biotechnology*, **21**(10), 1229-1232.

Chen, X. C., Chen, L. T., Shi, J. Y., Wu, W. X. and Chen, Y. X. (2008). Immobilization of heavy metals by *Pseudomonas putida* C Z1/goethite composites from solution. *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, **61**, 170-175.

Comte, S., Guibaud, G. and Baudu, M. (2006). Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties. Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods. *Enzyme and Microbial Technology*, **38**, 237-245.

Comte, S., Guibaud, G. and Baudu, M. (2007). Effect of extraction method on EPS from activated sludge: An HPSEC investigation. *Journal of Hazardous Materials*, **40**(1-2), 129-137.

Comte, S., Guibaud, G. and Baudu, M. (2008). Biosorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) towards Cd, Cu and Pb for different pH values. *Journal of Hazardous Materials*, **151**, 185-193.

Corzo, J., León-Barrios, M., Hernández-Rico, V. and Gutiérrez-Navarro, A. M. (1994). Precipitation of metallic cations by the acidic exopolysaccharides from *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium (Chamaecytisus)* strain BGA-1. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**(12), 4531-4536.

Daoud, J. and Karamanev, D. (2006). Formation of jarosite during Fe²⁺ oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Minerals Engineering*, **19**, 960 - 967.

CONCLUSIONES

De-Philippis, R., Paperi, R. and Sili, C. (2007). Heavy metal sorption by released polysaccharides and whole cultures of two exopolysaccharide-producing cyanobacteria. *Biodegradation* **18**, 181-187.

Deo, N., Narayan, K. A. and Somasundaran, P. (2001). Mechanisms of adhesion of *Paenabacillus polymyxa* onto hematite, corundum and quartz. *International Journal of Mineral Processing*, **62**, 27-39.

Di-Castro, V. and Ciampi, S. (1994). XPS study of the growth and reactivity of Fe/Mn O thin films. *Surface Science*, **331-333**, 294-299.

Dignac, M., Urbain, V., Rybacki, D., Bruchet, A., Snidaro, D. and Scribe, P. (1998). Chemical description of extracellular polymers: implication on activated sludge floc structure. *Water Science and Technology*, **38**(8-9), 45-53.

Eneroth, E. and Koch, C. B. (2004). Fe-hydroxysulphates from bacterial Fe²⁺ oxidation. *Hyperfine Interactions*, **156/157**, 423-429.

Fernández, V., Amils, R., García, J., Gómez, F., Ballester, A. and Martín, J. (2004). Empleo de bacterias reductoras de hierro en procesos energéticos y de descontaminación. Dirección General de Universidades e Investigación. Comunidad Autónoma de Madrid.

Figueira, M. M., Volesky, B. and Mathieu, H. J. (1999). Instrumental analysis study of iron species biosorption by *Sargassum* biomass. *Environmental Science and Technology*, **33**(11), 1840-1846.

Fourest, E. and Roux, J. C. (1992). Heavy metal biosorption by fungal mycelial by-products: mechanisms and influence of pH. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **37**, 399-403.

Fourest, E. and Volesky, B. (1995). Contribution of sulfonate groups and alginate to heavy metal biosorption by the dry biomass of *Sargassum fluitans*. *Environmental Science and Technology*, **30**(1), 277-282.

Fox, M. A. and Whitesell, J. K. (1997). *Organic chemistry*. Jones and Bartlett, Sudbury, MA.

Frankel, R. B. and Bazylinski, D. A. (2003). Biologically induced mineralization by bacteria. *Reviews Mineralogy and Geochemistry*, **54**, 95-114.

Freire-Nordi, C. S., Vieira, A. A. H. and Nascimento, O. R. (2005). The metal binding capacity of *Anabaena spiroides* extracellular polysaccharide: an EPR study. *Process Biochemistry*, **40**, 2215-2224.

Friedrich, J. M., Ponce-de-León, C., Reade, G. W. and Walsh, F. C. (2004). Reticulated vitreous carbon as an electrode material. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **561**, 203-217.

CONCLUSIONES

Frölund, B., Palmgren, R., Keiding, K. and Nielsen, P. (1996). Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Research*, **30**(8), 1749-1758.

Fuks, L., Filipiuk, D. and Majdan, M. (2006). Transition metal complexes with alginate biosorbent. *Journal of Molecular Structure*, **792-793**, 104-109.

Gadd, G. M. (2009). Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **84**, 13-28.

Geesey, G. (1982). Microbial exopolymers: ecological and economic considerations. *ASM News*, **48**, 9-14.

Gehrke, T., Teledge, J., Thierry, D. and Sand, W. (1998). Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(7), 2743 - 2747.

Génin, J. M. R., Ruby, C., Géhin, A. and Refait, P. (2006). Synthesis of green rust by oxidation of $\text{Fe}(\text{OH})_2$, their products of oxidation and reduction of ferric oxyhydroxides; E_h -pH Pourbaix diagrams. *C. R. Geoscience*, **338**, 433-446.

Gérente, C., Mesnil, P. C. d., Andrès, Y., Thibault, J.-F. and Cloirec, P. L. (2000). Removal of metal ions from aqueous solution on low cost natural polysaccharides. Sorption mechanism approach. *Reactive and Functional Polymers*, **46**, 135-144.

Ghuri, M., Okibe, N. and Johnson, D. (2007). Attachment of acidophilic bacteria to solid surfaces: the significance of species and strain variations. *Hydrometallurgy*, **85**(2-4), 72-80.

Ginn, B. R. and Fein, J. B. (2008). The effect of species diversity on metal adsorption onto bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **72**(16), 3939-3948.

González-Toril, E., Gómez, F., Malki, M. and Amils, R. (2006). Methods for the isolation and study of acidophilic microorganisms. *Methods in Microbiology*. Rainey, F. and Oren, A. (eds), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 436-502.

Guibaud, G., Tixier, N., Bouju, A. and Baudu, M. (2003). Relations between extracellular polymers' composition and its ability to complex Cd, Cu and Pb. *Chemosphere*, **52**, 1701-1710.

Guibaud, G., van Hullebusch, E. and Bordas, F. (2006). Lead and cadmium biosorption by extracellular polymeric substances (EPS) extracted from activated sludges: pH-sorption edge tests and mathematical equilibrium modelling. *Chemosphere*, **64**(11), 1955-1962.

Guibaud, G., Bordas, F., Saaid, A., D'Abzac, P. and Van Hullebusch, E. (2008). Effect of pH on cadmium and lead binding by extracellular polymeric substances (EPS) extracted from environmental bacterial strains. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, **63**(1), 48-54.

CONCLUSIONES

Guibaud, G., Hullebusch, E. v., Bordas, F., d'Abzac, P. and Joussein, E. (2009). Sorption of Cd(II) and Pb(II) by exopolymERIC substances (EPS) extracted from activated sludges and pure bacterial strains: Modelling of the metal/ligand ratio effect and role of the mineral fraction. *Bioresource Technology*, **100**, 2959-2968.

Harneit, K., Göksel, A., Kock, J., Klock, J., Gehrke, T. and Sand, W. (2006). Adhesion to metal sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*. *Hydrometallurgy*, **83**(1-4), 245-254.

Harris, D. C. (2007). *Análisis químico cuantitativo*. Edit. Reverté, Barcelona.

Harrison, A. (1983). Genomic and physiological comparisons between heterotrophic thiobacilli and *Acidiphilium cryptum*, *Thiobacillus versutus* sp. nov. and *Thiobacillus acidophilus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **33**, 211-217.

Holleman, A. and Wiberg, E. (2001). *Inorganic Chemistry*. Academic Press, San Diego.

Ibáñez, J. P. and Umetsu, Y. (2004). Uptake of trivalent chromium from aqueous solutions using protonated dry alginate beads. *Hydrometallurgy*, **72**, 327-334.

INE (2008). *Anuario Estadístico de España*. Instituto Nacional de Estadística s INE, Madrid, España.

IPCC (2007). *Cambio climático 2007: Informe de síntesis*. Intergovernmental Panel on Climate Change IPCC, Ginebra, Suiza.

Jahn, A. and Nielsen, P. (1995). Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from biofilms using a cation exchange resin. *Water Science and Technology*, **32**(8), 157-164.

Jang, A., Seo, Y. and Bishop, P. L. (2005). The removal of heavy metals in urban runoff by sorption on mulch. *Environmental Pollution*, **133**, 117-127.

Jiang, W., Saxena, A., Song, B., Ward, B. B., Beveridge, T. J. and Myneni, S. C. B. (2004). Elucidation of functional groups on Gram-positive and Gram-negative bacterial surfaces using infrared spectroscopy. *Langmuir*, **20**, 11433-11442.

Johnson, D. B., Macvicar, J. H. and 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.

Johnson, D. B. and McGinness, S. (1991). A highly efficient and universal solid medium for growing mesophilic and moderately thermophilic, iron-oxidizing, acidophilic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, **13**, 113-122.

Johnson, D. B. (1995). Selective solid media for isolating and enumerating acidophilic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, **23**, 205-218.

Johnson, M. A. and Yang, K. (1975). Process for removing iron from an aqueous acid solution containing iron and copper. Patents, B. o. United States. 3929599.

CONCLUSIONES

Kang, S. Y., Bremer, P. J., Kim, K. W. and Mc Quillan, A. J. (2006). Monitoring metal ion binding in single-layer *Pseudomonas aeruginosa* biofilms using ATR-IR spectroscopy. *Langmuir*, **22**, 286-291.

Kelly, D. and Wood, A. (2000). Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **50**(511-516),

Kim, H. J., Park, H. S., Hyun, M. S., Chang, I. S., Kim, M. and Kim, B. H. (2002). A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *Enzyme and Microbial Technology*, **30**, 145-152.

Kinzler, K., Gehrke, T., Teledgi, J. and Sand, W. (2003). Bioleaching—a result of interfacial processes caused by extracellular polymeric substances (EPS). *Hydrometallurgy*, **71**, 83-88.

Kiran, B. and Kaushik, A. (2008). Chromium binding capacity of *Lyngbya putealis* exopolysaccharides. *Biochemical Engineering Journal*, **38**, 47-54.

Kives, J., Orgaz, B. and SanJosé, C. (2006). Polysaccharide differences between planktonic and biofilm-associated EPS from *Pseudomonas fluorescens* B52. *Colloids and Surfaces*, **50**, 104-108.

Konishi, Y., Noda, Y. and Asai, S. (1998). Precipitation stripping of yttrium oxalate powders from yttrium-loaded carboxylate solutions with aqueous oxalic acid solutions. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **37**, 2093-2098.

Lakzian, A., Berenji, A. R., Karimi, E. and Razavi, S. (2008). Adsorption capability of lead, nickel and zinc by exopolysaccharide and dried of *Ensifer meliloti*. *Asian Journal of Chemistry*, **20**(8), 6075-6080.

Laspidou, C. S. and Rittmann, B. E. (2002). A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Research*, **36**, 2711-2720.

Lei, J., Huaiyang, Z., Xiaotong, P. and Zhonghao, D. (2009). The use of microscopy techniques to analyze microbial biofilm of the bio-oxidized chalcopyrite surface. *Minerals Engineering*, **22**, 37-42.

Li, X. Y. and Yang, S. F. (2007). Influence of loosely bound extracellular polymeric substances (EPS) on the flocculation, sedimentation and dewaterability of activated sludge. *Water Research*, **41**(5), 1022-1030.

Liu, H. and Fang, H. (2002a). Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *Journal of Biotechnology*, **95**, 249-256.

Liu, H. and Fang, H. (2002b). Characterization of electrostatic binding sites of extracellular polymers by linear programming analysis of titration data. *Biotechnology and Bioengineering*, **80**(7), 806-811.

CONCLUSIONES

Liu, Y., Lam, M. C. and Fang, H. H. P. (2001). Adsorption of heavy metals by EPS of activated sludge. *Water Science and Technology*, **43**(6), 59-66.

Liu, Y. and Fang, H. P. (2003). Influences of extracellular polymeric substances (EPS) on flocculation, settling, and dewatering of activated sludge. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **33**(3), 237-273.

Lovley, D. R. and Phillips, E. J. P. (1986). Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, **51**(4), 683-689.

Lowry, O. L., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry*, **193**, 265-275.

Mackintosh, M. (1978). Nitrogen fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Genetics Microbiology*, **105**, 215-218.

Malki, M., González-Toril, E., Sanz, J. L., Gómez, F., Rodríguez, N. and Amils, R. (2006). Importance of the iron cycle in biohydrometallurgy. *Hydrometallurgy*, **83**(1-4), 223-228.

Malki, M., De Lacey, A. L., Rodríguez, N., Amils, R. and Fernandez, V. M. (2008). Preferential use of an anode as an electron acceptor by an acidophilic bacterium in the presence of oxygen. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**(14), 4472-4476.

McLean, R. J., Beauchemin, D., Clapham, L. and Beveridge, T. J. (1990). Metal binding characteristics of the gamma-glutamyl capsular polymer of *Bacillus licheniformis* ATCC 9945. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**(12), 3671-3677.

McLean, R. J., Beauchemin, D. and Beveridge, T. J. (1992). Influence of oxidation state on iron binding by *Bacillus licheniformis* capsule. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**(1), 405-408.

McSwain, B., Irvine, R., Hausner, M. and Wilderer, P. (2005). Composition and distribution of extracellular polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**(2), 1051-1057.

Meruane, G. and Vargas, T. (2003). Bacterial oxidation of ferrous iron by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in the pH range 2.5 - 7.0. *Hydrometallurgy*, **71**, 149 - 158.

Micheletti, E., Colica, G., Viti, C., Tamagnini, P. and De Philippis, R. (2008). Selectivity in the heavy metal removal by exopolysaccharide-producing cyanobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, **105**(1), 88-94.

MMA (2008). *Banco Público de Indicadores Ambientales*. Ministerio de Medio Ambiente MMA, Madrid, España.

Moon, S.-H., Park, C.-S., Kim, Y.-J. and Park, Y.-I. (2006). Biosorption isotherms of Pb(II) and Zn(II) on Pestan, an extracellular polysaccharide, of *Pestalotiopsis* sp. KCTC 8637P. *Process Biochemistry*, **41**, 312-316.

CONCLUSIONES

Morel, F. and Hering, J. G. (1993). Principles and applications of aquatic chemistry. (eds), John Wiley & Sons, New York,

Morgan, J., Foster, C. and Evison, L. (1990). A comparative study of the nature of biopolymers extracted from anaerobic and activated sludges. *Water Resources*, **6**(743-750),

Morillo, J. A., García-Ribera, R., Quesada, T., Aguilera, M., Ramos-Cormenzana, A. and Monteoliva-Sánchez, M. (2008). Biosorption of heavy metals by the exopolysaccharide produced by *Paenibacillus jamilae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **24**(11), 2699-2704.

Mousavi, S., Yaghmaei, S. and Jafari, A. (2007). Influence of process variables on biooxidation of ferrous sulfate by an indigenous *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Part II: Bioreactor experiments. *Fuel*, **86**, 993-999.

Naja, G. and Mustin, C. (2005). Lead biosorption study with *Rhizopus arrhizus* using a metal-based titration technique. *Journal of Colloid and Interface Science*, **292**(2), 537-543.

Nakamoto, K. (1997). *Infrared spectra of inorganic and coordination compounds*. Wiley & Sons, New York.

Nielsen, P. H. and Jahn, A. (1999). Extraction of EPS. *Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function*. Wingender, J., Neu, T. R. and Flemming, H. C. (eds), Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 1-19.

Omoike, A. and Chorover, J. (2004). Spectroscopic study of extracellular polymeric substances from *Bacillus subtilis*: Aqueous chemistry and adsorption effects. *Biomacromolecules*, **5**(4), 1219-1230.

Omoike, A. and Chorover, J. (2006). Adsorption to goethite of extracellular polymeric substances from *Bacillus subtilis*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **70**, 827-838.

Pal, A. and Paul, A. (2008). Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. *Indian Journal of Microbiology*, **48**, 49-64.

Parikh, S. J. and Chorover, J. (2006). ATR-FTIR spectroscopy reveals bond formation during bacterial adhesion to iron oxide. *Langmuir*, **22**, 8492-8500.

Pérez, R. M., Abalos, A., Gómez, J. M. and Cantero, D. (2007). Biosorption of heavy metals by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a petroleum contaminated site. *Advanced Materials Research*, **20**(615-618),

Pettine, M., D'Ottone, L., Campanella, L., Millero, F. J. and Passino, R. (1998). The reduction of chromium (VI) by iron (II) in aqueous solutions. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **62**(9), 1509-1519.

Prado, M., Valdman, E., Leite, S. G. F., Battaglini, F. and Ruzal, S. M. (2005). Biosorption of copper by *Paenibacillus polymyxa* cells and their exopolysaccharide. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **21**(6-7), 1157-1163.

CONCLUSIONES

- Pretsch, E., Bühlmann, P., Affolter, C., Herrera, A. and Martínez, R. (2003). *Determinación estructural de compuestos orgánicos*. Masson S.A., Barcelona.
- Quintelas, C., Fernandes, B., Castro, J., Figueiredo, H. and Tavares, T. (2008). Biosorption of Cr(VI) by three different bacterial species supported on granular activated carbon - A comparative study. *Journal of Hazardous Materials*, **153**, 799-809.
- Quintelas, C., Rocha, Z., Silva, B., Fonseca, B., Figueiredo, H. and Tavares, T. (2009). Removal of Cd(II), Cr(VI), Fe(III) and Ni(II) from aqueous solutions by an *E. coli* biofilm supported on kaolin. *Chemical Engineering Journal*, **149**, 319-324.
- Rau, I., González, A. and Valiente, M. (2003). Arsenic (V) adsorption by immobilized iron mediation. Modeling of the adsorption process and influence of interfering anions. *Reactive and Functional Polymers*, **54**, 85-94.
- Roden, N. (2006). *Goal of geomicrobiology*. Washington, DC.
- Salles, P., Azamor, F., Pereira, A., Ashton, E. and Gomes, S. (2005). Evaluation of heavy metals biosorption in aqueous effluents by a bacterial extracellular polymeric substance. Rio de Janeiro.
- Sand, W., Gehrke, T., Jozsa, P. G. and Schippers, A. (2001). (Bio)chemistry of bacterial leaching-direct vs. indirect bioleaching. *Hydrometallurgy*, **59**, 159-175.
- Sand, W. and Gehrke, T. (2006). Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria. *Research in Microbiology*, **157**, 49-56.
- Schmidt, J. and Ahring, B. (1994). Extracellular polymers in granular sludge from different upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **42**, 457-462.
- Schmitt, J. and Flemming, H. (1998). FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **41**, 1-11.
- Selatnia, A., Boukazoula, A., Kechid, N., Bakhti, M. Z. and Chergui, A. (2004). Biosorption of Fe³⁺ from aqueous solution by a bacterial dead *Streptomyces rimosus* biomass. *Process Biochemistry*, **39**, 1643-1651.
- Sesay, M., Özcengiz, G. and Sanin, F. (2006). Enzymatic extraction of activated sludge extracellular polymers and implications on bioflocculation. *Water Research*, **40**, 1359-1366.
- Shackelford, J. F. and Güemes, A. (1998). *Introducción a la ciencia de materiales para ingenieros*. Prentice Hall Iberia, Madrid.
- Sheng, G., Yu, H. and Yu, Z. (2005). Extraction of extracellular polymeric substances from the photosynthetic *Rhodospseudomonas acidophila*. *Applied Microbial and Cell Physiology*, **67**, 125-130.

CONCLUSIONES

Sheng, G., Yu, H. and Wang, C. (2006). FTIR-spectral analysis of two photosynthetic H₂-producing strains and their extracellular polymeric substances. *Applied Microbial and Cell Physiology*, **73**, 204-210.

Smith, D. S. and Ferris, F. G. (2003). Specific surface chemical interactions between hydrous ferric oxide and iron-reducing bacteria determined using pK_a spectra. *Journal of Colloid and Interface Science*, **266**, 60-67.

Souza, C., Henriques, A. and Rangel, O. (2005). The metal binding capacity of *Anabaena spiroides* extracellular polysaccharide: an EPR study. *Process Biochemistry*, **40**, 2215-2224.

Stefansson, A. (2007). Iron(III) hydrolysis and solubility at 25°C. *Environmental Science & Technology*, **41**, 6117-6123.

Tan, G. Q. and Xiao, D. (2008). Chemical modification and XPS study for lead(II) binding by wheat stems biomass. *Separation Science and Technology*, **43**(8), 2196-2207.

Tandon, R. K., Payling, R., Chenhall, B. E., Crisp, P. T., Ellis, J. and Baker, R. S. (1985). Application of X-ray photoelectron spectroscopy to the analysis of stainless steel welding aerosols. *Applications of Surface Science*, **20**(4), 527-537.

Tian, Y. (2008). Behaviour of bacterial extracellular polymeric substances from activated sludge: a review. *International Journal of Environment and Pollution*, **32**(1), 78-89.

Toner, B., Manceau, A., Webb, S. M. and Sposito, G. (2006). Zinc sorption to biogenic hexagonal-birnessite particles within a hydrated bacterial biofilm. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **70**(1), 27-43.

Tremaine, P. R., Trevani, L. N. and Rudolph, W. W. (2004). Acid-base ionisation and metal complexation under hydrothermal conditions by UV-visible and Raman spectroscopy. Banff, Alberta, Canada.

Trevelyan, W. E., Forrest, R. S. and Harrison, J. S. (1952). Determination of yeast carbohydrates with the anthrone reagent. *Nature*, **170**, 626-627.

Turner, R. C. and Miles, K. E. (1957). The ultraviolet absorption spectra of the ferric ion and its first hydrolysis product in aqueous solutions. *Canadian Journal of Chemistry*, **35**, 1002-1009.

Ueshima, M., Ginn, B. R., Haack, E. A., Szymanowski, J. E. S. and Fein, J. B. (2008). Cd adsorption onto *Pseudomonas putida* in the presence and absence of extracellular polymeric substances. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **72**, 5885-5895.

Upadhyayula, V. K. K., Deng, S., Smith, G. B. and Mitchell, M. C. (2009). Adsorption of *Bacillus subtilis* on single-walled carbon nanotube aggregates, activated carbon and NanoCeram. *Water Research*, **43**, 148-156.

CONCLUSIONES

van Hullebusch, E. D., Gieteling, J., Zhang, M., Zandvoort, M. H., Van Daele, W., Defrancq, J. and Lens, P. N. L. (2006). Cobalt sorption onto anaerobic granular sludge: Isotherm and spatial localization analysis. *Journal of Biotechnology*, **121**(2), 227-240.

Videla, H. and Herrera, L. (2005). Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. *International Microbiology*, **8**, 169-180.

Volesky, B. (2003). *Sorption and Biosorption*. BV-Sorbex Inc., St. Lambert (Quebec), Canada.

Volesky, B. (2004). *Sorption and Biosorption*. BV-Sorbex Inc., St. Lambert (Quebec), Canada.

Volesky, B. and Holan, Z. R. (2008). Biosorption of heavy metals. *Biotechnology Progress*, **11**(3), 235-250.

Wagner, C. D., Riggs, W. M., Davis, L. E., Moulter, J. M. and Muilenberg, G. E. (1978). *Handbook of X-ray photoelectron spectroscopy*. Perkin-Elmer, Londres.

Wierzejewska, M. and Ratajczak, H. (1997). Matrix isolation infrared studies of complexes formed between substituted phenols and trimethylamine. *Journal of Molecular Structure*, **416**, 121-132.

Wingender, J., Neu, T. R. and Flemming, H. C. (1999). What are bacterial extracellular polymeric substances?. *Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function*. Wingender, J., Neu, T. R. and Flemming, H. C. (eds), Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-19.

Yamashita, T. and Hayes, P. (2008). Analysis of XPS spectra of Fe²⁺ and Fe³⁺ ions in oxide materials. *Applied Surface Science*, **254**(8), 2441-2449.

Yeo, Y., Jang, N., Cho, J., Kim, K. S. and Kim, I. S. (2007). Identification of the effect of extracellular polymeric substances on bacterial adhesion to the membrane surface in a membrane bioreactor using *Pseudomonas fluorescens*. *Water Science and Technology*, **55**(1-2), 35-42.

Yu, T., Lei, Z. and Sun, D. Z. (2006). Functions and behaviors of activated sludge extracellular polymeric substances (EPS): a promising environmental interest. *Journal of Environmental Sciences-China*, **18**(3), 420-427.

Zhang, D., Wang, J. and Pan, X. (2006). Cadmium sorption by EPSs produced by anaerobic sludge under sulfate-reducing conditions. *Journal of Hazardous Materials*, **B 138**, 589-593.

Zhang, X., Bishop, P. and Kinkle, B. (1999). Comparison of extraction methods for quantifying extracellular polymers in biofilms. *Water Science and Technology*, **39**(7), 211-218.

Zheng, Y., Fang, X., Ye, Z., Li, Y. and Cai, W. (2008). Biosorption of Cu(II) on extracellular polymers from *Bacillus sp.* 19. *Journal of Environmental Sciences - China*, **20**(11), 1288-1293.