

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE LOS MATERIALES E
INGENIERÍA METALÚRGICA



TESIS DOCTORAL

Biorreducción de especies solubles e insolubles de hierro

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Ernesto Alejandro González Romo

Directores

Antonio Ballester Pérez
Felisa González González

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Ciencia de los Materiales
e Ingeniería Metalúrgica

TESIS DOCTORAL:

**Biorreducción de especies solubles
e insolubles de hierro**

Por:

Ernesto Alejandro González Romo

Directores

Dr. Antonio Ballester Pérez
Dra. Felisa González González

Madrid, junio de 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Ciencia de los Materiales
e Ingeniería Metalúrgica

Biorreducción de especies solubles e insolubles de hierro

Memoria para optar al grado de Doctor en Química Avanzada,
presentada por:

Ernesto Alejandro González Romo

Directores

Dr. Antonio Ballester Pérez
Dra. Felisa González González

Madrid, junio de 2015

El Dr. Antonio Ballester Pérez y la Dra. Felisa González González, Catedráticos 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 Ernesto Alejandro González Romo ha realizado el trabajo titulado “**Biorreducción de especies solubles e insolubles de hierro**” en los laboratorios del Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica de la Universidad Complutense de Madrid.

2º.- Que como directores del trabajo, autorizan su presentación en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense, 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, firman el presente en Madrid a ocho de junio de dos mil quince.

Fdo.: Dr. Antonio Ballester Pérez

Fdo.: Dra. Felisa González González

“La filosofía está escrita en ese vasto libro que está siempre abierto ante nuestros ojos: me refiero al universo [...]. Está escrito en lenguaje matemático, y las letras son triángulos, círculos y otras figuras geométricas, sin las cuales es humanamente imposible entender una sola palabra.”

“Todas las verdades son fáciles de entender, una vez descubiertas. La cuestión es descubrirlas.”

Galileo Galilei

*Dedicada a mi familia y a Piedad...
definitivamente lo mejor que me ha pasado.*

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a mis directores de tesis, los Profesores Antonio Ballester y Felisa González, la excelente disposición que han mostrado en todo momento para que los trabajos se desarrollaran en las mejores condiciones y sus palabras de aliento cuando las cosas no transcurrían tal como estaba previsto.

También mis agradecimientos a los Profesores Jesús Muñoz y María Luisa Blázquez por el apoyo brindado, y en especial al primero de ellos por todo el tiempo dedicado a los intercambios de ideas, a la revisión de los manuscritos de los artículos y a las sesiones de microscopía electrónica.

Agradezco sinceramente a Amalia Espada y José Manuel Rodríguez por haberme permitido acompañarles durante la realización de su trabajo de fin de grado y por haberme ayudado, mediante dicho trabajo, a realizar algunos de los experimentos.

Quisiera agradecerle al Dr. Wolfgang Sand, de la Universidad de Duisburg-Essen, su disposición a suministrar las cepas de *Acidiphilium cryptum* y *Sulfolobus metallicus*, así como también al Dr. Joan Viñals (Q.E.P.D.), de la Universidad de Barcelona, por proporcionar el mineral de magnetita.

Muchas gracias al Dr. Julián Velázquez y a D. Enrique Fraga por su apoyo para la realización de los ensayos de difracción y fluorescencia de rayos X, respectivamente.

Gracias a los Dres. Ángel Pardo y José Manuel Pingarrón por permitirnos utilizar algunos de sus instrumentos para los ensayos electroquímicos.

No puedo dejar de agradecer a mi familia en general, y en especial a mis padres, Inés y Hernán, Karol, la Nena y la Lela, por el cariño y apoyo brindados. Una mención especial a D. Juan, Dña. Dolores, José Fco., Inma., Emmanuel, Candela, Lucas y, por supuesto, Piedad, a quienes he llegado a querer mucho en este período de tiempo.

Quiero agradecer a dos grandes amigos que he podido hacer durante este período: Beatriz Mingo y Mitja Šajatovič.

En último lugar quiero agradecer, en mayor o menor medida, a todos con quienes he podido compartir en el laboratorio. Entre ellos se encuentran: Laura, Irene, Rommel, Nicolás, Diana, Sara, Miguel, Marta, Gabriela, Rodrigo, Ignacio, Leticia, Ana, Alfonso, David, Tomás y Sisa.

Resumen

Introducción

Los procesos pirometalúrgicos empleados en la industria siderúrgica son responsables de gran parte de las emisiones de CO₂. En contraposición a estas técnicas, la Hidrometalurgia es reconocida como una tecnología más limpia, que requiere menores inversiones para el procesamiento de minerales de baja ley.

La Biohidrometalurgia, una rama de la Hidrometalurgia, es responsable de la recuperación de metales mediante reacciones microbianas en medio acuoso. El conocimiento adquirido por los hidrometalurgistas tras el descubrimiento de los microorganismos quimiolitotrófos ha contribuido a los procesos de extracción de cobre y oro. Sin embargo, el creciente interés en el desarrollo de operaciones para el aprovechamiento de minerales oxidados ha conducido al estudio de otras cepas microbianas.

Casi todos los organismos vivos adquieren la energía de un proceso de transferencia de electrones, conocido como cadena de transporte electrónico. En éste, el flujo de los electrones desde bajos hasta altos potenciales permite la síntesis de adenosín trifosfato, la “moneda” energética celular. Aunque los quimiolitotrófos utilizan oxígeno para oxidar los compuestos reducidos de hierro y azufre, otras bacterias obtienen su energía desde compuestos orgánicos reduciendo Fe(III), M(IV), SO₄²⁻ y NO₃⁻.

Los microorganismos capaces de utilizar Fe(III) como aceptor final de electrones son conocidos como bacterias reductoras de hierro, de las que se han aislado cepas neutrófilas (p.ej., *Geobacter* sp. y *Shewanella* sp.) y acidófilas (p.ej., *Acidiphilium* sp.). Sin embargo, las últimas podrían tener una mayor aplicación hidrometalúrgica dado que la solubilidad del hierro se incrementa en ambientes ácidos.

La termodinámica muestra que los óxidos de Fe(III) son compuestos con una baja solubilidad en condiciones de neutralidad. Pese a que su solubilidad se incrementa a medida que disminuye el pH, el hierro disuelto puede ser mantenido en disolución fácilmente como Fe(II). Aunque la disolución de los óxidos ocurre mediante mecanismos de protonación, complejamiento y reducción, las estrategias desarrolladas por las bacterias para la respiración extracelular incluyen: adhesión microbiana, síntesis de apéndices conductores, mediadores redox y ligandos.

Además de la posibilidad de utilizar bacterias reductoras de hierro en procesos biomineros, su empleo podría incluir el mejoramiento de materiales mediante la remoción de impurezas de hierro, la recuperación de metales no féreos, la biorremediación de ambientes contaminados y la producción de hidrógeno o electricidad en sistemas bioelectroquímicos.

En cualquier caso, esta investigación se centra en la biorreducción de compuestos de hierro disueltos y sólidos empleando la cepa *Acidiphilium cryptum* JF-5. Para lograr este objetivo, en primer lugar se caracterizó la cinética de biorreducción de sólidos y especies disueltas de Fe(III). Seguidamente, se evaluó la disolución de sólidos férricos en medios que contenían ligandos y mediadores redox. Finalmente, se investigó la biolixiviación de manganeso empleando dicha bacteria en distintos medios.

Materiales y métodos

La mayoría de los experimentos se llevaron a cabo en viales sellados que contenían medio E y *Acidiphilium cryptum* JF-5, a 35 °C y 150 rpm. En algunos casos, el medio E se suplementó con Fe(III), Fe(II), ligandos o mediadores redox, procediendo a su esterilización en autoclave o por filtración. Los sólidos probados incluyeron minerales de hierro (magnetita, goethita y hematitas) y manganeso (originarios de Brasil y Costa de Marfil) junto a jarosita de amonio sintética; todos ellos

con un tamaño de partícula menor a 0,090 mm y previamente desinfectados con etanol. Los sólidos iniciales y residuos fueron caracterizados, por lo general, mediante: difracción y fluorescencia de rayos X, microscopía electrónica de barrido y distribución de tamaño de partícula.

El sobrenadante contenido en los viales fue muestreado periódicamente empleado jeringuillas estériles para determinar el pH, potencial redox y las concentraciones de Fe(II) y hierro total (por los métodos de la ferrocina y espectroscopía de absorción atómica). Las jeringuillas fueron desoxigenadas mediante una corriente de gas (CO₂:N₂ estéril). El pH se corrigió periódicamente añadiendo H₂SO₄, según las lecturas de pH y curvas de valoración ácido/base hechas previamente.

En algunos experimentos se probaron distintas condiciones, por ejemplo: cultivos en matraces, columnas conteniendo hematites (con mayor tamaño de partícula), diferentes tipos de agitación, midiendo las concentraciones de biomasa y glucosa, y desarrollando algunos cultivos con otras cepas. Esto último, se refiere específicamente a los ensayos realizados con mediadores redox y *Aeromonas hydrophila*, donde las muestras fueron homogéneamente tomadas y digeridas con HCl para medir el contenido total de ferroso. Finalmente, se realizaron experimentos para determinar la autooxidación del Fe(II), la biorreducción de los quelatos de Fe(III) y pruebas de voltamperometría para explicar los datos obtenidos.

Resultados y discusión

Las mediciones de sustrato, biomasa y Fe(II) obtenidas en los experimentos de biorreducción de Fe(III) disuelto con *A. cryptum* permitieron la determinación de parámetros cinéticos y de rendimiento. Los resultados obtenidos indican que la eficiencia de reducción disminuye al incrementarse la aireación, probablemente porque la reducción del oxígeno y Fe(III) son reacciones paralelas que compiten entre sí por los electrones liberados por las células. *A. cryptum* también fue capaz de reducir Fe(III) cuando la glucosa se hubo agotado, lo que podría ser atribuido a su capacidad de acumular polihidroxibutirato. Finalmente, la velocidad específica de crecimiento registrada en condiciones aeróbicas se incrementó cuando la concentración de hierro estuvo entre 5 y 120 mmol/L. Concentraciones menores de hierro no hicieron cambiar la velocidad, mientras que este parámetro disminuyó levemente para concentraciones por encima de 120 mmol/L; probablemente debido a la inhibición por este metal.

El beneficio de un sistema de control de pH se demostró en los experimentos realizados con magnetita. Por el contrario, cuando no se controló el pH, el proceso de disolución se detuvo además de formarse siderita. La disolución de la magnetita se incrementó apreciablemente desde menos del 2 %, en las pruebas abióticas, hasta más del 20 %, en los viales inoculados (con control de pH). El oxalato también tuvo un efecto positivo en los viales inoculados debido a su capacidad de amortiguar las variaciones de pH, incrementándose la disolución de la magnetita de un 20 a un 25 %.

Las pruebas de disolución de goethita, hematites y jarosita de amonio, en medios que contenían *A. cryptum* y oxalato, mostraron que este último compuesto fue efectivo incrementando la velocidad de disolución. Un diseño factorial completo (2^k) con tres variables (bacteria, Fe(II) y ligando, k=3) se utilizó para extender el estudio a otros quelantes: glicina, citrato, etilendiaminotetraacetato (EDTA), nitrilotriacetato (NTA), oxalato, piruvato, ftalato y salicilato. Los mejores resultados, obtenidos en medios que contenían Fe(II) y NTA u oxalato, podrían explicarse por la capacidad de los quelatos de hierro para comportarse como mediadores redox, según los resultados obtenidos en los ensayos de autooxidación de Fe(II) y biorreducción de quelatos de Fe(III).

La biorreducción de jarosita de amonio fue probada empleando dos cepas, *Acidiphilium cryptum* y *Aeromonas hydrophila*, y nueve mediadores redox: antraquinona-2,6-disulfonato (2,6-AQDS), antraquinona-1,5-disulfonato (1,5-AQDS), safranina, fenosafranina, rojo neutro, tionina, azul de metileno, resazurina y 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP). Los compuestos con un potencial redox entre 50 y 150 mV vs. Ag/AgCl (a pH 2,4, azul de metileno y tionina) dieron buenos resultados en presencia de *A. cryptum*, mientras que los mejores resultados para *A. hydrophila* se obtuvieron para

aquellas moléculas con un potencial redox en el rango -500 a -400 mV vs. Ag/AgCl (a pH neutro, 2,6-AQDS, safranina y fenosafranina). Los diferentes intervalos observados para ambas cepas podrían explicarse por los límites de los campos de estabilidad de las especies de Fe(II)-Fe(III) y las capacidades reductoras microbianas.

La disolución de la jarosita de amonio probada bajo diferentes modos de agitación mostró que la velocidad de disolución obtenida con una baja agitación casi duplicó aquella conseguida en condiciones estáticas; sin embargo, dicha velocidad no se incrementó cuando la mezcla fue completa. Los viales agitados magnéticamente presentaron los mejores resultados, probablemente por el efecto disgregante del agitador magnético que logró la exposición de una mayor área superficial del sólido atacado. De este modo, la disolución de la jarosita no sería un proceso controlado por la transferencia de masa sino por el área superficial. La disolución de hematites en columnas presentó períodos de incremento y decrecimiento de la concentración de hierro disuelto, los que estuvieron relacionados con las oscilaciones en el potencial redox y los sucesivos agotamientos de glucosa. Los mejores resultados obtenidos fueron en presencia de tionina, seguidos por el medio con oxalato y sin suplementar, lo cual puede explicarse por los potenciales redox registrados.

La biolixiviación de manganeso fue probada usando dos minerales (de diferente origen) con distintos contenido de este metal. *A. cryptum* resultó ser capaz de biolixiviar manganeso de ambos sólidos. Los ensayos llevados a cabo en medios que contenían Fe(II) y oxalato mostraron mejores resultados, probablemente por la capacidad de los complejos de hierro para actuar como mediadores redox. Sin embargo, la incorporación de hierro tuvo, en un caso, un efecto negativo, posiblemente atribuido a su precipitación en los sitios activos de disolución. La selectividad del proceso resultó incrementada por la presencia de oxalato, mientras que el azul de metileno y la tionina causaron su disminución. Dichos resultados estuvieron de acuerdo con los datos termodinámicos de los sistemas del hierro y manganeso.

Conclusiones

Los resultados experimentales mostraron que la biorreducción del Fe(III) desde una fuente soluble ocurrió más rápidamente que desde sólidos férricos, caso en que la velocidad de disolución fue ampliamente dependiente de la composición del sólido. La presencia de *A. cryptum* y un sistema de control de pH resultaron esenciales para alcanzar elevados grados de disolución.

El NTA, oxalato y Fe(II) tuvieron un efecto positivo sobre la disolución de la jarosita de amonio, probablemente por la formación de quelatos capaces de actuar como mediadores redox. Adicionalmente, los buenos resultados de disolución de magnetita en medios suplementados con oxalato podrían explicarse por la capacidad de este último compuesto para amortiguar las variaciones de pH.

Los experimentos llevados cabo con jarosita de amonio en medios suplementados con mediadores redox mostraron buenos resultados para *A. cryptum* y *A. hydrophila* cuando aquellos compuestos tenían potenciales redox de 50 a 150 mV y de -500 a -400 mV vs. Ag/AgCl, respectivamente. Este comportamiento estaría relacionado con el diagrama Eh-pH y las habilidades reductoras de ambas variedades.

Finalmente, los experimentos llevados a cabo con minerales de manganeso probaron la factibilidad de emplear *A. cryptum* en la biolixiviación de manganeso. Los medios que contenían oxalato y Fe(II) mostraron buenos resultados; sin embargo, la adición de azul de metileno y tionina afectó significativamente la selectividad del proceso.

Summary

Introduction

Pyrometallurgical processes employed in the steel industry are responsible for the emission of large amounts of CO₂. In contrast to these, Hydrometallurgy has been recognized as a cleaner technology, which requires lower investment for processing low-grade ores.

Biohydrometallurgy, a field belonging to Hydrometallurgy, deals with the recovery of metals using microbial reactions in aqueous media. The knowledge acquired by hydrometallurgists after the discovery of chemolithotrophic microorganisms has contributed to both copper and gold extraction processes. However, the growing interest to develop operations for the beneficiation of oxide ores has led to the study of other microbial strains.

Almost every living organism acquires energy from an electron transfer process, known as electron transport chain. Hence, the electron flux from low to high potentials allows the synthesis of adenosine triphosphate, the energetic coin of the cell. Although chemolithotrophs use oxygen to oxidize iron and sulphur reduced compounds, other bacteria harvest energy from organic compounds by reducing Fe(III), Mn(IV), SO₄²⁻ and NO₃⁻.

Microorganisms capable to use Fe(III) as final electron acceptor are known as iron-reducing bacteria. Notwithstanding it has been possible to isolate neutrophilic (e.g. *Geobacter* sp. and *Shewanella* sp.) and acidophilic (e.g. *Acidiphilium* sp.) iron-reducing strains. The last ones would have greater applications in hydrometallurgy since acidic environments increase iron solubility.

Thermodynamics shows that Fe(III) oxides are low soluble compounds under circumneutral conditions. Although its solubility increases as pH drops, dissolved iron can be easily kept in solution as Fe(II). Despite oxides dissolution takes place through protonation, complexation and reduction mechanisms, strategies developed by bacteria for extracellular respiration include: microbial adhesion, conductive appendages synthesis, electron shuttles and ligands.

Besides the possibility of using iron-reducing bacteria in iron biomining, they could be implemented in: materials upgrading by removing iron impurities, non-ferrous metal recovery, bioremediation of polluted environments and hydrogen or electricity production in bioelectrochemical systems.

Accordingly, this research focused on the bioreduction of dissolved and solid ferric compounds using the *Acidiphilium cryptum* JF-5 strain. In order to achieve this goal, the kinetics of dissolved and solid Fe(III) bioreduction was first characterized. Secondly, the ferric solids dissolution was evaluated in media containing ligands and electron shuttles. Finally, the manganese bioleaching process was investigated using this bacteria in different media.

Materials and methods

Most of experiments were performed in sealed vials, at 35 °C and 150 rpm, containing E medium and *Acidiphilium cryptum* JF-5. In some cases, E medium was supplied with Fe(III), Fe(II), ligands or electron shuttles, and autoclaved or sterilized by filtration. Tested solids included iron (magnetite, goethite and hematite) and manganese ores (originally from Brazil and Ivory Coast) and synthetic ammonium jarosite; all of them with a particle size lower than 0.090 mm and previously disinfected with ethanol. Starting solids and residues were generally characterized through: X-ray fluorescence and diffraction, scanning electron microscopy and particle sized distribution.

Supernatant in vials was periodically sampled using sterile syringes to determine pH, redox potential, Fe(II) and total iron concentrations (by the ferrozine and atomic absorption spectroscopy methods, respectively). Syringes were deoxygenated by gas flushing (CO₂:N₂ sterile). pH was periodically corrected adding H₂SO₄, according to pH readings and acid/base titration curves previously made.

For some experiments different conditions were tested, for example: culture flasks, columns filled with hematite (greater particle size), different stirring modes, biomass and glucose concentration measurements, and cultures with other strain. The last one referred specifically to assays performed with electron shuttles and *Aeromonas hydrophila*, where samples were homogeneously withdrawn and digested with HCl to measure total ferrous iron. Finally, experiments to determine Fe(II) autooxidation, Fe(III) chelates bioreduction and voltammetry tests were performed to explain the obtained data.

Results and discussion

Substrate, biomass and Fe(II) measurements obtained from dissolved Fe(III) bioreduction experiments with *A. cryptum* allowed to determine both kinetics and yield parameters. The obtained results pointed out that the reduction efficiency declines as aeration increases, likely because oxygen and Fe(III) reduction are parallel reactions that compete for electrons released by the cells. *A. cryptum* was also able to reduce Fe(III) under glucose depletion probably by its ability to accumulate polyhydroxybutyrate. Finally, the specific growth rate recorded under aerobic conditions increased when the dissolved iron concentration was between 5 and 120 mmol/L. Lower dissolved iron concentrations did not change this rate whereas this parameter decreased slightly for concentrations above 120 mmol/L; likely due to inhibition by this metal.

The benefit of a pH control system was demonstrated in assays performed with magnetite. Unlikely, when pH was not controlled, the dissolution process ceased and siderite was formed. Magnetite dissolution increased dramatically from less than 2 % in abiotic tests to more than 20 % in inoculated vials (with pH control). Oxalate also had a positive effect in inoculated vials due to its pH buffering capacity, increasing magnetite dissolution from 20 to 25 %.

Goethite, hematite and ammoniojarosite dissolution tests in media containing *A. cryptum* and oxalate showed that the last compound was effective enhancing the dissolution rate. A full factorial design (2^k) with three variables (bacterium, Fe(II) and ligand, $k=3$) was used to extend the study to other chelating agents: glycine, citrate, ethylenediaminetetraacetate (EDTA), nitrilotriacetate (NTA), oxalate, pyruvate, phthalate and salicylate. The best results were obtained for media containing Fe(II) and NTA or oxalate, and they would be explained by iron chelates capacity to behave as electron shuttles, according to results obtained in Fe(II) autooxidation and Fe(III) chelates bioreduction tests.

Ammonium jarosite bioreduction was tested using two strains, *Acidiphilium cryptum* and *Aeromonas hydrophila*, and nine electron shuttles: anthraquinone-2,6-disulfonate (2,6-AQDS), anthraquinone-1,5-disulfonate (1,5-AQDS), safranin, phenosafranin, neutral red, thionine, methylene blue, resazurina and 2,6-dichlorophenol indophenols (DCPIP). Compounds with a redox potential between 50 and 150 mV vs. Ag/AgCl (at pH 2.4, methylene blue and thionine) gave good results in presence of *A. cryptum*, while the best results for *A. hydrophila* were obtained for those molecules with a redox potential in the range -500 to -400 mV vs. Ag/AgCl (at neutral pH, 2,6-AQDS, safranin and phenosafranin). The different intervals observed for both strains would be explained by the boundaries in stability fields of Fe(II)-Fe(III) species and their microbial reducing abilities.

Ammonium jarosite dissolution assayed under different stirring modes showed that the dissolution rate obtained under static conditions was almost doubled under poor mixing; however, this rate did not increase under vigorous mixing. Magnetically stirred vials presented best results, likely by the grinding effect of magnetic stirrer which exposed a larger surface area. Hence, jarosite dissolution would not be controlled by mass transfer but its surface area. Hematite dissolution in columns showed periods where dissolved iron increased and decreased, which were related to redox potential oscillations and successive glucose depletions. The best result obtained in presence of thionine, followed by oxalate and unsupplied media, could be explained from recorded redox potentials.

Manganese bioleaching was tested using two ores (from different sources) with distinct manganese content. *A. cryptum* was able to bioleach manganese from both ores. Assays performed in Fe(II) and oxalate containing media showed better performances, likely because iron and iron-oxalate complexes

behave as electron shuttles. However, Fe(II) addition had a negative effect in one case, probably due to its precipitation on active dissolution sites. The process selectivity was increased in oxalate containing medium and decreased in presence of methylene blue or thionine. This result was in agreement with thermodynamic data of iron and manganese systems.

Conclusions

The experimental results showed that Fe(III) bioreduction was faster from a soluble source than from insoluble ferric ones, in which case the dissolution rate is highly dependent on the solid composition. Both *A. cryptum* and a pH control system were essential to achieve a high solid dissolution grade.

NTA, oxalate and Fe(II) had a positive effect on the ammonium jarosite dissolution, likely because of the formation of chelates able to behave as electron shuttles. Furthermore, the good results obtained for magnetite dissolution in oxalate-containing medium would be explained by the oxalate buffering capacity.

Experiments performed with ammonium jarosite in electron shuttles-containing media showed good results for *A. cryptum* and *A. hydrophila* when those compounds had redox potentials from 50 to 150 mV and from -500 to -400 mV vs. Ag/AgCl., respectively. This behavior would be related to the Eh-pH diagram and the microbial reducing abilities.

Finally, assays performed with manganese ores proved the feasibility to use *A. cryptum* in manganese bioleaching. Results showed good results in oxalate- and Fe(II)-containing media, however, methylene blue and thionine addition affected negatively the process selectivity.

Contenido

CAPÍTULO I: ASPECTOS INTRODUCTORIOS	1
1 Planteamiento del problema	3
1.1 Objetivo General	4
1.2 Objetivos Específicos	4
2 Marco teórico	5
2.1 Energética celular y transferencia de electrones	5
2.1.1 Microorganismos fotótrofos	5
2.1.2 Microorganismos quimiótrofos	5
2.2 Biohidrometalurgia	9
2.2.1 Procesos oxidantes	11
2.2.2 Procesos reductores	14
2.3 Microorganismos reductores de hierro	17
2.3.1 Microorganismos neutrófilos	18
2.3.2 Microorganismos acidófilos y <i>Acidiphilium cryptum</i>	19
2.4 Transferencia extracelular de electrones	21
2.4.1 Microorganismos exoelectrógenos	22
2.4.2 Mecanismos de transferencia de electrones	23
2.5 Disolución de óxidos metálicos	27
2.5.1 Aspectos termodinámicos y solubilidad	28
2.5.2 Aspectos cinéticos y mecanismos de disolución	31
CAPÍTULO II: PARTE EXPERIMENTAL	37
3 Materiales y métodos generales	39
3.1 Propagación de <i>Acidiphilium cryptum</i> y <i>Aeromonas hydrophila</i>	39
3.2 Medios de cultivos y su esterilización	40
3.3 Pretratamiento de los sólidos y técnicas de caracterización	40
3.4 Esterilización de los materiales y desinfección de los minerales	41
3.5 Inoculación de matraces y viales	42
3.6 Metodología de muestreo	42
4 Biorreducción de especies solubles de hierro	45
4.1 Materiales y métodos	45
4.1.1 Cinética de crecimiento en presencia y ausencia de Fe(III) bajo distintas condiciones de aireación	45
4.1.2 Cinética de crecimiento anóxico con baja concentración de glucosa	46

Contenido

4.1.3	Cinética de crecimiento aerobia bajo distintas concentraciones de hierro.....	46
4.2	Resultados y discusión.....	47
4.2.1	Cinética de crecimiento en presencia y ausencia de Fe(III) bajo distintas condiciones de aireación.....	47
4.2.2	Cinética de crecimiento anóxico con baja concentración de glucosa.....	53
4.2.3	Cinética de crecimiento aerobia bajo distintas concentraciones de hierro.....	54
5	Presencia microbiana y pH.....	57
5.1	Materiales y métodos	57
5.2	Resultados y discusión.....	57
6	Disolución asistida por ligandos	67
6.1	Materiales y métodos	67
6.1.1	Disolución reductora de jarosita, goethita y hematites en medios con y sin oxalato	67
6.1.2	Estudio de las variables: bacteria, ligando y Fe(II).....	67
6.1.3	Capacidad de los ligandos para promover la autooxidación del Fe(II)	68
6.1.4	Capacidad de <i>A. cryptum</i> para reducir algunos quelatos de Fe(III)	69
6.2	Resultados y discusión.....	70
6.2.1	Disolución reductora de jarosita, goethita y hematites en medios con y sin oxalato	70
6.2.2	Estudio de las variables: bacteria, ligando y Fe(II).....	75
6.2.3	Capacidad de los ligandos para promover la autooxidación del Fe(II)	80
6.2.4	Capacidad de <i>A. cryptum</i> para reducir algunos quelatos de Fe(III)	82
7	Reducción asistida por mediadores redox.....	85
7.1	Materiales y métodos	85
7.1.1	Caracterización de los mediadores redox mediante voltamperometría cíclica	85
7.1.2	Biorreducción de jarosita en medios que contienen mediadores redox.....	86
7.2	Resultados y discusión.....	87

7.2.1	Caracterización de los mediadores redox mediante voltamperometría cíclica	87
7.2.2	Biorreducción de jarosita en medios que contienen mediadores redox	91
8	Tipos de agitación y trabajo en columnas.....	97
8.1	Materiales y métodos	97
8.1.1	Tipos de agitación.....	97
8.1.2	Experiencias en columnas	98
8.2	Resultados y discusión.....	99
8.2.1	Tipos de agitación.....	99
8.2.2	Experiencias en columnas	105
9	Biolixiviación de minerales de manganeso	109
9.1	Materiales y métodos	109
9.1.1	Minerales de manganeso utilizados	109
9.1.2	Capacidad de <i>Acidiphilium cryptum</i> para lixiviar minerales de manganeso en medios con y sin hierro.....	110
9.1.3	Biolixiviación de manganeso en presencia de oxalato	110
9.1.4	Biolixiviación de manganeso en medios con mediadores redox	110
9.2	Resultados y discusión.....	111
9.2.1	Capacidad de <i>Acidiphilium cryptum</i> para lixiviar minerales de manganeso en medios con y sin hierro.....	111
9.2.2	Biolixiviación de manganeso en presencia de oxalato	115
9.2.3	Biolixiviación de manganeso en medios con azul de metileno y tionina, selectividad del proceso y consumo de ácido	116
CAPÍTULO III: ANÁLISIS GLOBAL.....		123
10	Valoración general.....	125
10.1	Aspectos termodinámicos	125
10.2	Aspectos cinéticos.....	126
10.3	Aspectos operacionales	128
11	Conclusiones	131
CAPÍTULO IV: BIBLIOGRAFÍA Y APÉNDICES.....		135
12	Bibliografía.....	137
13	Apéndices.....	153

Índice de tablas

Tabla 2.1: Sistema de clasificación microbiana	5
Tabla 2.2: Bacterias y arqueas acidófilas con capacidad para catalizar la oxidación desasimilatoria de Fe(II) o la reducción desasimilatoria de Fe(III)	20
Tabla 3.1: Composición del medio de cultivo E.....	39
Tabla 3.2: Composición del medio de cultivo BRS.....	39
Tabla 4.1: Condiciones estudiadas en el ensayo cinético.....	45
Tabla 4.2: Parámetros cinéticos de crecimiento del cultivo de <i>Acidiphilium cryptum</i> JF-5 bajo distintas condiciones	52
Tabla 6.1: Velocidad global de disolución de jarosita en presencia de los ligandos estudiados	79
Tabla 7.1: Mediadores redox empleados en este estudio ordenados por familias de compuestos junto a su potencial estándar aparente de reducción.....	88
Tabla 7.2: Potenciales de los picos catódico y anódico, y su media, obtenidos en los voltamperogramas de los mediadores redox a pH 2,4, 4,5 y 7,0.....	90
Tabla 7.3: Comparación entre los potenciales de los mediadores reportados en bibliografía y los determinados mediante voltamperometría.	91
Tabla 9.1: Composición de los minerales de manganeso usados en este estudio.	109
Tabla 9.2: Pendientes y coeficientes de determinación (r^2) de las rectas que ajustan los datos de Fe_{Total} respecto de Mn_{Total}	119
Tabla 13.1: Composición del mineral de magnetita.	159
Tabla 13.2: Composición del mineral de hematites mediante XRF.....	160
Tabla 13.3: Composición de los minerales de manganeso usados en este estudio.	162
Tabla 13.4: Composición de la disolución de formaldehído neutro tamponado.	165
Tabla 13.5: Constantes de producto de solubilidad de compuestos de Fe(II).....	169

Índice de figuras

Figura 2.1: Modelo de la cadena de transporte de electrones de <i>Escherichia coli</i> y componentes redox de su membrana plasmática.....	6
Figura 2.2: Transferencia de electrones hasta el Fe(III) en <i>Shewanella</i>	8
Figura 2.3: Transporte de electrones en <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	9
Figura 2.4: Esquema de una célula de <i>A. ferrooxidans</i> en la superficie de un sustrato de pirita con una capa circundante de sustancias poliméricas extracelulares.....	11
Figura 2.5: Mecanismos de reducción de óxidos insolubles de Fe(III), por medio de contacto directo o mediadores redox.....	15
Figura 2.6: Potenciales redox estándar (pH 7,0) de algunos pares electroquímicos importantes en los diferentes procesos respiratorios y metanogénicos y grupos microbiológicos previstos en un acuífero prístino que refleja las distintas zonas según la tendencia termodinámica de los distintos aceptores de electrones.....	17
Figura 2.7: Bioánodo en combinación con un biocátodo en una celda microbiana de combustible.....	21
Figura 2.8: Potenciales de interés en una biopelícula de bacterias cediendo electrones al ánodo.....	23
Figura 2.9: Cuatro posibles estrategias para la respiración extracelular.....	24
Figura 2.10: Modelo de la disolución reductora de óxidos de Fe(III) mediante la biosíntesis de ligandos.....	27
Figura 2.11: Solubilidad de la goethita en condiciones oxidantes y reductoras.....	30
Figura 2.12: Diagrama de Pourbaix para el sistema Fe-O ₂ -CO ₂ -H ₂ O a 25°C.....	30
Figura 2.13: Modelo de sitios activos.....	31
Figura 2.14: Mecanismos de disolución de óxidos de Fe(III) promovidos por protones y ligandos.....	32
Figura 2.15: Esquema de la disolución reductora promovida por protones y por ligandos de un óxido trivalente.....	34
Figura 2.16: Mecanismo de disolución de óxidos de Fe(III) en un medio que contiene Fe(II) mediante la formación de un complejo ternario superficial.....	35
Figura 2.17: Relación entre la velocidad de disolución de la goethita y el pH mediante los mecanismos de protonación, complejamiento y reducción.....	35
Figura 4.1: Perfiles de biomasa y sustrato en los cultivos de <i>A. cryptum</i> desarrollados sin limitación de oxígeno en los medios E y E/Fe(III), y en su cultivo anóxico.....	48

Figura 4.2: Evolución del Fe(II), Fe _{Total} y potencial redox de los cultivos de <i>A. cryptum</i> desarrollados en condiciones anóxicas y en el medio E/Fe(III) sin limitación de oxígeno	48
Figura 4.3: Perfiles de biomasa y sustrato de los cultivos de <i>A. cryptum</i> desarrollados con limitación de oxígeno en los medios E y E/Fe(III). En C se muestra la evolución del Fe(II), Fe _{Total} y potencial redox para el experimento realizado en el medio E/Fe(III).	49
Figura 4.4: Difractograma de rayos X del sólido formado en los cultivos de <i>A. cryptum</i> en el medio E/Fe(III).	49
Figura 4.5: Perfiles de sustrato y biomasa, determinada por recuento celular y OD ₆₀₀ , en el cultivo de <i>A. cryptum</i> en un medio similar al E pero con una concentración de glucosa de 100 mg/L. Evolución del Fe(II), Fe _{Total} y potencial redox registrada en dicho experimento.	53
Figura 4.6: Velocidad específica de crecimiento de <i>Acidiphilium cryptum</i> JF-5 en medio E suplementado con concentraciones crecientes de Fe(II).	54
Figura 5.1: Perfiles de Fe _{Total} , Fe(II), pE+pH y pH obtenidos en los experimentos realizados con magnetita en medio E	58
Figura 5.2: Diagrama de Pourbaix del sistema Fe-NH ₄ ⁺ -S-O ₂ -CO ₂ -H ₂ O	60
Figura 5.3: Perfiles de Fe _{Total} , Fe(II), pE+pH y pH obtenidos en los experimentos realizados con magnetita en medio E/Ox	62
Figura 5.4: Gráfica comparativa del hierro extraído desde el mineral de magnetita bajo las distintas condiciones ensayadas corregidos según los cambios de volumen	63
Figura 5.5: Micrografías electrónicas de barrido de los residuos de magnetita	64
Figura 5.6: Difractograma de rayos X de los residuos de magnetita y del material de partida	65
Figura 5.7: Relación entre hierro extraído y H ₂ SO ₄ consumido en la disolución reductora de magnetita	65
Figura 6.1: Esquema de la preparación de los medios que incluían quelatos de Fe(III)	70
Figura 6.2: Perfiles de Fe _{Total} , Fe(II), pE+pH y pH obtenidos en los experimentos realizados con jarosita en los medios E y E/Ox	71
Figura 6.3: Perfiles de Fe _{Total} , Fe(II), pE+pH y pH obtenidos en los experimentos realizados con goethita en los medios E y E/Ox	72
Figura 6.4: Perfiles de Fe _{Total} , Fe(II), pE+pH y pH obtenidos en los experimentos realizados con hematites en los medios E y E/Ox	73
Figura 6.5: Perfiles de Fe _{Total} , Fe(II) y pE+pH para los ensayos realizados en los medios: sin ligandos, con glicina y citrato; con y sin Fe(II) inicial.	76

Figura 6.6: Perfiles de Fe _{Total} , Fe(II) y pE+pH para los ensayos realizados en los medios: con EDTA, NTA y oxalato; con y sin Fe(II) inicial	77
Figura 6.7: Perfiles de Fe _{Total} , Fe(II) y pE+pH para los ensayos realizados en los medios: con piruvato, ftalato y salicilato; con y sin Fe(II) inicial	78
Figura 6.8: Cinética de autooxidación de Fe(II) en presencia de diferentes ligandos: EDTA, NTA, oxalato, citrato, piruvato, ftalato, glicina y salicilato, respecto de aquella en ausencia de ligandos	80
Figura 6.9: Generalización del esquema que describe el comportamiento del hierro en presencia de materia orgánica y oxígeno tras incluir un ligando.....	81
Figura 6.10: Perfiles de Fe(II) en la biorreducción de quelatos de Fe(III) de los ligandos: EDTA, NTA, oxalato y citrato	83
Figura 6.11: Fracción de quelatos de Fe(III) reducidos. EDTA, NTA, oxalato, citrato	83
Figura 7.1: Potencial redox medio (respecto del electrodo de hidrógeno), en función del pH, de algunos transportadores de electrones: tionina, azul de metileno, safranina y riboflavina.....	88
Figura 7.2: Voltamperogramas de los mediadores redox antraquinona-2,6-disulfonato, antraquinona-1,5-disulfonato, safranina, fenosafranina, rojo neutro, tionina, azul de metileno, resazurina/resorufina y 2,6-diclorofenol indofenol a pH 7,0, 4,5 y 2,4.....	89
Figura 7.3: Perfiles de Fe(II) de la biorreducción de jarosita en viales inoculados con <i>A. hydrophila</i> en presencia de distintos mediadores redox.	92
Figura 7.4: Perfiles de Fe(II) de la disolución de jarosita en viales inoculados con <i>A. cryptum</i> en presencia de distintos mediadores redox.	93
Figura 7.5: Estados de agregación (sólido o acuoso) del hierro tras los experimentos en ausencia de mediadores y en presencia de 2,6-AQDS.	93
Figura 7.6: Velocidad media de biorreducción de jarosita por <i>A. hydrophila</i> en función del potencial redox de los mediadores redox	94
Figura 7.7: Velocidad media de disolución de jarosita por <i>A. cryptum</i> en función del potencial redox de los mediadores redox.....	94
Figura 7.8: Diagrama de Pourbaix del sistema Fe-NH ₄ ⁺ -S-O ₂ -CO ₂ -H ₂ O	95
Figura 7.9: Perfiles de potencial redox en el cultivo de <i>A. cryptum</i> en presencia de mediadores redox: tionina, fenosafranina, rojo neutro 2,6-AQDS y en ausencia de mediadores	96
Figura 8.1: Barra magnética utilizada para la agitación.	97
Figura 8.2: Fotografías frontal y lateral del rotor construido, donde se observan dos viales en posición axial y seis en posición radial, sujetos estos últimos con una cinta de velcro.....	98

Figura 8.3: Esquema y fotografía del montaje experimental utilizado para las experiencias en columnas.....	99
Figura 8.4: Perfiles de Fe _{Total} y Fe(II) obtenidos en la experiencia con distintos tipos de agitación	100
Figura 8.5: Sedimentación de los residuos de jarosita a los 1, 5 y 30 min.....	102
Figura 8.6: Distribución de tamaño de partícula de los residuos abióticos de jarosita en viales estáticos, incubador orbital, agitador magnético, posiciones radiales y axiales del rotor construido, comparadas con el material sin tratar	102
Figura 8.7: Micrografías electrónicas de barrido de los residuos del ensayo con distintos tipos de agitación	103
Figura 8.8: Relación entre hierro extraído y H ₂ SO ₄ consumido en la disolución reductora de jarosita en los viales con agitación magnética.	104
Figura 8.9: Perfiles de Fe _{Total} , Fe(II), pE+pH y pH de los ensayos de disolución reductora del mineral de hematites en columnas en los medios: E, E/Ox y E suplementado con tionina 100 μmol/L.....	106
Figura 9.1: Biolixiviación de manganeso por <i>Acidiphilium cryptum</i> en medio E comparada con su lixiviación química (abiótica) en el mismo medio	112
Figura 9.2: Biolixiviación de manganeso por <i>Acidiphilium cryptum</i> desde el mineral procedente de Brasil, comparada con su lixiviación química, en medio E sin suplementar y suplementado con Fe(II) hasta una concentración de 2 mmol/L	112
Figura 9.3: Biolixiviación de manganeso por <i>Acidiphilium cryptum</i> desde el mineral procedente de Costa de Marfil, comparada con su lixiviación química, en medio E sin suplementar y suplementado con Fe(II) hasta una concentración de 2 mmol/L	113
Figura 9.4: Biolixiviación de manganeso por <i>Acidiphilium cryptum</i> desde el mineral de Brasil en los medios E y E/Ox, sin y con hierro disuelto al comienzo....	115
Figura 9.5: Lixiviación química de manganeso desde el mineral de Brasil en los medios E y E/Ox, sin y con hierro disuelto al comienzo.....	116
Figura 9.6: Biolixiviación de manganeso por <i>Acidiphilium cryptum</i> desde el mineral de Brasil en el medio E sin aditivos y suplementado con azul de metileno y tionina	117
Figura 9.7: Lixiviación química de manganeso desde el mineral de Brasil en el medio E sin aditivos y suplementado con azul de metileno y tionina	117
Figura 9.8: Relación entre la evolución del Mn _{Total} y Fe _{Total} en la biolixiviación de manganeso por <i>Acidiphilium cryptum</i> desde los minerales de Brasil y Costa de Marfil en los medios: E, E con hierro, E/Ox, E/OX con hierro, E suplementado con azul de metileno o tionina.....	118
Figura 9.9: Diagrama de Pourbaix para el sistema Mn-O ₂ -H ₂ O.....	120

Figura 9.10: Perfiles de pE+pH en la biolixiviación de manganeso por <i>Acidiphilium cryptum</i> desde el mineral de Brasil en los medios: E, E con hierro, E/Ox, E/Ox con hierro, E suplementado con azul de metileno o tionina	120
Figura 9.11: Relación entre hierro y manganeso extraídos con el H ₂ SO ₄ consumido en la biolixiviación de minerales de manganeso.....	121
Figura 13.1: Difractograma de rayos X de la jarosita sintetizada	157
Figura 13.2: Micrografías electrónicas de barrido de la jarosita sintetizada.....	157
Figura 13.3: Micrografías electrónicas de barrido de la magnetita.....	158
Figura 13.4: Difractograma de rayos X del mineral de magnetita	158
Figura 13.5: Micrografía electrónica de barrido del mineral de goethita	159
Figura 13.6: Difractograma de rayos X del mineral de goethita	159
Figura 13.7: Micrografías electrónicas de barrido del mineral de hematites	160
Figura 13.8: Difractograma de rayos X del mineral de hematites	160
Figura 13.9: Difractograma de rayos X de los minerales de manganeso de Brasil y Costa de Marfil empleados en el estudio	161
Figura 13.10: Micrografía electrónica de barrido de los minerales de manganeso procedentes de Brasil y Costa de Marfil.....	162
Figura 13.11: Perfiles de absorbancia obtenidos de aplicar las variantes del método a una disolución de glucosa 0,9 g/L.....	168
Figura 13.12: Determinación de glucosa por el método del DNS para altas y bajas concentraciones en soluciones con distinta concentración de ión ferroso. ...	169
Figura 13.13: Perfiles de concentración de ión ferroso en la valoración con NaOH 1 y 2 mol/L de soluciones de FeSO ₄ ·7H ₂ O 30, 60 y 90 mmol/L.....	170

Listado de acrónimos y definiciones importantes

1,5-AQDS	antraquinona 1,5-disulfonato
2,6-AQDS	antraquinona 2,6-disulfonato
ADN	ácido desoxirribonucleico
ATP	adenosín trifosfato
DCPIP	2,6-diclorofenol indofenol
DPTA	ácido dietilen triamino pentaacético (y su anión)
E	potencial redox
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético (y su anión)
EEH	electrodo estándar de hidrógeno
k_{La}	coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno
NAD/NADH	nicotinamida adenina dinucleótido
NADP/NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NTA	ácido nitrilotriacético (y su anión)
OD_{600}	densidad óptica a 600 nm
PHB	polihidroxi butirato
p/v	relación peso/volumen
p/p	relación peso/peso
pE	logaritmo negativo en base diez de la actividad de los electrones
rH	logaritmo negativo en base diez de la presión parcial de hidrógeno
rpm	revoluciones por minuto
SEM	microscopía electrónica de barrido
UV	ultravioleta
v/v	relación volumen/volumen
vvm	flujo volumétrico de aire por unidad de volumen de líquido por minuto
XRD	difracción de rayos X
XRF	fluorescencia de rayos X
Anaerobio:	En ausencia de oxígeno y cualquier otro aceptor final de electrones.
Anóxico:	En ausencia de oxígeno pero en presencia de otros aceptores de electrones (p.ej., Fe(III), Mn(IV), etc.)

CAPÍTULO I: ASPECTOS INTRODUCTORIOS



1 Planteamiento del problema

El hierro es un metal importante por razones económicas, medioambientales y biológicas. En el ámbito económico, la producción anual de hierro alcanza los 10^9 Mg, siendo el metal con mayor volumen de producción (Gerst y Graedel, 2008). Dado que su principal vía para ello es la pirometalúrgica, esta industria es responsable del 27 % de las emisiones de CO_2 del sector industrial (IEA, 2007), empleándose en ello una energía equivalente a 21,9 GJ/t de hierro extraído (Norgate y Jahanshahi, 2010). Su producción mediante una ruta biohidrometalúrgica podría generar, por tanto, importantes beneficios ambientales y económicos debido a que este tipo de tecnología es reconocida como menos contaminante, además de requerir menores inversiones y ser capaz de procesar minerales de baja ley.

Geológicamente hablando, el hierro es el segundo metal más abundante en la corteza terrestre, después del aluminio, alcanzando un 5 %, formando parte de uno de los ciclos biogeoquímicos más importantes. Debido a que su reacción con el oxígeno está termodinámicamente favorecida, se encuentra principalmente en forma de magnetita (Fe_3O_4), hematites (Fe_2O_3), goethita ($\text{FeO}\cdot\text{OH}$) y limonita ($\text{FeO}(\text{OH})\cdot n\text{H}_2\text{O}$) (GSA, 2011).

En el campo de la biología, el hierro es un elemento imprescindible para todas las formas de vida, salvo contadas excepciones, debido a su incorporación como componente prostético en biomoléculas involucradas en procesos como la fotosíntesis, fijación de N_2 , metanogénesis, producción y consumo de H_2 , respiración, ciclo de los ácidos tricarboxílicos, transporte de oxígeno, regulación genética y biosíntesis de ADN (ácido desoxirribonucleico) (Andrews et al., 2003).

Las bacterias reductoras de hierro, y en general aquellas exoelectrogénicas, podrían ser empleadas para (Dubiel et al., 2002, Eisele y Gabby, 2014, Fredrickson y Gorby, 1996, Logan, 2009, Lloyd, 2003):

- La remoción de impurezas de hierro y el mejoramiento de productos donde éste es perjudicial, tales como caolín, sílice o bauxita.
- La lixiviación de hierro con el objetivo específico de recuperarlo desde minerales, subproductos o desechos.

Planteamiento del problema

- La remoción de hierro para acelerar la degradación de la roca con la finalidad de recuperar otros metales.
- La ralentización del proceso de corrosión del acero.
- La producción de electricidad o hidrógeno, desde residuos u otros materiales, mediante sistemas bioelectroquímicos.
- La biorremediación de ambientes contaminados con metales como Cr(VI) y U(VI).

1.1 Objetivo General

En este contexto, el objetivo general de este trabajo es estudiar la biorreducción de compuestos solubles e insolubles de hierro en condiciones ácidas, con la finalidad de lograr la disolución de estos sólidos, junto con la determinación de las condiciones adecuadas que permitan acelerar al máximo la cinética de este proceso. Para tal efecto, se empleará la bacteria acidófila *Acidiphilium cryptum* JF-5, debido a que es capaz de reducir hierro en condiciones aeróbicas y ácidas.

1.2 Objetivos Específicos

Para la consecución de este objetivo general se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar la cinética de reducción y disolución del hierro disuelto y de algunos sólidos férricos en presencia de las bacterias seleccionadas.
- Determinar el efecto inhibitorio o estimulante de distintos ligandos sobre la biodisolución de sólidos férricos, y los mecanismos que pueden tener lugar.
- Establecer qué transportadores de electrones presentan un mejor rendimiento para el microorganismo seleccionado, y relacionar este comportamiento con otros parámetros.
- Estudiar la biolixiviación de algún otro metal en presencia del microorganismo elegido.

2 Marco teórico

2.1 Energética celular y transferencia de electrones

Todos los microorganismos, y en general todos los organismos vivos, precisan de una fuente de energía para subsistir. Según si esta energía es obtenida de la degradación de compuestos químicos o de la luz, los organismos se clasifican en quimiótrofos o fotótrofos, respectivamente (Tabla 2.1).

Tabla 2.1: Sistema de clasificación microbiana. Tomada de Heijnen (1999).

Fuente de Energía	Dador de electrones	Fuente de carbono
Luz (fotótrofos)	Inorgánica (litótrofo)	CO ₂ (autótrofo)
Química (quimiótrofo)	Orgánica (organótrofo)	Orgánica (heterótrofo)

2.1.1 Microorganismos fotótrofos

El proceso donde la energía de los fotones se transforma en energía bioquímicamente útil, en forma de adenosín trifosfato (ATP), se llama fotosíntesis (Tredici, 1999). En ella, la luz es captada y dirigida hasta ciertos pigmentos (como el P680 y P700) que, al ser excitados, liberan electrones. Estos electrones atraviesan una serie de intermediarios hasta alcanzar al aceptor final, que puede ser el mismo u otro pigmento, o una molécula de NADP⁺ (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) o NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleótido), generándose, en estos casos, transportadores electrónicos reducidos (NADPH o NADH, respectivamente). Este flujo también provoca la translocación de protones a través de una membrana semipermeable (la membrana de los tilacoides), acumulándose una cierta fuerza protón-motriz (Vermaas, 2001). La disipación de este gradiente de protones transmembrana impulsa la síntesis de ATP por la enzima ATP-sintasa (Konhauser, 2007).

2.1.2 Microorganismos quimiótrofos

Los microorganismos quimiótrofos obtienen su energía de la degradación de compuestos químicos mediante procesos que guardan similitud con los usados por los fotótrofos, ya que también involucran reacciones redox, cadenas transportadoras de electrones, acumulación de fuerza protón-motriz y generación de poder reductor.

Microorganismos quimioorganoheterótrofos

Muchos de los microorganismos quimioorganoheterótrofos obtienen su energía de la degradación aerobia de la materia orgánica, donde el oxígeno atmosférico desempeña el rol de aceptor final de electrones. Esta energía es almacenada en forma de ATP mediante el proceso de fosforilación, también presente en los animales superiores, y del cual existen dos tipos: fosforilación a nivel de sustrato y fosforilación oxidativa. La ubicuidad de la fosforilación oxidativa se explica por su elevada eficiencia al producir 30 - 32 moles de ATP por mol de glucosa, en comparación con los 2 generados por la fosforilación a nivel de sustrato (Nelson y Cox, 2008). A pesar de esto, algunos microorganismos emplean otros mecanismos, tales como las fermentaciones alcohólica y láctica, para regenerar los cofactores reducidos (NADH) en ausencia de un aceptor final de electrones (Madigan et al., 2003).

En la primera parte de la fosforilación oxidativa (Figura 2.1) la enzima NADH deshidrogenasa oxida el NADH, transfiriendo estos electrones a la menaquinona. Este compuesto difunde a través de la membrana, entregando los electrones al complejo de la citocromo b-d oxidasa, que reduce el O_2 a H_2O . Este flujo de electrones hace posible la generación de fuerza protón-motriz mediante el bombeo

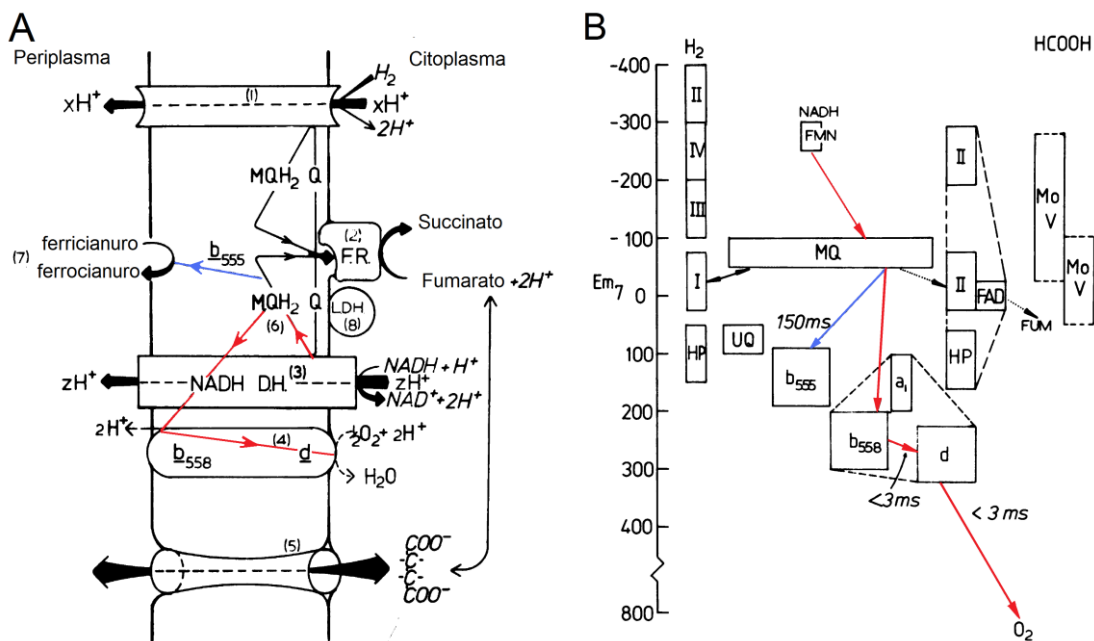


Figura 2.1: Modelo de la cadena de transporte de electrones de *Escherichia coli* (A) y componentes redox de su membrana plásmica (B). Adaptada de Ingledew y Poole (1984). La ruta que siguen los electrones desde el NADH hasta el oxígeno ha sido marcada en rojo, mientras que en azul se muestra una variante para la reducción de ferrocianuro

de protones desde la matriz citoplasmática hacia el exterior celular. En la segunda parte, la enzima ATP-sintasa disipa este gradiente de protones utilizando la energía almacenada para sintetizar ATP. Adicionalmente, la fuerza protón-motriz también puede ser disipada mediante otros mecanismos, entre ellos: el simporte y antiporte de moléculas a través de la membrana plasmática, y el movimiento flagelar en aquellos microorganismos que lo poseen (Rossi, 1990a).

Dependiendo del microorganismo, los electrones pueden provenir de otros compuestos (p.ej., de la reducción de H_2 en la Figura 2.1A) y ser donados a otros aceptores finales de electrones; entre ellos cabe destacar el sulfato para las bacterias sulfatorreductoras, el nitrato para las desnitrificantes, el hierro (III) para las reductoras de hierro (p.ej., reducción de ferricianuro en la Figura 2.1) y el CO_2 para algunas bacterias metanogénicas (Yamanaka, 2008). Por ejemplo, las bacterias del género *Shewanella* son capaces de oxidar lactato utilizando O_2 y Fe(III) como aceptor final de electrones, según se muestra en la Figura 2.2; aunque esto lo realizarían sólo para regenerar el NAD^+ , debido a que toda su energía la obtienen de la fosforilación a nivel de sustrato. Por el contrario, *Geobacter*, otro microorganismo reductor de hierro, aunque incapaz de utilizar el O_2 , efectivamente sintetiza ATP mediante la fosforilación oxidativa (Bird et al., 2011).

Organismos quimiolitautótrofos

Los microorganismos quimiolitautótrofos son aquellos que obtienen su energía a partir de compuestos químicos, utilizándola para conseguir poder reductor y fijar CO_2 . Uno de los más estudiados es la bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans*, previamente clasificada como *Thiobacillus ferrooxidans* (Valdés et al., 2008).

Esta bacteria, bacilo Gram negativo, obtiene energía de la oxidación de Fe(II) y compuestos reducidos de azufre en condiciones aeróbicas (Valdés et al., 2008). Según se muestra en la Figura 2.3, la fuerza protón-motriz es utilizada tanto para la síntesis de ATP, por la ATP-sintasa, como para la generación de NADH, debido a que su formación a partir de Fe(II) no está termodinámicamente favorecida (Bird et al., 2011). Este gradiente de protones se establece naturalmente debido a la diferencia entre el bajo pH extracelular (~ 2) y el intracelular, cercano a la neutralidad ($\sim 6,5$). De este modo, la oxidación del Fe(II) acoplada con la reducción del oxígeno provoca la translocación de protones hasta el exterior celular y el consumo de

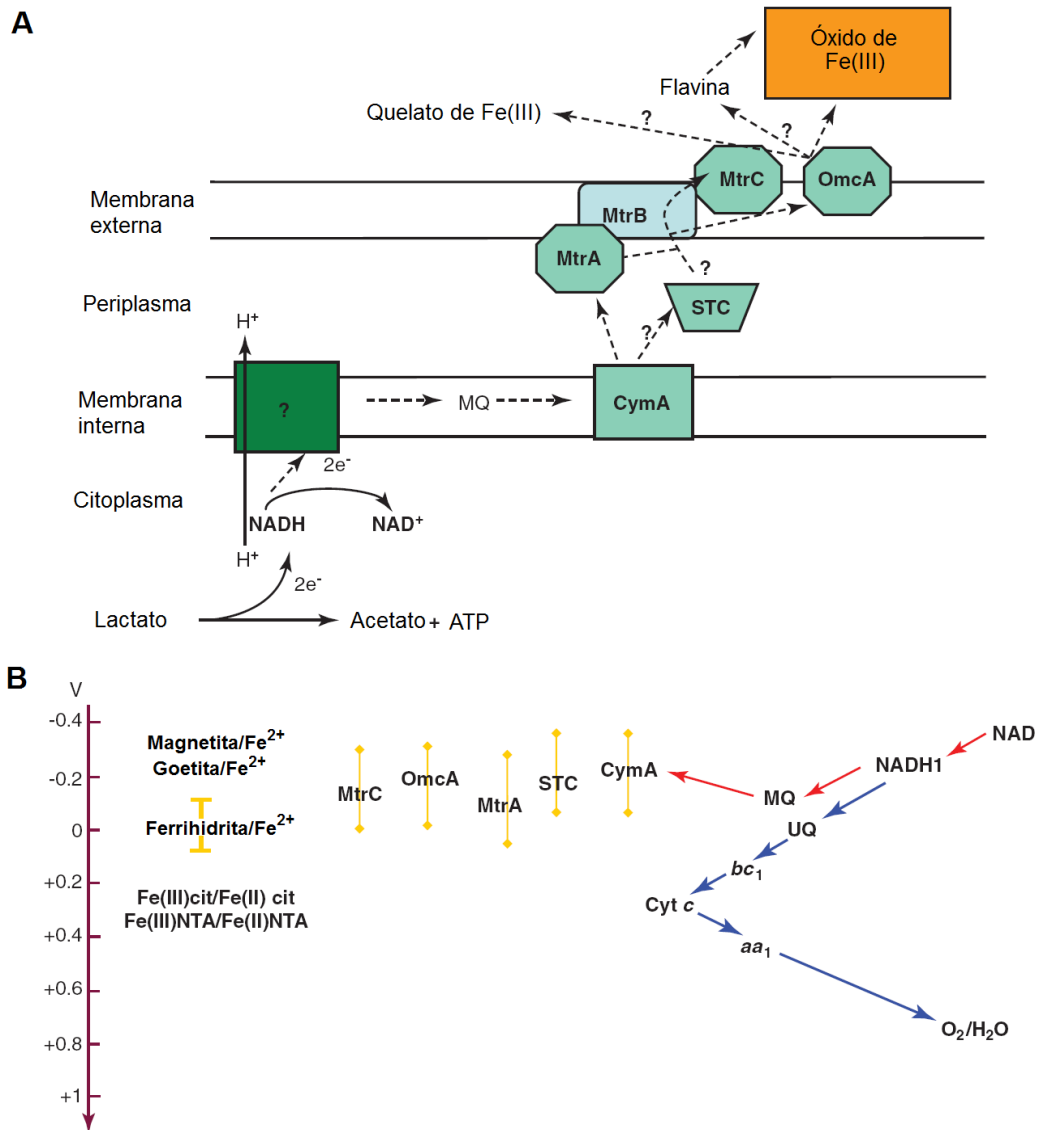


Figura 2.2: Transferencia de electrones hasta el Fe(III) en *Shewanella*. Adaptada de Bird et al. (2011).

(A) La línea segmentada representa la trayectoria de los electrones desde el citosol hasta el Fe(III). Pese a que no se tiene total claridad sobre todos los elementos, se sabe que no ocurre fosforilación oxidativa, por lo que toda la síntesis de ATP se realiza mediante fosforilación a nivel de sustrato.

(B) Potenciales redox de los componentes de la cadena transportadora de electrones. La flecha azul indica la ruta aeróbica, mientras la roja señala aquella involucrada en la reducción de Fe(III).

protones intracelulares, lo que permite mantener el bajo pH interior (Bonnefoy y Holmes, 2012).

En todos los casos expuestos, que abarcan una amplia gama de organismos, se deduce tanto la importancia de la transferencia de electrones para el establecimiento de la fuerza protón-motriz, que permite en última instancia la generación de energía, como la espontaneidad de la transferencia y su capacidad para generar energía cuando ésta se realiza hacia potenciales mayores. Al respecto, la Enciclopedia

constituyéndose de este modo como un campo multidisciplinario donde están involucrados: geólogos, ingenieros de minas, metalurgistas e hidrometalurgistas, químicos, ingenieros químicos y microbiólogos, abarcando tanto la explotación de los recursos minerales como la protección medioambiental.

En el aspecto aplicado y desde el punto de vista extractivo, esta disciplina se enmarca en la hidrometalurgia, rama de la metalurgia dedicada a la extracción y recuperación de metales por medio de soluciones líquidas, acuosas y orgánicas, mediante los procesos de biolixiviación: biooxidación y biorreducción. Así, el término biominería (*biomining*) ha sido recientemente acuñado para hacer referencia a la faceta extractiva de la biohidrometalurgia (Acevedo, 2000), lo que se ha diferenciado históricamente de su aplicación medioambiental, que se ocupa, principalmente, de la biorremediación.

Cualquier microorganismo capaz de interactuar con minerales podría, teóricamente, tener alguna aplicación hidrometalúrgica (Ehrlich, 1997, Viera et al., 2007). Los primeros en ser aislados e identificados fueron los quimiolitautótrofos (p.ej., *Beggiatoa* sp.) capaces de crecer aeróbicamente en medios carentes de materia orgánica fijando el CO₂ disuelto y oxidando compuestos inorgánicos de hierro y azufre (Rossi, 1990b). Dentro de este mismo grupo de microorganismos ha sido, posteriormente, identificada una gran variedad de especies acidófilas, p.ej., *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, *Sulfolobus metallicus* y *Ferroplasma acidiphilum* (Schippers et al., 2014), y algunas neutrófilas, p.ej., *Gallionella* y *Leptothrix* (Rossi, 1990a). Una de las bacterias más estudiadas en este ámbito ha sido *A. ferrooxidans*, probablemente por su amplia diseminación y por ser un buen modelo para el estudio de este tipo de microorganismos.

Aunque al comienzo se creía que la adhesión microbiana al mineral (mecanismo directo) era absolutamente necesaria para que tuviese lugar su disolución, posteriormente se determinó que ésta no era imprescindible debido a que el Fe(III) puede oxidar al mineral transformándose en Fe(II). De este modo, el papel de los microorganismos sería catalizar la oxidación del Fe(II) regenerando el Fe(III) (mecanismo indirecto). Finalmente, se ha concluido que los mecanismos indirecto y directo actúan conjuntamente para las células planctónicas y adheridas, respectivamente; no obstante, el directo es más efectivo debido a la mayor

concentración de hierro que alcanza el glicocálix bacteriano, Figura 2.4 (Rodríguez et al., 2003).

Por otra parte, los microorganismos heterótrofos también pueden interactuar con los minerales mediante la liberación de ligandos y ácidos orgánicos que son capaces de formar complejos con los iones en disolución, adsorberse en la superficie de los sólidos y promover su disolución (Stone, 1997). Aunque hasta ahora se ha dado mayor importancia a aquellos capaces de transferir electrones a óxidos poco solubles, provocando su biorreducción o disolución reductora (Bridge y Johnson, 2000, Laguna et al., 2011), también se conocen muchos microorganismos que sintetizan sustancias reductoras (p.ej., oxalato y citrato) o mediadores redox, que actúan como portadores de electrones entre el microorganismo y el óxido.

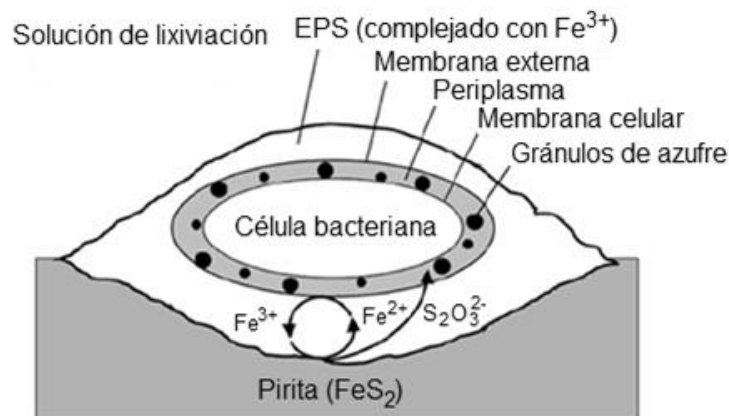


Figura 2.4: Esquema de una célula de *A. ferrooxidans* en la superficie de un sustrato de pirita con una capa circundante de sustancias poliméricas extracelulares (EPS). Adaptada de Vera et al. (2013).

2.2.1 Procesos oxidantes

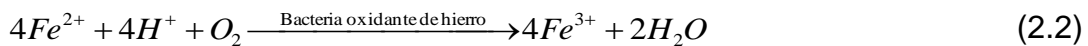
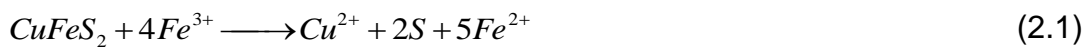
La biohidrometalurgia ha sido ampliamente usada en la metalurgia extractiva del cobre y oro, pero también, aunque a menor escala, en la del uranio y cobalto (Das et al., 2011).

Cobre

Principalmente hay dos tipos de minerales de cobre, los óxidos y los sulfuros, siendo ambos económicamente explotados mediante distintos procesos. Los minerales oxidados, que actualmente suelen ser de baja ley, se disuelven con relativa facilidad con ácido sulfúrico (Habbache et al., 2009), por lo que el cobre metálico se obtiene

desde el licor de lixiviación mediante extracción por disolventes y electroobtención (Johnson, 2010). Por su parte, los sulfuros han sido, generalmente, molidos y concentrados por flotación para su posterior tratamiento pirometalúrgico (Sancho, 2000).

Tradicionalmente, los residuos pobres de la minería del cobre se fueron disponiendo a nivel superficial en escombreras, quedando expuestos a la atmósfera oxidante. Ya hace varias décadas, se comprobó que, en tales condiciones, ciertos microorganismos naturalmente presentes en el mineral, como *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans* (Acevedo y Gentina, 2005), principalmente, catalizaban las reacciones de oxidación del hierro y el azufre con formación de ácido sulfúrico y, consecuentemente, liberando el cobre según las reacciones 2.1 a 2.3 (Watling, 2006).



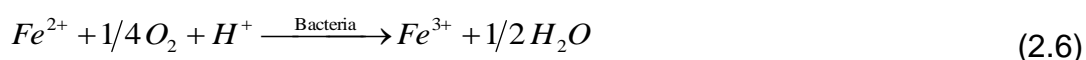
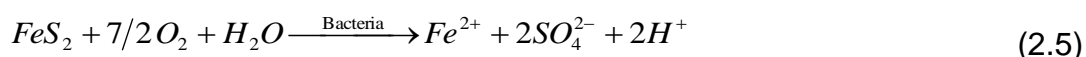
De este modo, el líquido que percolaba con el cobre en disolución, tras su extracción con disolvente y electrodeposición sobre cátodos del mismo metal, posibilitaba la revalorización de tales residuos. Es por ello que en los últimos años se han venido desarrollando múltiples procedimientos para el tratamiento de pilas y montones de minerales de baja ley, principalmente sulfurados, con sistemas de aireación, inoculación y recolección del licor de lixiviación que han optimizado el proceso haciendo que la biolixiviación constituya, en la actualidad, una importante alternativa para la extracción de cobre (Pradhan et al., 2008).

Más recientemente, se han realizado también bastantes ensayos para promover la biolixiviación de concentrados de sulfuros en reactores agitados, demostrándose que las condiciones de la reacción pueden ser controladas con mayor precisión. Sin embargo, el precio actual del cobre convierte en prohibitiva la implementación de estos sistemas a escala industrial (Acevedo y Gentina, 2005).

Oro

A pesar de que el oro se encuentra en la naturaleza en estado metálico, la profusión con que fue explotado en el pasado ha llevado a que, actualmente, se tenga que extraer a partir de fuentes donde se encuentra finamente diseminado, principalmente piritas y arsenopiritas. Esto ha llevado a la implementación de procesos como el MacArthur-Forrest, también conocido como de cianuración, con el fin de disolverlo y posteriormente recuperarlo en forma metálica (Lawrence, 1990).

Sin embargo, mediante el proceso de cianuración sólo una baja fracción es fácilmente recuperable, quedando el resto del oro retenido en la matriz mineral. Por esta razón, se ha desarrollado el proceso de biooxidación de concentrados, donde los microorganismos oxidantes de hierro y azufre contribuyen a degradar la matriz, según las reacciones 2.4 a 2.6 (Zhang et al., 2008), lográndose una mayor recuperación del contenido de oro en el tratamiento de cianuración (Syed, 2012).



En la biooxidación, un cierto porcentaje del sulfuro, al no ser degradado hasta sulfato y permanecer como especies sulfuradas intermedias, consume cianuro en la siguiente etapa; sin embargo, esto no ocurre en otros pretratamientos más agresivos, como la oxidación a altas presiones (van Aswegen et al., 2007). Otra situación desfavorable para la extracción de oro mediante estas rutas es la prohibición que varios países han establecido para la utilización de cianuro. Por esta razón los hidrometalurgistas están trabajando en la búsqueda de nuevas alternativas que permitan salvar estas dificultades (MEI, 2014).

Uranio

Los minerales de U(IV) son prácticamente insolubles en ácidos minerales diluidos, mientras que los de U(VI) se disuelven fácilmente. Dado que la reacción 2.7 se encuentra altamente favorecida al tener una constante de equilibrio muy elevada ($K=10^{22,6}$ a pH 2), los minerales de U(IV) pueden ser lixiviados con facilidad tras su oxidación hasta U(VI); adicionalmente, el Fe(III) consumido en tal oxidación se

regenera fácilmente mediante microorganismos oxidantes de hierro (p.ej., *A. ferrooxidans*) (Rossi, 1990d).



Los depósitos de uranio de baja ley suelen explotarse, con inversiones mínimas, mediante lixiviación *in-situ*, siempre que cumplan las siguientes condiciones: (1) permanecer en una zona hidrológicamente saturada (bajo el nivel de agua); (2) tener una geometría horizontal y confinada por estratos relativamente impermeables, para que el licor lixiviante no se disperse; (3) poseer una adecuada permeabilidad; y (4) ser factible de lixiviar químicamente (Holen y Hatchell, 1986). Sin embargo, cuando la ley es mayor, se ha venido optando por la lixiviación en montones o pilas (Hamidian, 2011).

Cobalto

El interés de la aplicación comercial de la biolixiviación en el tratamiento de los minerales de este metal surgió en el distrito de Kasese, Uganda, donde una mina de cobre, explotada durante 27 años, llegó a producir 900.000 t de un residuo de pirita que contenía cobalto (1,38 %). En 1988 comenzaron los ensayos en laboratorio para estudiar la factibilidad de recuperar dicho metal, que 10 años más tarde permitirían poner en marcha una instalación basada en el empleo de tanques inoculados para la biolixiviación del cobalto (Morin y d'Hugues, 2007).

2.2.2 Procesos reductores

En todos los procesos biohidrometalúrgicos que hasta la fecha se han implantado a escala industrial, se han utilizado microorganismos que oxidan aerobiamente compuestos inorgánicos. Sin embargo, debido al hallazgo y estudio de varias cepas capaces de catalizar la reducción óxidos, en la comunidad científica hay un creciente interés por su aplicación en procesos mineros.

En 1999 (Ehrlich) se comenzó a plantear la posibilidad de que la biohidrometalurgia debía dirigirse hacia la lixiviación y/o el beneficio de óxidos, silicatos y carbonatos; de este modo, el empleo de procesos anaerobios, en los que las bacterias usasen el óxido como aceptor final de electrones, podría ser una posibilidad prometedora para tal finalidad. De hecho, aunque en la actualidad el procesamiento biotecnológico a escala industrial de estos minerales aún no ha podido llevarse a cabo, existen

aplicaciones potenciales, tales como la producción de litio a partir de espodumeno, de cobalto y níquel desde lateritas, o de cobalto, níquel, cobre y manganeso del procesamiento de nódulos polimetálicos recolectados en aguas marinas profundas (Schippers et al., 2014), que corroboran dicha posibilidad.

Hierro

Algunos microorganismos son capaces de reducir óxidos de Fe(III) utilizándolos como aceptores finales de electrones, en un proceso denominado reducción desasimilatoria (Lovley et al., 2004). Se ha determinado que estos electrones pueden ser transferidos por contacto directo con el mineral, en algunos casos a través de apéndices conductores, o mediante transportadores de electrones (Weber et al., 2006), según se muestra en la Figura 2.5. Aunque esta capacidad la presentan un gran número de bacterias, se conocen pocos microorganismos acidófilos que la posean, entre ellos *Acidithiobacillus ferrooxidans* en condiciones anóxicas y *Acidiphilium cryptum* (Eisele y Gabby, 2014).

Cuando este proceso ocurre a un pH cercano a la neutralidad tienen a formarse compuestos sólidos que contienen Fe(II) (p.ej., magnetita y siderita) (Bingjie et al., 2014, Roh et al., 2003), mientras que si se produce en ambientes ácidos el Fe(II) se mantiene principalmente en disolución (Bridge y Johnson, 2000). Esta circunstancia

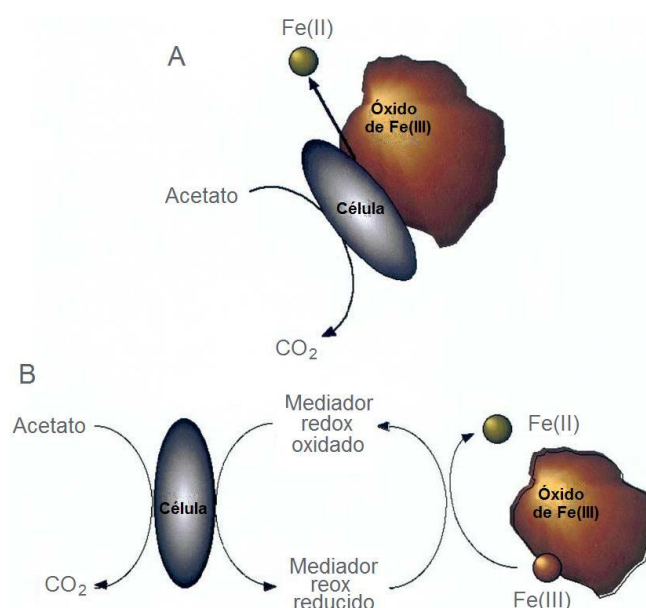


Figura 2.5: Mecanismos de reducción de óxidos insolubles de Fe(III), por medio de contacto directo (A) o mediadores redox (B). Adaptada de Lloyd (2003).

marca la diferencia entre un proceso de biomineralización o mineralización secundaria y uno de biolixiviación reductora, respectivamente.

Según Eisele y Gabby (2014), la disolución de óxidos de hierro podría tener las siguientes aplicaciones: (1) la remoción de impurezas de hierro para aumentar el valor de productos donde la presencia de este metal tiene un efecto negativo (p.ej., arcilla de caolín, sílice y bauxita), (2) la lixiviación de hierro con la finalidad de recuperarlo a partir de sus especies minerales; y (3) la remoción de hierro para acelerar la obtención del elemento deseado.

Níquel

Las lateritas de níquel son la mayor reserva de este metal. La capa superficial de éstas está formada por limonita (p.ej., goethita, $\alpha\text{FeO}\cdot\text{OH}$), donde el níquel se ha incorporado en la estructura cristalina, tanto por coadsorción como por sustitución del hierro formando, por ejemplo, minerales complejos $(\text{Fe}_{0,97}\text{Ni}_{0,03}\text{Co}_{0,003})\text{O}\cdot\text{OH}$. Dado que estos sólidos no se disuelven en condiciones oxidantes, se ha planteado la posibilidad de disolverlos empleando otras alternativas como ácidos minerales fuertes, quelantes de hierro, ácidos orgánicos y microorganismos reductores de hierro (Johnson, 2012, Viera et al., 2007).

Al usar microorganismos reductores de hierro (p.ej., *A. ferrooxidans* en condiciones anóxicas) se ha observado que las concentraciones de hierro y níquel disueltos se incrementan de manera directa, teniendo lugar un consumo proporcional de ácido sulfúrico junto con la liberación de otros metales como manganeso y cobalto. Por el contrario, es mucha menor la cantidad del mismo mineral que se logra disolver en condiciones oxidantes (Johnson, 2012).

Manganeso

La creciente demanda por manganeso ha despertado el interés por desarrollar vías alternativas a la pirometalúrgica y la piro-hidrometalúrgica, actualmente disponibles, para hacer rentable la explotación de minerales de baja ley. En este marco, la biolixiviación constituiría una alternativa con posibilidades reales de ser implementada a escala comercial (Zhang y Cheng, 2007).

Mientras el Mn(II) es altamente soluble, el Mn(IV) tiende a formar óxidos insolubles, principalmente como MnO_2 (Tebo et al., 2010). Por esta razón, se ha planteado la

lixiviación del manganeso a partir de sus minerales mediante el empleo de agentes reductores o de microorganismos capaces de transferir electrones a los mismos. Aunque esta transferencia de electrones puede ocurrir de un modo directo, se ha visto que suelen predominar mecanismos indirectos, como la síntesis de compuestos reductores y ácidos orgánicos (oxálico y cítrico, principalmente) (Acharya et al., 2003, Das et al., 2011).

2.3 Microorganismos reductores de hierro

El oxígeno es el aceptor final de electrones más usado por la mayoría de los microorganismos aislados, probablemente porque su empleo genera una gran cantidad de energía para el metabolismo microbiano, Figura 2.6A. Sin embargo, en

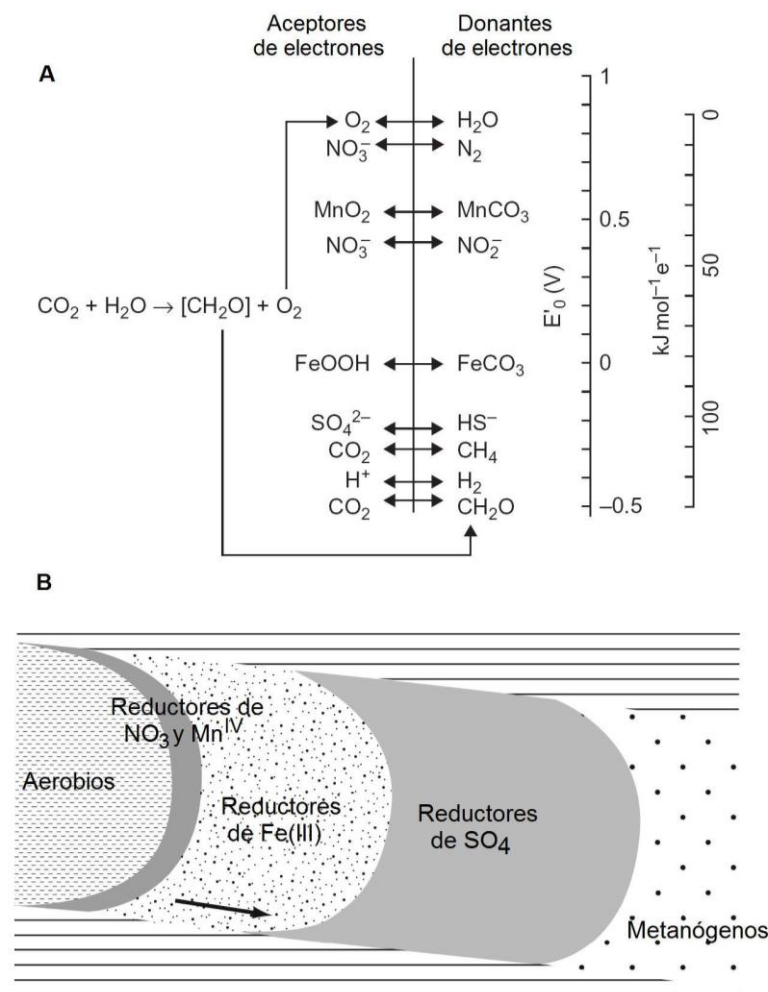


Figura 2.6: Potenciales redox estándar (pH 7,0) de algunos pares electroquímicos importantes en los diferentes procesos respiratorios y metanogénicos (A) y grupos microbiológicos previstos en un acuífero prístino que refleja las distintas zonas según la tendencia termodinámica de los distintos aceptores de electrones (B). Adaptada de Fenchel et al. (2012) y Bethke et al. (2011).

ausencia de O₂ algunos microorganismos también son capaces de utilizar otros aceptores finales de electrones llevando a cabo una respiración anóxica, Figura 2.6B.

Aunque la existencia de microorganismos capaces de reducir Fe(III) y Mn(IV) se conoce desde el siglo XIX (Lovley, 1991), durante mucho tiempo se pensó que esto ocurría porque producían sustancias que indirectamente eran capaces de reducir estos compuestos. Sin embargo, el descubrimiento de *Geobacter metallireducens* confirmó que ciertas bacterias podían usar hierro en su respiración de un modo directo y específico (Eisele y Gabby, 2014).

2.3.1 Microorganismos neutrófilos

Por motivos geológicos, ambientales y energéticos, hasta ahora, se han aislado una gran variedad de microorganismos neutrófilos reductores de hierro (Eisele y Gabby, 2014, Lovley et al., 2004). Entre éstos, los más estudiados son los pertenecientes a los géneros *Geobacter* (Lovley et al., 2011) y *Shewanella* (Bingjie et al., 2014, Wu et al., 2014).

Cuando el pH es cercano a la neutralidad y en ausencia de quelantes, la concentración de hierro disuelto es muy baja ya que, por acción del O₂, el Fe(II) se oxida rápidamente hasta Fe(III) (Morgan y Lahav, 2007), que tiende a formar (hidr)óxidos insolubles. En condiciones mayoritariamente anóxicas, las bacterias reductoras de hierro son capaces de utilizar estos sólidos férricos como aceptores finales de electrones provocando su biorreducción hasta sólidos más ricos en Fe(II), como la siderita y magnetita (Roh et al., 2003). Aunque este proceso pudiera representarse como un mecanismo de respiración primitivo, en la actualidad, se ha planteado que podría tener un papel importante en entornos contaminados, así como en sedimentos, suelos y ambientes subsuperficiales prístinos (Lovley et al., 2004).

Durante los últimos años, también se ha ensayado la utilización de este tipo de microorganismos en celdas microbianas de combustible (Logan, 2009), que son dispositivos que emplean microorganismos para transformar directamente en electricidad la energía química contenida en un sustrato. La aplicación de estos sistemas en el tratamiento de algunos efluentes contaminados podría permitir el

paso desde la situación actual, donde se utiliza energía para su tratamiento, hasta un escenario futuro donde se pueda producir energía a partir de ellos (Logan, 2008).

2.3.2 Microorganismos acidófilos y *Acidiphilium cryptum*

En los ambientes ácidos también es posible encontrar una amplia variedad de microorganismos capaces de oxidar Fe(II), azufre y compuestos orgánicos, o de reducir Fe(III) (Johnson y Hallberg, 2003). La Tabla 2.2 presenta algunas bacterias y arqueas acidófilas implicadas en la reducción u oxidación del hierro.

A pesar de que las variedades con mayor importancia en la reducción de hierro son *Acidiphilium* spp. (Johnson, 1998), la capacidad hierro-reductora de *Acidithiobacillus ferrooxidans* ha sido probablemente más estudiada (Brock y Gustafson, 1976, Das et al., 1992, Hallberg et al., 2011, Kucera et al., 2012, Ohmura et al., 2002b, Pronk et al., 1992, Pronk et al., 1991, Sand, 1989).

Acidiphilium cryptum, bacteria Gram negativa perteneciente a la familia *Acetobacteraceae*, es la especie tipo de su género (Hiraishi e Imhoff, 2005). Esta bacteria fue aislada por primera vez en 1981 (Harrison), a partir de residuos de minas de carbón, cultivos de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (que en su momento se creyeron puros) y muestras de suelo, clasificándose como mesófila, heterótrofa y aerobia, capaz de crecer entre pH 1,9 y 5,9.

Diez años después se descubrió que algunas bacterias acidófilas heterótrofas, entre ellas *Acidiphilium* SJH, también son capaces de reducir Fe(III) en disolución y algunos sólidos férricos (Johnson y McGinness, 1991). Las investigaciones en este campo fueron avanzando con Bridge y Johnson (2000), quienes comprobaron la capacidad de *A. cryptum* SJH para solubilizar sólidos férricos, comenzando a estudiar ciertas variables como el pH, la presencia de ligandos y el contacto directo de la bacteria con el mineral.

Otros estudios contemporáneos a los anteriores permitieron aislar una nueva variedad, *Acidiphilium cryptum* JF-5, a partir de sedimentos de un lago con aguas ácidas de una mina de carbón (Küsel et al., 1999). Se ha comprobado que esta cepa es capaz de crecer aeróbica y anóxicamente, mediante la reducción de Fe(III), a un pH entre 2,1 y 5,8 y temperatura entre 12 y 37 °C, aunque los valores óptimos de ambos parámetros son 3,2 y 35 °C, respectivamente. Para la reducción de Fe(III)

Tabla 2.2: Bacterias y arqueas acidófilas con capacidad para catalizar la oxidación desasimilatoria de Fe(II) o la reducción desasimilatoria de Fe(III). Tomada de Johnson et al. (2012).

Oxidantes de hierro	Reductores de hierro	Oxidantes y reductores de hierro
Bacterias		
<i>Leptospirillum (L.)</i> ¹	<i>Acidiphilium (A.)</i> ^{2/3}	<i>Acidithiobacillus (At.)</i> ¹
<i>L. ferrooxidans</i>	<i>A. cryptum</i> ²	<i>At. ferrooxidans</i>
<i>L. ferriphilum</i>	<i>A. acidophilum</i> ³	<i>At. ferrivorans</i>
" <i>L. ferrodiazotrophum</i> "	<i>A. angustum/rubrum</i> ²	<i>Acidiferrobacter thiooxydans</i> ¹
" <i>Ferrovum myxofaciens</i> " ¹	<i>A. organovorum</i> ²	<i>Ferrimicrobium acidiphilum</i> ²
" <i>Thiobacillus prosperous</i> " ¹	<i>A. multivorum</i> ²	<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i> ³
	<i>Acidocella (Ac.)</i> ²	<i>Ferrithrix thermotolerans</i> ²
	<i>Ac. facilis</i>	<i>Sulfobacillus (Sb.)</i> ³
	" <i>Ac. aromatica</i> "	<i>Sb. acidophilus</i>
	<i>Acidobacterium (Acb.)</i> ²	<i>Sb. thermosulfidooxidans</i>
	<i>Acb. capsulatum</i>	<i>Sb. benefaciens</i>
	<i>Acidobacterium spp.</i>	<i>Alicyclobacillus (Alb.)</i>
		<i>Alb. tolerans</i>
		<i>Alb. ferrooxydans</i>
		<i>Alb. aeris</i>
		<i>Alb. pohliae</i>
		<i>Alicyclobacillus sp. GSM</i>
Arqueas		
<i>Sulfolobus (S.)</i>		<i>Ferroplasma (Fp.) spp.</i>
<i>S. metallicus</i>		<i>Fp. acidiphilum</i>
<i>S. tokodaii</i>		" <i>Fp. acidarmanus</i> "
<i>Metallosphaera sedula</i>		<i>Acidiplasma (Ap.)</i>
		<i>Ap. cupricumulans</i>
		<i>Ap. aeolicum</i>

¹ Autótrofo obligado; ² heterótrofo obligado; ³ autótrofo facultativo.

puede utilizar glucosa, fructosa, xilosa, etanol, glicerol, malato, glutamato, fumarato, citrato y H₂, sin generar productos de fermentación; mientras que la adición de acetato inhibe tanto su crecimiento como la reducción de Fe(III). Estudios posteriores han mostrado que esta bacteria reduce Fe(III) y Cr(VI) incluso en ambientes aeróbicos (Cummings et al., 2006, Küsel et al., 2002).

Acidithiobacillus ferrooxidans, por otra parte, es una bacteria acidófila oxidante de compuestos reducidos de azufre, H₂ y Fe(II) en ambientes aeróbicos (Valdés et al., 2008); pudiendo, también, utilizar los dos primeros sustratos para reducir Fe(III) cuando se desarrolla en ambientes carentes de oxígeno (Ohmura et al., 2002b). Aunque ya se han realizado algunos estudios para utilizar esta bacteria en la obtención de algunos metales, p.ej., níquel a partir de lateritas (Hallberg et al., 2011),

dato que se requiere un ambiente anóxico, el empleo de su capacidad reductora de hierro en ambientes industriales precisaría de una elevada inversión y coste de operación que permitiera mantener tales condiciones (Ohmura et al., 2002b, Pronk et al., 1992). Por este motivo, parece más adecuada la utilización de *Acidiphilium cryptum*, que obviamente tiene la gran ventaja de que no necesita condiciones anóxicas estrictas.

2.4 Transferencia extracelular de electrones

Los microorganismos capaces de tomar/ceder electrones desde/hacia sólidos son conocidos como microorganismos electroactivos; siendo a su vez clasificables en electrótrofos o exoelectrógenos según su capacidad para captar o ceder los electrones, respectivamente (Huang et al., 2013, Kalathil et al., 2013, Schrott et al., 2011, Sydow et al., 2014). El estudio y la descripción de la transferencia de electrones entre la bacteria y un sólido se facilita en los sistemas bioelectroquímicos (p.ej., celdas microbianas de combustible y celdas de electrolisis microbiana, Figura 2.7) debido a la insolubilidad de los propios electrodos.

El avance más reciente en los sistemas bioelectroquímicos es la utilización de microorganismos electrótrofos, capaces de captar los electrones desde el cátodo y promover la reducción del agente oxidante, pudiendo ocurrir esta transferencia de electrones a través de varios mecanismos (He y Angenent, 2006, Park et al., 1999, Rosenbaum et al., 2011). A este tipo de sistemas, junto al empleo de algas para

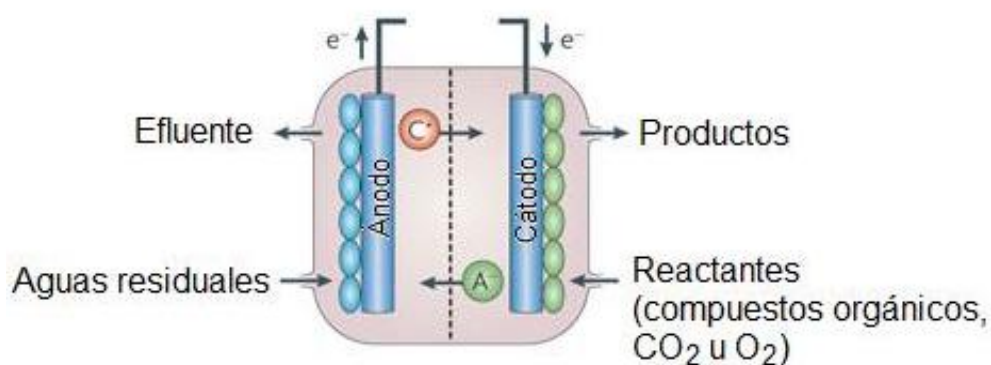


Figura 2.7: Bioánodo en combinación con un biocátodo en una celda microbiana de combustible. Adaptada de Rabaey y Rozendal (2010). Las elipses verdes y celestes representan microorganismos electrótrofos y exoelectrógenos, respectivamente.

generar el agente oxidante (Wu et al., 2013), se le conoce como biocátodos. Considerando la transferencia de electrones, a *Acidithiobacillus ferrooxidans* podría considerársele como un microorganismo tanto electrótrofo (Morra et al., 2003) como exoelectrógeno (Ohmura et al., 2002a), ya que puede utilizar en ambos casos el hierro en disolución como aceptor o dador de electrones.

Aunque el uso de microorganismos exoelectrógenos en el compartimento anódico de las celdas microbianas de combustible es una aplicación menos novedosa, su estudio, desde el punto de vista del presente trabajo, reviste gran interés porque dicho proceso se corresponde con el sentido en que los electrones serían transferidos desde el microorganismo al óxido.

2.4.1 Microorganismos exoelectrógenos

Entre los microorganismos capaces de utilizar aceptores de electrones distintos al O_2 , como por ejemplo nitrato y sulfato (que pueden difundir a través de la membrana plasmática), destacan aquellos con la capacidad de ceder dichos electrones a soportes sólidos. Estos microorganismos, conocidos como exoelectrógenos, *anode respiring bacteria* y *electricigens* (Logan, 2009), pueden ser aprovechados en el compartimento anódico de los sistemas bioelectroquímicos y para la biorreducción de óxidos de hierro (Gralnick y Newman, 2007).

Aunque la transferencia de electrones hasta un sólido semiconductor se logre de modos diferentes, dependiendo de si las bacterias exoelectrogénicas se encuentran en forma planctónica o formando una biopelícula (Hernandez y Newman, 2001, Patil et al., 2012), el esquema propuesto por Torres et al. (2010), que grafica las pérdidas de potencial que ocurren en el ánodo (Figura 2.8), puede ser generalizado a cualquier caso. En esta figura se muestra que para un determinado microorganismo el potencial E_{ME} (potencial de la membrana externa) es clave, puesto que corresponde a aquél potencial al cual los electrones abandonan la célula. Es por esto que la transferencia de electrones estará termodinámicamente permitida sólo si el potencial del aceptor de electrones (el potencial del ánodo para los sistemas bioelectroquímicos o el potencial de reposo para los óxidos de hierro) es menor a este valor.

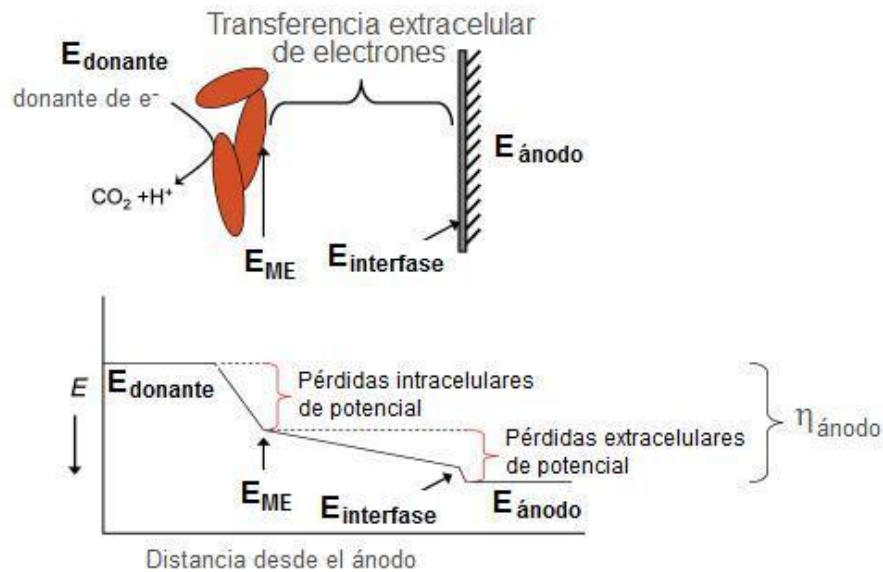


Figura 2.8: Potenciales de interés en una biopelícula de bacterias cediendo electrones al ánodo. Adaptada de Torres et al. (2010).

2.4.2 Mecanismos de transferencia de electrones

La transferencia de electrones desde los microorganismos hasta los óxidos de hierro, y su posterior disolución, se ha explicado mediante los mecanismos de contacto directo y mediadores redox, que se detallan a continuación. Adicionalmente, se expondrá un tercer mecanismo que supone la disolución del óxido de hierro en presencia de ligandos, aunque, en este caso, los electrones no son transferidos al sólido sino que lo son a un quelato soluble de Fe(III) (Weber et al., 2006).

Contacto directo

Algunas especies de microorganismos son capaces de utilizar aceptores de electrones insolubles sólo cuando están en contacto directo con ellos. Un modo de lograr este contacto es mediante la adhesión bacteriana a la superficie sólida, donde los citocromos, u otros elementos que participan en la cadena transportadora de electrones, pueden entrar en contacto directo con esta superficie, Figura 2.9A (Logan, 2009). Tal es el caso de *Geobacter metallireducens*, el primer microorganismo con el que se confirmó la capacidad de usar directa y específicamente al hierro en su proceso de respiración (Eisele y Gabby, 2014).

Un mecanismo similar supone la síntesis de apéndices conductores, también referidos como pili conductores o nanocables, mediante los cuales se transfieren los electrones desde la cadena transportadora de electrones hasta los sólidos cercanos, Figura 2.9B. Esta estrategia de reducción de óxidos de hierro ha sido principalmente estudiada en *Shewanella oneidensis* y *Geobacter sulfurreducens* (Malvankar y Lovley, 2014).

Es importante destacar que estos dos mecanismos se han descrito como los más importantes cuando se trata de emplear este tipo de microorganismos en celdas de combustible para recuperar energía desde las aguas residuales, ya que se obtienen altas densidades de corriente prescindiendo de la presencia de otros compuestos (Patil et al., 2012).

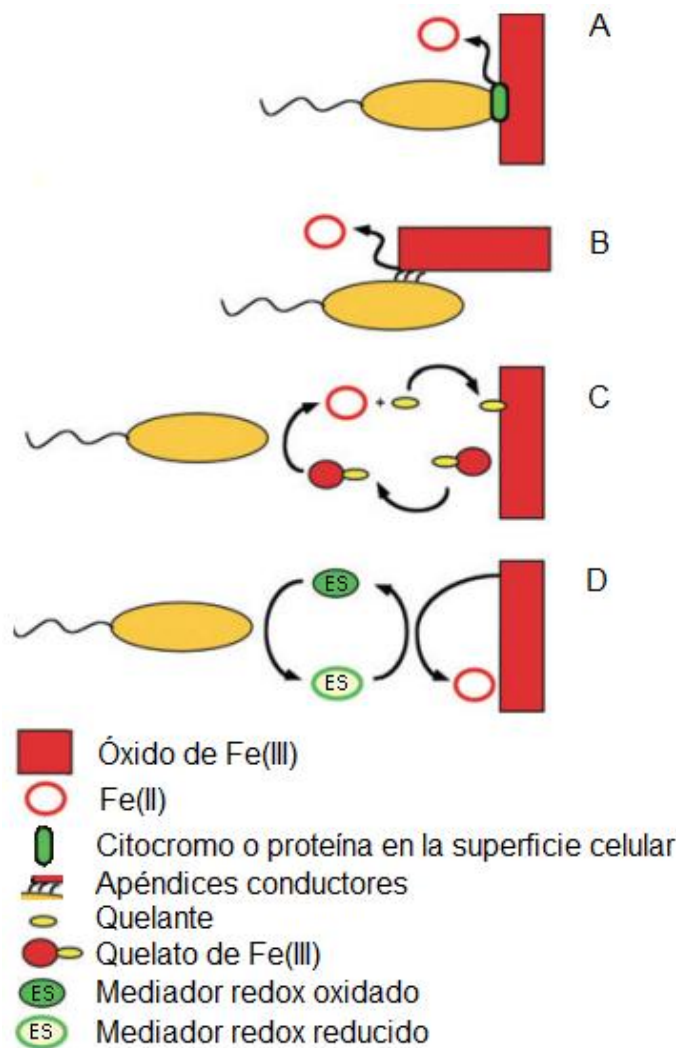


Figura 2.9: Cuatro posibles estrategias para la respiración extracelular. Adaptada de Gralnick y Newman (2007). Contacto directo (A), síntesis de apéndices conductores (B), quelantes (C) y transportador de electrones (D).

Mediadores redox

Algunos microorganismos son capaces de transferir electrones hasta sólidos insolubles usando mediadores redox, también conocidos como transportadores de electrones (*electron shuttles*), Figura 2.9D. Estos compuestos han sido definidos como moléculas orgánicas que pueden ser oxidadas y reducidas reversiblemente, confiriéndoles la capacidad para servir como portador de electrones en múltiples reacciones redox (Van der Zee y Cervantes, 2009, Watanabe et al., 2009). No obstante, se ha reportado que el uranio y azufre también podrían servir como transportadores de electrones en la reducción de Fe(III) y que, por otro lado, el hierro podría mediar la reducción de Mn(IV) (Lovley et al., 2004).

Se ha visto que algunas especies microbianas son capaces de sintetizar de forma natural este tipo de compuestos; p. ej., la piocianina y fenazina-1-carboxamida producidas por *Pseudomonas aeruginosa* (Rabaey et al., 2005). Por otra parte, algunas sustancias generadas durante la degradación de la materia orgánica también pueden llevar a cabo esta función mediadora. Estos compuestos, que se agrupan bajo el término de sustancias húmicas, pueden ser clasificados en huminas, ácidos húmicos y ácidos fúlvicos, según su solubilidad en condiciones ácidas y alcalinas (Straub et al., 2005). Al respecto, se ha comprobado que la presencia de este tipo de compuestos acelera la reducción desasimilatoria de Fe(III) (Wolf et al., 2009) al ser microbianamente reducidos (Jiang y Kappler, 2008, Kappler et al., 2004) y, posteriormente, oxidados por los oxi-hidróxidos de Fe(III) (Piepenbrock et al., 2014).

Finalmente, este tipo de compuestos también puede ser incorporado exógenamente, siendo comunes los casos en los que se ha empleado antraquinona-2,6-disulfonato, azul de metileno, safranina, fenosafranina, tionina, rojo neutro, cobalamina, riboflavina, piridoxina, metil viológeno y benzil viológeno. Así, se ha visto que la incorporación de este tipo de moléculas puede mejorar las funciones de los microorganismos, incluso otorgándoles nuevas capacidades (Borole et al., 2008, Guerrero-Barajas y Field, 2005, Schröder, 2007, Van der Zee y Cervantes, 2009, Yarlagadda et al., 2012). Por ejemplo, la incorporación de azul de metileno, fenosafranina y tionina ha mejorado el funcionamiento de celdas microbianas de combustible empleando *Saccharomyces cerevisiae*, *Acidiphilium cryptum* y *Escherichia coli*, respectivamente (Borole et al., 2008, Rahimnejad et al., 2011,

Tanaka et al., 1983b); mientras que la melanina puede mediar en la biorreducción de hidróxidos de hierro por *Shewanella algae* (Turick et al., 2002).

Ligandos

Los compuestos de coordinación están formados por un átomo central, usualmente un catión metálico, rodeado de otros átomos o grupos de ellos, que se denominan ligandos. Cuando un ligando formado por varios átomos interactúa con el catión a través de dos o más sitios (denticidad mayor o igual a dos) puede ser llamado quelante (Stumm y Morgan, 1995b).

Dado que el hierro es un catión importante para la mayor parte de los seres vivos, muchos microorganismos, hongos y plantas sintetizan compuestos llamados sideróforos para proliferar en medios donde este metal escasea. Estos compuestos son quelantes de origen biológico que se unen fuerte y específicamente al hierro con la función de secuestrarlo de los distintos lugares donde se pueda encontrar, haciéndolo más biodisponible (Kraemer, 2004). Por esta razón, se sostiene que en la reducción desasimilatoria de hierro los ligandos actúan de modo similar, formando un quelato de Fe(III) tras la disolución química del óxido de hierro, Figura 2.9C. Este quelato es posteriormente reducido por la acción microbiana, liberando el hierro en forma de Fe(II) y quedando libre para volver a realizar este ciclo, Figura 2.10 (Weber et al., 2006). Es importante mencionar que los ácidos húmicos también podrían comportarse como quelantes de hierro y de otros metales (Pandey et al., 2000, Shapiro, 1964).

En este contexto, se ha planteado la posibilidad de emplear microorganismos que sintetizan ácidos orgánicos y ligandos para producir metales base y plata (Ehrlich, 1997), donde el oxalato y citrato son los ejemplos más destacados por su capacidad de formar complejos con Fe(III) (Braunschweig et al., 2014, Eisele y Gabby, 2014, Stone, 1997). Sin embargo, Stone (1997) sostiene al respecto que la efectividad no solo depende de los valores de las constantes de equilibrio de complejamiento sino que, también, deben considerarse las constantes de acidez, debido a que los ligandos tienen un distinto grado de protonación según el pH. El análisis se dificulta cuando se considera que algunos ligandos pueden comportarse como agentes reductores (p.ej., el oxalato por sí mismo y el citrato en presencia de luz) (Eisele y Gabby, 2014, Llorens-Molina, 1988)

2.5.1 Aspectos termodinámicos y solubilidad

La solubilidad de un soluto se define como “la composición analítica de una disolución saturada, expresada como una proporción del soluto en un disolvente” (IUPAC, 1997). Dado que el proceso de disolución de un sólido se detiene cuando se alcanza el equilibrio, la solubilidad de dicho sólido está determinada termodinámicamente, debido a que en el equilibrio el cambio en la energía libre de Gibbs es igual a cero (Cornell y Schwertmann, 2003c). Aunque es usual que la solubilidad se cuantifique en unidades de concentración, el comportamiento de los compuestos que tienden a ionizarse puede ser descrito de mejor modo mediante el producto de solubilidad.

pH

La disolución de los óxidos de Fe(III) puede ser expresada mediante dos ecuaciones químicas análogas, una en la que se generan iones hidroxilo y otra donde se consumen protones, reacciones 2.8 y 2.9 tomando como ejemplo la goethita. La ecuación donde intervienen protones tiene la ventaja de representar más claramente la dependencia entre el pH y la máxima actividad de Fe^{3+} , según se muestra en la ecuación 2.10 para la goethita (Cornell y Schwertmann, 2003c).



$$\log a_{Fe^{3+}} = \log K'_{so} - 3pH \quad (2.10)$$

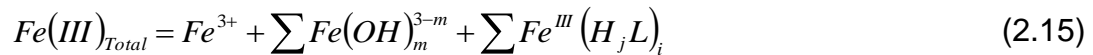
El Fe(III) en disolución se puede encontrar en forma de varias especies con distinto grado de hidroxilación, representadas por la reacción 2.11, donde por simplicidad se han omitido aquellos iones en los que el hierro interviene con más de un átomo. De este modo, la concentración total de Fe(III) corresponde a la suma de todas sus formas iónicas, ecuación 2.12 (Langmuir, 1997b).



$$Fe(III)_{Total} = Fe^{3+} + \sum Fe(OH)_m^{3-m} \quad (2.12)$$

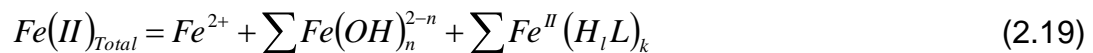
Ligandos

En presencia de ligandos (p.ej., cloruro, fosfato y citrato) tiene lugar la formación de quelatos de la forma $Fe^{III}(H_iL)_j$ (Dean, 1999), según la reacción 2.13, cuya concentración dependerá de la actividad del ligando y del pH. Adicionalmente, el ligando también puede encontrarse protonado en mayor o menor grado, según la reacción 2.14, por lo que su afinidad por el hierro también dependerá del pH. De este modo, la concentración total de Fe(III) está dada por la ecuación 2.15 (Cornell y Schwertmann, 2003c).



Ambiente reductor

Cuando el ambiente es reductor puede tener lugar una disolución reductora, efectuándose, por ejemplo, para la goethita según la reacción 2.16. De este modo, en la disolución también sería posible encontrar Fe^{2+} junto a sus especies solubles con distinto grado de hidroxilación (Langmuir, 1997b) y sus quelatos (Dean, 1999), lo que se ajustaría a las reacciones 2.17 y 2.18, respectivamente. Por esta razón, la concentración total de Fe(II) estaría dada por la ecuación 2.19, mientras que a la concentración total de hierro disuelto se llegaría con la ecuación 2.20 (Cornell y Schwertmann, 2003c).



Los aspectos termodinámicos de estos sistemas pueden ser representados adecuadamente a través de esquemas como los mostrados en la Figuras 2.11 y 2.12; observándose, en la primera de ellas, que pese a que en condiciones

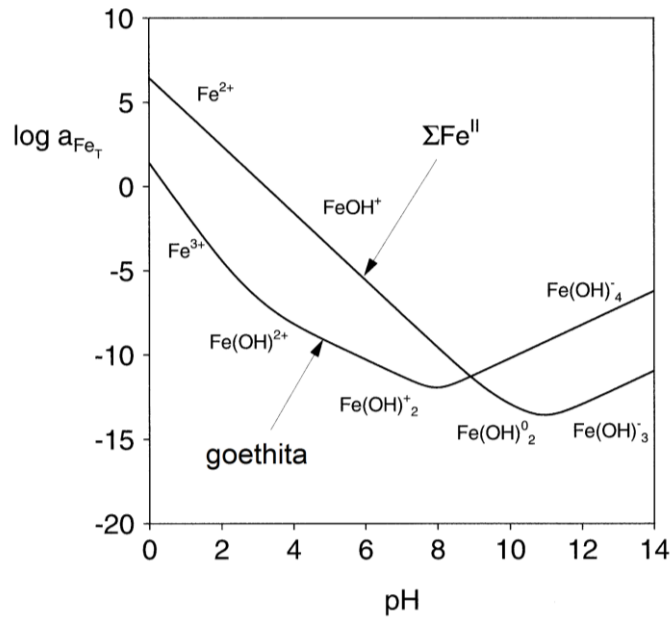


Figura 2.11: Solubilidad de la goethita en condiciones oxidantes y reductoras ($pE+pH=8$). Tomada de Cornell y Schwertmann (2003c).

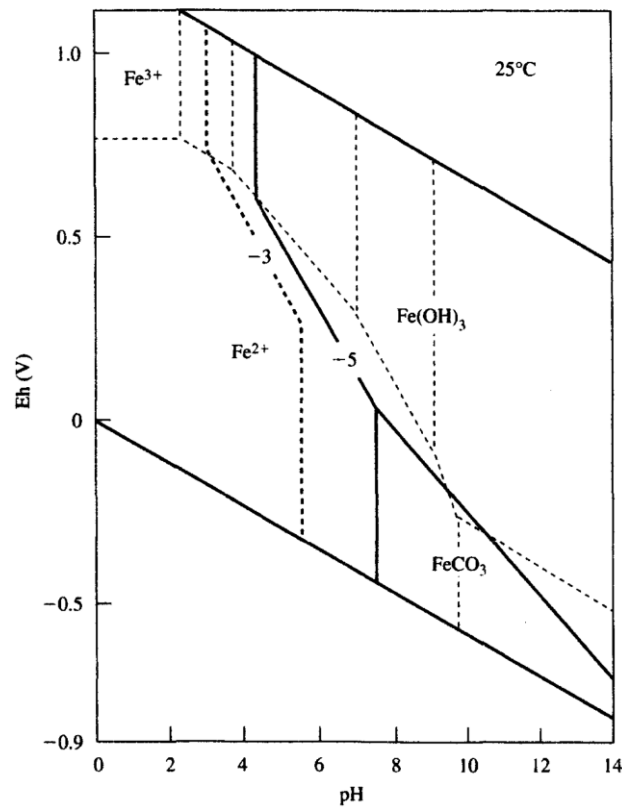


Figura 2.12: Diagrama de Pourbaix (Eh-pH) para el sistema Fe-O₂-CO₂-H₂O a 25°C. Tomado de Langmuir (1997b).

Se ha ignorado el $Fe_3(OH)_8$, mientras que se asumió un $pK_{sp}=37,1$ para el $Fe(OH)_3$ amorfo. Se ha fijado el bicarbonato a $10^{-2.7}$ mol/kg. Los límites entre las fases sólidas y acuosas han sido graficados para concentraciones de 10^{-5} mol/kg (línea continua) y 10^{-3} mol/kg (línea segmentada oscura). La línea segmentada más clara muestra la estabilidad de las distintas especies acuosas de Fe(II) y Fe(III).

reductoras se suele lograr una mayor concentración de hierro disuelto, las mayores concentraciones son sólo alcanzables a valores bajos de pH (Kostka y Nealson, 1995).

2.5.2 Aspectos cinéticos y mecanismos de disolución

Aunque el grado de subsaturación de la disolución con respecto al óxido es la fuerza que impulsa el proceso de disolución (Cornell y Schwertmann, 2003b), la velocidad de la reacción dependerá de los mecanismos involucrados y de la cantidad de sitios activos en la superficie del mineral. Con respecto a esto último, conviene recordar que la superficie de un cristal no es perfectamente plana y uniforme, sino que posee una cierta cantidad de imperfecciones, o sitios más reactivos, que serán aquellos donde preferentemente se lleve a cabo su disolución, según se muestra en la Figura 2.13 (Wieland et al., 1988). En relación a los mecanismos de disolución, se han identificado tres: protonación, complejamiento y reducción (Cornell y Schwertmann, 2003b).

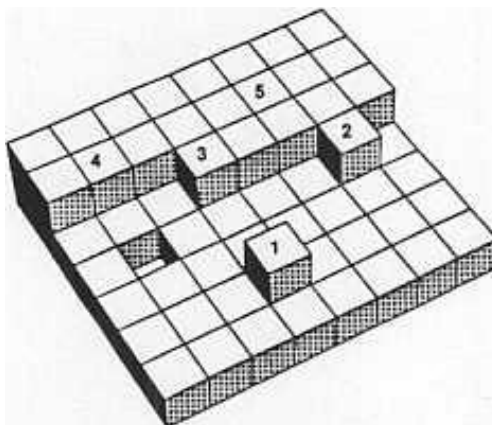


Figura 2.13: Modelo de sitios activos. Según el número de enlaces cubiertos, la velocidad de disolución disminuye desde los altamente reactivos (1) hasta los más inactivos (5). Adaptada de Wehrli et al. (1990).

Protonación

En el caso de un óxido, el desprendimiento de especies metálicas superficiales ocurre como consecuencia de la polarización y el debilitamiento de los enlaces oxígeno-metal en su superficie. Cuando este proceso está causado por protones, Figura 2.14A, la expresión que describe la velocidad de disolución (R_H en $\text{mol/h}\cdot\text{m}^2$) se presenta en la ecuación 2.21, donde C_H^s representa la concentración superficial

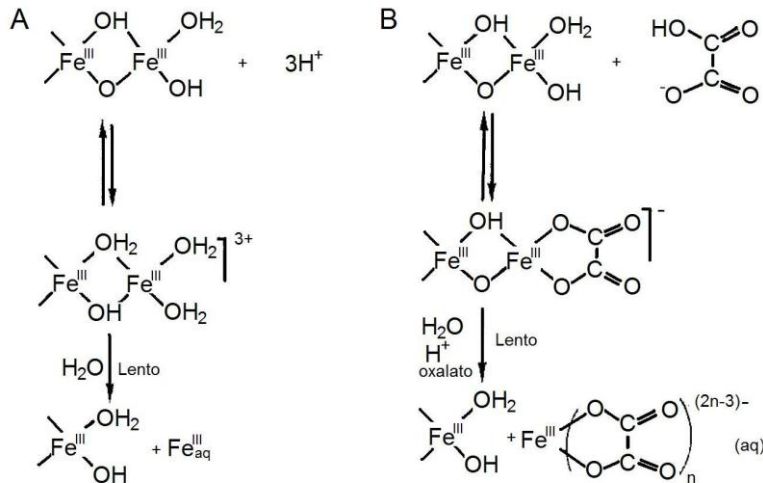


Figura 2.14: Mecanismos de disolución de óxidos de Fe(III) promovidos por protones (A) y ligandos (B, ácido oxálico). Adaptada de Sulzberger et al. (1989).

de protones (en mol/m²) y n el número de protones requeridos para el debilitamiento del enlace metal-oxígeno por centro metálico (Zinder et al., 1986).

$$R_H = k_H \cdot (C_H^s)^n \tag{2.21}$$

Complejamiento

La adsorción de ligandos sobre la superficie del óxido también puede contribuir al debilitamiento de los enlaces metal-oxígeno, acelerando el proceso de disolución, Figura 2.14B (Biber et al., 1994). La ecuación 2.22 describe, de modo general, el efecto de los ligandos sobre la velocidad de disolución (R_L en mol/h·m²), donde n es un número entero (a menudo igual a cero) y C_L^s representa la concentración superficial de ligando (Zinder et al., 1986).

$$R_L = k_L \cdot C_L^s \cdot (C_H^s)^n \tag{2.22}$$

También se ha constatado que la adsorción de ciertos ligandos, p.ej., fosfato y sulfato, pueden retardar e incluso bloquear la disolución del óxido. De este modo, los ligandos mononucleares con denticidad mayor a uno tenderían a facilitar el proceso de disolución, mientras que aquellos que son capaces de formar complejos superficiales bi- o multinucleares la inhibirían. Finalmente, también conviene tener en cuenta que la adsorción de cualquier tipo de ligando puede modificar la carga superficial, lo que hará variar el grado de protonación (Biber et al., 1994, Cornell y Schwertmann, 2003b).

Reducción

El mecanismo de disolución reductora de los óxidos de hierro es el más importante en ambientes naturales. Éste es, sin embargo, un proceso bastante más complejo que los descritos previamente, debido a que puede ocurrir: por adsorción de un dador de electrones, por polarización catódica de un electrodo constituido por el propio óxido de hierro o por transferencia de electrones hasta el Fe(III) superficial a través de un complejo ternario (Cornell y Schwertmann, 2003b).

Debido a que el Fe(II) y el Fe(III) se diferencian en la carga, tamaño y propiedades electrónicas (Bauer y Knölker, 2008, Stone, 1997), la reducción de un centro metálico superficial causa el debilitamiento de los enlaces hierro-oxígeno, lo que facilita su desprendimiento (Cornell y Schwertmann, 2003b). Adicionalmente, la concentración superficial de protones (C_H^s) determina la velocidad de la disolución de estos núcleos reducidos promovida por tales protones ($R_{e,H}$), ecuación 2.23. Por otra parte, la velocidad de disolución de estos núcleos reducidos promovida por ligandos ($R_{e,L}$) está determinada tanto por la concentración superficial de ligandos (C_L^s) como por C_H^s , ecuación 2.24. En estas expresiones $k_{e,H}$ y $k_{e,L}$ son constantes de proporcionalidad que dependen del potencial redox. Una esquematización de ambos procesos se muestra en la Figura 2.15 (Zinder et al., 1986).

$$R_{e,H} = k_{e,H} \cdot (C_H^s)^n \quad (2.23)$$

$$R_{e,L} = k_{e,L} \cdot C_L^s \cdot (C_H^s) \quad (2.24)$$

Se ha planteado que ciertos ligandos podrían facilitar la transferencia de electrones desde el Fe(II) disuelto hasta centros superficiales de Fe(III), mediante la formación de complejos ternarios superficiales, Figura 2.16 (Sulzberger et al., 1989). El ejemplo más estudiado ha sido el oxalato (Suter et al., 1988), para el que se ha propuesto que la velocidad del proceso de disolución está determinada por la transferencia de electrones desde el complejo $Fe^{II}(C_2O_4)_2^{2-}$, localizado en el plano Stern, hasta el complejo superficial oxalato-Fe(III) (Blesa et al., 1987). Otros ligandos que podrían actuar de modo similar son los ácidos nitrilotriacético (NTA) (del Valle Hidalgo et al., 1988) y etilendiaminotetraacético (EDTA) (Borghi et al., 1989). Este mecanismo

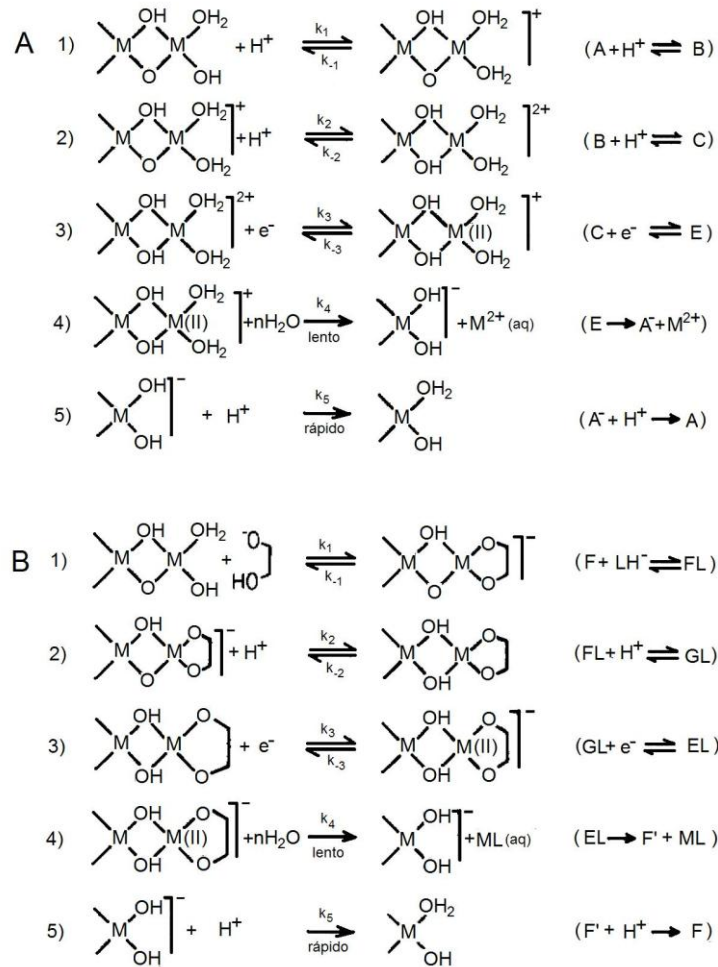


Figura 2.15: Esquema de la disolución reductora promovida por protones (A) y por ligandos (B, p.ej., oxalato) de un óxido trivalente (M_2O_3). Adaptada de Zinder et al. (1986).

explicaría el incremento en la velocidad de disolución cuando se agrega Fe(II) en presencia de oxalato o EDTA (Cornell y Schwertmann, 2003b).

Finalmente, la velocidad global de disolución (R_{Total}) estará dada por la suma ponderada de todas las reacciones que estén ocurriendo simultáneamente, ecuación 2.25, donde los factores de ponderación (x_i) representan la ocupación de los sitios activos de disolución, mientras que el término final (k_{aq}) representa el efecto de la hidratación, por lo que será independiente del pH y los ligandos presentes (Biber et al., 1994, Zinder et al., 1986). Pese a que puedan estar ocurriendo varias reacciones al mismo tiempo, usualmente, sólo una o dos de ellas determinaran la velocidad global de la reacción, Figura 2.17 (Biber et al., 1994).

$$R_{Total} = x_H \cdot R_H + \sum x_L \cdot R_L + x_{e,H} \cdot R_{e,H} + \sum x_{e,L} \cdot R_{e,L} + k_{aq} \quad (2.25)$$

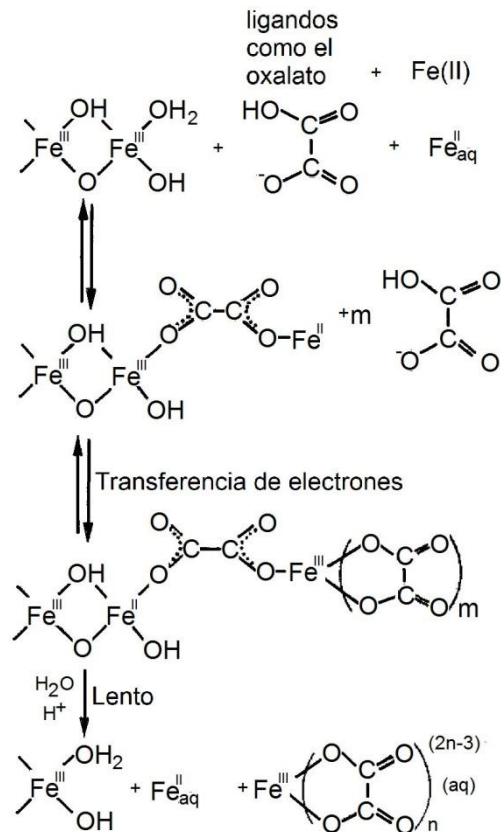


Figura 2.16: Mecanismo de disolución de óxidos de Fe(III) en un medio que contiene Fe(II) mediante la formación de un complejo ternario superficial. Adaptada de Sulzberger et al. (1989).

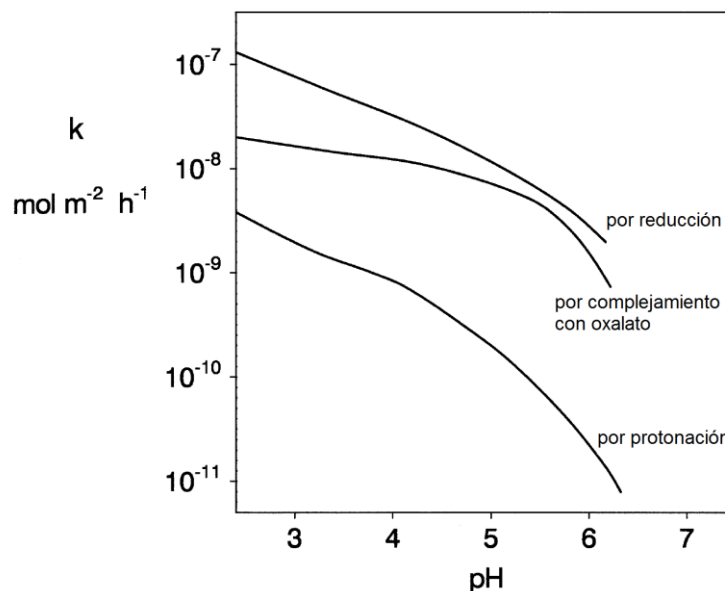


Figura 2.17: Relación entre la velocidad de disolución de la goethita y el pH mediante los mecanismos de protonación, complejamiento (con oxalato) y reducción (con ácido ascórbico). Adaptada de Cornell y Schwertmann (2003b).

CAPÍTULO II: PARTE EXPERIMENTAL



3 Materiales y métodos generales

En términos generales, cada uno de los experimentos requirió de sus adecuados materiales y métodos. No obstante, para una lectura más cómoda, en esta sección, se presentan aquellas metodologías que fueron transversales a toda la investigación, mientras que el resto de los protocolos, específicos de cada ensayo, se describen en las secciones correspondientes.

3.1 Propagación de *Acidiphilium cryptum* y *Aeromonas hydrophila*

La propagación de *Acidiphilium cryptum* JF-5 (Küsel et al., 1999) y *Aeromonas hydrophila* (García-Balboa et al., 2010) fue realizada aeróbicamente, en matraces con tapón de algodón, en un incubador orbital a 35 °C y a 150 rpm. Para *A. cryptum* se empleó el medio de cultivo E (modificado a partir del medio *Acidiphilium* de la colección alemana; DSMZ, 2007), Tabla 3.1, mientras que para *A. hydrophila* se utilizó el medio BRS, Tabla 3.2.

Una vez que todos los componentes fueron pesados y disueltos en agua destilada, el pH de los medios E y BRS se ajustó a 2,4 y 7,0, respectivamente, con H₂SO₄ y NaOH, procediendo posteriormente a su esterilización en autoclave a 121 °C durante 30 min.

Tabla 3.1: Composición del medio de cultivo E.

Componente	Concentración (g/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0
KCl	0,1
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5
Extracto de levadura	0,3
Glucosa	3,0

Tabla 3.2: Composición del medio de cultivo BRS (García-Balboa et al., 2010).

Componente	Concentración (g/L)
KH ₂ PO ₄	0,5
NH ₄ Cl	1,0
Na ₂ SO ₄	4,5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,04
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,06
Citrato trisódico	0,22
Extracto de levadura	1,0
Lactato sódico	6,0

3.2 Medios de cultivos y su esterilización

Los medios de cultivo E y BRS, presentados en la sección anterior, fueron los empleados en todos los experimentos; no obstante, en algunos casos fue necesario modificar el pH, o incluir nuevos componentes, como la fuente de Fe(III), Fe(II), ligandos o transportadores de electrones, en distintas concentraciones.

Así, el medio E/Fe(III) era un medio con una composición similar a la del medio E aunque con Fe(III) a una concentración de 23 mmol/L. Para su elaboración, 6,6 g de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (~20% Fe, p/p) fueron añadidos a 1 L de agua destilada, calentándose para favorecer su disolución. El resto de componentes listados en la Tabla 3.1 fueron disueltos posteriormente, ajustándose en último lugar el pH hasta 2,4 con NaOH. Por otra parte, los medios suplementados con Fe(II) fueron preparados añadiendo cantidades conocidas de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, en forma de sólido o disolución (cuando ésta era muy baja), al medio original, siempre asegurándose que éste no se diluyese significativamente. De modo similar, se prepararon soluciones de concentración conocida para los distintos ligandos y transportadores de electrones. Éstas se utilizaron para suplementar los medios originales a fin de obtener aquellos otros en los que era necesario que contuvieran dichas especies.

La esterilización se realizó, generalmente, mediante autoclave, a 121 °C y 30 min. Sin embargo, cuando los medios contenían Fe(III), Fe(II), ligandos o transportadores de electrones, éstos fueron esterilizados por filtración empleando una membrana de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0,22 μm .

3.3 Pretratamiento de los sólidos y técnicas de caracterización

En los ensayos se empleó jarosita biogénica, Apéndice I, junto a otros minerales de hierro, Apéndice II. Para su utilización, estos sólidos fueron tamizados, recogándose, usualmente, la fracción con tamaño de partícula menor a 0,090 mm. Aunque el pretratamiento de la jarosita no requirió una etapa de molienda, para el ajuste del tamaño de partícula de los minerales se empleó un molino de bolas.

En líneas generales, los sólidos fueron caracterizados mediante las siguientes técnicas analíticas:

- Fluorescencia de rayos X (XRF): para conocer su composición elemental.

- Medición de hierro o manganeso tras la digestión durante 7 días con HCl 6 mol/L (Aller et al., 1986): para determinar el contenido de ambos metales.
- Difracción de rayos X (XRD): para determinar la presencia de fases cristalinas.
- Microscopía electrónica de barrido (SEM): para determinar los aspectos morfológicos de las partículas y células, detallándose la preparación de las muestras en el Apéndice III.
- Determinación de la distribución de tamaños de partícula por vía húmeda mediante la técnica de difracción laser (equipo Malvern Mastersizer 2000 con el accesorio Hydro 2000SM).

3.4 Esterilización de los materiales y desinfección de los minerales

Para evitar la contaminación microbiana se trabajó en cabina de flujo laminar horizontal esterilizada previamente con luz UV, durante 20 min, utilizando matraces Erlenmeyer de 250 mL (con tapón de algodón) y viales de 100 mL previamente cubiertos con papel de aluminio y esterilizados en autoclave.

La esterilización del material en contacto directo con los cultivos se realizaba adaptándola según las necesidades. Por ejemplo, el orificio trasero de las pipetas y puntas de micropipeta fue taponado con una mota de algodón hidrófobo antes de su esterilización. De modo similar, se utilizó papel de aluminio para cubrir el resto de materiales antes de ser introducidos en el autoclave y esterilizados a 121 °C durante 30 min.

A fin de evitar la posible modificación superficial de los sólidos durante su esterilización en autoclave, éstos fueron desinfectados empleando etanol para evitar la proliferación de la microflora presente en ellos. Para ello, una vez pesados y depositados en viales estériles, se adicionó etanol (96% v/v) hasta cubrirlos completamente. Los viales fueron tapados nuevamente con el papel de aluminio, dejándolos en etanol durante 3-5 días. Transcurrido este período, los viales tapados fueron transferidos a una estufa a 105 °C durante 6-12 h, ventilando periódicamente para la evaporación de todo el etanol.

3.5 Inoculación de matraces y viales

Una vez que el cultivo de propagación, descrito en la sección 3.1, se hallaba al término de la fase exponencial de crecimiento o al comienzo de la estacionaria, se procedía a su utilización como inóculo.

Para esto, el primer paso consistía en el recuento microbiano del cultivo de propagación, empleando una cámara *Neubauer-improved* modelo Petroff (profundidad 0,01 mm, Apéndice IV), a fin de determinar la población microbiana. Posteriormente, con el fin de disponer de la concentración bacteriana inicial que se precisaba en el ensayo (usualmente $1 \cdot 10^8$ células/mL), se determinaba el volumen a inocular según la población microbiana lograda en el cultivo de propagación y el volumen de medio a utilizar, que solía ser 60 mL para los viales y 100 mL para los matraces Erlenmeyer.

En los matraces y viales, que podían o no contener sólido, en primer lugar, se añadía el medio de cultivo y, posteriormente, el volumen de inóculo calculado con anterioridad. A menos que se indique lo contrario, los viales eran consecutivamente tapados con un tapón de goma de butilo y sellados con tapas de engarzado metálicas (*crimp cap*) utilizando una máquina de prensa adecuada. Siendo, finalmente, puestos en un incubador orbital a 35 °C y 150 rpm.

3.6 Metodología de muestreo

El muestreo de matraces y viales fue llevado a cabo en una cabina de flujo laminar horizontal, cuya luz UV incorporada se había encendido con una anterioridad de, al menos, 20 min.

Cuando se trabajaba con matraces, éstos fueron sacados del incubador orbital e introducidos en la cabina de flujo laminar. Una vez flameada la boca del matraz, se tomaba la muestra empleando una pipeta de vidrio. Si la experiencia se realizaba en viales, cuando éstos eran retirados del incubador orbital, se agitaban vigorosamente, para resuspender completamente el sólido, y su tapón de goma de butilo se desinfectaba exteriormente con etanol (96%, v/v). Seguidamente, los viales se colocaban en la cabina de flujo laminar, esperando a que todo el sólido sedimentase nuevamente.

Habitualmente, se muestreaba el líquido sobrenadante utilizando jeringuillas desechables estériles previamente desoxigenadas. Esto se lograba usando una corriente de $\text{CO}_2:\text{N}_2$ (20:80 v/v) esterilizada mediante un filtro (estéril) que contenía una membrana de teflón con un tamaño de poro de $0,20\ \mu\text{m}$. Es importante señalar que en el proceso de muestreo se reemplazaba el volumen de muestra, usualmente de 2 mL, con un volumen equivalente de la mezcla de gases antes mencionada a fin de mantener el equilibrio entre las presiones interna y externa.

Inmediatamente después de tomada la muestra (2 mL), una alícuota de 0,5 mL se diluía hasta 5 mL empleando HCl 1 mol/L, reservándose para la posterior medición del contenido de Fe(II) por el método de la ferrocina, según se detalla en el Apéndice V, y de hierro total (Fe_{Total}) mediante absorción atómica. Posteriormente, con la muestra restante se determinaba el potencial redox y el pH.

Para aquellos casos en que se deseaba mantener controlado el pH, de forma previa a la realización del experimento, se llevó a cabo una valoración ácido/base del medio de cultivo empleado. Esto permitió que, a partir de la lectura del pH, se estimase la cantidad de H_2SO_4 0,5 mol/L que se debía añadir para que el pH volviese al valor preestablecido, lo que permitió un control *off-line* de esta variable.

4 Biorreducción de especies solubles de hierro

Acidiphilium cryptum es una de las pocas bacterias reductoras de hierro que es capaz de multiplicarse en ambientes altamente ácidos, donde puede estar el Fe(III) disuelto en ausencia de ligandos. Pese a que ya se han realizado algunas investigaciones que abordan la biorreducción de Fe(III) empleando esta bacteria (Bilgin et al., 2004, Küsel et al., 1999, Küsel et al., 2002), en esta sección se estudia la cinética y estequiometría con que *A. cryptum* JF-5 lleva a cabo este proceso bajo diferentes condiciones de aireación. Finalmente, se desarrolló un experimento para determinar el efecto de concentraciones crecientes de hierro sobre el microorganismo.

4.1 Materiales y métodos

4.1.1 Cinética de crecimiento en presencia y ausencia de Fe(III) bajo distintas condiciones de aireación

Los experimentos se desarrollaron con *Acidiphilium cryptum* JF-5 en los medios de cultivo E y E/Fe(III), secciones 3.1 y 3.2, respectivamente. Se estudiaron tres grados de aireación, utilizándose para ello matraces de cultivo de 250 mL con dos niveles de llenado: 100 y 300 mL (hasta el cuello del matraz), y viales sellados de 100 mL llenos hasta el 60 % de su capacidad. Las condiciones antes señaladas se resumen en la Tabla 4.1.

Se dosificaron los medios E y E/Fe(III) en matraces y viales estériles (sección 3.4), tras lo que se inoculó una población inicial de $1 \cdot 10^8$ células/mL, como se describe en la sección 3.5. A fin de desoxigenar inicialmente los viales, previo a su sellado, se

Tabla 4.1: Condiciones estudiadas en el ensayo cinético.

Medio	Aireación normal (matraces de 250 mL con 100 mL de caldo)	Aireación baja (matraces de 250 mL llenos hasta el cuello)	Aireación nula (viales sellados)
Medio E [sin Fe(III)]	Cultivo aerobio sin limitación de oxígeno	Cultivo aerobio con limitación por oxígeno	-*
Medio E/Fe(III) [con Fe(III)]	Cultivo aerobio sin limitación de oxígeno	Cultivo aerobio con limitación por oxígeno	Cultivo anóxico

* Condición no ensayada.

burbujeó durante 10 min una corriente de CO₂:N₂ (20:80, v/v), esterilizada con un filtro con un tamaño de poro de 0,20 µm. Finalmente, se transfirieron los matraces y viales a un incubador orbital, a 150 rpm y 35 °C, para el desarrollo de los experimentos.

Las muestras de 4 mL, tomadas periódicamente según lo descrito en la sección 3.6, se separaron en dos porciones de 2 mL. Una de estas fracciones se empleó para determinar el potencial redox y el pH, tras lo que se sometió a centrifugación durante 20 s (~ 3200 rpm) a fin de sedimentar cualquier precipitado de hierro que pudiera haberse formado. Mientras una alícuota del sobrenadante obtenido se diluyó 1:10 (v/v) con HCl 1 mol/L para la posterior determinación de Fe(II) y Fe_{Total}, el resto de éste se utilizó para cuantificar la población microbiana mediante densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀) y recuento celular, empleando una cámara de recuento *Neubauer-improved* modelo Petroff (profundidad 0,01 mm, Apéndice IV). La segunda fracción de 2 mL se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min, tras lo que el sobrenadante se congeló para medir la concentración de glucosa por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico, Apéndice VI. Cabe destacar que se elaboró una curva de calibrado que permitiese relacionar la lectura de OD₆₀₀ con el correspondiente valor de peso seco de la biomasa.

4.1.2 Cinética de crecimiento anóxico con baja concentración de glucosa

Esta experiencia fue una modificación de la realizada en condiciones anóxicas en el medio E/Fe(III), descrita en la sección anterior. Por este motivo, todo se desarrolló en idénticas condiciones, con la salvedad de que en este caso se empleó una variante del medio E/Fe(III), cuya concentración de glucosa fue de 100 mg/L en vez de 3,0 g/L, sección 3.2.

La concentración de glucosa en el sobrenadante se midió mediante un kit basado en dos enzimas, la hexoquinasa y la glucosa-6-P deshidrogenasa, después de que el Fe(II) de la muestra hubiera sido precipitado mediante la adición de NaOH 1 mol/L en proporción 1:10 (vol. NaOH: vol. muestra).

4.1.3 Cinética de crecimiento aerobia bajo distintas concentraciones de hierro

En este experimento se utilizó medio E suplementado con distintas concentraciones de Fe(II) en el rango 0,01 - 200 mmol/L, sección 3.2. Los cultivos de *A. cryptum* JF-5

fueron crecidos aeróbicamente y sin limitación de oxígeno empleando matraces Erlenmeyer de 250 mL, sección 3.4, con 100 mL de caldo de cultivo y una población inicial de $5 \cdot 10^7$ células/mL, sección 3.5.

Las muestras tomadas periódicamente, mediante pipetas Pasteur estériles, fueron centrifugadas durante 20 s (~ 3200 rpm) para remover cualquier sólido presente. El sobrenadante de estas muestras se empleó para determinar la evolución de la OD₆₀₀, lo que permitió determinar la velocidad específica de crecimiento bacteriano para las diferentes concentraciones de hierro.

4.2 Resultados y discusión

4.2.1 Cinética de crecimiento en presencia y ausencia de Fe(III) bajo distintas condiciones de aireación

Aunque se ha demostrado que *Acidiphilium cryptum* es capaz de reducir oxígeno y Fe(III) al metabolizar compuestos orgánicos, en ausencia de un aceptor de electrones esta bacteria no es capaz de proliferar (Harrison, 1981, Küsel et al., 2002). Por esta razón no se ensayó su crecimiento en viales sellados empleando el medio E.

Las Figuras 4.1 y 4.2 presentan los resultados obtenidos en los cultivos sin limitación de oxígeno y en condición anóxica, mientras que la Figura 4.3 presenta aquellos conseguidos en condiciones de limitación por oxígeno. En los gráficos de biomasa se ha incorporado un eje auxiliar que representa la relación entre la OD₆₀₀ y el peso seco (Koch, 2007) mostrada en la ecuación 4.1. Dicha expresión se obtuvo tras correlacionar estas dos variables para un cultivo aeróbico de *A. cryptum* crecido en medio E que se hallaba en fase exponencial de crecimiento, donde el peso seco se determinó, por triplicado, tras cuatro lavados del pellet bacteriano con agua destilada. En estos experimentos, el pH no varió significativamente, registrándose un leve descenso desde 2,4 a 2,1 – 2,2. En las paredes de los recipientes de los controles abióticos con medio E/Fe(III), y en algunos cultivos desarrollados en este mismo medio, se observó la aparición de un precipitado amarillo con bajo grado de cristalinidad que contenía Fe(III), Figura 4.4. En los cultivos, dicho precipitado se disolvió naturalmente a medida que transcurrió el tiempo.

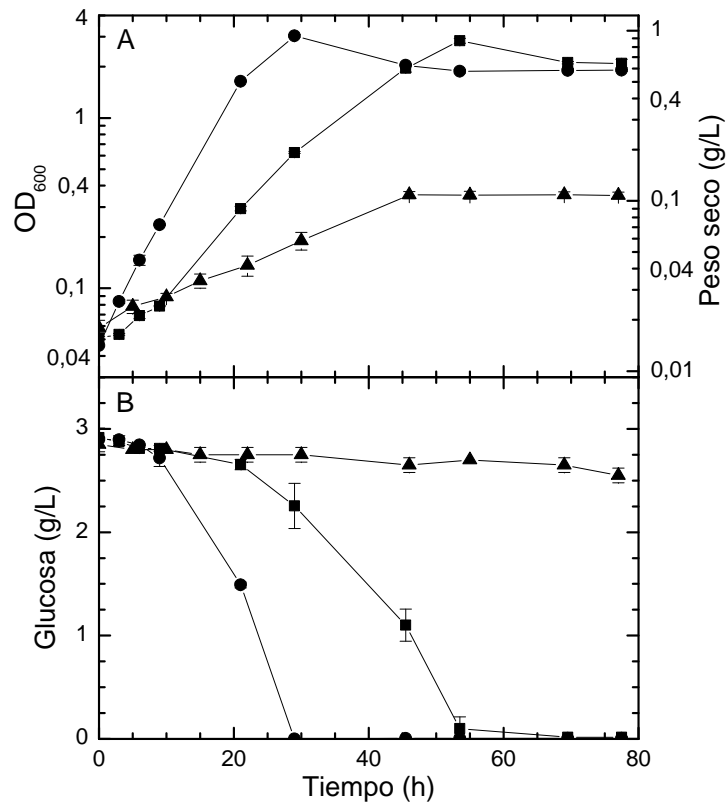


Figura 4.1: Perfiles de biomasa (A) y sustrato (B) en los cultivos de *A. cryptum* desarrollados sin limitación de oxígeno en los medios E (■) y E/Fe(III) (●), y en su cultivo anóxico (▲).

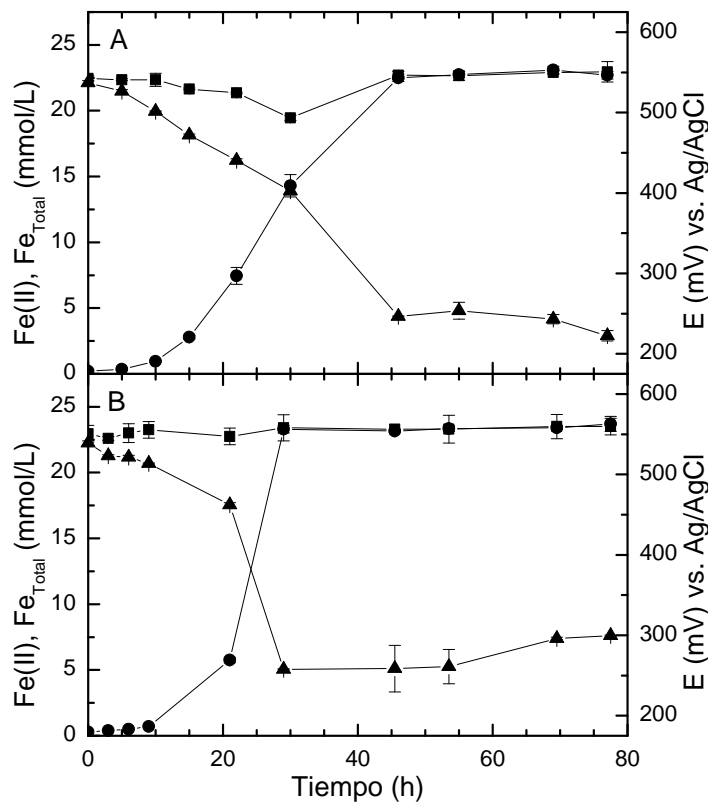


Figura 4.2: Evolución del Fe(II) (●), Fe_{Total} (■) y potencial redox (E, ▲) de los cultivos de *A. cryptum* desarrollados en condiciones anóxicas (A) y en el medio E/Fe(III) sin limitación de oxígeno (B).

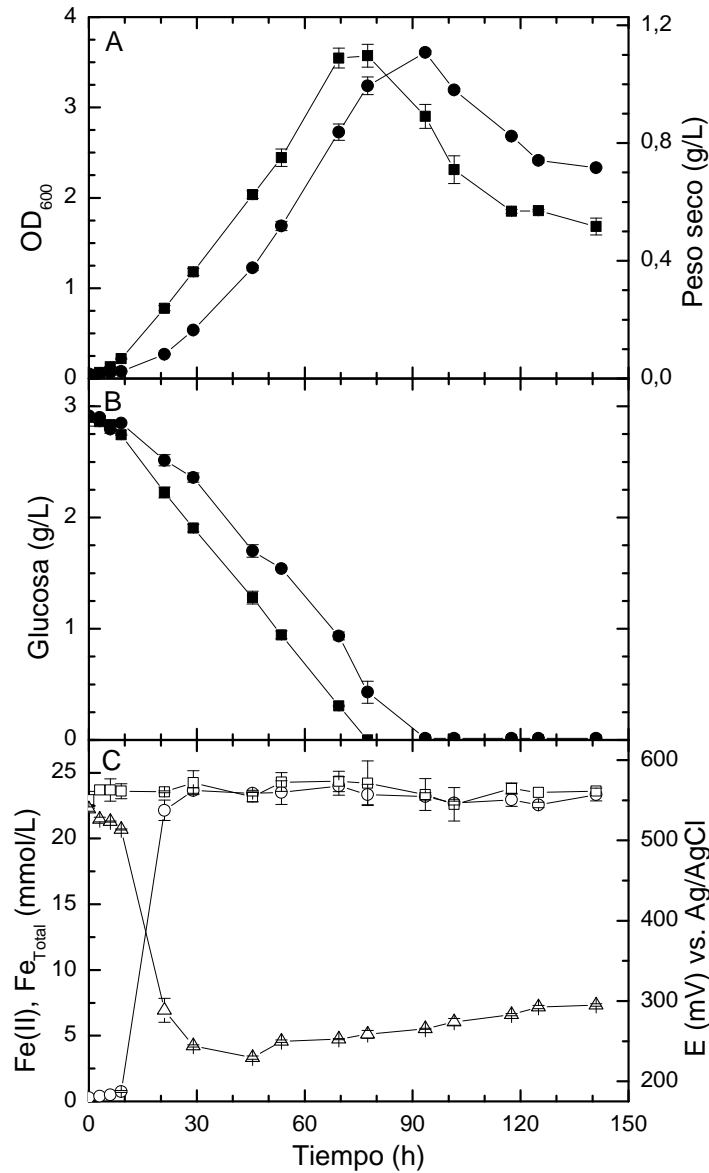


Figura 4.3: Perfiles de biomasa (A) y sustrato (B) de los cultivos de *A. cryptum* desarrollados con limitación de oxígeno en los medios E (●) y E/Fe(III) (■). En C se muestra la evolución del Fe(II) (○), Fe_{Total} (□) y potencial redox (E, Δ) para el experimento realizado en el medio E/Fe(III).

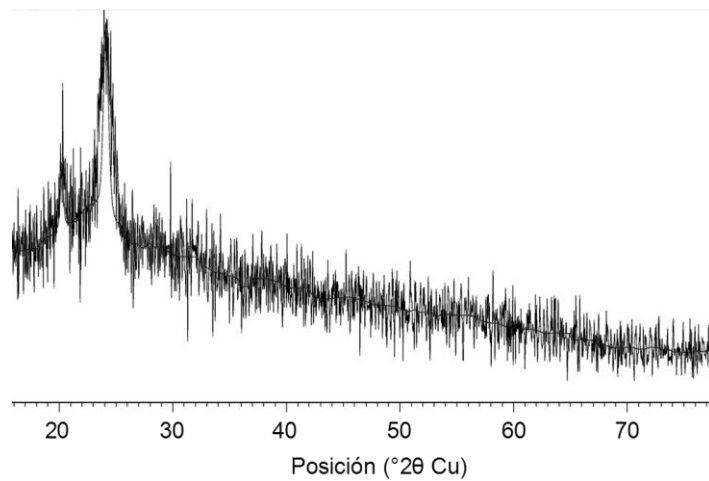


Figura 4.4: Difractograma de rayos X del sólido formado en los cultivos de *A. cryptum* en el medio E/Fe(III).

$$\text{Peso seco (g/L)}=0,307 \cdot \text{OD}_{600} \quad (4.1)$$

La Figura 4.1A muestra que, en los tres casos, *A. cryptum* presentó un inmediato crecimiento exponencial tras la inoculación, sin observarse una fase *lag*. Sin embargo, el cese del crecimiento microbiano en los cultivos aerobios y anóxico estuvo determinado por el agotamiento de la glucosa (Figura 4.1B) y el Fe(III) (Figura 4.2A), respectivamente. La aparición de un precipitado férrico en los controles abióticos sugiere que el medio E/Fe(III) es una disolución metaestable sobresaturada en Fe(III), que puede precipitar sobre la superficie del recipiente y, probablemente, de los microorganismos (Pesic y Kim, 1993). La depresión transitoria en la concentración de Fe_{Total} de la Figura 4.2A, se explicaría satisfactoriamente por la formación del mencionado precipitado, que más tarde se disuelve por la acción microbiana. Pese a que el centrifugado de la muestra fue capaz de sedimentar significativamente este sólido, el error experimental de las mediciones de biomasa en el medio E/Fe(III) podría ser mayor que para el medio E.

A pesar de que tras el cese del crecimiento bacteriano en el medio E/Fe(III) se alcanzaron potenciales redox similares (E, Figura 4.2), la leve tendencia hacia el alza o la baja de esta variable que se observa al final en los cultivos que se desarrollaron en matraces (sin limitación de oxígeno) o viales (condiciones anóxicas), respectivamente, se puede explicar por el continuo suministro de aire de los primeros. Dado que en los matraces el oxígeno atmosférico seguía ingresando cuando el crecimiento microbiano hubo cesado por agotamiento de la glucosa, el Fe(II) presente pudo oxidarse químicamente (Morgan y Lahav, 2007); hecho que no pudo ocurrir en los viales sellados.

En la Figura 4.3A se aprecia que tras alcanzar una OD₆₀₀ mayor que 0,5, la biomasa se incrementó linealmente con el tiempo, registrándose pendientes similares en ambos casos. Este mismo comportamiento también se reflejó en el descenso lineal de la concentración de glucosa con los dos medios (Figura 4.3B); lo cual era predecible, dado que bajo estas condiciones los microorganismos suelen crecer limitados por el aire que ingresa, suministro que depende de parámetros como: el tamaño del matraz, el volumen de líquido y la velocidad de agitación (Maier et al., 2004, Nikakhtari y Hill, 2005).

En el cultivo aeróbico de *A. cryptum* en medio E (Figura 4.1A), se observó que las mediciones de biomasa mediante OD₆₀₀ y recuento microbiano recopiladas durante la zona de crecimiento exponencial estaban relacionadas a través de la ecuación 4.2. Tras el cese del desarrollo, en todos los cultivos realizados en matraces se presentó un descenso en el valor de la OD₆₀₀ conjuntamente con un leve incremento en el recuento microbiano (datos no mostrados); esto no se observó en el cultivo anóxico, donde la detención del crecimiento estuvo causada por el agotamiento del Fe(III) (el aceptor de electrones) y no de la glucosa (el donante de electrones).

$$\ln(\text{células/mL})=0,996 \cdot \ln(\text{OD}_{600})+21,4 \quad r^2=0,9990 \text{ and } n=22 \quad (4.2)$$

Recientemente, se ha comprobado la presencia de polihidroxitirato (PHB) en *Acidiphilium cryptum* JF-5 (Ciobotă et al., 2010), a la vez que se ha extraído y caracterizado el PHB procedente de otra especie de *A. cryptum* (Xu et al., 2010); se ha confirmado así la presunción de que los gránulos sudanofílicos encontrados en esta bacteria correspondían a PHB (Hiraishi e Imhoff, 2005). De este modo, la disminución en la OD₆₀₀ y el peso seco, así como el incremento en el recuento microbiano tras el agotamiento de la glucosa, estarían explicados por la utilización del PHB acumulado durante la fase de crecimiento, sustancia que puede actuar como reserva de carbono y energía (Ranade y Vining, 1993).

Los datos obtenidos en las experiencias anteriores se emplearon para calcular, mediante regresiones lineales, las velocidades específicas de crecimiento (μ) y los rendimientos de sustrato en biomasa ($Y_{X/S}$) y en Fe(II) ($Y_{P/S}$), mostrados en la Tabla 4.2, para el cultivo de *A. cryptum* JF-5 bajo las condiciones ensayadas. Cabe destacar que en esta tabla no se presentan velocidades específicas de crecimiento en condiciones de limitación de oxígeno porque, como se mencionó previamente, en dicho caso la proliferación de esta bacteria no estuvo limitada intrínsecamente, sino que dependió del suministro de aire. Adicionalmente, no se calcularon los rendimientos de sustrato en biomasa y Fe(II) a partir de los datos del cultivo anóxico por la baja precisión que se obtendría dado el despreciable consumo de glucosa (Figura 4.1B). En su lugar, estos parámetros se determinaron en un experimento adicional llevado a cabo bajo las mismas condiciones, aunque empleando un medio con una concentración de glucosa de 380 mg/L, frente a los 3 g/L de los experimentos anteriores. Al respecto se puede señalar que, tras el consumo de una cantidad significativa de glucosa (55 % de la inicialmente presente), el resto de

Biorreducción de especies solubles de hierro

Tabla 4.2: Parámetros cinéticos de crecimiento del cultivo de *Acidiphilium cryptum* JF-5 bajo distintas condiciones.

Medio de cultivo	Parámetro	Aireación normal ($k_L a = 12,7 \text{ h}^{-1*}$)	Aireación baja ($k_L a = 2,0 \text{ h}^{-1*}$)	Aireación nula ($k_L a = 0 \text{ h}^{-1*}$)
Medio E	Velocidad específica de crecimiento (μ , h^{-1})	0,081±0,003	-	-
	Rendimiento de sustrato en biomasa ($Y_{X/S}$, g biomasa/g glucosa)	0,32±0,01	0,40±0,02	-
Medio E/Fe(III)	Velocidad específica de crecimiento (μ , h^{-1})	0,15±0,01	-	0,037±0,002
	Rendimiento de glucosa en biomasa ($Y_{X/S}$, g biomasa/g glucosa)	0,32±0,01	0,40±0,01	0,32±0,03
	Rendimiento de glucosa en Fe(II) ($Y_{P/S}$, mmol Fe(II)/g glucosa)**	7,5±0,9	34±4	105±9
	Eficiencia de reducción de Fe (%)***	5,6	26	79

* $k_L a$ (coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno) estimado usando una ecuación empírica (Nikakhtari y Hill, 2005) y 0 h^{-1} debido a que los viales se encontraban sellados.

** Calculada en el período donde se registró un incremento en el Fe(II) disuelto.

*** Estimada comparando el YP/S con el rendimiento máximo de 24 mol Fe(II)/mol glucosa, según la ecuación: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 24\text{Fe(III)} + 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow 6\text{CO}_2 + 24\text{Fe(II)} + 24\text{H}^+$

variables presentaron perfiles similares a los reportados en las Figuras 4.1 y 4.2A, razón por la que no se han incluido estos resultados.

Los valores de la velocidad específica de crecimiento de la Tabla 4.2 resultan cercanos a los reportados previamente: $0,077 - 0,23 \text{ h}^{-1}$ para *A. cryptum* y otras especies relacionadas, y $0,12 \text{ h}^{-1}$ para *A. cryptum* ATCC 33463 (Dutta, 2008, Harrison, 1981, Hiraishi e Imhoff, 2005). El rendimiento de glucosa en biomasa obtenido en el cultivo anóxico y bajo condiciones normales de aireación (0,32) fue menor al registrado en los cultivos limitados por oxígeno (0,40). Esto implica que cuando la aireación limitó la velocidad de crecimiento se obtuvo una mayor cantidad de biomasa por unidad de sustrato, similar a lo reportado para *Azotobacter beijerinckii*, una bacteria productora de PHB (Senior et al., 1972).

A medida que disminuye la aireación, la Tabla 4.2 muestra un incremento en el rendimiento de glucosa en Fe(II), lo que se traduce en mayores eficiencias de reducción. Esto significa que, mientras decrece el suministro de oxígeno, una mayor fracción de los electrones producidos por el metabolismo de la glucosa son

efectivamente empleados para reducir el Fe(III). De este modo, si se llevase a cabo un experimento de reducción de Fe(III) con un suministro continuo de aire (intencional o involuntario) por un tiempo suficientemente largo, podría tener lugar el agotamiento de la glucosa y la consiguiente detención del proceso de reducción.

4.2.2 Cinética de crecimiento anóxico con baja concentración de glucosa

A fin de contar con información adicional sobre el crecimiento de *A. cryptum* en un medio con Fe(III), se estudió su crecimiento en un medio similar al E/Fe(III) pero con una concentración de glucosa menor (100 mg/L), consiguiéndose los resultados de la Figura 4.5. Aquí se observa que la bacteria creció exponencialmente durante el período que hubo glucosa en el medio, manteniéndose un paralelismo entre las mediciones de OD₆₀₀ y el recuento microbiano.

Al agotarse la glucosa, la OD₆₀₀ (y consecuentemente el peso seco) decayó, mientras que la densidad celular se incrementó ligeramente. Este proceso estuvo acompañado por la reducción de Fe(III) a una velocidad menor. Esto avala la

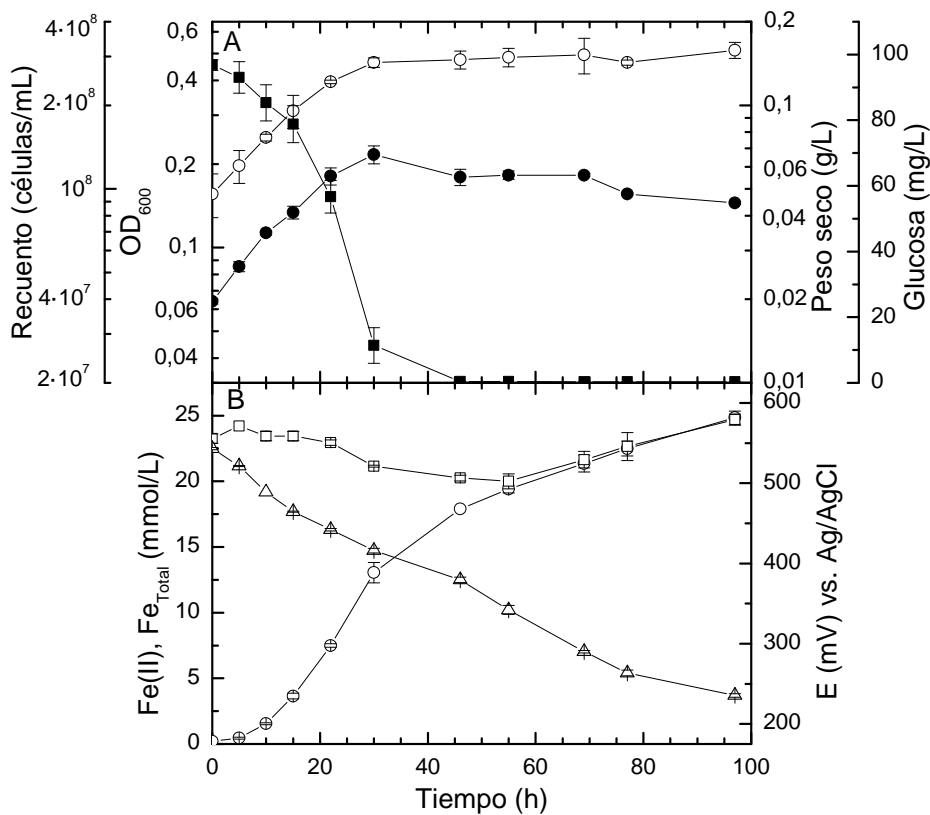


Figura 4.5: (A) Perfiles de sustrato (■) y biomasa, determinada por recuento celular (○) y OD₆₀₀ (●), en el cultivo de *A. cryptum* en un medio similar al E pero con una concentración de glucosa de 100 mg/L. (B) Evolución del Fe(II) (○), Fe_{Total} (□) y potencial redox (E, △) registrada en dicho experimento.

presunción de que, pese al agotamiento de la glucosa, la célula es capaz de utilizar el PHB para mantener su crecimiento si cuenta con un aceptor final de electrones (aire en los matraces de la sección precedente y Fe(III) en este caso). Adicionalmente, la depresión transitoria en la concentración de Fe_{Total} (Figura 4.5B) se explica por la aparición del sólido férrico previamente mencionado.

4.2.3 Cinética de crecimiento aerobia bajo distintas concentraciones de hierro

El hierro es un elemento esencial para el desarrollo de casi todos los organismos conocidos, pero, dependiendo de su concentración, podría resultar beneficioso o dañino para tal desarrollo. Por esta razón, se ensayó el cultivo aerobio de *A. cryptum* en medio E suplementado con concentraciones crecientes de Fe(II), resultando las velocidades específicas de crecimiento reportadas en la Figura 4.6. Esta figura muestra que, cuando la concentración de Fe_{Total} (principalmente en forma de Fe(II)) es menor a ~ 5 mmol/L, la velocidad específica de crecimiento resulta prácticamente independiente de la concentración de ferroso. Sin embargo, desde este valor y hasta los ~ 120 mmol/L, dicha velocidad específica se incrementa a medida que se eleva la concentración de Fe_{Total}. Finalmente, a partir de este último valor se observa una leve disminución de dicho parámetro, momento que podría considerarse el comienzo de la zona donde este metal tenga ya una influencia nociva en el crecimiento bacteriano.

Los efectos del Fe(II) y Fe(III) difícilmente pueden separarse debido a que esta bacteria es capaz de reducir Fe(III) en presencia de oxígeno (Küsel et al., 2002), a la

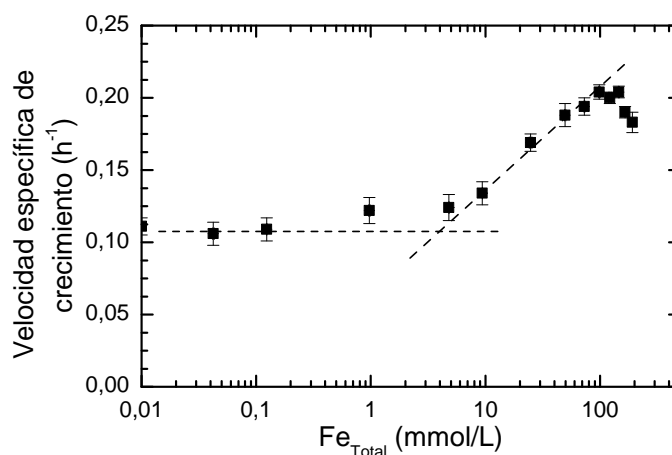


Figura 4.6: Velocidad específica de crecimiento de *Acidiphilium cryptum* JF-5 en medio E suplementado con concentraciones crecientes de Fe(II).

vez que el oxígeno atmosférico puede oxidar químicamente al Fe(II). Hay reportes divergentes sobre la relación entre la velocidad de oxidación del Fe(II) y su concentración; en algunos casos, se apunta a que la primera es proporcional al cuadrado de la concentración de Fe(II) (Kupka y Škvarla, 2001); en otros, se sugiere que es una función lineal de las distintas especies de Fe(II) (Morgan y Lahav, 2007). En cualquier caso, dicha velocidad decrece a medida que disminuye la concentración de Fe(II).

De este modo, si se asume que la oxidación del Fe(II) es despreciable cuando su concentración es suficientemente baja, se observa que en presencia de este ion se registra una velocidad específica de crecimiento cercana a $0,11 \text{ h}^{-1}$ (Figura 4.6), valor ligeramente superior al $0,081 \text{ h}^{-1}$ reportado para el medio E en la Tabla 4.2. En este sentido, Hiraishi e Imhoff (2005) ya habían informado del efecto estimulador de este ion sobre el crecimiento heterotrófico de *Acidiphilium* spp.; sin embargo, aún se desconoce su causa.

Esta observación podría tener relación con el hecho de que, en un medio con hierro (independiente de su cantidad), más del 80 % de las células de *Acidiphilium cryptum* JF-5 poseen una especie de ampollas en su superficie (Küsel et al., 1999). Considerando que la velocidad específica de crecimiento máxima (expresada durante el crecimiento exponencial) aparece como consecuencia de un factor limitante en el metabolismo microbiano, asumible como la velocidad de generación de energía (Andersen y von Meyenburg, 1980, Heijnen, 1999), la aparición de estas protrusiones incrementaría la velocidad de producción de ésta debido a la mayor área expuesta para la reducción de oxígeno. Sin embargo, también existe la posibilidad de que estas ampollas estén relacionadas con algunos componentes de la cadena transportadora de electrones, de forma similar a como la enzima formiato deshidrogenasa actúa en la bacteria reductora de sulfato *Desulfovibrio gigas* (Haynes et al., 1995).

Finalmente, comparando nuevamente el valor de $0,11 \text{ h}^{-1}$ (Figura 4.6) con aquellos reportados en la Tabla 4.2, se aprecia que la velocidad específica de crecimiento presentada por *A. cryptum* cuando respira Fe(III) y oxígeno ($0,15 \text{ h}^{-1}$) resulta aproximadamente igual a la suma de las velocidades encontradas respirando sólo Fe(III) ($0,037 \text{ h}^{-1}$) y oxígeno en presencia de hierro ($0,11 \text{ h}^{-1}$). En analogía con estos resultados, Blanch y Clark (1996) ya propusieron que, para un microorganismo

Biorreducción de especies solubles de hierro

capaz de degradar simultáneamente dos sustratos, su velocidad específica de crecimiento sería igual a la suma de las correspondientes a cada uno de ellos.

5 Presencia microbiana y pH

La capacidad de *Acidiphilium cryptum* JF-5 para mediar la disolución reductora de los óxidos de hierro se ensayó, en esta sección, sobre un óxido mixto de Fe(II)-Fe(III), la magnetita; estudiando también la utilización un método de control del pH.

5.1 Materiales y métodos

En los experimentos se emplearon los medios de cultivo E (sección 3.1) y E/Ox, ambos a pH 2,4. Este último correspondió al medio E suplementado en un 1% (v/v) con una disolución de ácido oxálico 200 mmol/L, resultando un medio con una concentración final de oxalato de 2 mmol/L, que se esterilizó por filtración (sección 3.2).

El mineral de magnetita utilizado, con tamaño de partícula menor a 0,090 mm (sección 3.3), se desinfectó empleando etanol, sección 3.4. El estudio se realizó en viales con una densidad de pulpa de un 1 % (p/v). Una muestra de la magnetita inicial fue analizada por XRF y XRD, mientras que los residuos obtenidos de los distintos ensayos fueron analizados mediante SEM y XRD, sección 3.3.

Las experiencias se llevaron a cabo en dos etapas. En la primera de ellas, donde se empleó el medio E, se analizó el efecto que ejerce en el proceso el control del pH, cuantificando también la disolución obtenida en condiciones abióticas. Dicho control de pH se llevó a cabo de forma periódica, según se detalla en la sección 3.6. En la segunda etapa, manteniendo controlado el pH, se estudió la capacidad de esta bacteria para promover la disolución de magnetita en el medio E/Ox. En todos los casos se empleó una población bacteriana inicial de $1 \cdot 10^8$ células/mL (sección 3.5), mientras que el muestreo se realizó periódicamente tal como se describe en la sección 3.6.

5.2 Resultados y discusión

En la Figura 5.1, que exhibe los perfiles de hierro total (Fe_{Total}), Fe(II), pE+pH y pH registrados en el experimento en medio E, se aprecia que en el control abiótico la

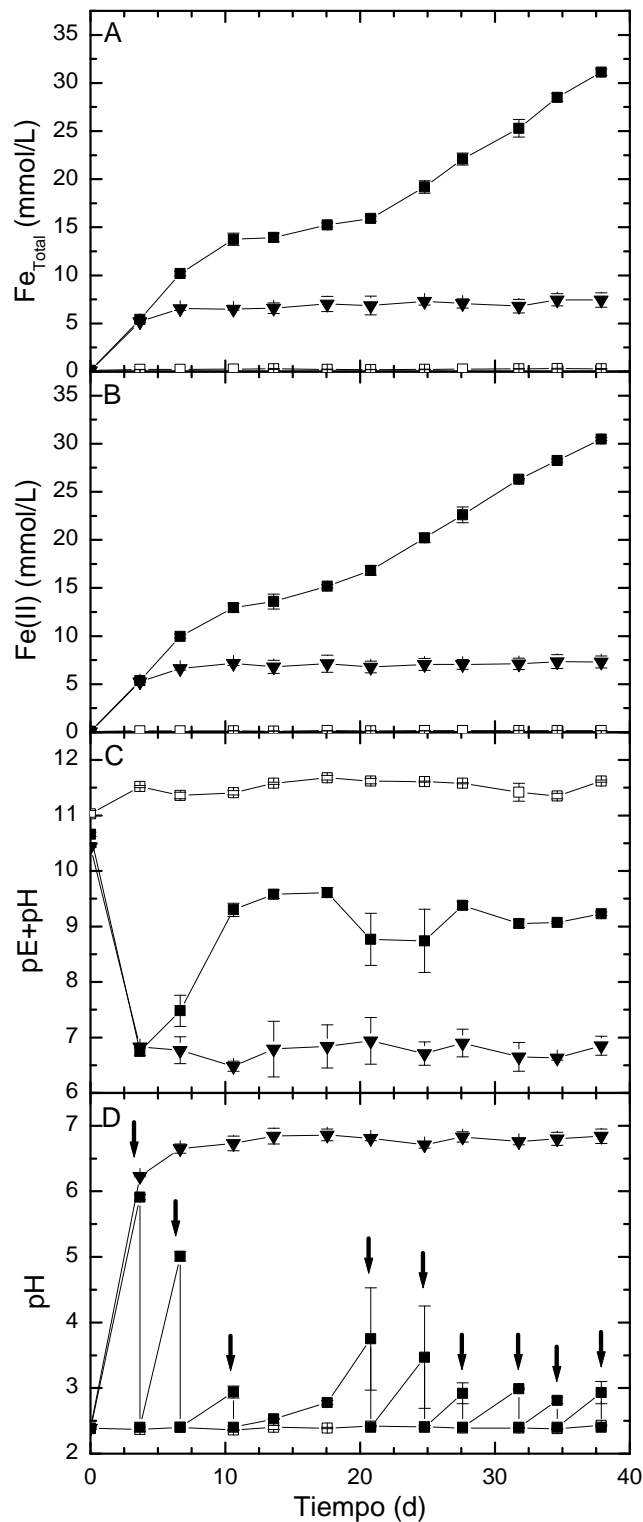


Figura 5.1: Perfiles de Fe_{Total} , $Fe(II)$, $pE+pH$ y pH obtenidos en los experimentos realizados con magnetita en medio E. Control abiótico (\square) y viales inoculados con (\blacksquare) y sin (\blacktriangledown) control de pH . Las flechas señalan las sucesivas adiciones de H_2SO_4 .

disolución de la magnetita fue prácticamente nula, mientras que en los viales inoculados sí tuvo lugar su disolución. Considerando que la meteorización de óxidos metálicos involucra consumo de protones, ecuación 5.1 (Mulder y Cresser, 1994), la Figura 5.1D muestra que, al no controlarse el pH, ésta variable se incrementó hasta alcanzar valores cercanos a la neutralidad, deteniéndose la disolución del mineral.



Para el control del pH es común la inclusión en el medio de sustancias amortiguadoras, muchas de ellas capaces de interactuar con las superficies minerales y de formar complejos de coordinación con cationes di o trivalentes, causando, incluso, su precipitación (AppliChem, 2008, Cornell y Schwertmann, 2003a, Davis y Kent, 1990, Djurdjevic, 1990, Hamm et al., 1954). Aunque el control del pH también puede implementarse mediante sistemas continuos, que miden constantemente esta variable y añaden ácido o base cuando la lectura se distancia del valor inicialmente prefijado, para éstos se precisa una determinada cantidad de electrodos y controladores de pH que permitan la realización de todos los ensayos que se deseen llevar a cabo en paralelo.

Una solución de compromiso, que utiliza poco equipamiento y prescinde de amortiguadores, consiste en el control *off-line* del pH, donde esta variable se monitoriza y corrige manualmente cada cierto intervalo de tiempo. Dado que los experimentos diseñados tenían la complejidad adicional de que para mantener las condiciones anóxicas y la asepsia no era aconsejable la introducción periódica de un electrodo al interior de los viales, se optó por realizar previamente una curva de valoración ácido-base del medio de cultivo, que fue utilizada para estimar la cantidad de ácido a añadir según la lectura de pH al momento del muestreo. De este modo, las elevadas concentraciones de Fe_{Total} conseguidas al implementar este control (Figura 5.1A) evidencian un grado significativo de disolución. Al respecto, la importancia del pH inicial ya había sido reportada previamente por Bridge y Johnson (2000), mientras que en el trabajo de Hallberg et al. (2011) se empleó un biorreactor que contaba con un sistema de control de pH.

Cornell y Schwertmann (2003c) han señalado la conveniencia de utilizar los valores de $pE+pH$ para la caracterización de este tipo de sistemas redox, donde el valor de pE , definido como el logaritmo negativo en base diez de la actividad de los

electrones, se determina a partir del potencial redox (E, respecto del electrodo estándar de hidrógeno, EEH) según la ecuación 5.2, siendo T, R y F la temperatura absoluta y las constantes de los gases y Faraday, respectivamente. Cabe señalar que el valor de rH, definido como el logaritmo negativo en base diez de la presión parcial de hidrógeno y señalado como el “indicador absoluto del potencial redox” (Poljšak, 2008), también ha sido ampliamente utilizado para describir el estado redox (Tan, 1998). Sin embargo, en la expresión 5.3 se observa claramente su relación con pE+pH (Tan, 1998). Considerando que el valor de pE+pH puede ser fácilmente leído en los diagramas de Pourbaix disponibles, como el presentado por Keene et al. (2010) o el mostrado en la Figura 5.2, en adelante se empleará este término para describir el ambiente reductor generado por el crecimiento de la bacteria *Acidiphilium cryptum* (Figura 5.1C).

$$pE = \frac{F}{\ln(10) \cdot R \cdot T} \cdot E \tag{5.2}$$

$$pE + pH = \frac{1}{2} \cdot rH \tag{5.3}$$

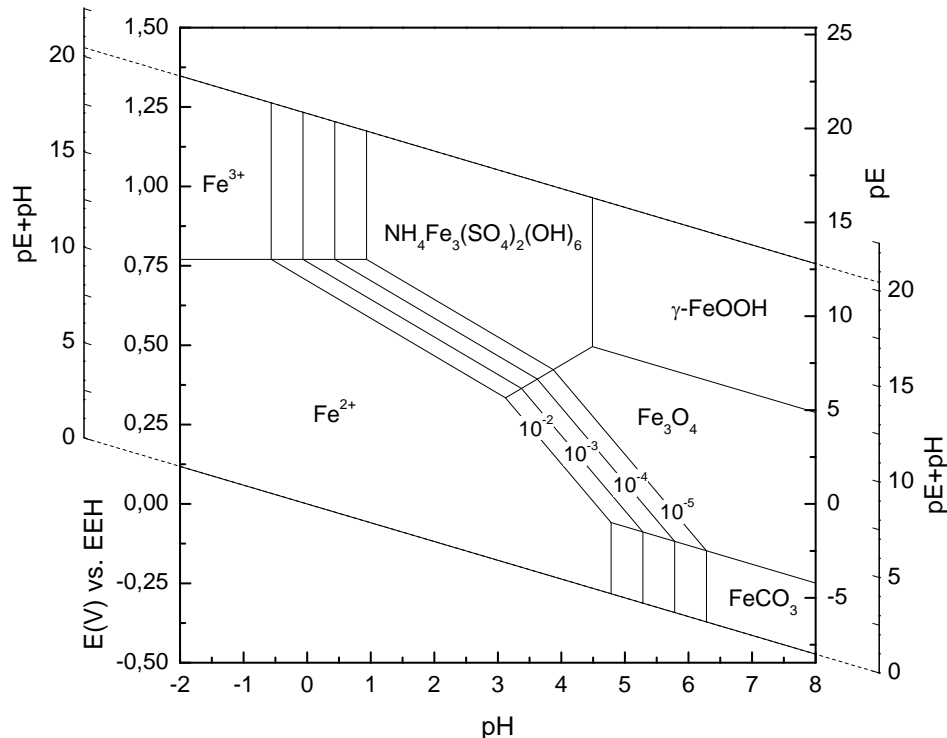


Figura 5.2: Diagrama de Pourbaix del sistema Fe-NH₄⁺-S-O₂-CO₂-H₂O. $a_{Fe} = 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}$ y 10^{-5} ; $P_{CO_2} = 1$ bar, $a_{NH_4^+} = a_{SO_4^{2-}} = 10^{-2}$. La energía libre de Gibbs estándar de formación de la amoniojarosita fue obtenida de Gaboreau y Vieillard (2004), mientras que todos los datos termodinámicos restantes fueron obtenidos de Langmuir (1997a).

La Figura 5.1A muestra una ralentización en la disolución de magnetita, entre los días 10 y 20, en los viales inoculados con control de pH. Dicho fenómeno, que puede ser atribuido directamente al importante incremento de pE+pH, tendría su causa primera en el pico de pH experimentado el día 3, lo cual se explicaría con el hecho de que *A. cryptum* sólo es capaz de crecer entre pH 2,1 y 5,8 (Küsel et al., 1999). Dado que el pH registrado el día 3 fue cercano a 6, esto podría haber afectado negativamente al cultivo microbiano, que no fue capaz de mantener un bajo valor de pE+pH que permitiese la continua disolución del mineral.

Considerando que en varias ocasiones se han utilizado ligandos para incrementar la disolución de ciertos minerales, como el oxalato para la movilización de hierro desde hematites por *Pseudomonas mendocina* (Dehner et al., 2010), EDTA y DPTA (ácido dietilen triamino pentaacético) en la disolución de goethita por *Acidiphilium* SJH (Bridge y Johnson, 2000) y EDTA en la disolución de goethita y hematites por *Shewanella putrefaciens* (Arnold et al., 1988); en este caso se ensayó la disolución de magnetita en un medio que contenía 2 mmol/L de oxalato (medio E/Ox), Figura 5.3.

Si se comparan los resultados obtenidos con este nuevo medio de cultivo y los llevados a cabo en el medio E (Figura 5.1), se observan dos diferencias reseñables. En primer lugar, en el control abiótico con medio E/Ox se registró una leve disolución del mineral de magnetita, atribuida a la disolución química por el oxalato presente. El hecho de que en estas condiciones el hierro disuelto se encontrara completamente en forma de Fe(II), podría explicarse por la disolución preferente del Fe(II) presente en la magnetita o por el comportamiento reductor que presenta el oxalato (Eisele y Gabby, 2014). En segundo lugar, la ralentización en la disolución de la magnetita observada en el medio E (Figura 5.1) no ocurrió utilizando este nuevo medio de cultivo, donde el pH resultó inferior a 5,8 en todo momento. Dado que se registraron velocidades de disolución similares en ambos medios (E y E/Ox, obviando la zona de ralentización antes mencionada), puede inferirse que la incorporación de oxalato sólo tuvo un efecto tamponante que amortiguó las variaciones de pH.

La Figura 5.4 muestra los perfiles de hierro extraído tras realizar las correspondientes correcciones de los cambios de volumen debidos al muestreo y a las sucesivas adiciones de H₂SO₄. El hecho de que los viales inoculados en los que se controló el pH presentaran el mayor grado de disolución, mientras que en los

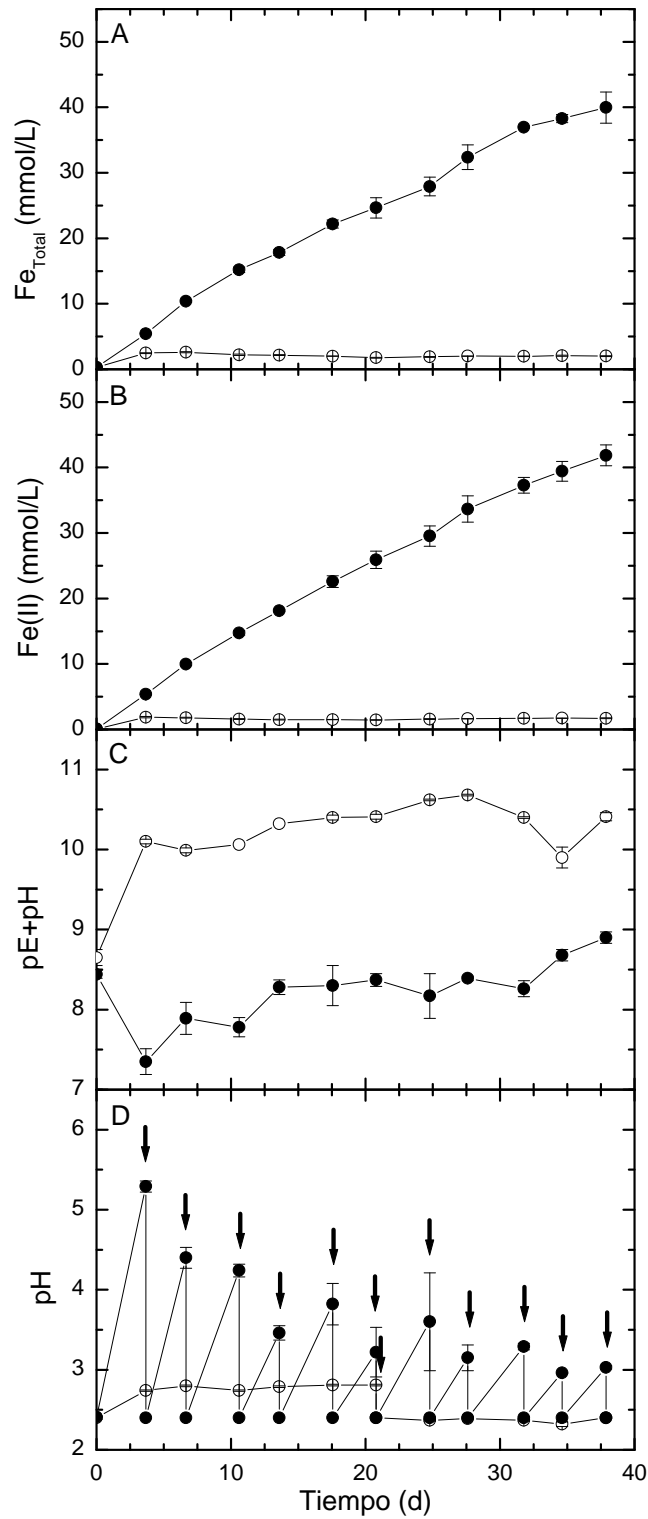


Figura 5.3: Perfiles de Fe_{Total} , $Fe(II)$, $pE+pH$ y pH obtenidos en los experimentos realizados con magnetita en medio E/Ox. Control abiótico (○) y viales inoculados (●). Las flechas señalan las sucesivas adiciones de H_2SO_4 .

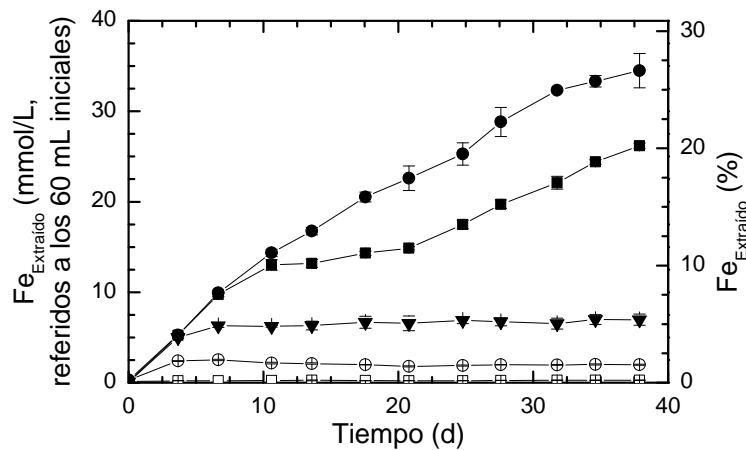


Figura 5.4: Gráfica comparativa del hierro extraído desde el mineral de magnetita bajo las distintas condiciones ensayadas corregidos según los cambios de volumen. Control abiótico (□) y viales inoculados con (■) y sin (▼) control de pH en medio E; control abiótico (○) y viales inoculados (●) en medio E/Ox.

controles abióticos la magnetita se disolviese sólo marginalmente, pone de manifiesto la importancia del control del pH y la presencia de *Acidiphilium cryptum* para que ocurra la reacción. Es destacable que las concentraciones de hierro alcanzadas en este caso se asemejen a las mayores alcanzadas por Eisele (2005) (1800 mg/L en 430 d), aunque los experimentos no sean del todo comparables por las diferencias en el montaje experimental, mineral empleado (granulometría, ley, e impurezas) y población microbiana.

Las micrografías electrónicas de barrido de los residuos (Figura 5.5) mostraron, por lo general, superficies limpias, exceptuando aquellos viales inoculados en los que no se controló el pH donde se observó un precipitado superficial fino. Esto se ratificó con el análisis de difracción de rayos X para este residuo, Figura 5.6, que reveló la aparición de una nueva fase cristalina, identificada como siderita. En este sentido, se ha comprobado que en condiciones cercanas a la neutralidad, el cultivo de bacterias reductoras de hierro causa una mineralización secundaria que puede originar: magnetita (Roh et al., 2003), vivianita (Crespo et al., 2007) y siderita (Dong et al., 2000). Además, la aparición de esta última fase cristalina está termodinámicamente favorecida a estos valores de pH (Roh et al., 2003), como puede comprobarse en la Figura 5.2.

Considerando que en aquellos viales donde se controló el pH: (1) se utilizó glucosa como fuente de carbono, (2) no se evidenció la aparición de nuevas fases cristalinas y (3) la concentración de hierro disuelto superó ampliamente la de oxalato (para el

medio E/Ox), se propuso la reacción 5.4 para describir la disolución de la magnetita. Esta reacción puede justificarse con la Figura 5.7 donde se muestra que las cantidades de hierro extraído y de H_2SO_4 consumido se ajustaron claramente a la línea diagonal trazada, que representa la relación 1:1 entre el hierro extraído y H_2SO_4 consumido tal como lo refleja la expresión 5.4. La ligera desviación hacia el alza que presentaron los experimentales en la Figura 5.7 fue atribuible al método empleado para el ajuste del pH.

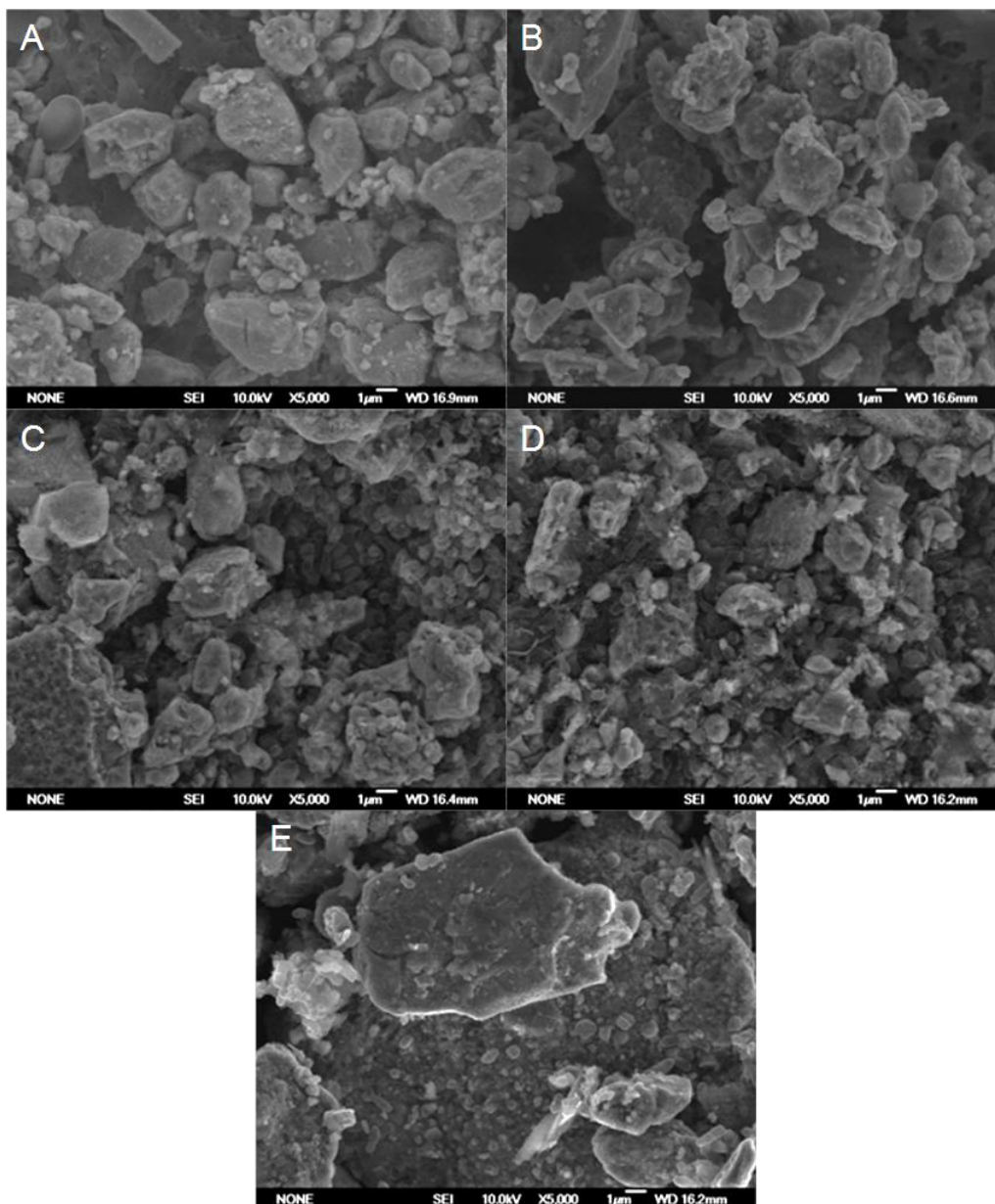
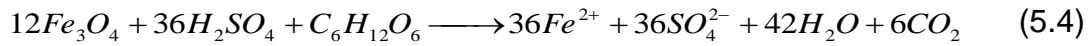


Figura 5.5: Micrografías electrónicas de barrido de los residuos de magnetita. Control abiótico (A) y viales inoculados con (C) y sin (E) control de pH en medio E; control abiótico (B) y viales inoculados (D) en medio E/Ox.

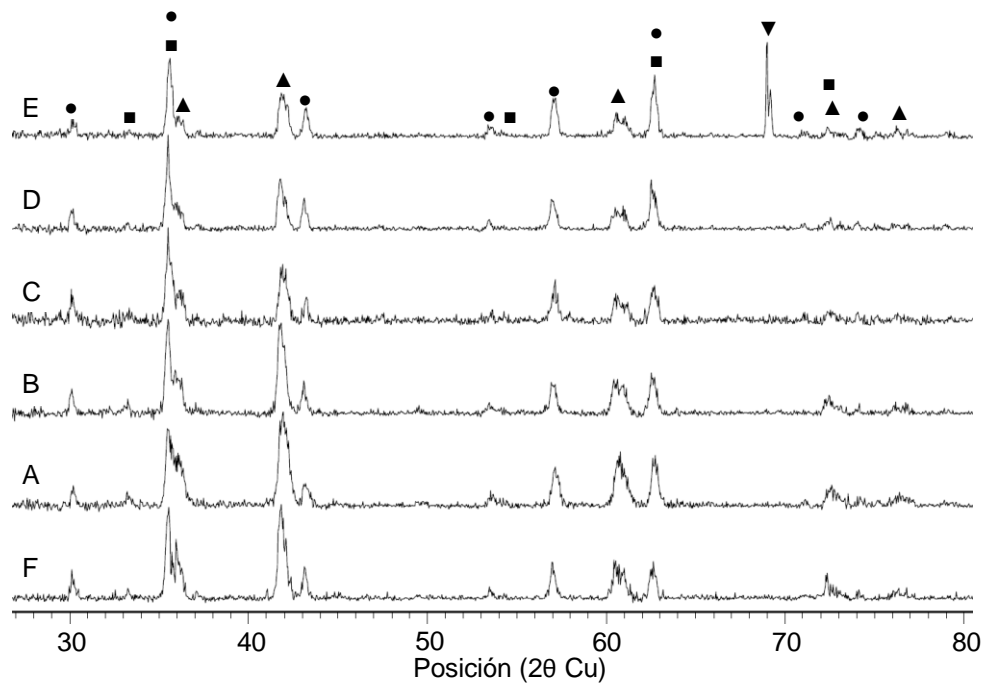


Figura 5.6: Difractograma de rayos X de los residuos de magnetita y del material de partida. Material de partida (F); control abiótico (A) y viales inoculados con (C) y sin (E) control de pH en medio E; control abiótico (B) y viales inoculados (D) en medio E/Ox. Los picos muestran la presencia de magnetita (●), hematites (■), wustita (▲) y siderita (▼).

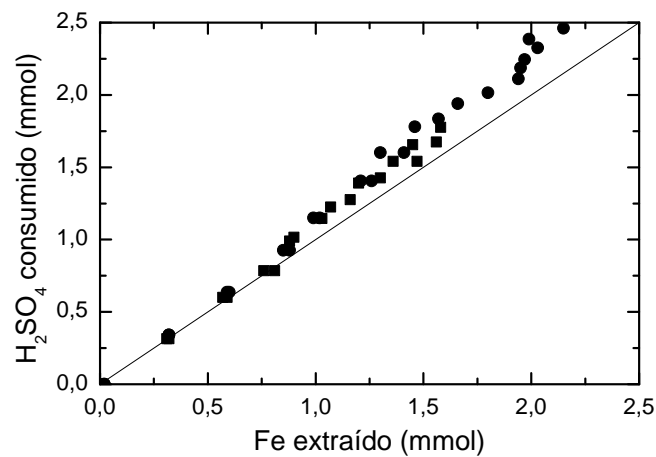


Figura 5.7: Relación entre hierro extraído y H_2SO_4 consumido en la disolución reductora de magnetita. Experimentos realizados en medios E (■) y E/Ox (●).

6 Disolución asistida por ligandos

Dado que algunos ligandos pueden promover la movilización del hierro desde sus óxidos (Bridge y Johnson, 2000, Dehner et al., 2010), en esta sección se estudió la disolución reductora de tres sólidos férricos: jarosita, goethita y hematites, en medios con oxalato y *Acidiphilium cryptum*. A partir de los resultados obtenidos se seleccionó la jarosita para continuar el análisis del proceso con otros ligandos, a fin de averiguar cuáles de ellos presentaban un mejor comportamiento y determinar el mecanismo que lo justificaba.

6.1 Materiales y métodos

6.1.1 Disolución reductora de jarosita, goethita y hematites en medios con y sin oxalato

El experimento se llevó a cabo por duplicado empleando los medios E (sección 3.1) y E/Ox (sección 5.1). La preparación y pretratamiento de los sólidos utilizados (jarosita, goethita y hematites) se detalla en la sección 3.3, mientras que su desinfección se describe en la sección 3.4.

La disolución reductora de los sólidos fue probada usando ambos medios de cultivo, a una densidad de pulpa del 1 % (p/v) y tanto en condiciones abióticas como en presencia de *A. cryptum* JF-5. Mientras la sección 3.5 puntualiza el protocolo de inoculación, la sección 3.6 especifica la metodología de muestreo y de control del pH en el rango 2,2-2,8.

6.1.2 Estudio de las variables: bacteria, ligando y Fe(II)

La disolución de jarosita biogénicamente producida (sección 3.3), se estudió por duplicado, con una densidad de pulpa del 1 % (p/v), mediante un experimento factorial completo 2^k , es decir, con dos niveles (ausencia y presencia) para las variables bacteria, ligando y hierro disuelto (como Fe(II), $k=3$); cubriendo así todas las combinaciones posibles.

El estudio se llevó a cabo empleando un amplio grupo de ligandos: EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), NTA (ácido nitrilotriacético), oxalato (ácido oxálico), citrato (ácido cítrico), glicina, piruvato (piruvato de sodio), ftalato (hidrogenoftalato de

potasio) y salicilato (ácido salicílico). Los niveles para la variable bacteria (*A. cryptum* JF-5) fueron una población inicial de $1 \cdot 10^8$ células/mL y controles abióticos, mientras que las dos variables restantes se ensayaron suplementando los medios, según el caso, con los correspondientes componentes hasta una concentración de 2 mmol/L; excepto para el salicilato que se probó a 0,2 mmol/L, por su conocida capacidad antimicrobiana (Lück y Jager, 1997).

La preparación de los medios de cultivo se llevó a cabo el día previo a la realización del experimento empleando como base el medio E (sección 3.1), suplementado en un 1 % (v/v) (0,1 % para el salicilato) con disoluciones de concentración 200 mmol/L de los distintos ligandos y Fe(II) ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Tras su preparación, se ajustó su pH a 3,0 y se procedió a su esterilización por filtración (sección 3.2). Hasta el momento de la inoculación, los medios se mantuvieron en matraces estériles cubiertos con un tapón de algodón a fin de permitir su saturación con el oxígeno atmosférico.

La jarosita y los viales empleados habían sido previamente desinfectados y esterilizados, respectivamente, según se detalla en la sección 3.4. Finalmente, la inoculación y muestreo se llevaron a cabo de acuerdo a las secciones 3.5 y 3.6, respectivamente, manteniendo el pH controlado en el rango 2,8-3,2.

6.1.3 Capacidad de los ligandos para promover la autooxidación del Fe(II)

El día previo al experimento, se preparó medio E (sección 3.1) suplementado con Fe(II) ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) hasta una concentración de 2 mmol/L. Tras ajustar el pH a 3,0, el medio se esterilizó por filtración (sección 3.2). Porciones de 100 mL de dicho medio fueron depositadas en matraces Erlenmeyer estériles (sección 3.4) de 250 mL tapados con algodón para permitir su saturación con oxígeno atmosférico. Al día siguiente, se comprobaba que la concentración de Fe(II) era idéntica a la medida en el momento de la preparación.

Pese a que en este caso los experimentos se realizaron en condiciones abióticas, el muestreo se realizó en una cabina de flujo laminar previamente esterilizada mediante luz UV a fin de evitar la posibilidad de contaminación con cepas oxidantes de hierro. Adicionalmente, todo el material empleado fue esterilizado según se detalla en la sección 3.4.

El experimento, llevado a cabo por duplicado, comenzó cuando en los correspondientes matraces se introdujeron 2 mL de una disolución 200 mmol/L de cada uno de los ligandos seleccionados. Los ensayos se llevaron a cabo en un incubador orbital, a 150 rpm y temperatura ambiente, midiendo periódicamente, sin diluir la muestra, la concentración de Fe(II) por el método de la ferrocina (Apéndice V).

6.1.4 Capacidad de *A. cryptum* para reducir algunos quelatos de Fe(III)

Se ensayó la capacidad de *A. cryptum* para reducir los quelatos de Fe(III) formados por cuatro de entre todos los ligandos anteriormente mencionados: EDTA, NTA, oxalato y citrato. Para esto, se utilizaron cuatro medios de cultivo que fueron preparados del siguiente modo. Las disoluciones de partida fueron: una de cada ligando (150 mmol/L), junto a dos disoluciones, A y B, que consistían en medio de cultivo E a pH 2,4 suplementado con $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ o $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{XH}_2\text{O}$ (20% Fe, p/p), hasta que el contenido de Fe(II) y hierro total fuese de 1,5 mmol/L, respectivamente. A continuación, se mezclaron 100 partes en volumen de la disolución B con 1 parte de la disolución del ligando, y 50 partes de la disolución A, Figura 6.1. Los medios fueron esterilizados por filtración (sección 3.2), con posterioridad a que su pH fuese ajustado a 3,0 con NaOH. Finalmente, se mantuvieron en matraces tapados con algodón durante la noche para su saturación con el oxígeno atmosférico.

Los experimentos comenzaron cuando se depositó una población inicial de $1 \cdot 10^8$ células/mL en los matraces que contenían los medios. Posteriormente, se distribuyeron porciones de 5 mL de los caldos resultantes en viales de 10 mL estériles (sección 3.4). Los viales se cerraron con tapones de goma de butilo, se sellaron con tapas metálicas de engarzado (*crimp cap*, sección 3.5) y se depositaron en un incubador orbital a 25 rpm y 35 °C. Para el muestreo se iban sacando del incubador en grupos de tres viales (medición por triplicado); inmediatamente después de su apertura, se procedía a medir, sin diluir, la concentración de Fe(II) por el método de la ferrocina (Apéndice V).

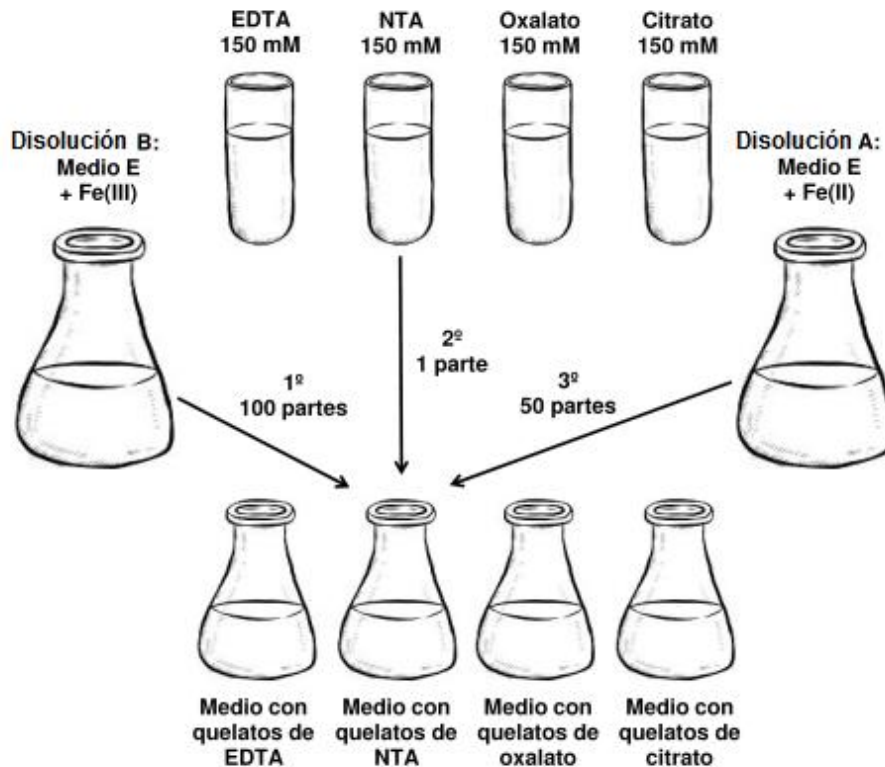


Figura 6.1: Esquema de la preparación de los medios que incluían quelatos de Fe(III).

6.2 Resultados y discusión

6.2.1 Disolución reductora de jarosita, goethita y hematites en medios con y sin oxalato

Los perfiles de hierro total (Fe_{Total}), $Fe(II)$, $pE+pH$ y pH para la disolución reductora de jarosita, goethita y hematites se exponen en las Figuras 6.2 a 6.4, respectivamente. Las curvas de Fe_{Total} muestran que la presencia de *A. cryptum* JF-5, en ambos medios de cultivo, incrementó la disolución de los sólidos, tal como se había observado en la sección anterior.

Respecto del oxalato, su incorporación al medio de cultivo causó una ligera disolución química de los sólidos en los controles abióticos, estabilizándose la concentración de hierro total por debajo de 2 mmol/L (valor de la concentración del oxalato en este medio). Sin embargo, en presencia de *A. cryptum*, la incorporación de oxalato (medio E/Ox) incrementó significativamente la velocidad de disolución, aunque no se lograron concentraciones de hierro tan elevadas como en la sección precedente.

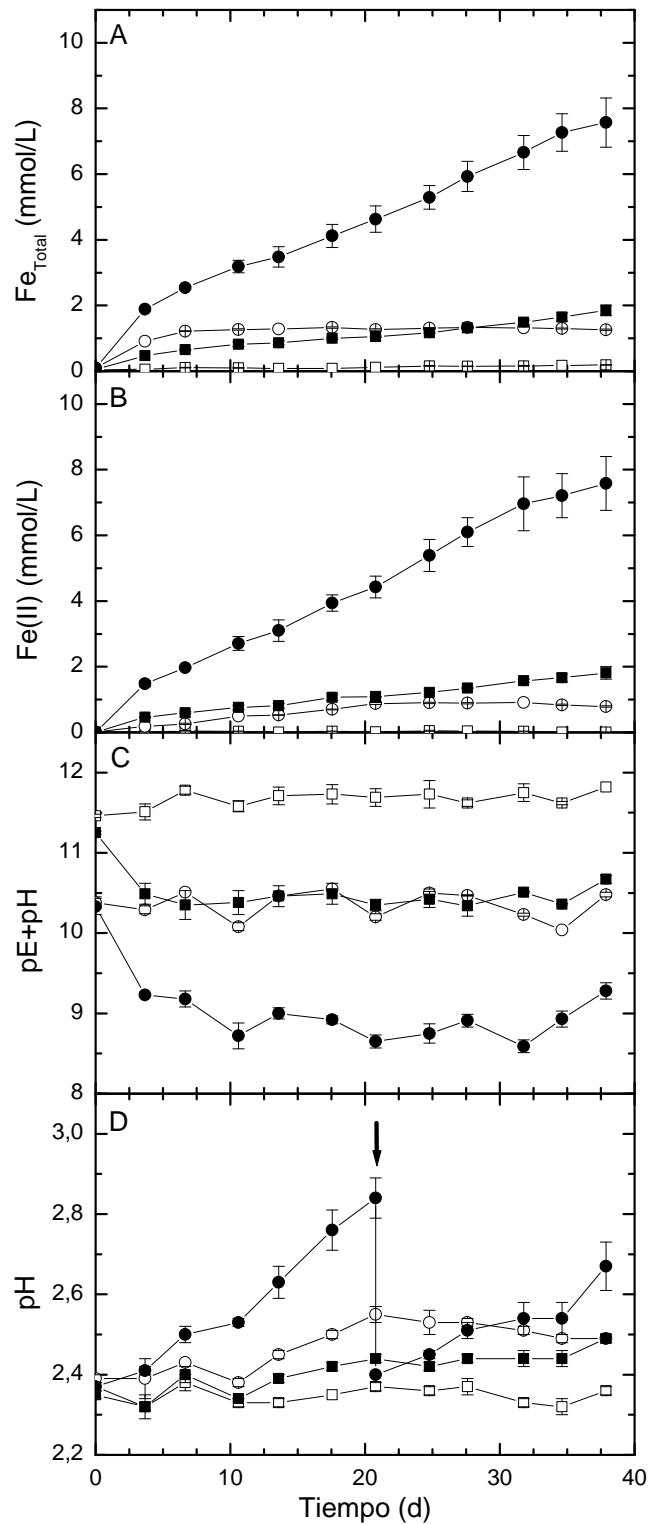


Figura 6.2: Perfiles de Fe_{Total} , $Fe(II)$, $pE+pH$ y pH obtenidos en los experimentos realizados con jarosita en los medios E (\blacksquare, \square) y E/Ox (\bullet, \circ). Los símbolos huecos y macizos representan controles abióticos y viales inoculados, respectivamente. La flecha señala la adición de H_2SO_4 .

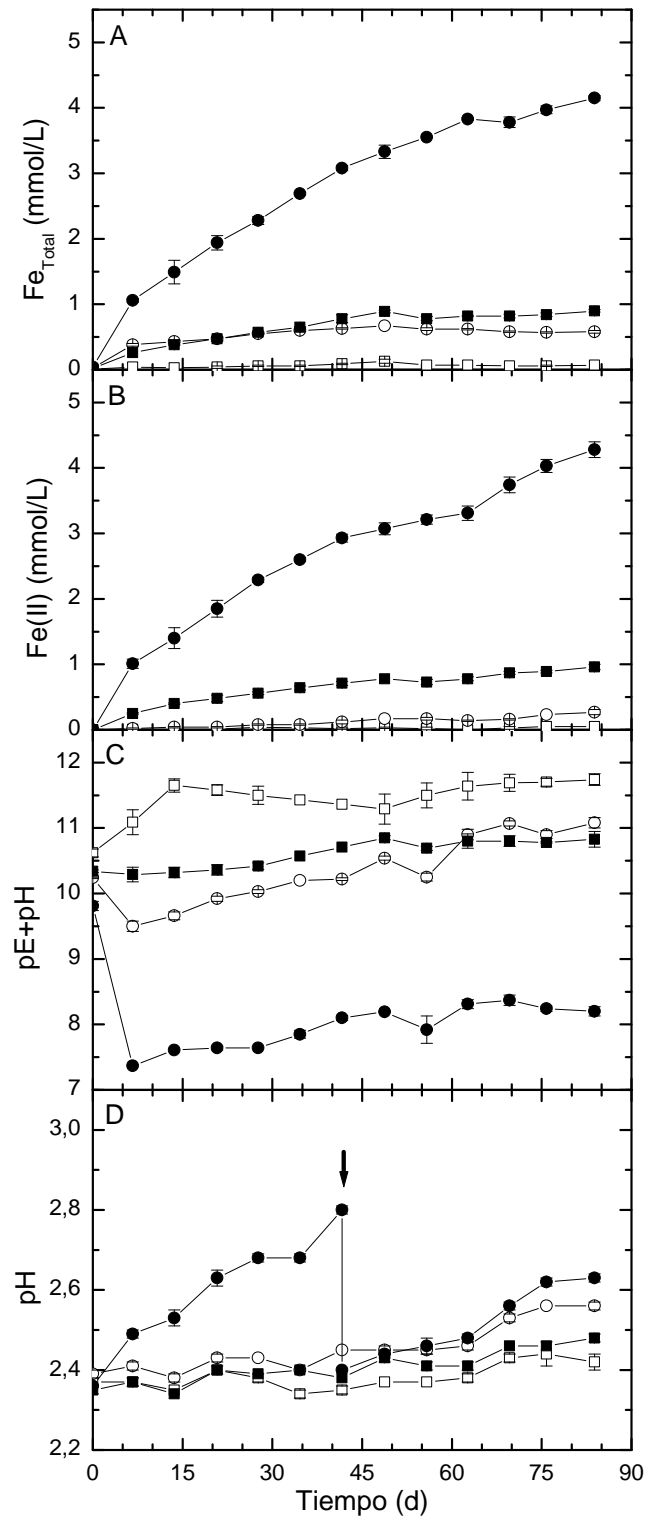


Figura 6.3: Perfiles de Fe_{Total}, Fe(II), pE+pH y pH obtenidos en los experimentos realizados con goethita en los medios E (■, □) y E/Ox (●, ○). Los símbolos huecos y macizos representan controles abióticos y viales inoculados, respectivamente. La flecha señala la adición de H₂SO₄.

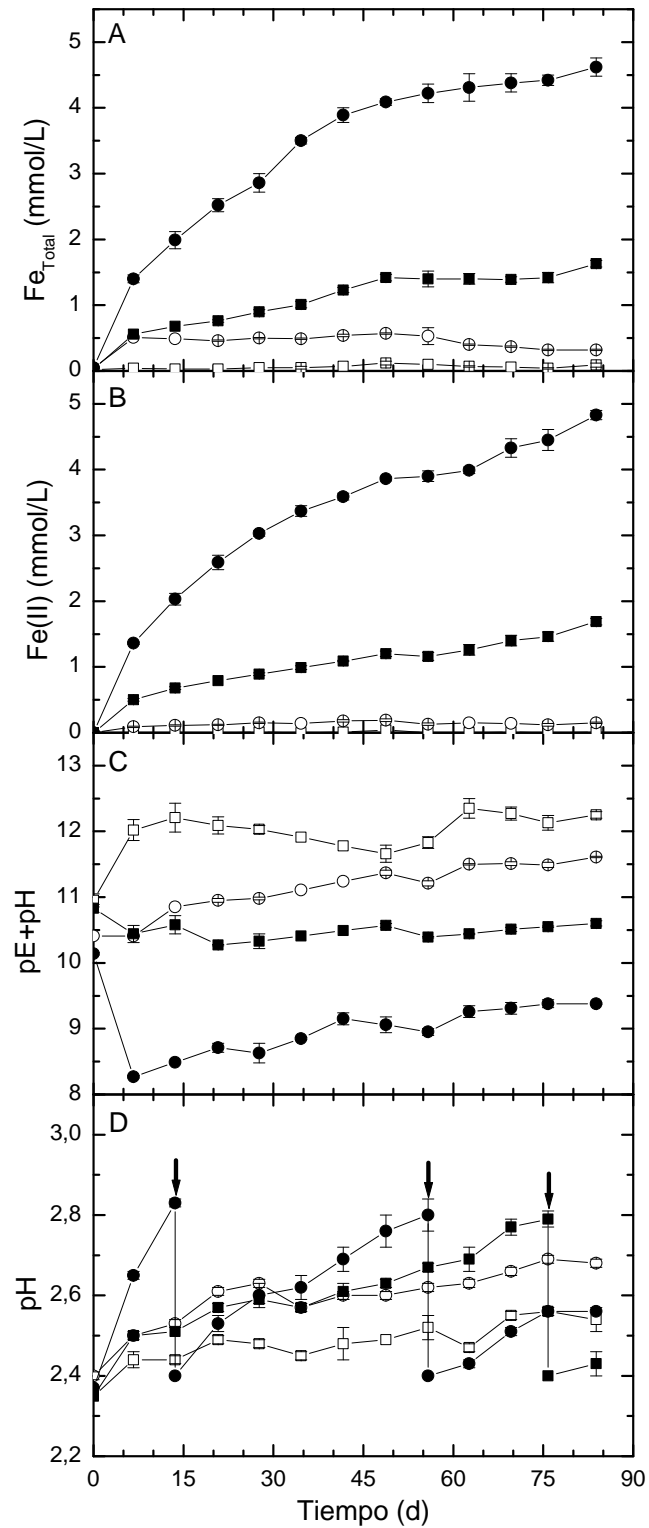


Figura 6.4: Perfiles de Fe_{Total} , $Fe(II)$, $pE+pH$ y pH obtenidos en los experimentos realizados con hematites en los medios E (■, □) y E/Ox (●, ○). Los símbolos huecos y macizos representan controles abióticos y viales inoculados, respectivamente. Las flechas señalan las sucesivas adiciones de H_2SO_4 .

Como se señaló en la sección 2.4.2, es común que a los ligandos se les adjudique una cierta capacidad en la disolución química del sólido férrico. A modo de ejemplo, Bridge y Johnson (2000) han propuesto que la disolución reductora de estos sólidos por *Acidiphilium* SJH ocurriría según la secuencia mostrada en la ecuación 6.1, y que la primera de tales reacciones sería el paso limitante. De este modo, la adición de EDTA y DPTA aceleraría la disolución y facilitaría el acceso de la bacteria al Fe(III) por la promoción de este paso.



Dada la gran cantidad de trabajos disponibles sobre la disolución abiótica mediada por ligandos, especialmente en medios con oxalato (Banwart et al., 1989, Blesa et al., 1987, Borggaard, 1992, Lee et al., 2007, Lee et al., 2006, Panias et al., 1996a, Panias et al., 1996b, Southam y Beveridge, 1993, Suter et al., 1988, Taxiarchou et al., 1997, Taxiarchou et al., 1998), gran parte de las justificaciones expuestas en los trabajos que emplean bacterias se han basado en conclusiones obtenidas en ausencia de microorganismos. Sin embargo, en presencia de éstos también podrían verse involucrados elementos como: una relación sinérgica entre los sideróforos y el oxalato en la movilización del hierro desde la hematites (Dehner et al., 2010), el rol de mediador redox que pueden desempeñar los quelatos de hierro (Schröder, 2007, Tanaka et al., 1983a, Tanaka et al., 1983b, Vega y Fernández, 1987) o la capacidad de algunos ligandos, como el oxalato, para formar complejos ternarios superficiales que favorecen la transferencia de electrones hasta la superficie (Blesa et al., 1987, Suter et al., 1988).

Los perfiles de Fe(II) dejan ver que la acción bacteriana mantiene el hierro en disolución (Fe_{Total}), casi por completo en su forma reducida. Por otra parte, la aparición de Fe(II) en los controles abióticos, en el medio E/Ox, se explicaría por el comportamiento reductor que presenta el oxalato (Eisele y Gabby, 2014). La comparación de las curvas pE+pH con las de Fe_{Total} muestra que la disolución de los sólidos mejoró a medida que se alcanzaron condiciones más reductoras, poniendo de manifiesto la importancia de esta variable. Finalmente, pese a que en estas figuras se presentan las distintas adiciones de H_2SO_4 , el bajo grado de disolución experimentado no permitió establecer una relación fehaciente entre el consumo de ácido y el hierro extraído.

6.2.2 Estudio de las variables: bacteria, ligando y Fe(II)

Dado que en la sección precedente los mejores resultados se obtuvieron empleando jarosita, se decidió estudiar la disolución reductora de este sólido, promovida por *A. cryptum* JF-5, en medios que contenían los siguientes ligandos: EDTA, NTA, oxalato, citrato, glicina, piruvato, ftalato y salicilato. Para tal efecto, como ya se apuntó anteriormente, se llevaron a cabo una serie de experimentos para analizar la influencia de las variables bacteria, ligando y hierro disuelto (como Fe(II)). Los resultados se muestran representados por grupos en las Figuras 6.5 a 6.7 y sintetizados en la Tabla 6.1.

La primera columna de la Figura 6.5 muestra que, en el medio sin ligandos, la jarosita no se disolvió, ni aún en presencia de *A. cryptum*, al contrario de lo que se había observado en la sección precedente (Figura 6.2), donde el experimento se llevó a cabo a un pH menor (2,8 - 3,2 frente a 2,4 - 2,8, respectivamente). Esto pone de manifiesto la importancia de prefijar un valor adecuado de esta variable. Los resultados obtenidos en presencia de glicina y citrato, Figura 6.5 y Tabla 6.1, tampoco revelan que haya ocurrido una disolución significativa del sólido, de modo similar a lo que ocurrió en el caso en que no había ligandos.

En contraposición a lo anterior, el análisis de los resultados de la Figura 6.6 deja ver que el EDTA, NTA y oxalato promovieron de manera efectiva la disolución de la jarosita en, al menos, una condición. Para estos tres compuestos, en ausencia de hierro en disolución, la Tabla 6.1 muestra que la velocidad de disolución en condición abiótica decreció en el orden EDTA>NTA>oxalato; mientras que en los tres casos la presencia de *Acidiphilium cryptum* incrementó dicha velocidad. Pese a esto, cabe mencionar que la disolución en el medio con EDTA se detuvo abruptamente cuando la concentración de hierro en disolución alcanzó los 2 mmol/L, valor de la concentración del ligando en el medio (Figura 6.6).

Cuando estos tres medios contenían hierro en disolución, las velocidades de ataque mostradas en la Tabla 6.1 indican que no hubo disolución de la jarosita. Por el contrario, en presencia de *A. cryptum* estas velocidades se incrementaron en aquellos medios suplementados con NTA y oxalato (Figura 6.6), mientras que en el que contenía EDTA, se obtuvo una disolución prácticamente nula (Tabla 6.1).

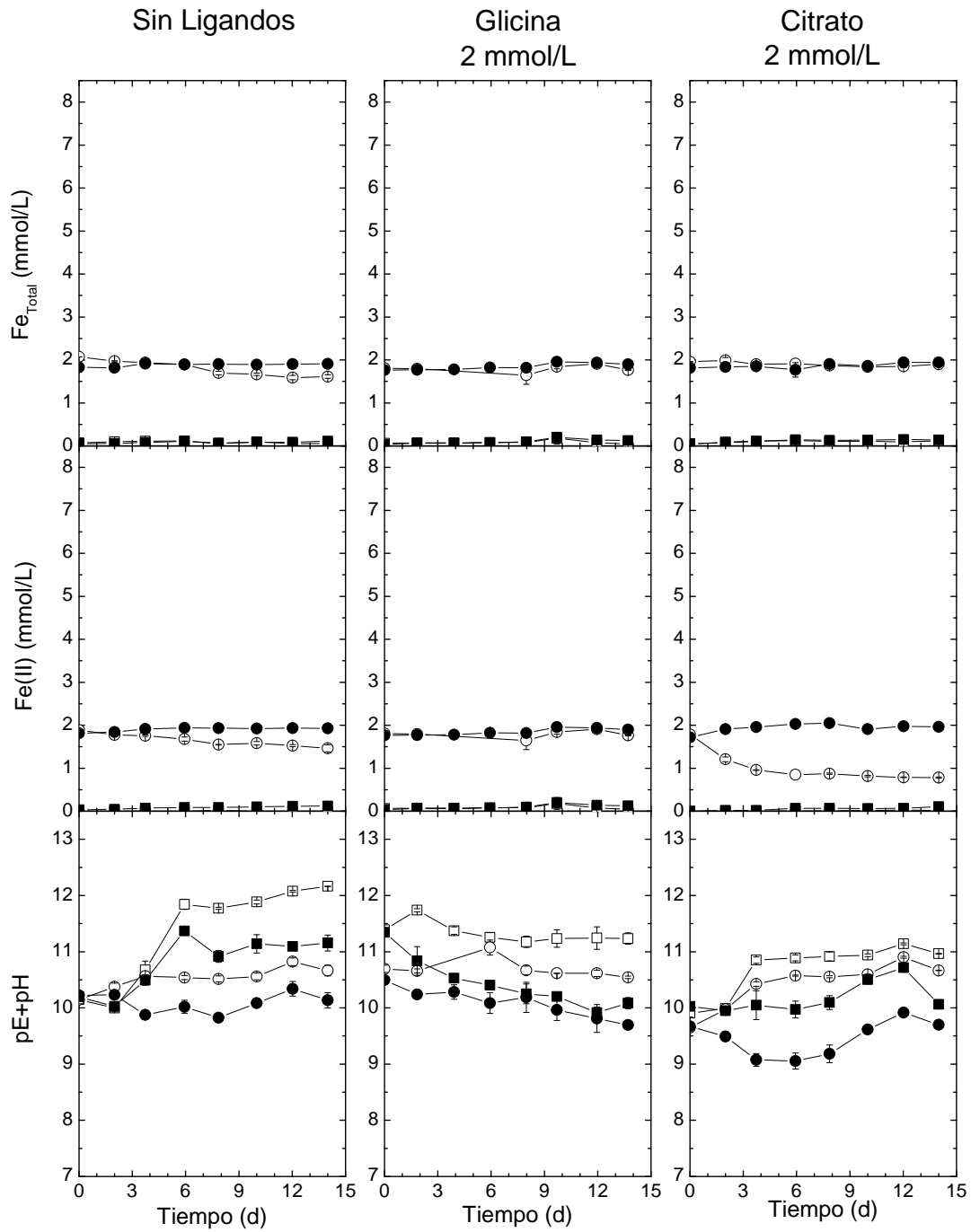


Figura 6.5: Perfiles de Fe_{Total}, Fe(II) y pE+pH para los ensayos realizados en los medios: sin ligandos, con glicina (2 mmol/L) y citrato (2 mmol/L); con (●,○) y sin (■,□) Fe(II) inicial. Los símbolos macizos y huecos representan los viales inoculados y controles abióticos, respectivamente.

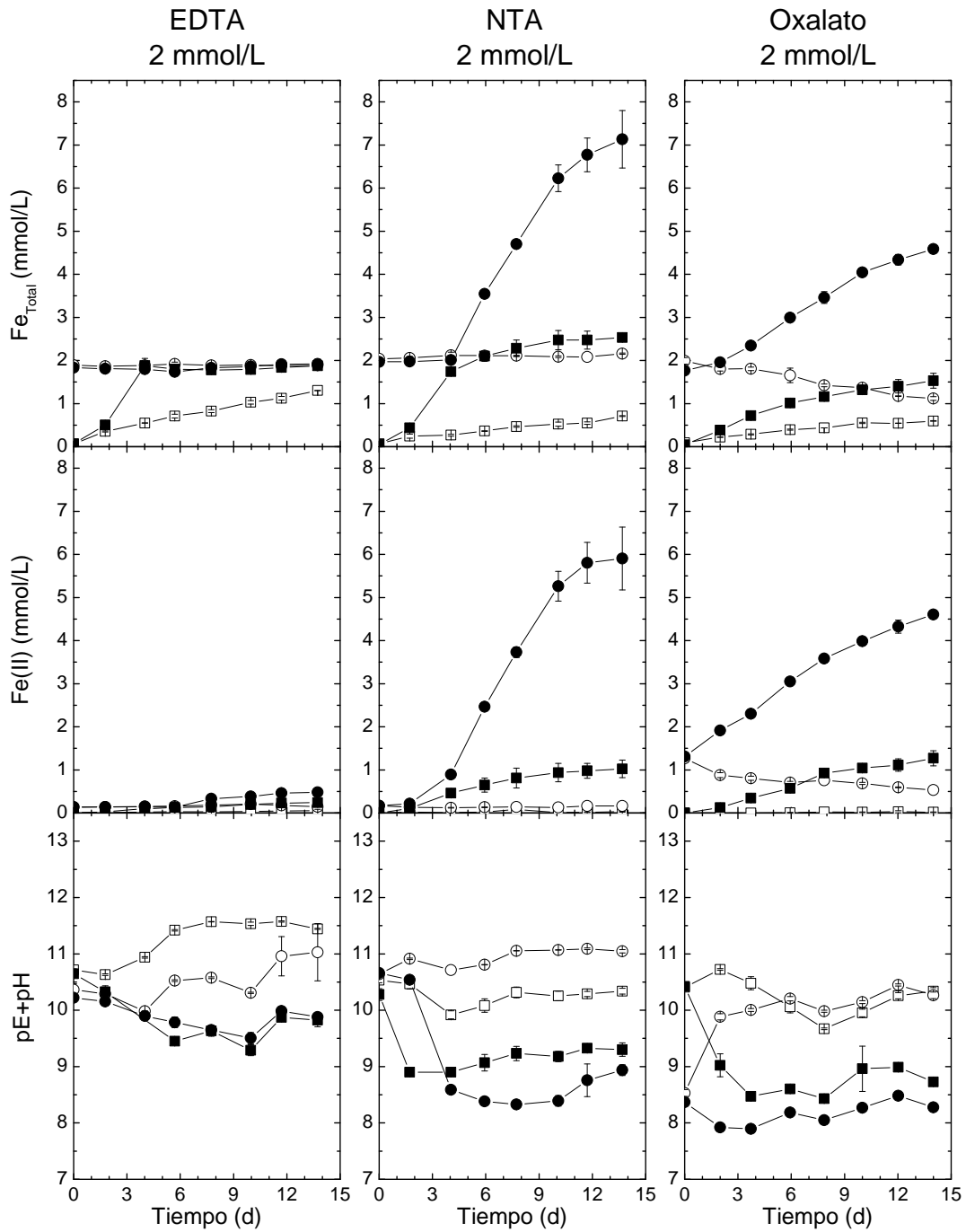


Figura 6.6: Perfiles de Fe_{Total}, Fe(II) y pE+pH para los ensayos realizados en los medios: con EDTA (2 mmol/L), NTA (2 mmol/L) y oxalato (2 mmol/L); con (●,○) y sin (■,□) Fe(II) inicial. Los símbolos macizos y huecos representan los viales inoculados y controles abióticos, respectivamente. El control de inóculo llevado a cabo en el medio suplementado con EDTA no indicó crecimiento microbiano.

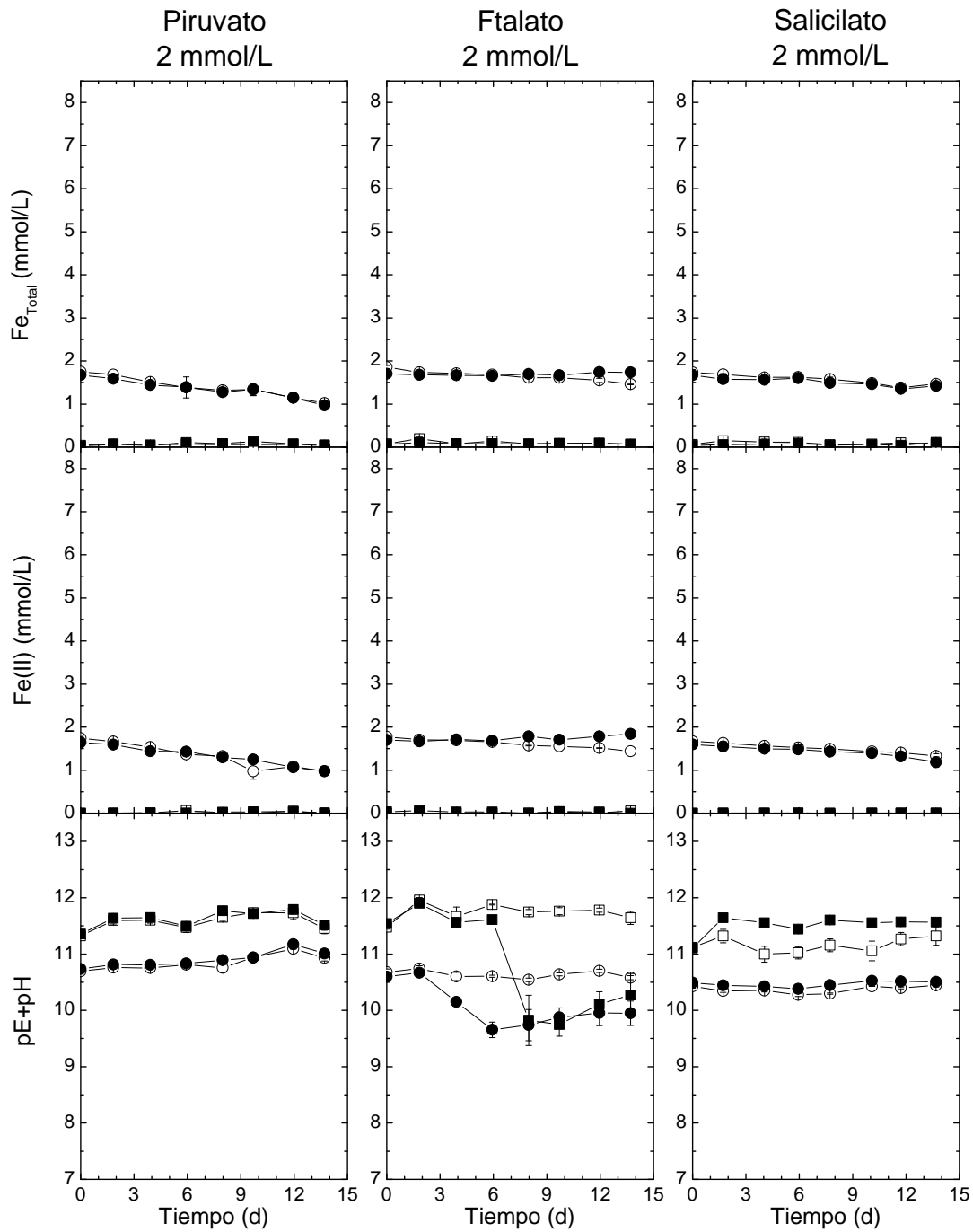


Figura 6.7: Perfiles de Fe_{Total}, Fe(II) y pE+pH para los ensayos realizados en los medios: con piruvato (2 mmol/L), ftalato (2 mmol/L) y salicilato (0,2 mmol/L); con (●,○) y sin (■,□) Fe(II) inicial. Los símbolos macizos y huecos representan los viales inoculados y controles abióticos, respectivamente. Ni los viales inoculados ni los controles de inóculo llevados a cabo aeróbicamente en estos tres medios presentaron crecimiento microbiano.

Tabla 6.1: Velocidad global de disolución de jarosita en presencia de los ligandos estudiados. Calculada sobre el período de 14 días como $\Delta Fe_{Total}/\Delta tiempo$ ($\mu\text{mol/L}\cdot\text{d}$).

Ligando	Medio sin Fe(II)		Medio con Fe(II)	
	Control abiótico	Inoculado	Control abiótico	Inoculado
Sin ligandos	0±0	4±2	-33±3*	6±2
Glicina	0±3	6±0	-3±2*	10±3
Citrato	6±0	6±1	-4±2*	9±2
EDTA	88±1	129±3	0±1	6±7
NTA	46±0	177±5	9±1	369±48
Oxalato	36±0	106±14	-62±9*	202±9
Piruvato	0±1	2±3	-52±4*	-50±0*
Ftalato	0±1	0±1	-28±3*	2±5
Salicilato	1±2	5±3	-19±7*	-18±0*

* Los valores negativos muestran una disminución en la concentración inicial de hierro.

Finalmente, para aquellos ligandos mostrados en la Figura 6.7, se aprecia que casi todas las variables medidas en los viales inoculados evolucionaron de un modo similar a como lo hicieron en los respectivos controles abióticos. La no observación de crecimiento bacteriano en los viales inoculados ni en los controles de inóculo podría ser atribuida a un posible efecto inhibitorio de estos compuestos sobre la población microbiana. Aunque la capacidad antimicrobiana del ácido salicílico y los derivados del ácido benzoico ya ha sido reportada (Lück y Jager, 1997, Park et al., 2001), respecto del piruvato, sólo se ha observado que *A. cryptum* es incapaz de reducir hierro utilizándolo como fuente de carbono y energía (Küsel et al., 1999). Por este motivo, las respectivas velocidades de disolución mostradas en la Tabla 6.1 no pueden ser consideradas.

El mecanismo de acción de los ligandos descrito en sección 2.4.2, y comentado en la sección anterior, no es capaz de explicar que la velocidad de disolución en presencia de *A. cryptum* y NTA u oxalato se incremente cuando hay hierro en disolución. Considerando que el hierro se incorporó a los medios en forma de Fe(II) con un día de antelación al comienzo del experimento, el análisis riguroso de las Figuras 6.5 a 6.7 permite ver que la concentración inicial de Fe(II) fue significativamente menor que la de Fe_{Total} en aquellos medios que habían sido suplementados con EDTA, NTA u oxalato, es decir, aquellos ligandos que mostraron efectos positivos en, al menos, una condición (Figura 6.6).

Cabe destacar que, aunque Bridge y Johnson (2000) reportaron que los ligandos provocaban interferencia en la determinación de Fe(II) mediante el método de la ferrocina, posteriormente se comprobó (Pepper et al., 2010) que dicho método no presentaba esta dificultad (Welch et al., 2002). Dado que la velocidad de autooxidación del Fe(II) es muy baja cuando el pH es menor que ~ 4 (Morgan y Lahav, 2007), la presencia de estos ligandos (EDTA, NTA y oxalato) podría haber incrementado dicha velocidad.

6.2.3 Capacidad de los ligandos para promover la autooxidación del Fe(II)

Para estudiar la posible relación entre los ligandos utilizados en la sección previa y la autooxidación del Fe(II), se estudió esta última manteniendo la mayor similitud posible entre las condiciones experimentales. Por este motivo, se empleó el medio de cultivo E suplementado con Fe(II) hasta una concentración de 2 mmol/L, a pH 3,0, aunque se optó por duplicar la concentración de los ligandos para asegurar su exceso respecto del Fe(II).

De este modo, se consiguieron los perfiles de Fe(II) remanente mostrados en la Figura 6.8, donde se aprecia claramente que ciertos ligandos causaron un drástico incremento en la velocidad de autooxidación del Fe(II), mientras que otros casi no tuvieron efecto. A partir de esta figura, se desprende que la velocidad de autooxidación decrece en presencia de los siguientes ligandos: EDTA > NTA > oxalato > citrato > piruvato > ftalato \approx glicina \approx salicilato > ausencia de ligandos.

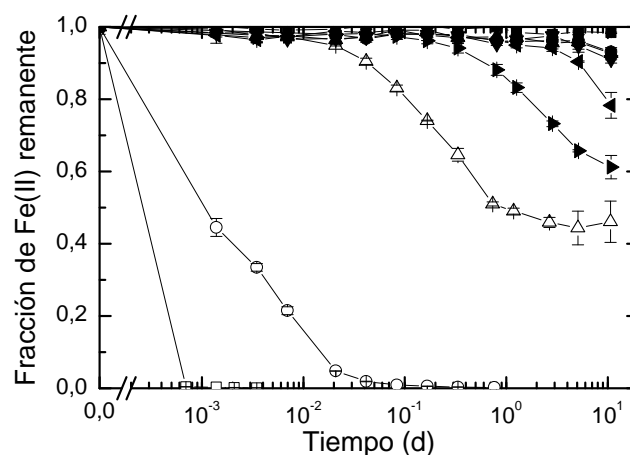


Figura 6.8: Cinética de autooxidación de Fe(II) en presencia de diferentes ligandos: EDTA (□), NTA (○), oxalato (Δ), citrato (▶), piruvato (◄), ftalato (▼), glicina (▲) y salicilato (●), respecto de aquella en ausencia de ligandos (■).

En la ecuación 6.2 (Morgan y Lahav, 2007) se aprecia que la velocidad global de autooxidación del Fe(II) es igual a la suma de las velocidades de oxidación de cada una de sus especies. De modo análogo, la presencia de ligandos en el medio genera nuevos complejos, cada uno de ellos con una velocidad de oxidación propia (Figura 6.9).

$$-\frac{d[Fe(II)]}{dt} = 6 \cdot 10^{-5} [Fe^{2+}] + 1,7 [Fe(OH)^+] + 4,3 \cdot 10^5 [Fe(OH)_{2(aq)}^0] \quad (6.2)$$

Pese a que la única diferencia entre el Fe(II) y Fe(III) radica en la configuración de la capa electrónica más externa, sus propiedades difieren considerablemente. Por ejemplo, el Fe(III) es un ácido duro (catión de pequeño tamaño y alta carga, de baja polarizabilidad), con tendencia a combinarse con ligandos donadores a través de átomos de oxígeno, mientras que el Fe(II) se comporta como ácido de Lewis frontera, con mayor afinidad por ligandos nitrogenados (Stumm y Morgan, 1995b). En relación a lo anterior, Welch et al. (2002) han reportado que los ligandos ricos en oxígeno promueven la oxidación del Fe(II), mientras que aquellos que contienen nitrógeno estabilizan el Fe(II), disminuyendo su velocidad de autooxidación.

Este comportamiento también se relaciona con el potencial redox de los quelatos de hierro, ya que un análisis termodinámico para un metal (M) y un ligando (L) revela que las constantes de formación de complejos con la especie oxidada (K_{ox}) y reducida (K_{red}) se relacionan con los potenciales redox de las reacciones 6.3 y 6.4 según la ecuación 6.5 (Atkins et al., 2010). De este modo, aquellos ligandos con átomos de oxígeno (que tienden a estabilizar a la especie oxidada) provocan la

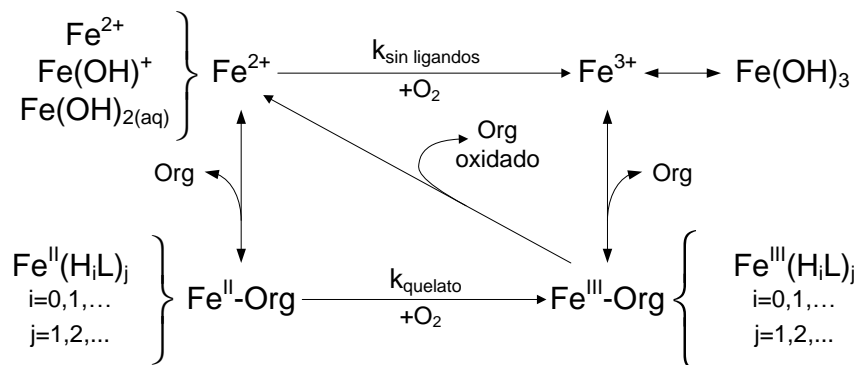


Figura 6.9: Generalización del esquema que describe el comportamiento del hierro en presencia de materia orgánica (org) y oxígeno tras incluir un ligando (L). Adaptado de Theis y Singer (1974) (Demmink y Beenackers, 1997, Morgan y Lahav, 2007, Pham y Waite, 2008, Zang y Van Eldik, 1990).

disminución del potencial $E^0(ML)$, mientras que los ligandos nitrogenados (que estabilizan a la forma reducida) hacen que se incremente (Galey, 1996). De estas relaciones se desprende que mientras mayor es la velocidad de autooxidación del Fe(II) en presencia de un ligando, menor será el potencial redox de sus quelatos; por lo que los potenciales redox de los distintos complejos de hierro estudiados en esta sección irían en dirección contraria a la secuencia de ligandos antes señalada. Para comprobar esto se intentó determinar el potencial redox de los quelatos de hierro mediante ensayos de voltamperometría cíclica con los medios empleados, obteniéndose resultados no concluyentes (datos no mostrados). Aunque se ha reportado que el potencial redox de los quelatos de hierro puede incrementar según el orden EDTA < NTA < citrato (Wang et al., 2008), esta secuencia debe considerarse sólo a modo orientativo, ya que ciertas variables, como el pH, pueden afectar tanto al potencial redox (Shimizu et al., 2007) como a la velocidad de autooxidación del Fe(II) (Welch et al., 2002).



$$E^0(M) - E^0(ML) = \frac{RT}{F} \ln \frac{K^{ox}}{K^{red}} \quad (6.5)$$

6.2.4 Capacidad de *A. cryptum* para reducir algunos quelatos de Fe(III)

Dado que la bacteria *A. cryptum* es la responsable de generar el ambiente reductor, se ensayó su capacidad para reducir algunos quelatos de Fe(III). Considerando que a pH 3,0 el Fe(III) es escasamente soluble, sólo se estudiaron los quelatos formados por EDTA, NTA, oxalato y citrato, ya que los demás ligandos fueron incapaces de mantener concentraciones significativas de Fe(III) en disolución.

La Figura 6.10 muestra los resultados de las mediciones de Fe(II) obtenidas en estos experimentos. No obstante, si se considera la concentración inicial de Fe(III), determinada por diferencia entre las concentraciones de Fe(II) y Fe_{Total} , se llega a la normalización de las concentraciones de Fe(II), representadas en la Figura 6.11 como fracción de Fe(III) reducido. Esta última figura resultó más útil para la correcta comparación de los resultados, ya que, pese a que en todos los casos la concentración del ligando fue de 1 mmol/L, la estequiometría del complejo de oxalato

(Fe(III)-Ox_n con n=1,2 ó 3) (Panias et al., 1996a) difiere de la del resto de los ligandos (Fe(III)-L).

En la Figura 6.11 se observa que la velocidad de reducción de los quelatos de hierro disminuye para los ligandos: citrato>oxalato>NTA>EDTA; que representa el orden inverso a la secuencia presentada en la sección anterior. De este modo, puede deducirse que mientras mayor es la tendencia de un ligando para estabilizar preferentemente a la especie oxidada de hierro, más difícil resulta la reducción de sus quelatos (que tienen un menor potencial redox).

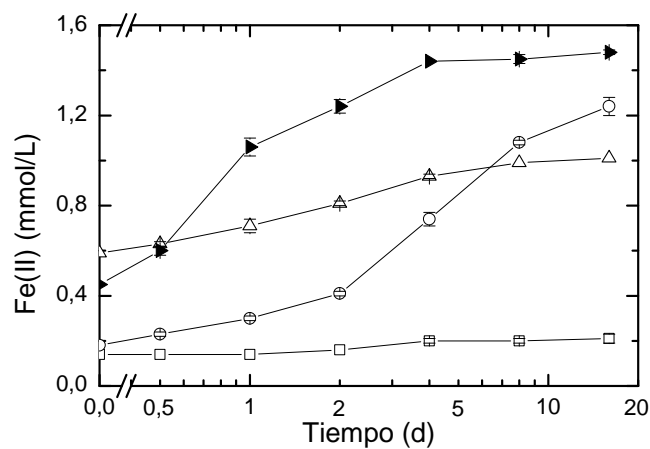


Figura 6.10: Perfiles de Fe(II) en la biorreducción de quelatos de Fe(III) de los ligandos: EDTA (□), NTA (○), oxalato (Δ) y citrato (▴).

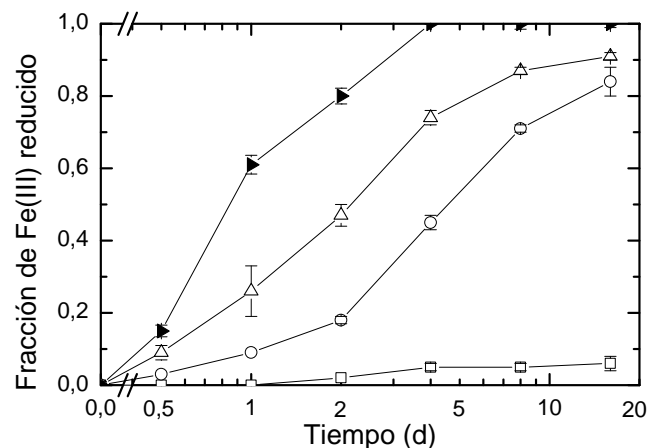


Figura 6.11: Fracción de quelatos de Fe(III) reducidos. EDTA (□), NTA (○), oxalato (Δ), citrato (▴). Calculados a partir de la Figura 6.10 considerando que las concentraciones de Fe_{Total} obtenidas fueron: 1,41±0,02, 1,44±0,03, 1,05±0,00 y 1,44±0,01 mmol/L para los quelatos de EDTA, NTA, oxalato and citrato, respectivamente.

Atendiendo todos estos antecedentes, el mecanismo de acción de los distintos ligandos estudiados en la sección 6.2.2 parece depender de dos situaciones:

- Cuando la concentración de Fe_{Total} es significativamente menor que la del ligando, la disolución procedería químicamente, incrementándose su velocidad en la medida que el ligando se une más fuertemente a la especie oxidada.
- Cuando la concentración de Fe_{Total} es similar a la del ligando, la disolución sólo ocurriría si la bacteria es capaz de reducir el complejo de Fe(III) a uno de Fe(II) (Gescher et al., 2008), que luego se oxidaría en la superficie del sólido (Blesa et al., 1987, del Valle Hidalgo et al., 1988). En este caso, el quelato actuaría como un mediador redox (Lovley, 2006, Schröder, 2007), tal como ha sido propuesto por Tanaka et al. (1983a, 1983b) y Vega y Fernández (1987).

Estos mecanismos permiten explicar que, cuando no había hierro en disolución, los ligandos que interactuaban débilmente con el Fe(III) (glicina y citrato) mostraran un efecto prácticamente nulo, mientras que el EDTA, NTA y oxalato promovieran la disolución de la jarosita. Asimismo, en presencia de hierro disuelto sólo aquellos con una preferencia moderada por el Fe(III) (oxalato y NTA) serían capaces de dar buenos resultados, ya que los quelatos de EDTA resultan difíciles de reducir (Haas y DiChristina, 2002), tal como se ha evidenciado en la Figura 6.11.

7 Reducción asistida por mediadores redox

Se ha reportado que hay mediadores redox que pueden facilitar la transferencia de electrones desde las bacterias hasta soportes sólidos, mejorando los resultados de la biorreducción de sustratos férricos (Straub y Schink, 2003), así como su utilidad en celdas microbianas de combustible (Borole et al., 2008). Por este motivo, en estos experimentos, se ensayó una amplia gama de compuestos de este tipo a fin de determinar cuáles de ellos podían mejorar los procesos de biorreducción y disolución reductora de la jarosita. En este estudio, se utilizaron dos cepas de bacterias reductoras de hierro: *Aeromonas hydrophila* y *Acidiphilium cryptum*.

7.1 Materiales y métodos

7.1.1 Caracterización de los mediadores redox mediante voltamperometría cíclica

La caracterización de los transportadores redox probados se llevó a cabo mediante ensayos de voltamperometría cíclica (Autolab PGSTAT101), entre -700 y 500 mV (vs. Ag/AgCl) y con una velocidad de escaneo de 100 mV/s. Como electrodos de referencia y auxiliar se utilizaron Ag/AgCl KCl 3 mol/L y una barra de grafito (área mayor a 4 cm²), respectivamente. El electrodo de trabajo se fabricó embutiendo una mina de lápiz de 0,5 mm de diámetro en la resina MA 2+ y su respectivo endurecedor. El extremo se pulió perpendicularmente (área ~ 0,20 mm²) mediante papeles de lija con tamaño de grano decreciente empleándose en último lugar uno con tamaño de grano 1000 o 1200. Seguidamente, se frotó el extremo suavemente con una mota de algodón y se realizó con él una voltamperometría cíclica entre -1200 y 1200 mV empleando H₂SO₄ 1 mol/L hasta obtener un voltamperograma donde no se observasen picos. Finalmente, el electrodo se lavó con agua destilada, tras lo que se dejó secar al aire.

Los mediadores redox estudiados fueron: antraquinona-2,6-disulfonato (2,6-AQDS), antraquinona-1,5-disulfonato (1,5-AQDS), safranina, fenosafranina, rojo neutro, tionina, azul de metileno, resazurina y 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP), debido a que cubrían un amplio rango de potenciales redox. Cada transportador de electrones fue probado a una concentración de 1 mmol/L y tres valores de pH (2,4, 4,5 y 7,0)

con la precisión de un decimal empleando tampones de amplio rango a base de citrato y fosfato. Éstos se prepararon mezclando disoluciones 0,1 mol/L ácido cítrico (disolución A) y 0,2 mol/L Na_2HPO_4 (disolución B) en las proporciones 46:4, 27:23 y 6:43 (vol. A/vol. B, para los pH 2,4, 4,5 y 7,0, respectivamente), y aplicando una dilución final de 1:2 con agua destilada.

7.1.2 Biorreducción de jarosita en medios que contienen mediadores redox

En estos experimentos, se usaron los medios BRS y E (a pH 7,0 y 2,4, respectivamente, sección 3.1) para *A. hydrophila* y *A. cryptum*, respectivamente. Éstos se suplementaron en un 1 % (v/v) con disoluciones 10 mmol/L de los distintos mediadores, de modo que su concentración fuese 100 $\mu\text{mol/L}$. Los medios se esterilizaron por filtración (sección 3.2).

Como sólido férrico se utilizó jarosita (sección 3.3) a una densidad de pulpa de 2 y 1 % (p/v) para *A. hydrophila* y *A. cryptum*, respectivamente, la que se desinfectó según se expone en la sección 3.4. En ambos casos, la inoculación y muestreo de los viales se realizó de modo similar al descrito en las secciones 3.5 y 3.6, respectivamente, con la salvedad que durante la toma de muestra los viales inoculados con *A. hydrophila* se mantuvieron en agitación a fin de remover una fracción representativa de la suspensión (en vez de sólo el sobrenadante). En ambos casos la dilución de la alícuota en HCl 1 mol/L se llevó a cabo con prontitud para evitar la oxidación del Fe(II) y, en el caso de *A. hydrophila*, para evitar la sedimentación del sólido. Dos días más tarde, se determinó la concentración de Fe(II) en la muestra acidulada mediante el método de la ferrocina (Apéndice V).

Con el objetivo de determinar el estado de agregación (sólido o en disolución) de las especies de Fe(II) y Fe(III) en los viales inoculados con *A. hydrophila*, en ausencia de transportador y en presencia de 2,6-AQDS (por obtenerse con este último los mejores resultados), al terminar el ensayo se muestreó el sobrenadante y la suspensión. Tras acidular 0,5 mL de estas muestras con 4,5 mL HCl 1 mol/L, se esperaron dos días para tomar alícuotas de 100 μL con la finalidad de determinar la concentración de Fe(II) por el método de la ferrocina, Apéndice V. Los tubos que contenían el resto de la mezcla acidulada se taparon e introdujeron en un baño de agua a ebullición durante 1 h (hasta la disolución completa del sólido) y se dejaron

enfriar. Finalmente, se midió en ellos la concentración de hierro total mediante absorción atómica.

7.2 Resultados y discusión

7.2.1 Caracterización de los mediadores redox mediante voltamperometría cíclica

De la amplia gama de mediadores redox reportados en la bibliografía, en este estudio se utilizaron aquellos reseñados en la Tabla 7.1 por su pertenencia a las principales familias de este tipo de compuestos y debido a que abarcan un amplio rango de potenciales redox.

El potencial estándar aparente de reducción (Alberty, 2004) de muchas de estas sustancias depende del pH, como puede apreciarse para la tionina, safranina y azul de metileno en la Figura 7.1 y para este último compuesto en la Tabla 7.1. Por este motivo, se determinaron estos valores a pH 2,4, 4,5, y 7,0 mediante voltamperometría. Los voltamperogramas obtenidos con este grupo de experimentos se muestran en la Figura 7.2, mientras que los potenciales correspondientes a los picos catódicos y anódicos, junto al potencial medio calculado, se hallan tabulados en la Tabla 7.2

Alguno de los voltamperogramas obtenidos (feno-safranina y rojo neutro) mostraron la forma típica, donde los picos anódico y catódico se definieron claramente además de poseer intensidades similares. Sin embargo, para otros compuestos (2,6-AQDS, azul de metileno, tionina y DCPIP) se obtuvieron picos más anchos y menos definidos, probablemente, porque la oxidación o reducción resultaron ser procesos cuasirreversibles (Marken et al., 2010), por la baja solubilidad de algunas de las especies en cuestión (Baglieri et al., 2014) o porque quizá el material del electrodo de trabajo no fuera el más adecuado.

En el voltamperograma obtenido para la safranina se observaron dos picos catódicos y anódicos, que dan cuenta de dos transiciones redox, tal como se ha reportado previamente para este compuesto (Heli et al., 2007). Por otra parte, el hallazgo de dos picos catódicos y solo uno anódico en el sistema resazurina/resorrufina se explicaría por la irreversibilidad del proceso de reducción

Reducción asistida por mediadores redox

Tabla 7.1: Mediadores redox empleados en este estudio ordenados por familias de compuestos junto a su potencial estándar aparente de reducción.

Mediador redox	Potencial	Referencia
Antraquinoides		
Antraquinona-2,6-disulfonato (2,6-AQDS)	$E^{\circ}(\text{pH } 7.0) = -184 \text{ mV}$	(Du et al., 2007)
Antraquinona-1,5-disulfonato (1,5-AQDS)	No hay datos*	
Fenazinas		
Safranina	$E^{\circ}(\text{pH } 7.0) = -280 \text{ mV}$	(Prince et al., 1981)
Fenosafnanina	$E^{\circ}(\text{pH } 7.0) = -252 \text{ mV}$	(Brey, 1978)
Rojo neutro	$E^{\circ}(\text{pH } 7.0) = -325 \text{ mV}$	(Brey, 1978)
Fenotiazinas		
Tionina	$E^{\circ}(\text{pH } 7.0) = +64 \text{ mV}$	(Du et al., 2007)
Azul de metileno	$E^{\circ}(\text{pH } 7.0) = +11 \text{ mV}$ $E^{\circ} = 0.532 + 0.0296 \cdot \log([H^+]^3 + K_1 \cdot [H^+]^2 + K_1 \cdot K_2 \cdot [H^+]) \text{ V}$ $pK_1 = 4.52$ and $pK_2 = 5.85$	(Brey, 1978) (Hulanicki y Glab, 1978)
Otros		
Resazurina (/resorrufina)	$E_1^{\circ}(\text{pH } 7.0) = +70 \text{ mV}$ (azul-rosa)** $E_2^{\circ}(\text{pH } 7.0) = -51 \text{ mV}$ (rosa-incoloro)	(Guerin et al., 2001)
2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP)	$E^{\circ}(\text{pH } 7.0) = +220 \text{ mV}$	(Nicholls y Ferguson, 1992)

* Probado en la reducción de Cr(VI) mediante *E. coli* BL21 (Guo et al., 2012). También señalado por Guin et al. (2011).

** Irreversible.

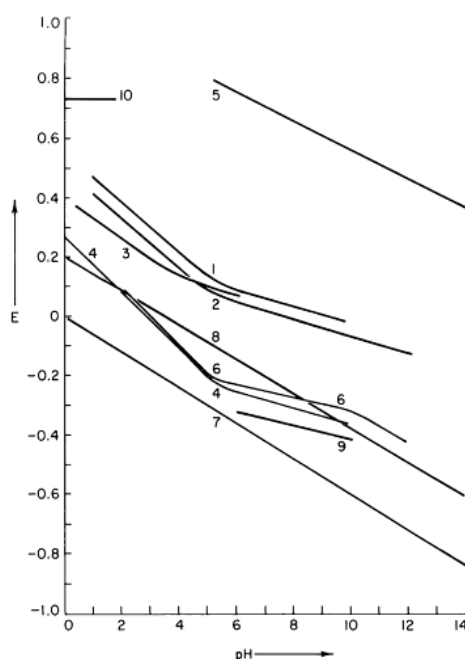


Figura 7.1: Potencial redox medio (respecto del electrodo de hidrógeno), en función del pH, de algunos transportadores de electrones: tionina (1), azul de metileno (2), safranina (4) y riboflavina (6). Tomada de Meier (1971).

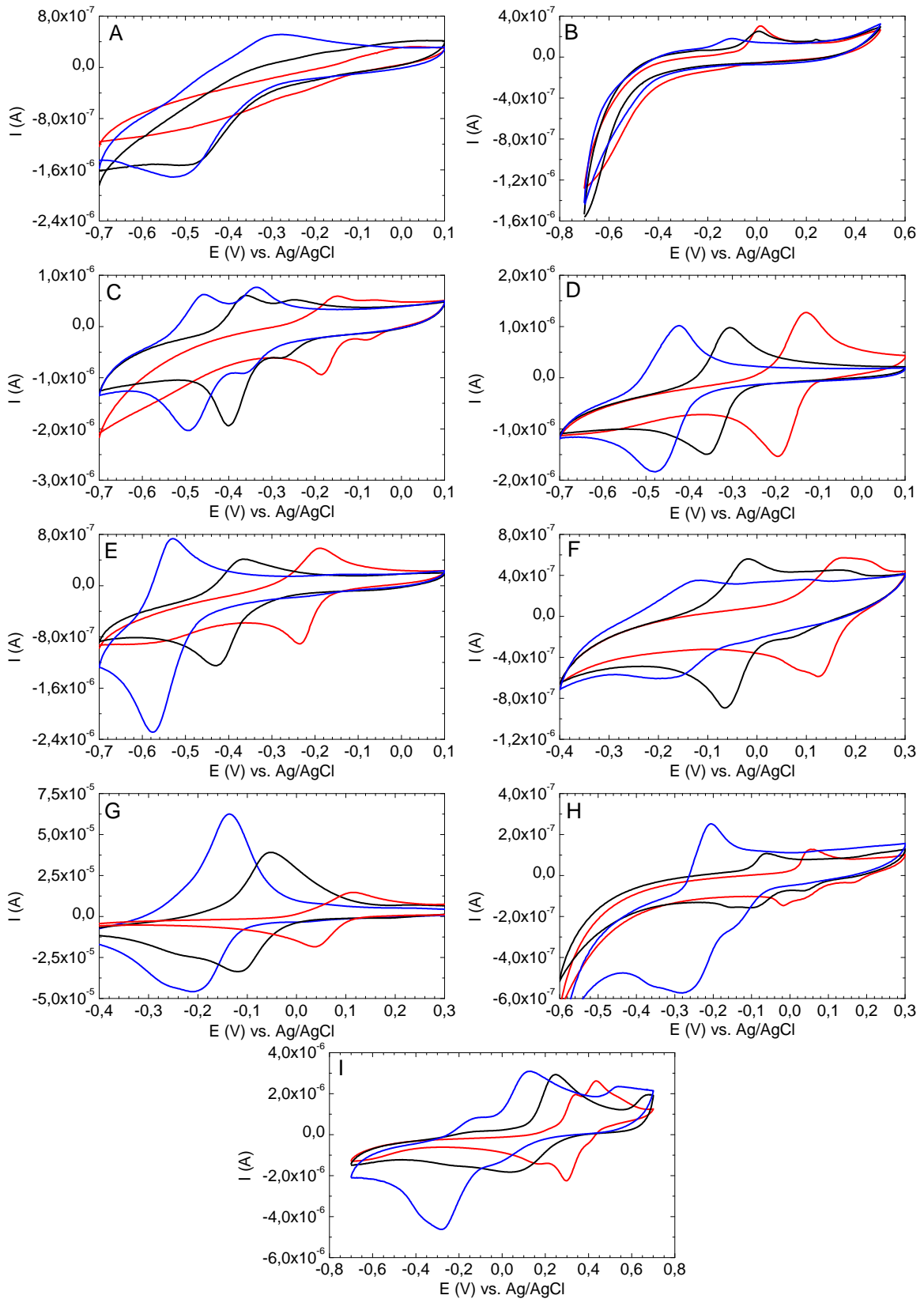


Figura 7.2: Voltamperogramas de los mediadores redox antraquinona-2,6-disulfonato (A), antraquinona-1,5-disulfonato (B), safranina (C), fenosafranina (D), rojo neutro (E), tionina (F), azul de metileno (G), resazurina/resorufina (H) y 2,6-diclorofenol indofenol (I) a pH 7,0 (azul), 4,5 (negro) y 2,4 (rojo).

Reducción asistida por mediadores redox

Tabla 7.2: Potenciales (mV vs. Ag/AgCl KCl 3 mol/L) de los picos catódico (E_{pc}) y anódico (E_{pa}), y su media (E_m), obtenidos en los voltamperogramas de los mediadores redox a pH 2,4, 4,5 y 7,0.

Compuesto	pH 7,0			pH 4,5			pH 2,4		
	E_{pc}	E_{pa}	E_m	E_{pc}	E_{pa}	E_m	E_{pc}	E_{pa}	E_m
2,6-AQDS	-534	-277	-406	-515	-	-	-	30	-
1,5-AQDS	-	-102	-	-	7	-	-	13	-
Safranina	-490	-459	-475	-400	-361	-381	-185	-148	-167
	-368	-336	-352	-280	-249	-265	-84	-61	-73
Fenosafranina	-479	-423	-451	-360	-307	-334	-195	-129	-162
Rojo neutro	-576	-529	-553	-430	-366	-398	-236	-188	-212
Tionina	-201	-114	-158	-65	-18	-42	124	178	151
Azul de metileno	-212	-136	-174	-120	-52	-86	37	115	76
Resazurina/	-	-*	-*	29	-*	-*	159	-*	-*
resorrufina	-281	-205	-243	-	-60	-	-17	58	21
DCPIP	-283	130	-77	37	247	142	174	340	257
							297	436	367

- Picos no definidos o no calculables.

* Reacción irreversible.

de la resazurina (González-Pinzón et al., 2012). Un comportamiento parecido se observa para el 1,5-AQDS, que presentó sólo un pico anódico y que podría corresponder a una oxidación irreversible.

En el voltamperograma realizado para la resazurina/resorrufina a pH 4,5 se constata que el pico catódico de menor potencial parece estar formado por dos picos que no se resuelven por completo. Esto último podría ser debido a que existen dos formas reducidas de resorrufina, la dihidrorresorrufina y el anión de resorrufina protonado (el primero de ellos favorecido a pH inferior a 4) (Çakir y Arslan, 2010). De este modo, dada la cercanía del valor del pH al que se realizó la voltamperometría (4,5) con el pK de estas dos formas reducidas (4), en el ensayo electroquímico se podrían haber visto representadas ambas especies.

Al comparar los valores reportados en la Tabla 7.1 con los presentados en la Tabla 7.2 a pH 7,0 y corrigiendo su valor con el potencial del electrodo de referencia usado en estos ensayos (Ag/AgCl KCl 3 mol/L: 210 mV vs. electrodo estándar de hidrógeno, EEH), se aprecia una adecuada similitud en casi todos los casos (Tabla 7.3), con una discrepancia menor a 25 mV (para la safranina se consideró el potencial menor). La disparidad de los valores correspondientes al DCPIP (87 mV) permite poner en duda el potencial redox determinado, dada la importante

Tabla 7.3: Comparación entre los potenciales de los mediadores reportados en bibliografía y los determinados mediante voltamperometría.

Compuesto	Potencial bibliográfico (mV vs.EEH)	Potencial determinado (mV vs. EEH)
2,6-AQDS	-184	-196
1,5-AQDS	-	-
Safranina	-280	-265
Fenosafranina	-252	-241
Rojo neutro	-325	-343
Tionina	+64	+52
Azul de metileno	+11	+36
Resorufina	-51	-33
DCPIP	+220	+133

separación de los picos; posiblemente debida a procesos cuasirreversibles o por transiciones redox a potenciales próximos.

7.2.2 Biorreducción de jarosita en medios que contienen mediadores redox

Aunque la capacidad de *Aeromonas hydrophila* para biorreducir óxidos de hierro ya se ha reportado (García-Balboa et al., 2010), el efecto de los transportadores de electrones sobre este proceso está empezando a ser estudiado (Castro et al., 2013). Por otra parte, el comportamiento de *Acidiphilium cryptum* en presencia de este tipo de compuestos apenas se ha ensayado (Borole et al., 2008).

Por este motivo, se realizaron experimentos para determinar que mediadores redox podrían favorecer el comportamiento de *A. hydrophila* y *A. cryptum*, obteniéndose los perfiles de Fe(II) presentados en las Figuras 7.3 y 7.4, respectivamente. En la Figura 7.3 se aprecia que el 2,6-AQDS, la safranina y fenosafranina generaron los mejores resultados para *A. hydrophila*, mientras que la Figura 7.4 muestra que el mejor comportamiento para *A. cryptum* se consiguió con los mediadores tionina y azul de metileno. Para ambos microorganismos, los restantes mediadores presentaron perfiles de Fe(II) similares al obtenido en ausencia de ellos.

Es importante mencionar que en el ensayo realizado con *A. hydrophila* una fracción importante del Fe(II) se encontró en forma de sólido (Figura 7.5). Aunque este hierro podría encontrarse como siderita (Figura 5.2), debido al pH neutro al que crece dicho microorganismo, los análisis de XRD sólo revelaron la presencia de jarosita (datos no mostrados). Esto podría deberse a que dicho compuesto podría encontrarse en una proporción muy baja por el corto tiempo empleado en el ensayo.

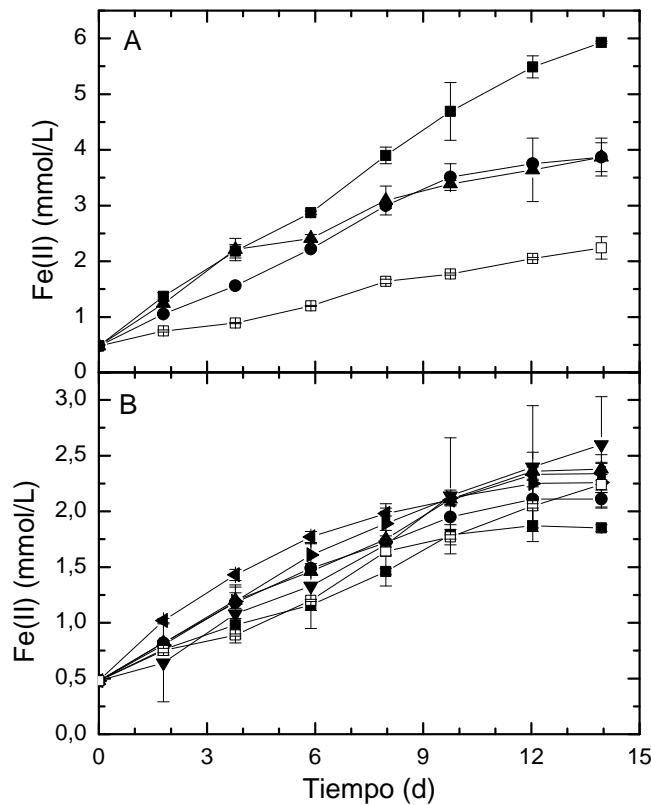


Figura 7.3: Perfiles de Fe(II) de la biorreducción de jarosita en viales inoculados con *A. hydrophila* en presencia de distintos mediadores redox. (A) Control inoculado (□), 2,6-AQDS (■), safranina (●) y fenosafranina (▲). (B) Control inoculado (□), 1,5-AQDS (■), rojo neutro (●), tionina (▲), azul de metileno (▼), resazurina/resorufina (◄) y DCPIP (►). Los valores de Fe(II) representan la concentración de Fe(II) total obtenida tras digerir del sólido.

Las Figuras 7.6 y 7.7 relacionan las velocidades promedio de reacción con los potenciales redox de los mediadores redox ensayados (Tablas 7.1 y 7.2). En estas figuras es posible observar que los que tenían un potencial redox en los rangos -500 a -400 mV y 50 a 150 mV vs. Ag/AgCl, para *A. hydrophila* y *A. cryptum*, respectivamente, fueron los que presentaron los mejores resultados; es decir: safranina, fenosafranina y 2,6-AQDS para la primera bacteria y azul de metileno y tionina para la segunda.

La importancia del potencial redox ya había sido previamente reportada por Van der Zee et al. (2009) y Watanabe et al. (2009) quienes han señalado que un mediador redox efectivo posee un potencial redox que se ubica entre los correspondientes a las eventuales semirreacciones. Por este motivo, dicha efectividad debería estar limitada inferiormente por el potencial redox al cual los electrones abandonan las células y superiormente por el de reducción del sólido.

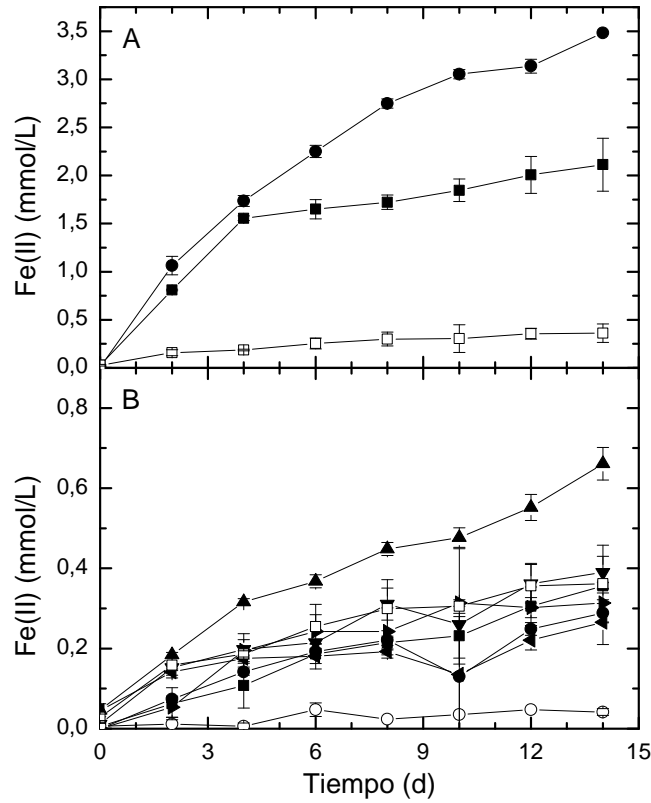


Figura 7.4: Perfiles de Fe(II) de la disolución de jarosita en viales inoculados con *A. cryptum* en presencia de distintos mediadores redox. (A) Control inoculado (□), tionina (●) y azul de metileno (■). (B) Control inoculado (□), 2,6-AQDS (■), 1,5-AQDS (●), safranina (▲), fensafanina (▼), rojo neutro (◄), resazurina/resorrufina (►) y DCPIP (○).

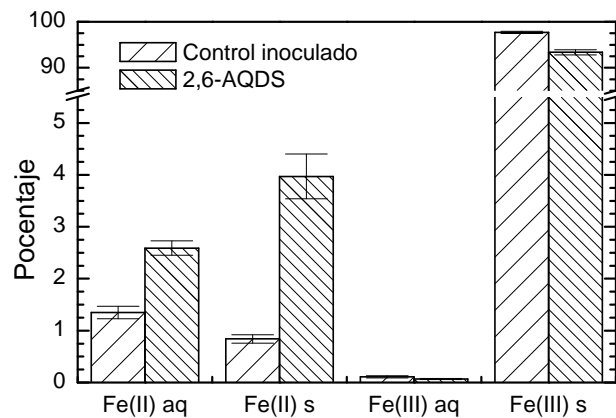


Figura 7.5: Estados de agregación (sólido o acuoso) del hierro tras los experimentos en ausencia de mediadores y en presencia de 2,6-AQDS.

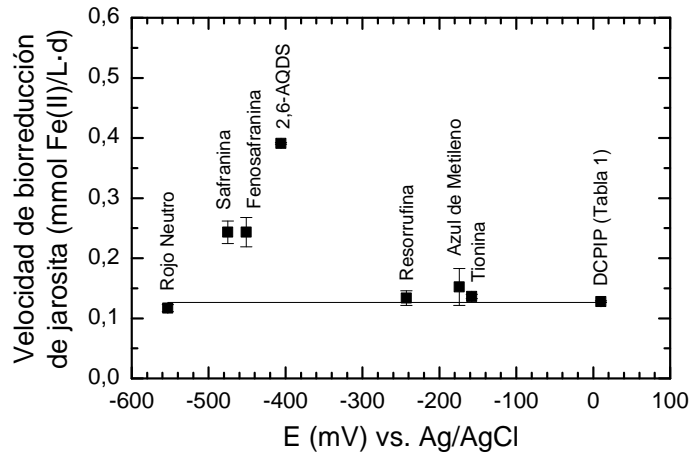


Figura 7.6: Velocidad media de biorreducción de jarosita por *A. hydrophila* (calculada a partir de la Figura 7.3) en función del potencial redox de los mediadores redox. La línea horizontal muestra la velocidad de biorreducción obtenida en los controles inoculados.

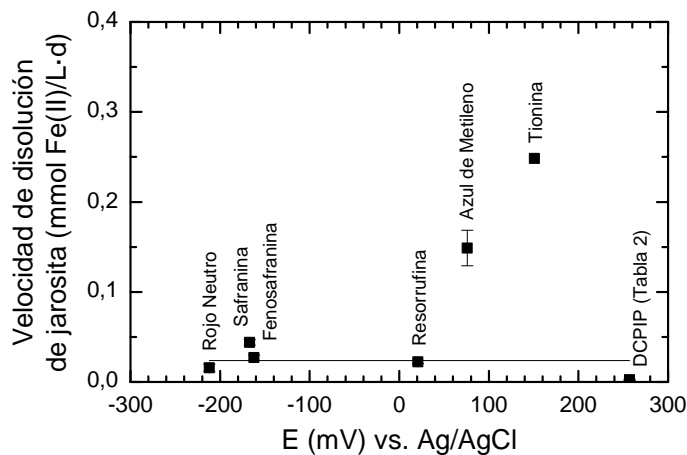


Figura 7.7: Velocidad media de disolución de jarosita por *A. cryptum* (calculada a partir de la Figura 7.4) en función del potencial redox de los mediadores redox. La línea horizontal muestra la velocidad de disolución obtenida en los controles inoculados.

Resultados similares han sido reportados para los microorganismos neutrófilos *Geobacter metallireducens* (Wolf et al., 2009), *Klebsiella pneumoniae* (Li et al., 2013), *Shewanella decolorationis* y otra cepa de *Aeromonas hydrophila* (Li et al., 2014); donde, centrándose principalmente en el estudio de derivados de la antraquinona, se ha encontrado que los más efectivos suelen tener potenciales en el rango de -300 a -100 mV vs. EEH, que comprende el intervalo determinado para *A. hydrophila*.

En la Figura 7.8 se muestran los potenciales redox de los mediadores en el diagrama de Pourbaix del sistema $\text{Fe-NH}_4^+-\text{S-O}_2-\text{CO}_2-\text{H}_2\text{O}$. En dicha figura se observa que los potenciales que resultaron útiles en ambos casos, los intervalos de

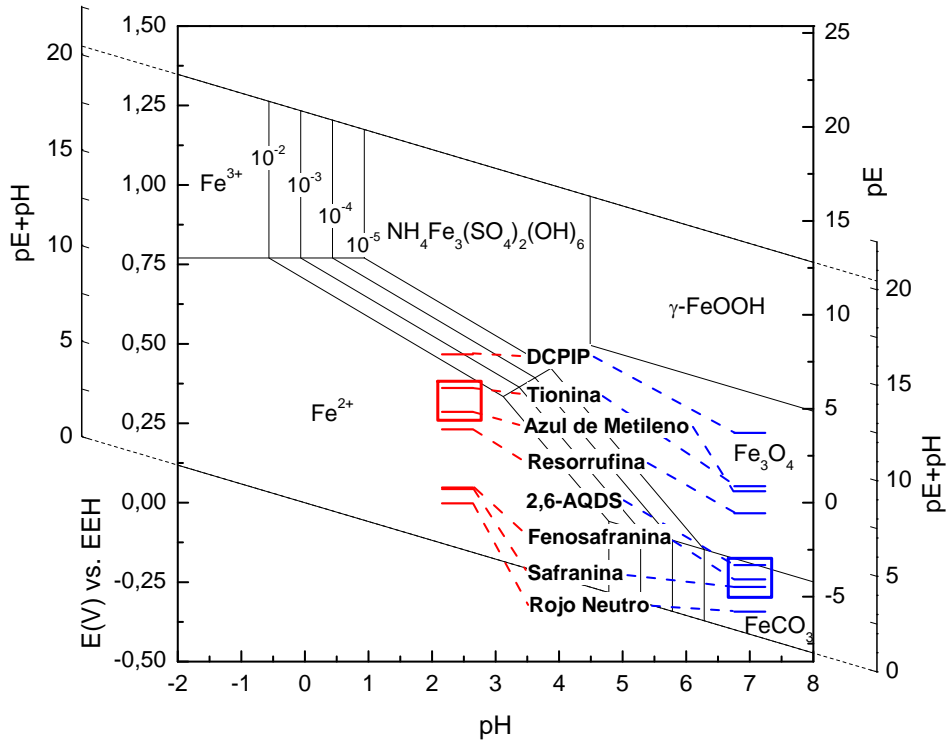


Figura 7.8: Diagrama de Pourbaix del sistema Fe-NH₄⁺-S-O₂-CO₂-H₂O. $a_{Fe} = 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}$ y 10^{-5} ; $P_{CO_2} = 1$ bar, $a_{NH_4^+} = a_{SO_4^{2-}} = 10^{-2}$. Los potenciales de los distintos mediadores se señalan a pH 2,4 en rojo y a 7,0 en azul. Los recuadros rojo y azul muestran los que generaron los mejores resultados en cada caso. La energía libre de Gibbs estándar de formación de la amoniojarosita fue obtenida de Gaboreau y Vieillard (2004), mientras que todos los datos termodinámicos restantes se obtuvieron de Langmuir (1997a).

-500 a -400 mV vs. Ag/AgCl (-290 a -190 mV vs. EEH) a pH neutro y 50 a 150 mV vs. Ag/AgCl (260 a 360 mV vs. EEH) a pH 2,4, se sitúan en los campos de las especies de Fe(II), FeCO₃ y Fe²⁺, respectivamente. Esto explicaría por qué los compuestos resorrufina, azul de metileno, tionina y DCPIP no resultaron útiles con *A. hydrophila*; lo que también sería aplicable al DCPIP en el caso de *A. cryptum*.

Resultados preliminares obtenidos haciendo crecer *A. cryptum* en medios similares a los empleados en el ensayo de biorreducción de jarosita (medio E suplementado con mediadores redox a una concentración de 100 μmol/L, Figura 7.9) han mostrado que los compuestos fenosafranina y rojo neutro no resultarían útiles debido a que esta bacteria no sería capaz de reducirlos, probablemente porque los electrones abandonen la célula a un potencial mayor a su potencial medio (Tabla 7.2). De este modo, tal como se había mencionado anteriormente, el rango de potenciales redox útiles estaría limitado inferiormente por el microorganismo.

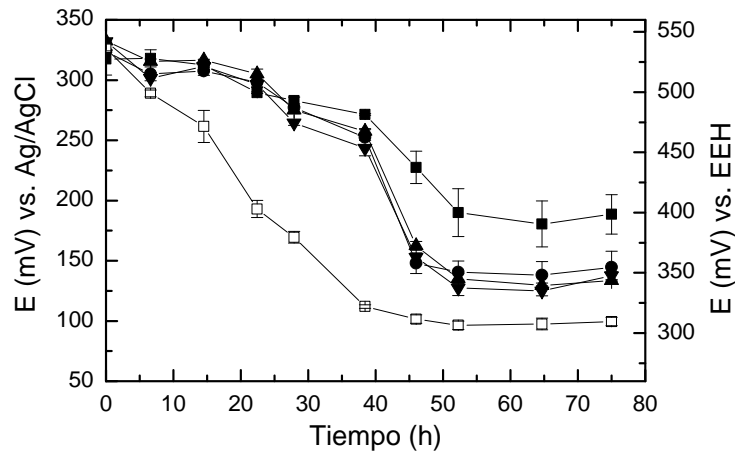


Figura 7.9: Perfiles de potencial redox en el cultivo de *A. cryptum* en presencia de mediadores redox: tionina (□), fenosafranina (▲), rojo neutro (▼) 2,6-AQDS (●) y en ausencia de mediadores (■). Las lecturas de pH se mantuvieron entre 2,3 y 2,5.

Finalmente, los resultados obtenidos en esta investigación permiten observar que la actuación de los mediadores no se relaciona necesariamente con la familia de compuestos a la que pertenecen, ya que, aunque el rojo neutro, la safranina y fenosafranina pertenecen a la misma familia (fenazinas), el primero de ellos no produjo el efecto positivo observado para los otros dos con *A. hydrophila*.

8 Tipos de agitación y trabajo en columnas

Considerando que en las secciones precedentes se han discutido las características básicas del proceso de disolución reductora de sólidos férricos, en la presente se estudian dos aspectos más relacionados con la implementación y escalamiento del proceso: la influencia del tipo de agitación y el desarrollo de un sistema basado en el trabajo con el mineral en columnas.

8.1 Materiales y métodos

8.1.1 Tipos de agitación

Los ensayos con distintos tipos de agitación se realizaron en viales, utilizando jarosita (sección 3.3) previamente desinfectada (sección 3.4), con una densidad de pulpa del 1 % (p/v) y en presencia del medio de cultivo E/Ox (sección 5.1). La inoculación de *A. cryptum* y el muestreo del sobrenadante se realizó según lo indicado en las secciones 3.5 y 3.6, respectivamente, con la salvedad de que en este caso los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente empleando las variantes de agitación descritas a continuación.

Se estudiaron cuatro casos: viales estáticos, incubador orbital (150 rpm), agitador magnético (250-350 rpm, Figura 8.1) y un rotor diseñado para la ocasión, que trabajaba de forma similar a los incorporados en las estufas o incubadoras de hibridación (40 rpm, Figura 8.2). Este rotor, fabricado en PVC y capaz de sostener viales de 100 mL en posición axial y radial, fue capaz de mantener los sólidos completamente suspendidos al girar en torno a 40 rpm. Respecto de la temperatura, todos los experimentos fueron realizados simultáneamente en un laboratorio que no



Figura 8.1: Barra magnética utilizada para la agitación.



Figura 8.2: Fotografías frontal y lateral del rotor construido, donde se observan dos viales en posición axial y seis en posición radial, sujetos estos últimos con una cinta de velcro.

disponía de un control de temperatura; cuando se usó el incubador orbital se tuvo la precaución de mantener desactivado el controlador de temperatura. Para monitorear esta variable se ubicaron termómetros de mercurio en la habitación ocupada por el laboratorio y en el interior del incubador orbital.

8.1.2 Experiencias en columnas

En los experimentos se utilizó un mineral de hematites, con tamaño de partícula entre 1 y 2 mm (sección 3.3), y tres medios de cultivo: E (sección 3.1), E/Ox (sección 5.1) y medio E suplementado con 100 $\mu\text{mol/L}$ de tionina (sección 7.1.2).

Las columnas, con un diámetro interno de 11 mm y altura de 30 cm, se llenaron con 20 g de mineral (ocupando cerca de un 50 % de la altura), tras lo que se desinfectó el sólido con etanol (sección 3.4). Cada columna se tapó y conectó a un reservorio para permitir la recirculación de la disolución lixiviante, 120 mL inicialmente, con un caudal cercano a los 35 mL/min, Figura 8.3. Es importante señalar que, pese a que la inoculación de *A. cryptum* y el muestreo no se realizaron en una cabina de flujo laminar, todo el material estaba inicialmente estéril (sección 3.4).

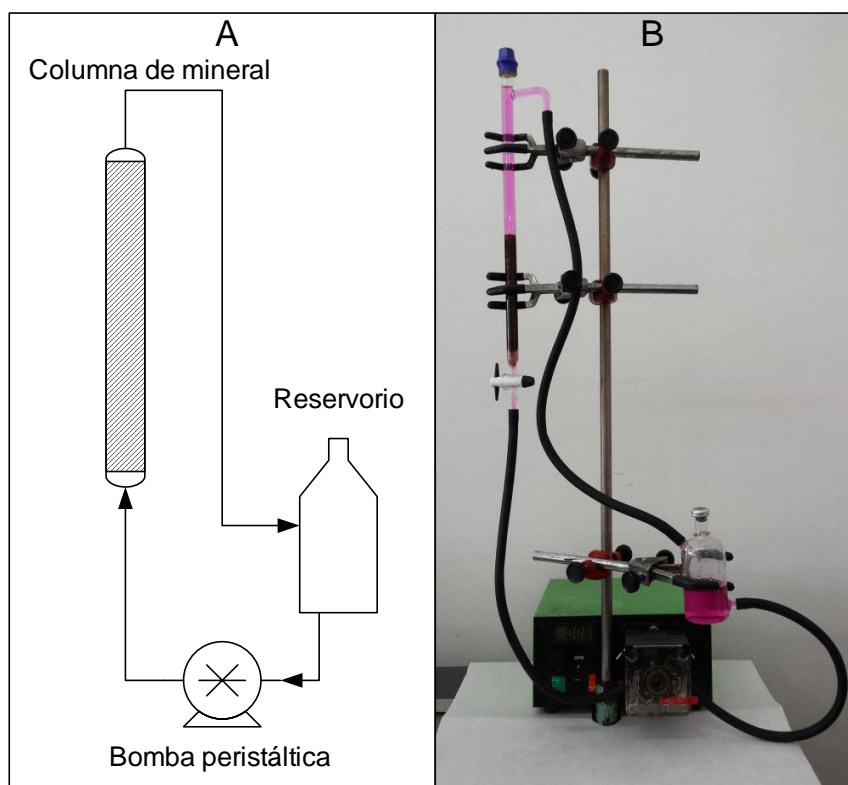


Figura 8.3: Esquema (A) y fotografía (B) del montaje experimental utilizado para las experiencias en columnas. El líquido ha sido coloreado de magenta para mejorar su identificación.

Los reservorios se inocularon mediante jeringuillas, de manera análoga a la descrita en la sección 3.5. De un modo similar al detallado en la sección 3.6, 2 mL de licor lixivante fueron removidos periódicamente utilizando jeringuillas estériles, reemplazando el volumen de muestra con una cantidad equivalente de mezcla de gases $\text{CO}_2:\text{N}_2$ estéril. Cabe destacar que, en determinados momentos, se midió la concentración de glucosa por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico, según se describe en el Apéndice VI.

8.2 Resultados y discusión

8.2.1 Tipos de agitación

La agitación orbital empleada en la experimentación anterior (incubador orbital a 150 rpm) era incapaz de mantener el sólido en suspensión, produciéndose su sedimentación en el interior de los viales poco tiempo después de que éstos se introdujesen en el equipo; no obstante, el líquido sobrenadante se apreciaba homogéneo. Estas observaciones motivaron que se ensayaran distintos tipos de agitación a fin de determinar las mejores condiciones para el proceso. Para la

agitación magnética, se seleccionó un agitador de sección triangular (Figura 8.1), recomendado para la disolución de sólidos y la mezcla de sedimentos. Adicionalmente, tomando como base el fundamento del reactor Biorotor® (Loi et al., 1995), se construyó un rotor, similar a los de las estufas de hibridación, capaz de agitar el contenido de los viales al girar sobre su eje horizontal (Figura 8.2).

Los perfiles de Fe_{Total} y $Fe(II)$ obtenidos con estos experimentos, Figura 8.4, muestran que la menor velocidad de disolución se obtuvo en los viales estáticos, mientras que empleando agitación orbital logró duplicar ésta velocidad; similar a lo reportado por Royer et al. (2003). Cabe señalar que se consideró despreciable el hecho de que el incubador estuviese trabajando en el entorno de 3 ± 1 °C sobre la temperatura ambiente.

Se ha reportado que los principales objetivos de la agitación en un proceso de fermentación son: mantener en suspensión los microorganismos, mejorar la transferencia de calor y masa, y favorecer el intercambio gaseoso (Dutta, 2008). Esto explica que en los viales estáticos el líquido permaneciera transparente hasta el

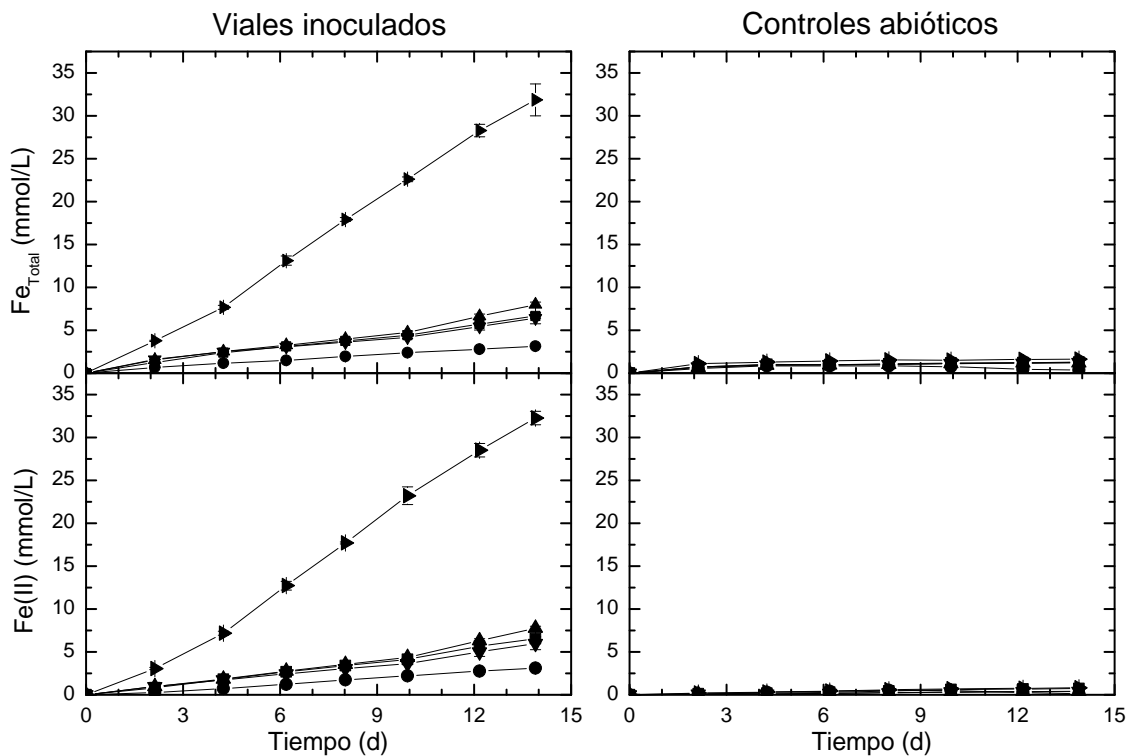


Figura 8.4: Perfiles de Fe_{Total} y $Fe(II)$ obtenidos en la experiencia con distintos tipos de agitación. Viales estáticos (●), incubador orbital (■), agitador magnético (►), posiciones radiales (▲) y axiales (▼) en el rotor construido.

momento de su homogenización. Tras ésta, el líquido adquiriría un tono amarillo opaco, por la jarosita suspendida, que rápidamente se tornaba blanquecino debido al mayor tiempo que tardaban las bacterias en sedimentar. Asimismo, en los viales con agitación orbital, el tono blanquecino del sobrenadante, tras la sedimentación de la jarosita, evidenció la capacidad del incubador orbital para mantener suspendidos los microorganismos pero no el mineral, dada su mayor densidad.

Respecto de los otros tipos de agitación, los viales que se encontraban en posiciones radiales y axiales en el rotor presentaron curvas similares entre sí, y casi coincidentes con las obtenidas en los viales con agitación orbital, demostrando que el proceso no mejoraba cuando el sólido pasa a estar completamente suspendido. Sin embargo, cuando se utilizó agitación magnética sí se obtuvo un significativo incremento en la velocidad de disolución de la jarosita, aproximadamente cinco veces superior a la obtenida en el incubador orbital. Respecto de los controles abióticos, la presencia de oxalato en el medio produjo una leve disolución química de la jarosita, similar en todos ellos, donde se alcanzaron concentraciones máximas de Fe_{Total} cercanas a 1,5 mmol/L.

Durante el transcurso del experimento se evidenció que aquellos viales sometidos a agitación magnética, independiente de si estaban inoculados o no, desarrollaron un color amarillo pálido y que, tras su agitación, el sólido contenido en éstos demoraba más tiempo en sedimentar, Figura 8.5. Considerando que: (1) cuando se reduce el tamaño de partícula de los óxidos de hierro el color se torna generalmente más pálido (Torrent y Barrón, 2002) y (2) las partículas pequeñas tardan más tiempo en sedimentar dada la menor velocidad con la que caen en un medio viscoso (ecuación 8.1, derivada de la Ley de Stokes, donde D_p es el diámetro de la partícula, g la fuerza de gravedad, μ la viscosidad dinámica del medio, ρ_p y ρ_l la densidad de la partícula y del medio, respectivamente), se conjeturó que el tamaño de partícula de la jarosita magnéticamente agitada había disminuido.

$$v = \frac{(\rho_p - \rho_l) \cdot D_p^2 \cdot g}{18 \cdot \mu} \quad (8.1)$$

Para establecer si esta presunción era verdadera se estudió el residuo de los controles abióticos, debido a que presentaron un grado de disolución bajo y similar entre todos ellos. La Figura 8.6 muestra que todos los residuos poseían una

Tipos de agitación y trabajo en columnas

distribución de tamaño de partícula similar entre sí y muy semejante a la del material de partida, exceptuando el del experimento con agitación magnética. Para este último, se observó una distribución de tamaño más estrecha y con un tamaño medio de partícula significativamente menor. Similar información se obtuvo mediante microscopía electrónica (Figura 8.7), donde la observación del residuo de jarosita magnéticamente agitado tuvo que realizarse bajo mayores aumentos que el resto

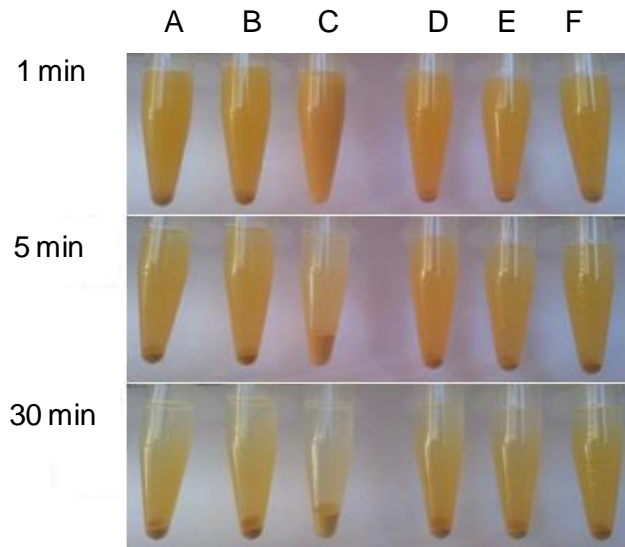


Figura 8.5: Sedimentación de los residuos de jarosita a los 1, 5 y 30 min. Viales estáticos (A), incubador orbital (B), agitador magnético (C), posiciones radiales (D) y axiales (E) del rotor construido, comparadas con el material sin tratar (F).

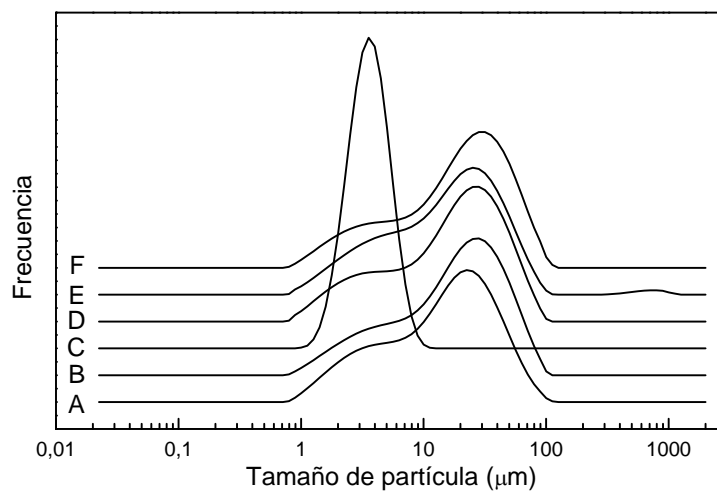


Figura 8.6: Distribución de tamaño de partícula de los residuos abióticos de jarosita en viales estáticos (A), incubador orbital (B), agitador magnético (C), posiciones radiales (D) y axiales (E) del rotor construido, comparadas con el material sin tratar (F).

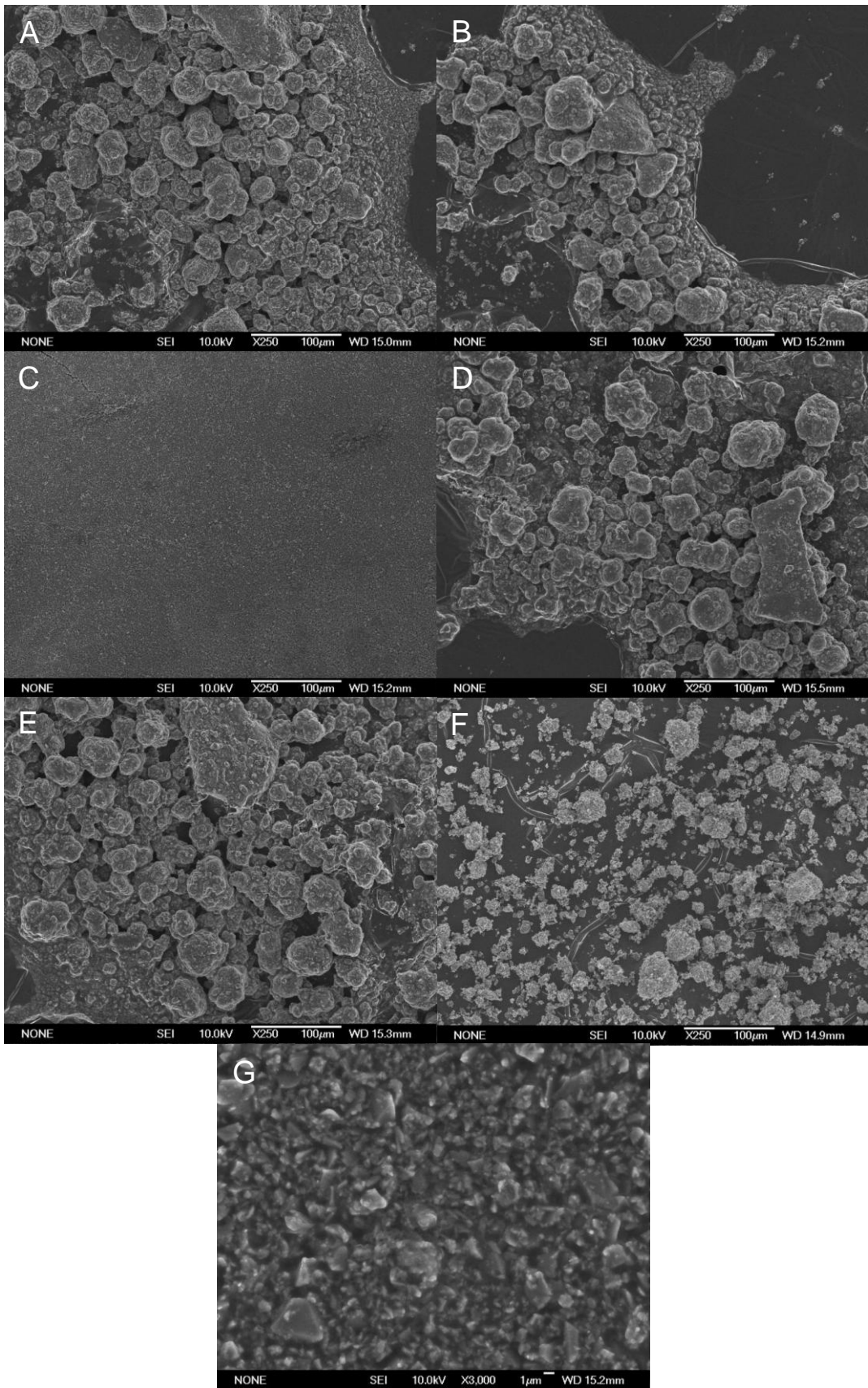


Figura 8.7: Micrografías electrónicas de barrido de los residuos del ensayo con distintos tipos de agitación. Viales estáticos (A), incubador orbital (B), agitador magnético (C x250 y G x3000), posiciones radiales (D) y axiales (E) del rotor construido, comparadas con el material sin tratar (F).

por el menor tamaño de las partículas. De este modo se corroboró que la agitación magnética provocó la molienda o disgregación de las partículas de jarosita, lo que habría incrementado la velocidad de disolución producto de la mayor área expuesta. De este modo, dicha velocidad no estaría determinada por un fenómeno de transferencia de masa, según se ha apuntado previamente (Royer et al., 2003), sino por el área superficial.

El elevado grado de disolución registrado para la jarosita en los viales inoculados con agitación magnética (Figura 8.4) permitió observar la relación entre el consumo de ácido y el hierro extraído, Figura 8.8. Considerando que: (1) se utilizó glucosa como fuente de carbono, (2) no se observó la aparición de nuevas fases cristalinas (datos no mostrados) y (3) la concentración de hierro disuelto superó ampliamente la de oxalato del medio E/Ox, se propuso la reacción 8.2 para describir la disolución de la jarosita. Esta reacción puede justificarse con la Figura 8.8 donde se muestra que las cantidades de hierro extraído y de H₂SO₄ consumido se aproximaron a la línea trazada, que representa la relación 1:2 entre el hierro extraído y H₂SO₄ consumido, tal como lo refleja la expresión 8.2. Finalmente, tal como se mencionó en la sección 5, la tendencia al alza de los datos en la Figura 8.8 sería atribuible al método de control de pH empleado.

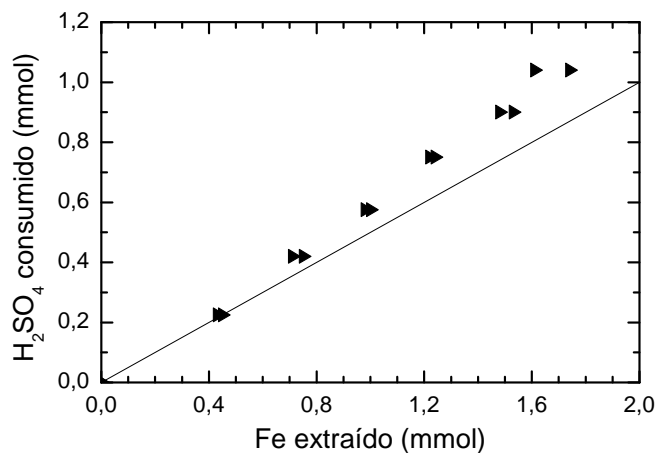
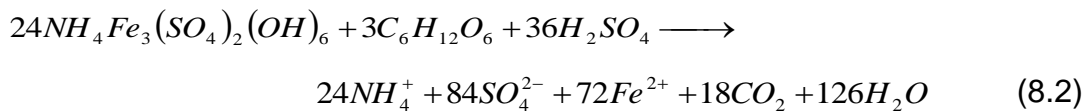


Figura 8.8: Relación entre hierro extraído y H₂SO₄ consumido en la disolución reductora de jarosita en los viales con agitación magnética.

8.2.2 Experiencias en columnas

La Figura 8.9 exhibe los perfiles de Fe_{Total} , $Fe(II)$, $pE+pH$ y pH obtenidos en el experimento de disolución reductora del mineral de hematites en columnas. Las zonas de crecimiento y disminución del Fe_{Total} mostradas en la Figura 8.9A se correspondieron, respectivamente, con los valles y picos de la curva $pE+pH$, Figura 8.9C. Este comportamiento podría estar relacionado con la concentración de glucosa en el medio, ya que los picos en las curvas de $pE+pH$ coincidieron con momentos en los que la concentración de glucosa era nula; por el contrario, las condiciones se tornaban significativamente más reductoras inmediatamente después de cada adición de glucosa.

Dado que *Acidiphilium cryptum* es capaz de utilizar O_2 y/o $Fe(III)$ como aceptor final de electrones (Küsel et al., 2002), este comportamiento oscilatorio podría deberse a infiltraciones de O_2 atmosférico en el sistema, que pueden asumirse similares para los tres ensayos. De este modo, en presencia de glucosa el microorganismo consumiría el O_2 disuelto y generaría un ambiente reductor, evidenciado por una disminución en el valor de $pE+pH$, lo que causaría el incremento de la concentración de Fe_{Total} , principalmente en forma de $Fe(II)$. Mientras hubiera glucosa en disolución, el microorganismo podría seguir reduciendo el O_2 que ingresara en el sistema y mantener las condiciones reductoras. Tras el agotamiento de la glucosa, el continuo ingreso de O_2 atmosférico provocaría el incremento del $pE+pH$ y la oxidación del $Fe(II)$ a $Fe(III)$, que podría hidrolizarse y precipitar.

Aunque no se han encontrado muchos antecedentes bibliográficos semejantes, se puede citar un hecho similar en los experimentos en columna llevados a cabo por Eisele (2005). En ellos, tras la adición del donante de electrones (sacarosa en su caso), se superaba el estancamiento en la solubilización. Sin embargo, dado que dicho experimento se realizó empleando neutrófilos, los autores atribuyeron este comportamiento a la pérdida del CO_2 generado y no al ingreso de O_2 . En otros experimentos se ha utilizado un flujo continuo de gas para mantener la condición anóxica (Hallberg et al., 2011) o se ha optado por no retirar el O_2 (Johnson, 2012). Cabe la posibilidad de que dicha diferencia esté asociada al modo de operación o a las especies microbianas involucradas, ya que en el experimento de Hallberg et al. (2011), desarrollado en lotes con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, se burbujeó

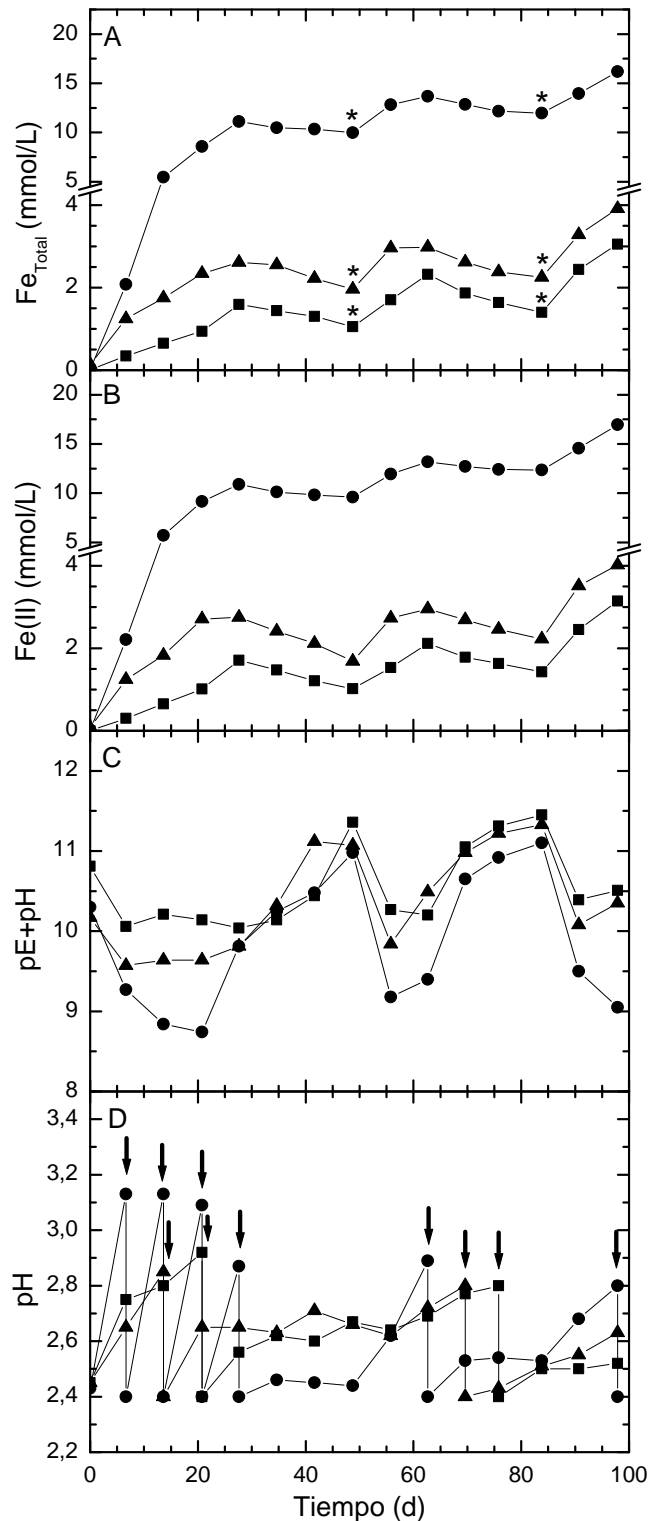


Figura 8.9: Perfiles de Fe_{Total}, Fe(II), pE+pH y pH de los ensayos de disolución reductora del mineral de hematites en columnas en los medios: E (■), E/Ox (▲) y E suplementado con tionina 100 μmol/L (●). Las flechas señalan las sucesivas adiciones de H₂SO₄, y los asteriscos muestran los momentos en que se adicionó glucosa dado que su análisis arrojó concentraciones nulas (menores al límite de detección).

nitrógeno libre de oxígeno, mientras que en la experiencia llevada a cabo por Johnson (2012), donde se utilizó *Acidiphilium* SJH con un ingreso continuo de medio con sustrato (glicerol), no se removi6 el O₂. Al respecto, este 6ltimo autor se6ala que la utilizaci6n de un exceso de glicerol promueve condiciones microaerobias que favorecen la reducci6n de hierro por parte de *Acidiphilium* SJH, afirmaci6n cuestionable ya que este tipo de condiciones no est6n dadas por un exceso de sustrato sino por un aporte limitado de O₂ que permite mantener una baja tensi6n de ox6geno disuelto (Trotter et al., 2011, Zeng y Deckwer, 1996).

Finalmente, al comparar los resultados obtenidos en los tres medios estudiados, se aprecia que la adici6n de oxalato acrecent6 levemente la disoluci6n de este mineral, similar a lo visto previamente en la Figura 6.4, mientras que la incorporaci6n de tionina caus6 un dr6stico incremento en la disoluci6n de la hematites. Este comportamiento podr6a ser atribuido a que el ambiente m6s reductor se logra en el medio E suplementado con tionina, seguido por los medios E/Ox y E en 6ltimo lugar (Figura 8.9C).

9 Biolixiviación de minerales de manganeso

Según se menciona en la sección 1, las bacterias reductoras de hierro podrían ser también utilizadas para facilitar la recuperación de otros metales a partir de sus correspondientes minerales. Por esta razón, y dada la factibilidad de utilizar la lixiviación reductora en la obtención de níquel y manganeso (sección 2.2.2), se probó la capacidad de *A. cryptum* JF-5 para llevar a cabo la biolixiviación de este último metal. En este grupo de experimentos se emplearon dos minerales de manganeso con distinta ley para estudiar variables como la incorporación al medio de hierro y la de ligandos o mediadores redox.

9.1 Materiales y métodos

9.1.1 Minerales de manganeso utilizados

En este estudio se empleó un mineral de manganeso proveniente de Brasil y otro de Costa de Marfil, ambos con un tamaño de partícula menor a 0,090 mm; sus respectivas composiciones se presentan en la Tabla 9.1. Los minerales de manganeso se clasifican, según la riqueza en dicho elemento, en tres grupos: los de alta ley (44 – 48 %), los de ley media (35 – 44 %) y los de baja ley (25 – 35 %) (Das et al., 2011). Considerando esta información, el sólido proveniente de Costa de Marfil correspondería a un mineral con baja ley de manganeso, mientras que el de Brasil sería un mineral con un contenido marginal de este metal.

Tabla 9.1: Composición de los minerales de manganeso usados en este estudio (% p/p).

Elemento	Mineral de Brasil		Mineral de Costa de Marfil	
	XRF	Digestión ácida	XRF	Digestión ácida
Mn	7,25	7,56±0,08	24,03	25,1±0,2
Fe	25,09	24,4±0,0	11,09	9,86±0,08
Si	23,97	-	14,17	-
O	36,96	-	37,75	-
Al	5,60	-	10,14	-
K	0,47	-	1,34	-

9.1.2 Capacidad de *Acidiphilium cryptum* para lixiviar minerales de manganeso en medios con y sin hierro

En estos experimentos se empleó el medio E (sección 3.1) y una variante de éste suplementada en un 1 % (v/v) con una disolución de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 200 mmol/L, de modo que su concentración de Fe(II) fuese 2 mmol/L, de manera similar a lo descrito en la sección 6.1.2. Tras ajustar el pH de ambos medios a 2,4, se esterilizaron mediante autoclave y filtración, respectivamente (sección 3.2).

Las experiencias se realizaron en dos etapas, con una densidad de pulpa del 1 % (p/v) (en viales estériles de 100 mL), usando los medios E y E suplementado con Fe(II). Previo al experimento, los sólidos se desinfectaron con etanol según se describió en la sección 3.4. La inoculación y muestreo se llevó a cabo según se indicó en las secciones 3.5 y 3.6, respectivamente. Al respecto, cabe destacar que se empleó una población inicial de $1 \cdot 10^8$ células/mL, se controló el pH cuando su lectura fue cercana o mayor a 2,8, y se determinó la concentración de manganeso total (Mn_{Total}) en las muestras aciduladas mediante absorción atómica.

9.1.3 Biolixiviación de manganeso en presencia de oxalato

Según lo descrito en la sección precedente, en este caso se probó la lixiviación del mineral proveniente de Brasil en los medios E/Ox (sección 5.1) y E/Ox suplementado en un 1 % con una disolución de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 200 mmol/L, de modo que su concentración de Fe(II) fuese 2 mmol/L. En ambos casos, los medios se esterilizaron por filtración tras ajustar su pH a 2,4 (sección 3.2).

Los ensayos se realizaron con una densidad de pulpa del 1 % (p/v) en viales estériles, previa desinfección del sólido con etanol (secciones 3.3 y 3.4). La inoculación se efectuó con una población inicial de *A. cryptum* de $1 \cdot 10^8$ células/mL (sección 3.5). Finalmente, durante el muestreo, llevado a cabo de acuerdo a la sección 3.6, también se iba midiendo la concentración de manganeso total en las muestras aciduladas mediante absorción atómica, además de controlar el pH.

9.1.4 Biolixiviación de manganeso en medios con mediadores redox

En la realización de estos experimentos de lixiviación se empleó el mineral de Brasil y los mediadores redox azul de metileno y tionina, los cuales se llevaron a cabo de modo análogo al reseñado en las secciones anteriores. Los medios se prepararon

suplementando el medio E (sección 3.1), en un 1 % (v/v), con disoluciones de azul de metileno y tionina 10 mmol/L, de modo que la concentración final de éstos compuestos fuese de 100 $\mu\text{mol/L}$ (sección 7.1.2). Tras ajustar el pH a 2,4, se procedió a su esterilización por filtración (sección 3.2).

El mineral se desinfectó según se detalla en la sección 3.4, llevando a cabo los ensayos con una densidad de pulpa del 1 % (p/v). La inoculación de los viales se realizó acorde a lo expuesto en la sección 3.5, con una población inicial de $1 \cdot 10^8$ células/mL, mientras que la sección 3.6 describe la metodología de muestreo. Al respecto de esta última, cabe destacar que también se determinó la concentración de manganeso total en las muestras aciduladas mediante absorción atómica y que durante el curso del experimento se controló periódicamente el pH.

9.2 Resultados y discusión

9.2.1 Capacidad de *Acidiphilium cryptum* para lixiviar minerales de manganeso en medios con y sin hierro

En el medio ambiente el manganeso puede encontrarse como Mn(II), una forma altamente soluble en agua (Mn^{2+}), o como Mn(III) y Mn(IV), especies con gran tendencia a formar óxidos insolubles. Valiéndose de este comportamiento, en varios estudios, se ha identificado al Mn(II) como aquella especie capaz de pasar por un filtro de 0,2 - 0,4 μm , mientras que se asume que el Mn(III,IV) es el que queda retenido en él (Tebo et al., 2010).

Los perfiles de manganeso y hierro totales (Mn_{Total} y Fe_{Total} , respectivamente) obtenidos en los experimentos donde se probaba la capacidad de *Acidiphilium cryptum* JF-5 para biolixiviar el primero de estos metales se muestran en la Figura 9.1. Adicionalmente, los resultados obtenidos para ambos sólidos empleando el medio E suplementado con hierro se presentan en las Figuras 9.2 y 9.3. Como puede observarse en estas figuras, en todos los casos, la presencia de *A. cryptum* incrementó la velocidad de lixiviación de manganeso, lo que constituye, según la información disponible, el primer reporte sobre la capacidad de dicha bacteria para promover la lixiviación de este metal.

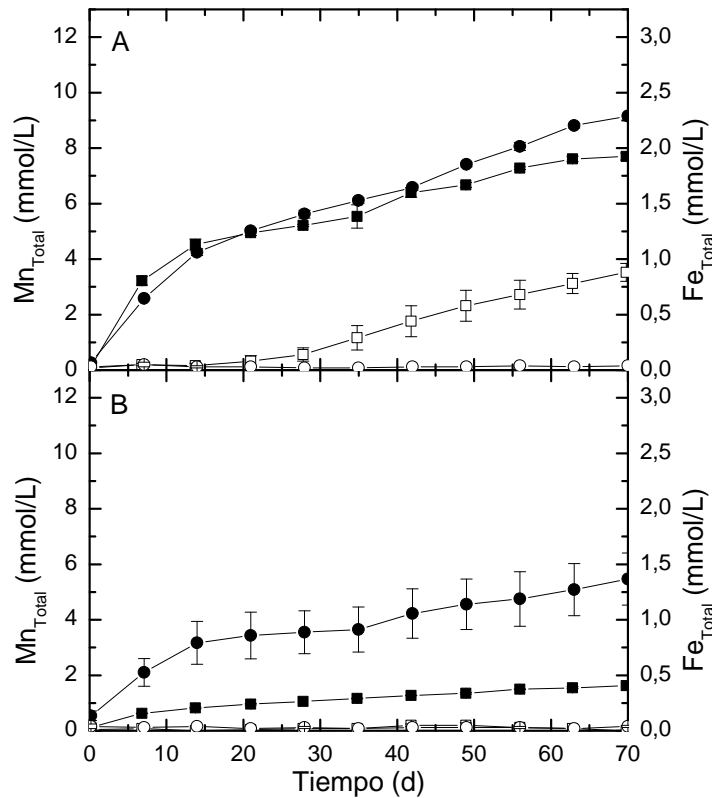


Figura 9.1: Biolixiviación de manganeso por *Acidiphilium cryptum* en medio E (A) comparada con su lixiviación química (abiótica) en el mismo medio (B). Perfiles de Mn_{Total} (símbolos macizos) y Fe_{Total} (símbolos huecos) para los minerales procedentes de Brasil (■, □) y Costa de Marfil (●, ○).

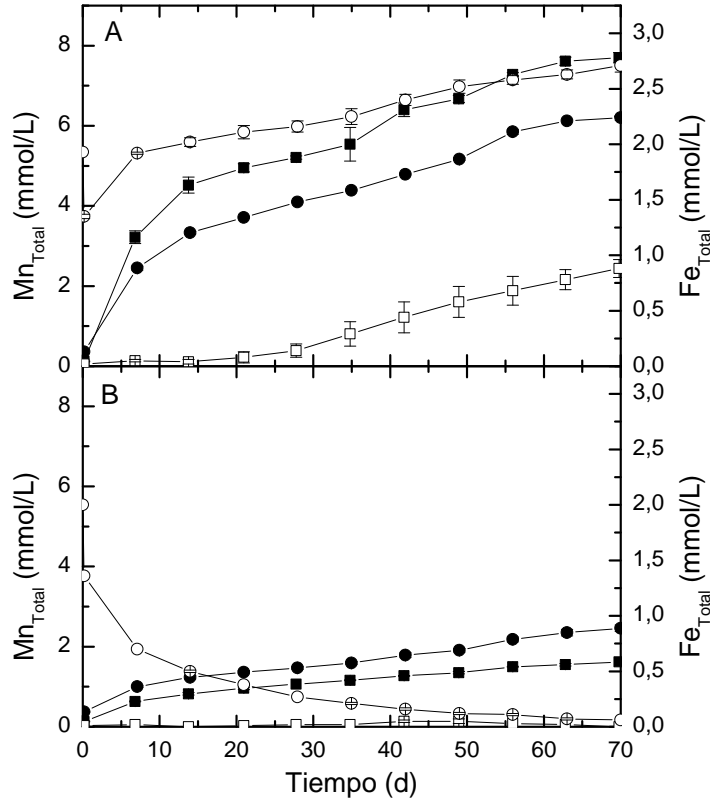


Figura 9.2: Biolixiviación de manganeso por *Acidiphilium cryptum* desde el mineral procedente de Brasil (A), comparada con su lixiviación química (B), en medio E sin suplementar (■, □) y suplementado con Fe(II) hasta una concentración de 2 mmol/L (●, ○). Perfiles de Mn_{Total} (símbolos macizos) y Fe_{Total} (símbolos huecos).

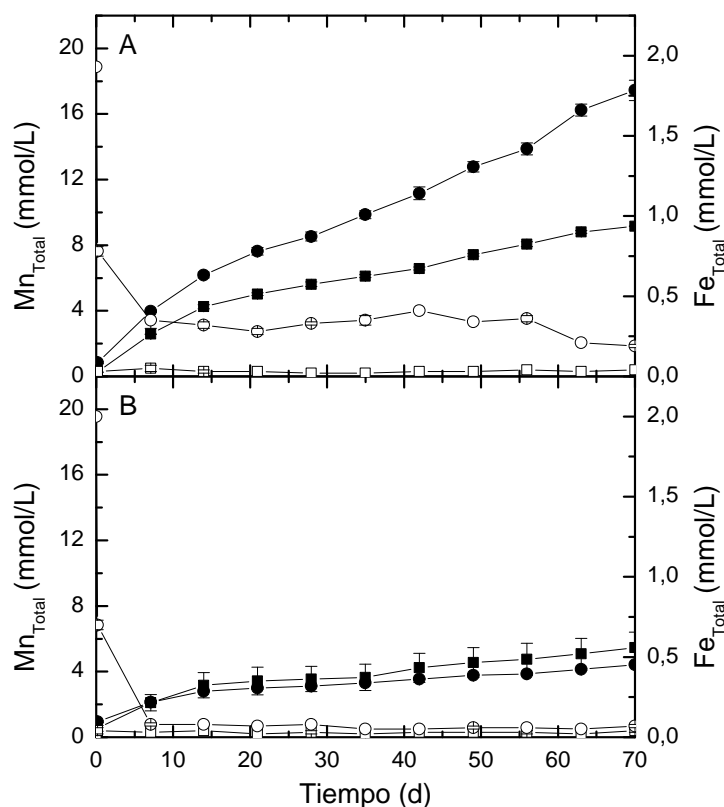


Figura 9.3: Biolixiviación de manganeso por *Acidiphilium cryptum* (A) desde el mineral procedente de Costa de Marfil, comparada con su lixiviación química (B), en medio E sin suplementar (■, □) y suplementado con Fe(II) hasta una concentración de 2 mmol/L (●, ○). Perfiles de Mn_{Total} (símbolos macizos) y Fe_{Total} (símbolos huecos).

En la literatura es posible encontrar algunos casos de lixiviación microbiana de manganeso desde minerales (Xin et al., 2015), nódulos marinos (Lee et al., 2001) y residuos electrolíticos de este metal (Xin et al., 2011). Aunque en algunos casos se han usado microorganismos que producen ácidos orgánicos (Acharya et al., 2003), en otros se han empleado bacterias capaces de oxidar hierro y azufre (Duan et al., 2011), similares a las utilizadas en el proceso Ferredox (du Plessis et al., 2011).

Lovley et al. (2004) han señalado que casi todos los microorganismos reductores de hierro también son capaces reducir Mn(IV), según lo representado en la Figura 2.6A desde un punto de vista termodinámico. Considerando que dicho proceso puede ocurrir por transferencia de electrones hasta el óxido de manganeso o bien mediante la formación de compuestos reductores resultantes del metabolismo microbiano (Zhang y Cheng, 2007), para esta bacteria probablemente suceda lo primero, dado que no se ha detectado la generación de productos de fermentación (Küsel et al., 1999).

La adición de Fe(II) afectó de distinto modo la cinética de biolixiviación de ambos minerales. En el caso del mineral procedente de Brasil (ley marginal, Figura 9.2) la incorporación de Fe(II) tuvo un doble efecto negativo, provocando una leve disminución en la velocidad de liberación de manganeso y reduciendo de ~ 20 días a menos de 10 días la primera etapa del proceso, donde el manganeso se disuelve selectivamente respecto del hierro. Esto tal vez se deba a la precipitación del hierro en los primeros momentos, que podría haber bloqueado algunos de los sitios en los que ocurre la disolución. Por el contrario, la incorporación de Fe(II) tuvo un efecto positivo en la biolixiviación del mineral procedente de Costa de Marfil (baja ley, Figura 9.3), aumentando significativamente la velocidad de disolución del manganeso. Dicho incremento en la velocidad podría explicarse por el establecimiento de un mecanismo indirecto de disolución, donde el Fe(II) sería capaz de reducir abióticamente al Mn(IV) tras oxidarse hasta Fe(III); posteriormente, se produciría la regeneración del Fe(II) a partir del Fe(III) por acción microbiana (Lovley et al., 2004). Respecto de la selectividad del proceso de biolixiviación, ésta será discutida en la sección 9.2.3 considerando todos los resultados.

La Figura 9.1A muestra que, pese a la diferente procedencia y contenido de manganeso de los minerales de Brasil y Costa de Marfil, éstos generaron perfiles de Mn_{Total} similares. Dada la escasa posibilidad de que ambos sólidos presenten reactividades y áreas superficiales semejantes, este fenómeno podría deberse a que la cinética del proceso estuvo determinada por variables que fueron parecidas en ambos casos: el medio empleado, la población bacteriana inicial, o el mecanismo de disolución que haya tenido lugar.

La Figura 9.1B muestra que ambos minerales se disolvieron ligeramente en condiciones abióticas. El hecho de que, bajo estas condiciones, el mineral procedente de Costa de Marfil lo hiciese con una velocidad levemente mayor tal vez se deba a su mayor contenido en manganeso (Tabla 9.1); aunque también podrían estar involucrados factores como la presencia de impurezas, el tamaño de partícula (aunque en ambos casos éste era menor a 0,090 mm dicho mineral quizá contenga una mayor cantidad de finos), el grado de cristalinidad, etc.

9.2.2 Biolixiviación de manganeso en presencia de oxalato

Considerando que ciertos ligandos pueden mejorar la disolución reductora de algunos sólidos férricos (sección 6), se probó si la incorporación de oxalato tenía algún efecto sobre la biolixiviación de los minerales de manganeso, tomando para dicho estudio el procedente de Brasil. Las Figuras 9.4 y 9.5 presentan los resultados obtenidos en estos experimentos.

La Figura 9.4A muestra que, en ausencia de hierro disuelto, el oxalato no afectó la velocidad de biolixiviación de manganeso por *A. cryptum*, aunque sí mejoró la selectividad de la reacción. Por otra parte, cuando el medio contenía inicialmente hierro en disolución (Figura 9.4B), la incorporación de oxalato provocó que la velocidad de disolución del manganeso casi se duplicase, mientras que la del hierro se incrementó levemente.

Esta mayor velocidad de disolución podría deberse a la presencia de quelatos de hierro capaces de actuar como mediadores redox entre *A. cryptum* y el sólido (Schröder, 2007) o a la capacidad de este anión para facilitar la transferencia de

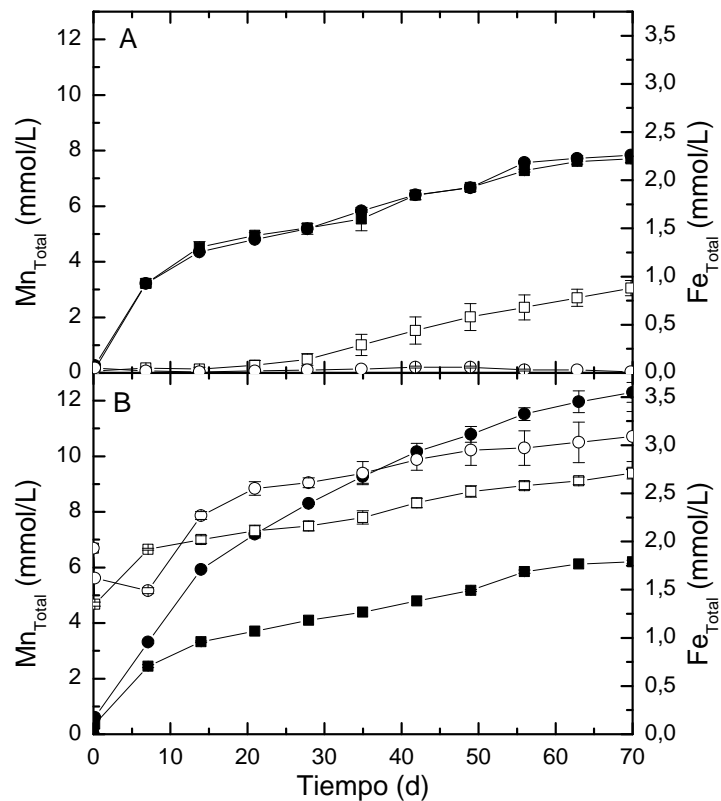


Figura 9.4: Biolixiviación de manganeso por *Acidiphilium cryptum* desde el mineral de Brasil en los medios E (■, □) y E/Ox (●, ○), sin (A) y con (B) hierro disuelto al comienzo. Perfiles de Mn_{Total} (símbolos macizos) y Fe_{Total} (símbolos huecos).

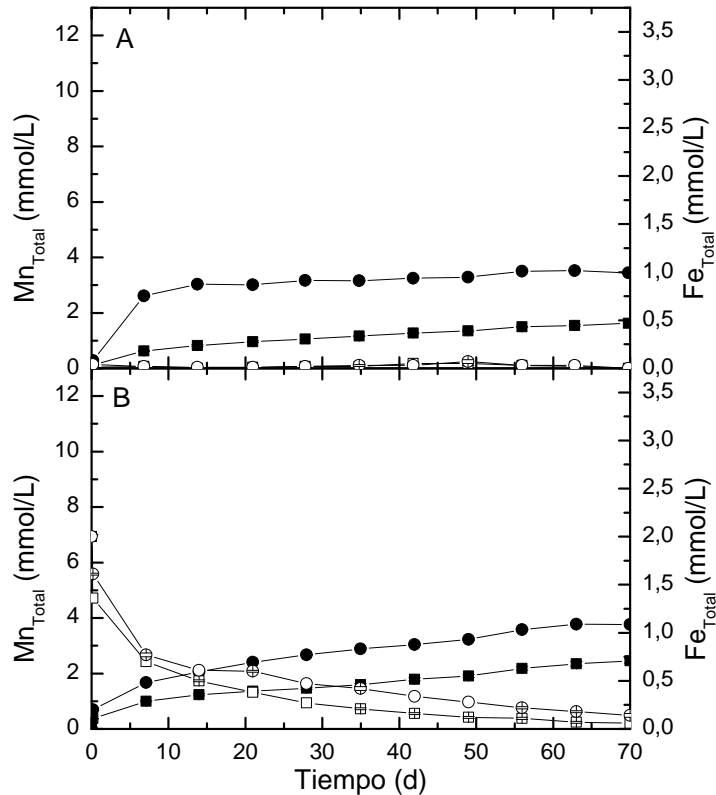


Figura 9.5: Lixiviación química de manganeso desde el mineral de Brasil en los medios E (■, □) y E/Ox (●, ○), sin (A) y con (B) hierro disuelto al comienzo. Perfiles de Mn_{Total} (símbolos macizos) y Fe_{Total} (símbolos huecos).

electrones desde iones reducidos en disolución hasta la superficie del mineral (Blesa et al., 1987, Panias et al., 1996b). Como se mencionó anteriormente, los aspectos relacionados con la selectividad del proceso se discutirán en la siguiente sección. Finalmente, los resultados obtenidos en los controles abióticos (Figura 9.5) revelan que la presencia de oxalato causó la disolución química del mineral, efecto que se vio disminuido cuando había hierro en disolución, probablemente porque parte del oxalato se encontraba formando complejos con los iones de este último metal.

9.2.3 Biolixiviación de manganeso en medios con azul de metileno y tionina, selectividad del proceso y consumo de ácido

Con estos experimentos se probó el efecto, sobre la biolixiviación del mineral de manganeso procedente de Brasil, de la adición de azul de metileno y tionina, mediadores redox que ya mostraron una influencia positiva en la acción de esta bacteria (sección 7.2.2). Los resultados obtenidos se presentan en las Figuras 9.6 y 9.7.

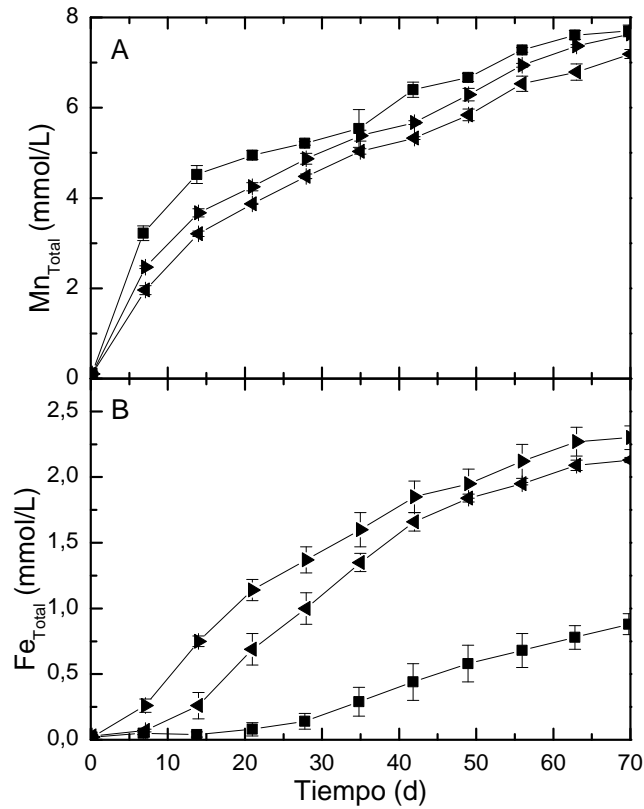


Figura 9.6: Biolixiviación de manganeso por *Acidiphilium cryptum* desde el mineral de Brasil en el medio E sin aditivos (■) y suplementado con azul de metileno (▴) y tionina (◄).

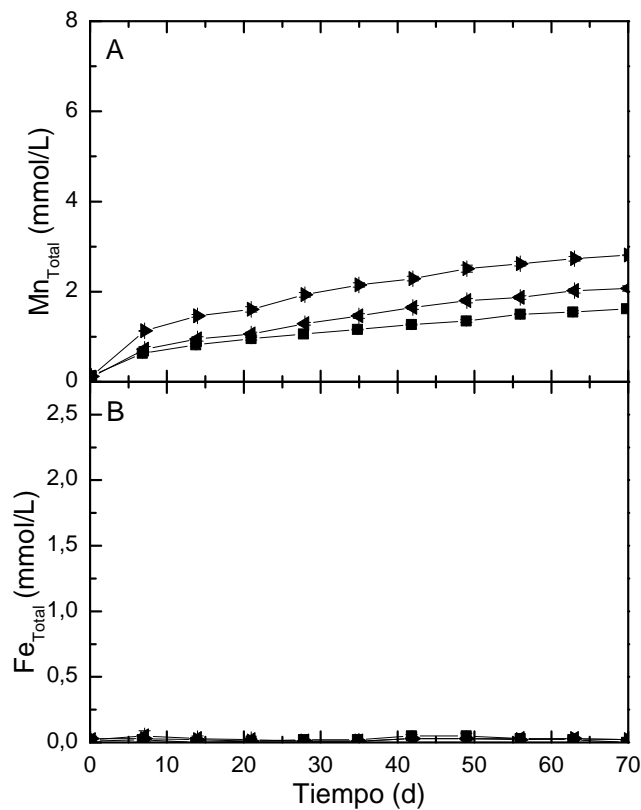


Figura 9.7: Lixiviación química de manganeso desde el mineral de Brasil en el medio E sin aditivos (■) y suplementado con azul de metileno (▴) y tionina (◄).

En los viales inoculados con *A. cryptum* (Figura 9.6) se observó que la incorporación de dichos mediadores tuvo un ligero efecto negativo sobre la velocidad de disolución del manganeso, mientras que ésta produjo un drástico incremento en la velocidad de disolución del hierro, perjudicando la selectividad del proceso. Los resultados obtenidos en condiciones abióticas (Figura 9.7) muestran que la incorporación de estos compuestos tuvo un efecto levemente positivo sobre la disolución del sólido, atribuible a la posibilidad de que los grupos funcionales presentes en estas moléculas le hayan conferido la posibilidad de formar quelatos (Pandey et al., 2000, Shapiro, 1964).

La Figura 9.8 permite analizar fácilmente la selectividad en la biolixiviación del manganeso frente a la de hierro para los distintos experimentos, ya que una gran especificidad en el proceso de extracción por el primer metal frente al segundo se representaría con una elevada tendencia de los puntos para disponerse de modo

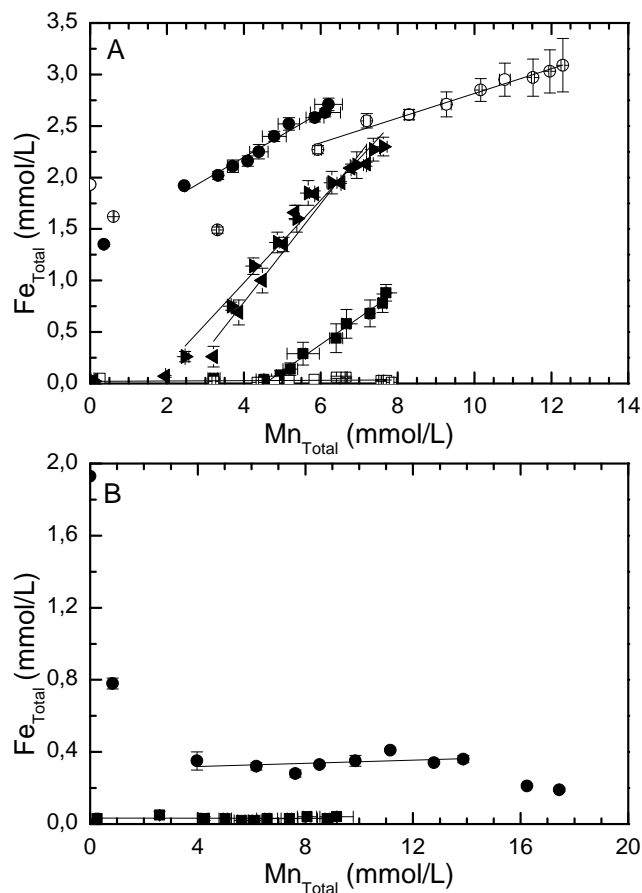


Figura 9.8: Relación entre la evolución del Mn_{Total} y Fe_{Total} en la biolixiviación de manganeso por *Acidiphilium cryptum* desde los minerales de Brasil (A) y Costa de Marfil (B) en los medios: E (■), E con hierro (●), E/Ox (□), E/OX con hierro (○), E suplementado con azul de metileno (▲) o tionina (▼).

horizontal, lo que se produjo especialmente en el caso del mineral de Costa de Marfil (Figura 9.8B). Debido a que la mayoría de los datos exhibieron un comportamiento lineal, la Tabla 9.2 muestra las pendientes y los coeficientes de determinación obtenidos en cada caso.

Tomando como referencia los resultados obtenidos con el medio E, se observa que la presencia de oxalato en el medio E/Ox tuvo un claro efecto positivo, debido a que el manganeso se disolvió significativamente, a la vez que los niveles de hierro disuelto resultaron marginales. Por otra parte, en presencia de los mediadores redox se obtuvieron mayores valores para las pendientes, lo que pone de manifiesto su efecto negativo en la disolución del manganeso frente a la del hierro.

Como se señaló anteriormente (sección 2.5), una reacción debe superar impedimentos termodinámicos y cinéticos, siendo los primeros observables en los diagramas de Pourbaix del hierro (Figura 5.2) y del manganeso (Figura 9.9). Comparando ambos, se aprecia que la disolución del hierro a un pH entre 2 y 3 requiere condiciones más reductoras que las del manganeso; por lo que bajos valores de pE+pH deberían conducir a la disolución de ambos óxidos, mientras que valores algo superiores permitirían que sólo se disolviesen los óxidos de manganeso.

La Figura 9.10 corrobora las afirmaciones obtenidas de este análisis termodinámico, ya que, para los medios que no contenían hierro, la especificidad del proceso disminuyó a medida que se registraron valores menores de pE+pH. Sin embargo, los resultados registrados en los medios suplementados con hierro no se ajustan a la explicación termodinámica anterior, ya que se alcanzaron selectividades mayores a

Tabla 9.2: Pendientes y coeficientes de determinación (r^2) de las rectas que ajustan los datos de Fe_{Total} respecto de Mn_{Total} (Figura 9.8).

Condición	Mineral de Brasil		Mineral de Costa de Marfil	
	Pendiente	r^2	Pendiente	r^2
Medio E	0,26	0,98	0,00	0,00
Medio E + 2 mmol/L Fe(II)	0,22	0,97	0,00	0,16
Medio E/Ox	0,00	0,05	-	-
Medio E/Ox + 2 mmol/L Fe(II)	0,12	0,98	-	-
Medio E + Azul de metileno	0,40	0,98	-	-
Medio E + Tionina	0,48	0,96	-	-

- Condiciones no probadas.

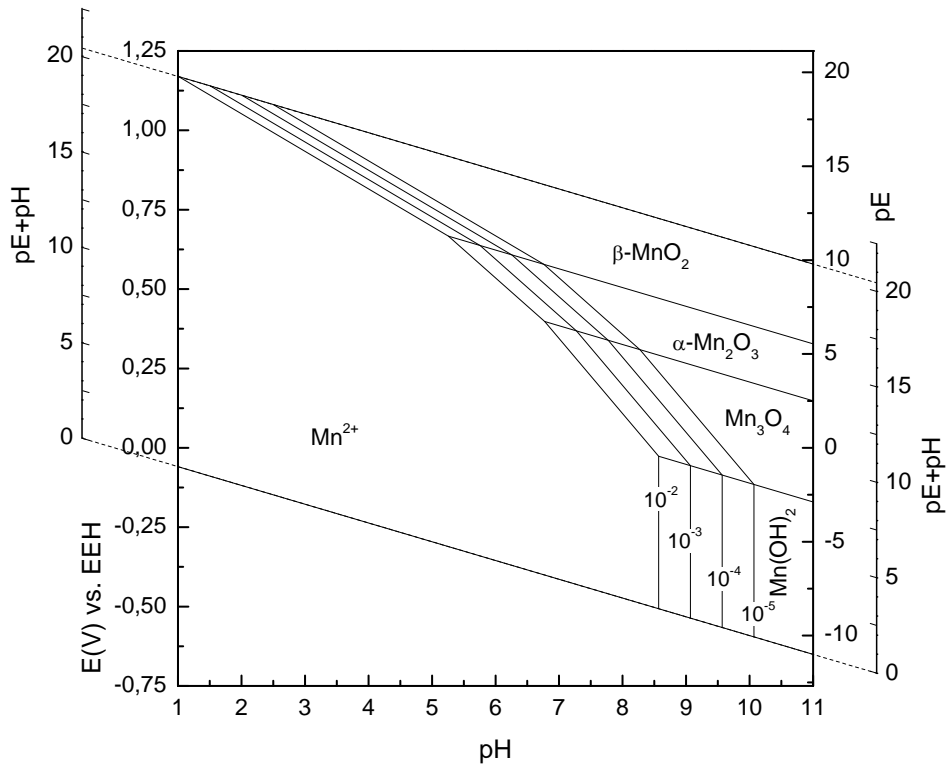


Figura 9.9: Diagrama de Pourbaix para el sistema Mn-O₂-H₂O. $a_{Mn^{2+}} = 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}$ y 10^{-5} . Los datos termodinámicos fueron obtenidos de Stumm y Morgan (1995a) y Langmuir (1997a).

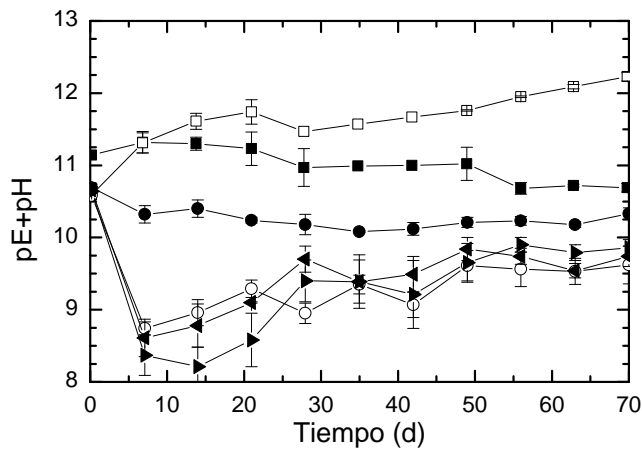


Figura 9.10: Perfiles de pE+pH en la biolixiviación de manganeso por *Acidiphilium cryptum* desde el mineral de Brasil en los medios: E (■), E con hierro (●), E/Ox (□), E/Ox con hierro (○), E suplementado con azul de metileno (▶) o tionina (◀).

la obtenida en el medio E pese a las menores lecturas de pE+pH. Esto apunta a que, en estos casos, podría adquirir mayor importancia un proceso distinto, como la disolución del óxido de manganeso por el Fe(II) presente (Tekin y Bayramoğlu, 1993).

Hasta el momento, se ha asumido que la concentración de manganeso total determinada en las muestras aciduladas con HCl se correspondía con aquella que se encontraba en disolución en el interior de los viales. Sin embargo, para descartar la posibilidad de que el HCl haya podido disolver partículas de mineral que no hubiesen sedimentado, se comparó la concentración de manganeso total de ocho muestras obtenida bien con el protocolo empleado en los experimentos anteriores (solo sedimentación) o bien con aquella registrada tras filtrar las muestras con una membrana con diámetro de poro de 0,2 μm (Tebo et al., 2010). Dado que los resultados conseguidos usando ambos métodos tuvieron una similitud del $99,7\pm 1,5\%$, se puede asumir con plena certeza que la metodología empleada permite una adecuada determinación del manganeso en disolución en el interior de los viales, presumiblemente en forma de Mn(II).

Finalmente, la Figura 9.11 muestra que, durante el proceso de biolixiviación, la disolución del manganeso y hierro estuvo directamente relacionada con el consumo de ácido. Por este motivo, la disolución específica del manganeso es deseable para disminuir los costes por el consumo de este reactivo (y probablemente de glucosa) y

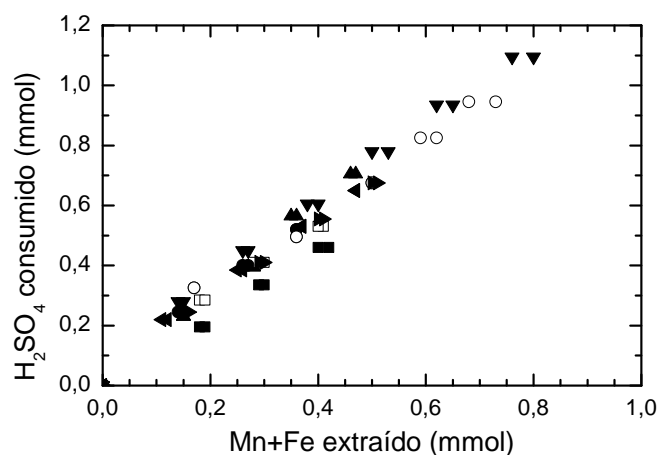


Figura 9.11: Relación entre hierro y manganeso extraídos con el H₂SO₄ consumido en la biolixiviación de minerales de manganeso. Mineral de Brasil en medios: E (■), E con hierro (●), E/Ox (□), E/Ox con hierro (○), E suplementado con azul de metileno (►) o tionina (◄). Mineral de Costa de Marfil en medio: E (▲) y E con hierro (▼).

Biolixiviación de minerales de manganeso

para incrementar la simplicidad del proceso. Esto último se relacionaría directamente con las etapas de purificación y concentración que puedan necesitarse en un proceso a escala industrial.

CAPÍTULO III: ANÁLISIS GLOBAL



10 Valoración general

A fin de facilitar la discusión general de todos los experimentos llevados a cabo, su análisis se desglosará en tres apartados: termodinámico, cinético y operacional.

10.1 Aspectos termodinámicos

Mientras que en ausencia de ligandos el Fe(III) es soluble sólo a muy bajos valores de pH, el Fe(II) puede hallarse disuelto en concentraciones significativas en condiciones de moderada acidez. A raíz de esto, y del reciente descubrimiento de la capacidad de las bacterias reductoras de hierro para interactuar directamente con óxidos metálicos, los estudios se han movido desde la disolución de estos compuestos mediante ácidos orgánicos hacia la utilización del mencionado grupo de bacterias.

Según se observa en el diagrama de Pourbaix del sistema Fe-NH₄⁺-S-O₂-CO₂-H₂O (Figura 5.2), la termodinámica predice la disolución de la amoniojarosita hasta Fe(III) a valores de pH inferiores a 1, mientras que su disolución reductora hasta Fe(II) puede llevarse a cabo inclusive cuando el pH es dos unidades mayor que este valor. Este hecho pudo observarse en los experimentos llevados a cabo en ausencia de ligandos, cuyos resultados se muestran en la Figura 6.2 (sección 6). Situación similar ocurrió para la magnetita, cuya disolución ácida a pH 2,4 fue marginal, mientras que en presencia de la bacteria *Acidiphilium cryptum* se lograron grados de disolución mayores al 20 %, como pudo comprobarse en la sección donde se investigó el efecto de la presencia de esta bacteria y del pH (sección 5).

Aunque el Fe(II) puede encontrarse en disolución en condiciones de neutralidad, este fenómeno está limitado por la formación de sus sólidos, tal como se observó en la Figura 7.5 al estudiar los mediadores redox con *Aeromonas hydrophila* (sección 7). En este sentido, en algunas experiencias realizadas con magnetita y *Acidiphilium cryptum*, se detectó la formación de siderita (Figura 5.6, sección 5); sin embargo, la literatura señala que, además de este sólido, en la biorreducción de óxidos férricos también podría formarse vivianita (Crespo et al., 2007, Dong et al., 2000) y magnetita (Roh et al., 2003).

En lo que se refiere a la presencia de ligandos en el medio, la solubilidad de estos óxidos se incrementa por la capacidad de dichos compuestos para quelar el hierro disuelto, según ya se detalló al repasar los aspectos termodinámicos en la sección 2.5.1. Esto mismo fue lo observado en los experimentos realizados en condición abiótica con magnetita (sección 5), amoniojarosita, goethita y hematites (sección 6). Sin embargo, dado que el hierro se mantiene en disolución formando quelatos, la concentración máxima de dicho metal que podría alcanzarse bajo estas condiciones nunca sería mayor que la concentración del ligando en disolución.

Según se detalló al estudiar la disolución asistida por ligandos (sección 6), la presencia de estos últimos conduce a la formación de quelatos de hierro que poseen valores de potencial redox diferentes a los del par Fe(II)/Fe(III). Como se ha apuntado en dicha sección, esto puede tener efectos sobre la cinética de autooxidación del Fe(II), la biorreducción de los quelatos de Fe(III) y su capacidad para promover la disolución reductora de sólidos férricos. De modo similar, se ha visto que el potencial redox de los distintos mediadores y su capacidad para favorecer la biorreducción de la jarosita (sección 7) son variables relacionadas, como se ha indicado previamente (Li et al., 2013, Li et al., 2014, Wolf et al., 2009).

En lo que se refiere a la biolixiviación de minerales de manganeso, y dado que en la disolución de los sólidos de hierro se necesitan condiciones reductoras más fuertes que para los del primer metal (Figuras 5.2 y 9.9), con las experiencias realizadas se ha observado que la especificidad del proceso está relacionada con el potencial redox al que ocurre. Esto último es importante porque, tanto para los sólidos férricos (magnetita en la sección 5 y jarosita en la sección 8) como para los minerales de manganeso (sección 9), el consumo de H_2SO_4 estuvo directamente relacionado con la cantidad de hierro y manganeso extraídos, similar a lo previamente descrito por Hallberg et al. (2011).

10.2 Aspectos cinéticos

Una vez salvados los impedimentos termodinámicos, la cinética general del proceso dependerá de los mecanismos de las distintas reacciones implicadas y, en especial, de aquella que tenga lugar con una menor velocidad (etapa limitante).

Cuando el Fe(III) se halla disuelto (sección 4), la biorreducción del hierro ocurre rápidamente (23 mmol/L en menos de 60 h) debido a que éste está fácilmente disponible para toda la población microbiana; por lo que la velocidad del proceso queda determinada por la capacidad intrínseca de los microorganismos para utilizar este aceptor final de electrones. Sin embargo, cuando el Fe(III) se encuentra como sólido (secciones 5 a 8), se registran velocidades mucho menores.

Para lograr una cinética más favorable en la biorreducción de los sólidos férricos la literatura plantea una serie de mecanismos (sección 2.4.2). En este trabajo se ha visto que, en presencia de *Acidiphilium cryptum*, la incorporación de ciertos ligandos (principalmente oxalato y NTA) tuvo efectos positivos sobre la velocidad de disolución de los sólidos férricos jarosita, goethita y hematites (sección 6). Estos resultados se explicarían por un mecanismo donde los quelatos de hierro son capaces de actuar como mediadores redox, tal como ha sido propuesto por otros autores (Lovley, 2006, Schröder, 2007, Tanaka et al., 1983a, Tanaka et al., 1983b, Vega y Fernández, 1987). Esto se aleja del rol de facilitar el acceso microbiano al hierro mediante la disolución química de los sólidos, que clásicamente se les ha asignado (Bridge y Johnson, 2000, Gralnick y Newman, 2007, Weber et al., 2006). Por otra parte, la incorporación de oxalato en el medio casi no modificó la velocidad de disolución de la magnetita en presencia de *Acidiphilium cryptum* (sección 5); aunque en tal caso se le pudo asignar un cierto papel en la amortiguación de las variaciones de pH.

Otro de los mecanismos empleados por los microorganismos reductores de hierro para acceder a los sólidos es la utilización de mediadores redox. Los resultados obtenidos con este tipo de compuestos (sección 7) revelaron que los mediadores que resultaron útiles para *Aeromonas hydrophila* y *Acidiphilium cryptum* tenían potenciales redox en los rangos de -500 a -400 mV y 50 a 150 mV vs. Ag/AgCl, respectivamente, los cuales incrementaron la biorreducción entre un 200 y un 600 %, según el caso. Puede sugerirse que dichos rangos estarían relacionados con las propiedades de las especies de Fe(II) y Fe(III) a los pH que se realizaron los experimentos (neutral y 2,2 – 2,8) y con las capacidades reductoras de ambos microorganismos.

Al estudiar distintos tipos de agitación (sección 8) se observó un drástico incremento en la velocidad de disolución de la jarosita cuando se usó agitación magnética. Este

resultado, atribuido al incremento de área superficial del sólido por la acción disgregante del agitador, permitió confirmar la conjetura de que la velocidad de disolución estaba determinada por el área superficial; supuesto basado en el incremento lineal del hierro disuelto obtenido en los ensayos de disolución de magnetita y jarosita (secciones 5 y 6, respectivamente).

Finalmente, en lo que se refiere a la velocidad de biolixiviación de minerales de manganeso (sección 9), se observó que ésta puede depender de la presencia de hierro y oxalato en el medio. El efecto positivo observado en presencia de hierro, con o sin oxalato, puede atribuirse a la capacidad del hierro, y sus quelatos, para promover la biolixiviación del manganeso a través de su actuación como mediadores redox. Por otra parte, el hierro disuelto también perjudicó el proceso de extracción, en un caso, probablemente por su tendencia a depositarse sobre algunos de los sitios donde el ataque bacteriano ocurre preferentemente (sección 2.5.2). En este proceso también se observó que la incorporación de ciertos mediadores redox (tionina y azul de metileno) no afectó la velocidad de disolución de manganeso aunque sí la del hierro, incrementando su liberación; lo que empeoró la selectividad del proceso extractivo.

10.3 Aspectos operacionales

Cuando se piensa en el escalamiento de un proceso, es de crucial importancia la consideración de los distintos aspectos operacionales que intervienen, destacando entre ellos: el tipo de operación, la agitación y el tamaño de partícula. En las operaciones biohidrometalúrgicas, se han empleado, principalmente, reactores agitados mediante un eje (o gases) y operaciones en pilas y escombreras (sección 2.2). Mientras que los primeros suelen utilizarse para el beneficio de minerales con bajo tamaño de partícula, con el costo asociado de trituración y molienda, los segundos se emplean para material con mayor granulometría, caso en el que es, incluso, indeseable la presencia de finos. Por este motivo, se suele optar por una u otra opción considerando el precio de mercado del metal, la ley del mineral y los datos económicos, cinéticos y de rendimiento de cada una de las opciones.

En este estudio se han empleado viales con sólido pulverizado y columnas rellenas con mineral, para tratar de emular las condiciones que se tendrían en reactores

agitados y en pilas, respectivamente. En los experimentos realizados se ha comprobado que el grado de disolución alcanzado en los viales varía ampliamente según el tipo de sólido férrico (secciones 5 y 6) y su granulometría (sección 8). Sin embargo, cabe destacar que también se deben considerar variables como la cristalinidad y presencia de impurezas en los minerales.

Al estudiar los efectos de la agitación (sección 8) se determinó que, aunque la disolución de jarosita puede ocurrir en condiciones estáticas, un bajo grado de agitación favorece el proceso (Royer et al., 2003), haciendo que la velocidad de disolución prácticamente se duplique. Sin embargo, no se consiguió seguir mejorando esta velocidad mediante el incremento del nivel de agitación. En este mismo experimento se logró determinar que el tamaño de partícula, probablemente por su relación con el área específica del sólido, influye significativamente sobre la cinética del proceso. Ambos parámetros se relacionan directamente con los costes, dado que se invierten cantidades importantes de energía en los procesos de trituración y agitación.

Tal como se observó al estudiar la biorreducción de las especies disueltas de hierro (sección 4), el hecho de que este microorganismo sea capaz de llevar a cabo la reducción del Fe(III) en presencia de oxígeno hizo que, a medida que se incrementaba la aireación, se obtuviesen menores eficiencias de reducción, dada la competencia que se establece entre el oxígeno y el Fe(III) por los electrones generados en el metabolismo microbiano. Las zonas de incremento y disminución del hierro en disolución, registradas en el experimento con columnas de mineral de hematitas (sección 8), junto con el comportamiento ondulatorio del pE+pH y las mediciones de concentración de glucosa, podrían estar explicadas por este tipo de hechos, donde las infiltraciones de aire en el sistema experimental incrementarían el consumo de glucosa que conduciría a su agotamiento.

Es interesante hacer notar que, pese al mayor o menor grado de disolución obtenido en los distintos experimentos (principalmente en las secciones 5 y 8), en ningún caso se superó la concentración de 120 mmol/L de hierro que marcó el comienzo de la etapa donde posiblemente se registre inhibición por este metal, según se determinó cuando se investigó la biorreducción de las especies solubles de hierro (sección 4). De este modo, aún queda un margen para que el proceso pueda ser mejorado considerando esta limitación.

Valoración general

Finalmente, dados los buenos resultados obtenidos con algunos mediadores redox, su utilización sería de gran utilidad. Sin embargo, cuando exista la posibilidad de escoger entre varios de ellos, deben tenerse en cuenta otros factores, tales como el coste y la peligrosidad. Por ejemplo, sería preferible el empleo del azul de metileno sobre la tionina, dada su inocuidad, ya que incluso el primero de éstos se utiliza como medicamento en casos de metahemoglobinemia (Lee y Lee, 2013). Del mismo modo, y en miras a un proceso industrial, podrían considerarse otras fuentes de carbono distintas a la glucosa. En este caso adquiere gran importancia el glicerol, que también puede ser utilizado en la biorreducción de Fe(III) por *Acidiphilium cryptum* (Küsel et al., 1999), ya que es un subproducto de la industria del biodiesel (Yang et al., 2012).

11 Conclusiones

En el presente trabajo, que aborda la biorreducción de especies solubles e insolubles de hierro, se ha empleado, principalmente, el microorganismo *Acidiphilium cryptum* JF-5; una bacteria quimioorganoheterótrofa acidófila, que es capaz de reducir Fe(III) en presencia de oxígeno. Las siguientes conclusiones han sido estructuradas considerando los objetivos general y específicos señalados en la sección 1.

Caracterización de la cinética de biorreducción del hierro disuelto y de algunos sólidos férricos

Este microorganismo es capaz de reducir el Fe(III) disuelto fácilmente, 23 mmol/L en menos de 60 h, debido a su amplia disponibilidad. Sin embargo, en presencia de sólidos férricos el proceso de biorreducción ocurre más lentamente. En este último caso, la velocidad de la reacción resulta ampliamente dependiente del sólido en cuestión, lográndose biorreducciones cercanas a 30, 2, 1 y 1,5 mmol/L de Fe(II) (en ausencia de ligandos) para los sólidos magnetita, amoniojarosita, goethita y hematites tras 38, 38, 84 y 84 días, respectivamente.

Dado el bajo pH al que tiene lugar el proceso, el Fe(II) se obtiene disuelto en el medio, generándose un consumo de H₂SO₄ cercano al estequiométrico. En caso de que no se suministre este último compuesto, se incrementa el pH del medio y se detiene el proceso de disolución, conduciendo a la formación de sólidos de Fe(II), similares a los reportados para los microorganismos reductores de hierro que proliferan a pH neutro.

Disolución de sólidos férricos en medios con ligandos

A partir de los experimentos llevados a cabo con amoniojarosita en presencia de ligandos, se logró determinar que algunos de ellos, tales como el NTA y oxalato, pueden mejorar la cinética del proceso. Sin embargo, otros, como el citrato, no tuvieron ningún efecto. La diferencia observada en su comportamiento, junto a los buenos resultados obtenidos en presencia de hierro en disolución, se explicaría por su capacidad para formar quelatos capaces de actuar como mediadores redox.

Además de lo anterior, en los experimentos realizados con magnetita, se observó que la adición de oxalato mejoró la disolución del mineral. Sin embargo, este resultado no fue atribuido a su habilidad para formar quelatos capaces actual como mediadores redox sino a su papel de agente tamponante del pH; variable de gran importancia en el proceso de disolución.

Biorreducción de sólidos férricos en presencia de mediadores redox

En el estudio de los mediadores redox, además de *Acidiphilium cryptum*, se empleó el microorganismo *Aeromonas hydrophila*, una bacteria neutrófila sobre la que se dispone de más información. En estos experimentos, se determinó que los mediadores que presentan mejores resultados con *A. cryptum* (tionina y azul de metileno) y *A. hydrophila* (2,6-AQDS, safranina y fenosafranina) tienen un potencial redox medio en el rango de 50 a 150 mV y de -500 a -400 mV vs. Ag/AgCl, respectivamente.

El intervalo de potenciales que resulta útil para *A. hydrophila* prácticamente coincide con aquellos reportados previamente para otros microorganismos reductores de hierro capaces de crecer a pH neutro. La diferencia en los potenciales de los compuestos útiles para ambas bacterias vendría fijada por los límites de los campos de estabilidad de las especies de Fe(II) y Fe(III) (a pH 2,2 – 2,8 y neutral) y las capacidades de las bacterias *A. cryptum* y *A. hydrophila* para llevar a cabo el proceso de reducción.

Biolixiviación de un metal no ferroso: caso del manganeso

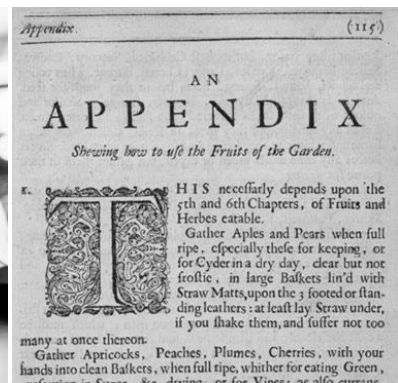
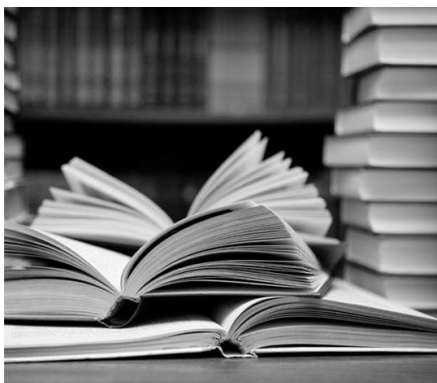
Finalmente, en los experimentos llevados a cabo con la bacteria *Acidiphilium cryptum* JF-5 y dos minerales de manganeso con distinto origen y contenido en manganeso, se observó que esta bacteria es capaz de promover la biolixiviación de este último, lo que constituye, según los datos disponibles, el primer reporte de esta capacidad.

Al probar el efecto que producía la incorporación de hierro y oxalato en el medio, se observó que la cinética del proceso podría mejorar por la actuación del hierro y sus quelatos como mediadores redox, o empeorar, debido a la posible precipitación del hierro sobre los sitios de reacción más activos. Respecto de la selectividad del proceso de disolución, ésta se incrementó con la incorporación de oxalato, mientras

que disminuyó con la incorporación de azul de metileno y tionina; dos mediadores redox que habían resultado previamente útiles en la disolución de la amoniojarosita.

De este modo, se ha demostrado la factibilidad de emplear este microorganismo para llevar a cabo la disolución reductora de los óxidos de hierro, lo que podría traducirse, bajo condiciones económicas adecuadas, en un nuevo proceso hidrometalúrgico para la extracción de hierro. Por otra parte, considerando que actualmente se dispone de una ruta hidrometalúrgica para la producción de Mn y MnO_2 , la utilización de esta bacteria supone una posibilidad para el aprovechamiento de minerales con baja ley.

CAPÍTULO IV: BIBLIOGRAFÍA Y APÉNDICES



12 Bibliografía

- Acevedo, F. 2000. The use of reactors in biomining processes. *Electronic Journal of Biotechnology* 3 (3): 184-194.
- Acevedo, F. y Gentina, J. C. 2005. Biolixiviación de Minerales de Cobre. *En: Acevedo, F. y Gentina, J. C. (eds.) Fundamentos y Perspectivas de las Tecnologías Biomineras*. Pp. 45-61 Valparaíso: Ediciones Universitarias de Valparaíso.
- Acharya, C., Kar, R. N. y Sukla, L. B. 2003. Studies on reaction mechanism of bioleaching of manganese ore. *Minerals Engineering* 16 (10): 1027-1030.
- Alberts, B. M., Bernfield, M. R., Chow, C., Cooper, J. A., Cuffe, M., Laskey, R. A., Lodish, H. F., Slack, J. M. W., Staehelin, L. A. y Stein, W. D. 2014. Cell - The Mitochondrion. *En: Alberts, B. M. (ed.) Encyclopædia Britannica Online*.
- Alberty, R. A. 2004. Standard apparent reduction potentials of biochemical half reactions and thermodynamic data on the species involved. *Biophysical Chemistry* 111 (2): 115-122.
- Aller, R. C., Mackin, J. E. y Cox Jr, R. T. 1986. Diagenesis of Fe and S in Amazon inner shelf muds: apparent dominance of Fe reduction and implications for the genesis of ironstones. *Continental Shelf Research* 6 (1-2): 263-289.
- Andersen, K. B. y von Meyenburg, K. 1980. Are growth rates of *Escherichia coli* in batch cultures limited by respiration? *Journal of Bacteriology* 144 (1): 114-123.
- Andrews, S. C., Robinson, A. K. y Rodríguez-Quiñones, F. 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews* 27 (2-3): 215-237.
- AppliChem. 2008. *Biological Buffers* [En línea]. AppliChem. Disponible: <http://www.applichem.com/en/literature/brochures/biological-buffers/> [Referido el 16 de Enero, 2015].
- Arnold, R. G., DiChristina, T. J. y Hoffmann, M. R. 1988. Reductive dissolution of Fe(III) oxides by *Pseudomonas* sp. 200. *Biotechnology and Bioengineering* 32 (9): 1081-1096.
- Atkins, P., Overton, T., Rourke, J., Weller, M., Armstrong, F. y Hagerman, M. 2010. Oxidation and Reduction. *En: Atkins, P., Overton, T., Rourke, J., Weller, M., Armstrong, F. y Hagerman, M. (eds.) Shriver & Atkins' Inorganic Chemistry*. 5th ed. Pp. 147-178: W.H. Freeman and Company.
- Baglieri, A., Vindrola, D., Gennari, M. y Negre, M. 2014. Chemical and spectroscopic characterization of insoluble and soluble humic acid fractions at different pH values. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 1 (1): 1-11.
- Banwart, S., Davies, S. y Stumm, W. 1989. The role of oxalate in accelerating the reductive dissolution of hematite (α -Fe₂O₃) by ascorbate. *Colloids and Surfaces* 39 (2): 303-309.
- Bauer, I. y Knölker, H.-J. 2008. Iron Complexes in Organic Chemistry. *Iron Catalysis in Organic Chemistry*. Pp. 1-27: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Bethke, C. M., Sanford, R. A., Kirk, M. F., Jin, Q. y Flynn, T. M. 2011. The thermodynamic ladder in geomicrobiology. *American Journal of Science* 311 (3): 183-210.

Bibliografía

- Biber, M. V., dos Santos Afonso, M. y Stumm, W. 1994. The coordination chemistry of weathering: IV. Inhibition of the dissolution of oxide minerals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 58 (9): 1999-2010.
- Bilgin, A. A., Silverstein, J. y Jenkins, J. D. 2004. Iron respiration by *Acidiphilium cryptum* at pH 5. *FEMS Microbiology Ecology* 49 (1): 137-143.
- Bingjie, O., Xiancai, L., Huan, L., Juan, L., Tingting, Z., Xiangyu, Z., Jianjun, L. y Rucheng, W. 2014. Reduction of jarosite by *Shewanella oneidensis* MR-1 and secondary mineralization. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 124 (0): 54-71.
- Bird, L. J., Bonnefoy, V. y Newman, D. K. 2011. Bioenergetic challenges of microbial iron metabolisms. *Trends in Microbiology* 19 (7): 330-340.
- Blanch, H. W. y Clark, D. S. 1996. *Biochemical Engineering*, New York, Marcel Dekker, Inc.
- Blesa, M. A., Marinovich, H. A., Baumgartner, E. C. y Maroto, A. J. G. 1987. Mechanism of dissolution of magnetite by oxalic acid-ferrous ion solutions. *Inorganic Chemistry* 26 (22): 3713-3717.
- Bonnefoy, V. y Holmes, D. S. 2012. Genomic insights into microbial iron oxidation and iron uptake strategies in extremely acidic environments. *Environmental Microbiology* 14 (7): 1597-1611.
- Borggaard, O. K. 1992. Dissolution of Poorly Crystalline Iron Oxides in Soils by EDTA and Oxalate. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 155 (5): 431-436.
- Borghi, E. B., Regazzoni, A. E., Maroto, A. J. G. y Blesa, M. A. 1989. Reductive dissolution of magnetite by solutions containing EDTA and FeII. *Journal of Colloid and Interface Science* 130 (2): 299-310.
- Borole, A., O'Neill, H., Tsouris, C. y Cesar, S. 2008. A microbial fuel cell operating at low pH using the acidophile *Acidiphilium cryptum*. *Biotechnology Letters* 30 (8): 1367-1372.
- Braunschweig, J., Klier, C., Schröder, C., Händel, M., Bosch, J., Totsche, K. U. y Meckenstock, R. U. 2014. Citrate influences microbial Fe hydroxide reduction via a dissolution-disaggregation mechanism. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 139 (0): 434-446.
- Brey, W. S. 1978. Oxidation-Reduction Equilibria. En: Brey, W. S. (ed.) *Physical Chemistry and its Biological Applications*. Pp. 213-243: Academic Press.
- Bridge, T. A. M. y Johnson, D. B. 2000. Reductive Dissolution of Ferric Iron Minerals by *Acidiphilium* SJH. *Geomicrobiology Journal* 17 (3): 193-206.
- Brock, T. D. y Gustafson, J. 1976. Ferric iron reduction by sulfur- and iron-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 32 (4): 567-571.
- Çakir, S. y Arslan, E. 2010. Voltammetry of resazurin at a mercury electrode. *Chemical Papers* 64 (3): 386-394.
- Castro, L., García-Balboa, C., González, F., Ballester, A., Blázquez, M. L. y Muñoz, J. A. 2013. Effectiveness of anaerobic iron bio-reduction of jarosite and the influence of humic substances. *Hydrometallurgy* 131-132 (0): 29-33.
- Ciobotă, V., Burkhardt, E.-M., Schumacher, W., Rösch, P., Küsel, K. y Popp, J. 2010. The influence of intracellular storage material on bacterial identification by means of Raman spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (7): 2929-2937.

- Cornell, R. M. y Schwertmann, U. 2003a. Adsorption of Ions and Molecules. *En: Cornell, R. M. y Schwertmann, U. (eds.) The Iron Oxides. Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*. 2nd ed. Pp. 253-296: Wiley-VCH.
- Cornell, R. M. y Schwertmann, U. 2003b. Dissolution. *En: Cornell, R. M. y Schwertmann, U. (eds.) The Iron Oxides. Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*. 2nd ed. Pp. 297-344: Wiley-VCH.
- Cornell, R. M. y Schwertmann, U. 2003c. Solubility. *En: Cornell, R. M. y Schwertmann, U. (eds.) The Iron Oxides. Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*. 2nd ed. Pp. 201-220: Wiley-VCH.
- Crespo, J., Munoz, J. A., Gonzalez, F., Blazquez, M. L. y Ballester, A. 2007. Comparative bioreduction of Fe(III) with *Geobacter metallireducens* and *Bacillus infernus*. *En: Schippers, A., Sand, W., Glombitza, F. y Willscher, S. (eds.) Biohydrometallurgy: From the Single Cell to the Environment*. Pp. 561-564 Stafa-Zurich: Trans Tech Publications Ltd.
- Cummings, D. E., Fendorf, S., Singh, N., Sani, R. K., Peyton, B. M. y Magnuson, T. S. 2006. Reduction of Cr(VI) under Acidic Conditions by the Facultative Fe(III)-Reducing Bacterium *Acidiphilium cryptum*. *Environmental Science & Technology* 41 (1): 146-152.
- Das, A., Mishra, A. K. y Roy, P. 1992. Anaerobic growth on elemental sulfur using dissimilar iron reduction by autotrophic *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiology Letters* 97 (1-2): 167-172.
- Das, A. P., Sukla, L. B., Pradhan, N. y Nayak, S. 2011. Manganese biomining: A review. *Bioresource Technology* 102 (16): 7381-7387.
- Davis, J. A. y Kent, D. B. 1990. Surface Complexation Modeling in Aqueous Geochemistry. *En: Hochella, M. F. J. y White, A. F. (eds.) Mineral-Water Interface Geochemistry*. Pp. 177-260 Chelsea, Michigan: Mineralogical Society of America.
- Dean, J. A. 1999. *Lange's Handbook of Chemistry*, McGraw-Hill.
- Dehner, C. A., Awaya, J. D., Maurice, P. A. y DuBois, J. L. 2010. Roles of Siderophores, Oxalate, and Ascorbate in Mobilization of Iron from Hematite by the Aerobic Bacterium *Pseudomonas mendocina*. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (7): 2041-2048.
- del Valle Hidalgo, M., Katz, N. E., Maroto, A. J. G. y Blesa, M. A. 1988. The dissolution of magnetite by nitrilotriacetatoferrate(II). *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases* 84 (1): 9-18.
- Demmink, J. F. y Beenackers, A. A. C. M. 1997. Oxidation of Ferrous Nitrilotriacetic Acid with Oxygen: A Model for Oxygen Mass Transfer Parallel to Reaction Kinetics. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 36 (6): 1989-2005.
- DiChristina, T. J., Fredrickson, J. K. y Zachara, J. M. 2005. Enzymology of Electron Transport: Energy Generation With Geochemical Consequences. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 59 (1): 27-52.
- Djurdjevic, P. 1990. The complexation between iron(III) ion and glycine in nitrate medium. *Transition Metal Chemistry* 15 (5): 345-350.
- Dong, H., Fredrickson, J. K., Kennedy, D. W., Zachara, J. M., Kukkadapu, R. K. y Onstott, T. C. 2000. Mineral transformations associated with the microbial reduction of magnetite. *Chemical Geology* 169 (3-4): 299-318.

Bibliografía

- DSMZ. 2007. 269. *Acidiphilium medium* [En línea]. Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Culture. Disponible: http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium269.pdf [Referido el 2013].
- du Plessis, C. A., Slabbert, W., Hallberg, K. B. y Johnson, D. B. 2011. Ferredox: A biohydrometallurgical processing concept for limonitic nickel laterites. *Hydrometallurgy* 109 (3–4): 221-229.
- Du, Z., Li, H. y Gu, T. 2007. A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnology Advances* 25 (5): 464-482.
- Duan, N., Zhou, C., Chen, B., Jiang, W. y Xin, B. 2011. Bioleaching of Mn from manganese residues by the mixed culture of *Acidithiobacillus* and mechanism. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 86 (6): 832-837.
- Dubiel, M., Hsu, C. H., Chien, C. C., Mansfeld, F. y Newman, D. K. 2002. Microbial Iron Respiration Can Protect Steel from Corrosion. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (3): 1440-1445.
- Dutta, R. 2008. *Fundamentals of Biochemical Engineering*, Springer.
- Ehrlich, H. 1997. Technical Potential for Bioleaching and Biobeneficiation of Ores to Recover Base Metals (Other than Iron or Copper), Platinum-Group Metals and Silver. *En: Rawlings, D. (ed.) Biomining*. Pp. 129-150: Springer Berlin Heidelberg.
- Ehrlich, H. L. 1999. Past, present and future of biohydrometallurgy. *En: Amils, R. y Ballester, A., eds. Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of the 21st century - International Biohydrometallurgical Symposium 1999, 1999 Madrid, Spain. Elsevier*, 3-12.
- Eisele, T. C. 2005. Direct Biohydrometallurgical Extraction of Iron From Ore. Michigan Technological University.
- Eisele, T. C. y Gabby, K. L. 2014. Review of Reductive Leaching of Iron by Anaerobic Bacteria. *Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review* 35 (2): 75-105.
- Fenchel, T., King, G. M. y Blackburn, T. H. 2012. Bacterial Metabolism. *En: Fenchel, T., King, G. M. y Blackburn, T. H. (eds.) Bacterial Biogeochemistry: The Ecophysiology of Mineral Cycling*. 3rd Edition ed. Pp. 1-34 Boston: Academic Press.
- Fredrickson, J. K. y Gorby, Y. A. 1996. Environmental processes mediated by iron-reducing bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 7 (3): 287-294.
- Gaboreau, S. y Vieillard, P. 2004. Prediction of Gibbs free energies of formation of minerals of the alunite supergroup. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 68 (16): 3307-3316.
- Galey, J.-B. 1996. Potential Use of Iron Chelators against Oxidative Damage. *En: Helmut, S. (ed.) Advances in Pharmacology*. Pp. 167-203: Academic Press.
- García-Balboa, C., Bedoya, I. C., González, F., Blázquez, M. L., Muñoz, J. A. y Ballester, A. 2010. Bio-reduction of Fe(III) ores using three pure strains of *Aeromonas hydrophila*, *Serratia fonticola* and *Clostridium celerecrescens* and a natural consortium. *Bioresource Technology* 101 (20): 7864-7871.
- Gerst, M. D. y Graedel, T. E. 2008. In-Use Stocks of Metals: Status and Implications. *Environmental Science & Technology* 42 (19): 7038-7045.

- Gescher, J. S., Cordova, C. D. y Spormann, A. M. 2008. Dissimilatory iron reduction in *Escherichia coli*: identification of CymA of *Shewanella oneidensis* and NapC of *E. coli* as ferric reductases. *Molecular Microbiology* 68 (3): 706-719.
- González-Pinzón, R., Haggerty, R. y Myrold, D. D. 2012. Measuring aerobic respiration in stream ecosystems using the resazurin-resorufin system. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* 117 (G3): G00N06.
- Gralnick, J. A. y Newman, D. K. 2007. Extracellular respiration. *Molecular Microbiology* 65 (1): 1-11.
- GSA. 2011. *Iron fact-ite* [En línea]. Geological Society of Australia. Disponible: <http://gsa.org.au/resources/factites/factitesIron.pdf> [Referido el 16 de Enero, 2015].
- Guerin, Mondido, McClenn y Peasley 2001. Application of resazurin for estimating abundance of contaminant-degrading micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology* 32 (5): 340-345.
- Guerrero-Barajas, C. y Field, J. A. 2005. Riboflavin- and cobalamin-mediated biodegradation of chloroform in a methanogenic consortium. *Biotechnology and Bioengineering* 89 (5): 539-550.
- Guin, P. S., Das, S. y Mandal, P. C. 2011. Electrochemical Reduction of Quinones in Different Media: A Review. *International Journal of Electrochemistry* 2011.
- Guo, J., Lian, J., Xu, Z., Xi, Z., Yang, J., Jefferson, W., Liu, C., Li, Z. y Yue, L. 2012. Reduction of Cr(VI) by *Escherichia coli* BL21 in the presence of redox mediators. *Bioresource Technology* 123 (0): 713-716.
- Haas, J. R. y DiChristina, T. J. 2002. Effects of Fe(III) Chemical Speciation on Dissimilatory Fe(III) Reduction by *Shewanella putrefaciens*. *Environmental Science & Technology* 36 (3): 373-380.
- Habbache, N., Alane, N., Djerad, S. y Tifouti, L. 2009. Leaching of copper oxide with different acid solutions. *Chemical Engineering Journal* 152 (2-3): 503-508.
- Hallberg, K. B., Grail, B. M., Plessis, C. A. d. y Johnson, D. B. 2011. Reductive dissolution of ferric iron minerals: A new approach for bio-processing nickel laterites. *Minerals Engineering* 24 (7): 620-624.
- Hamidian, H. 2011. Microbial Leaching of Uranium Ore. *En: Tsvetkov, P. V. (ed.) Nuclear Power - Development, operation and sustainability*. Pp. 291-304: InTech.
- Hamm, R. E., Shull, C. M. y Grant, D. M. 1954. Citrate Complexes with Iron(II) and Iron(III). *Journal of the American Chemical Society* 76 (8): 2111-2114.
- Harrison, A. P. 1981. *Acidiphilium cryptum* gen. nov., sp. nov., Heterotrophic Bacterium From Acidic Mineral Environments. *International Journal of Systematic Bacteriology* 31 (3): 327-332.
- Haynes, T. S., Klemm, D. J., Ruocco, J. J. y Barton, L. L. 1995. Formate Dehydrogenase Activity in Cells and Outer Membrane Blebs of *Desulfovibrio gigas*. *Anaerobe* 1 (3): 175-182.
- He, Z. y Angenent, L. T. 2006. Application of Bacterial Biocathodes in Microbial Fuel Cells. *Electroanalysis* 18 (19-20): 2009-2015.

Bibliografía

- Heijnen, J. J. 1999. Bioenergetics of microbial growth. *En: Flickinger, M. C. y Drew, S. W. (eds.) Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*. Pp. 267-291: John Wiley & Sons, Inc.
- Heli, H., Moosavi-Movahedi, A. A., Jabbari, A. y Ahmad, F. 2007. An electrochemical study of safranin O binding to DNA at the surface. *Journal of Solid State Electrochemistry* 11 (5): 593-599.
- Hernandez, M. E. y Newman, D. K. 2001. Extracellular electron transfer. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58 (11): 1562-1571.
- Hiraishi, A. y Imhoff, J. F. 2005. Genus II. *Acidiphilium* Harrison 1981. *En: Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T. y Garrity, G. M. (eds.) Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. Pp. 54-62 New York: Springer.
- Holen, H. K. y Hatchell, W. O. 1986. Geological characterization of New Mexico uranium deposits for extraction by in situ leach recovery. *En: Department, N. M. E. a. M. (ed.). New Mexico Bureau of Mines and Mineral Resources*.
- Huang, L., Wang, Q., Quan, X., Liu, Y. y Chen, G. 2013. Bioanodes/biocathodes formed at optimal potentials enhance subsequent pentachlorophenol degradation and power generation from microbial fuel cells. *Bioelectrochemistry* 94 (0): 13-22.
- Hulanicki, A. y Glab, S. 1978. *Redox Indicators. Characteristics and Applications*, International Union of Pure and Applied Chemistry.
- IEA. 2007. *Tracking Industrial Energy Efficiency and CO₂ Emissions* [En línea]. International Energy Agency. Disponible: http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/tracking_emissions.pdf [Referido el 16 de Enero, 2015].
- Ingledeu, W. J. y Poole, R. K. 1984. The respiratory chains of *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews* 48 (3): 222-271.
- IUPAC. 1997. *Compendium of Chemical Terminology - The Gold Book* [En línea]. Disponible: <http://goldbook.iupac.org/> [Referido el 2014].
- Jiang, J. y Kappler, A. 2008. Kinetics of Microbial and Chemical Reduction of Humic Substances: Implications for Electron Shuttling. *Environmental Science & Technology* 42 (10): 3563-3569.
- Johnson, D. B. 1998. Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiology Ecology* 27 (4): 307-317.
- Johnson, D. B. 2010. The Biogeochemistry of Biomining. *En: Barton, L. L., Mandl, M. y Loy, A. (eds.) Geomicrobiology: Molecular and Environmental Perspective*. Pp. 401-426: Springer Netherlands.
- Johnson, D. B. 2012. Reductive dissolution of minerals and selective recovery of metals using acidophilic iron- and sulfate-reducing acidophiles. *Hydrometallurgy* 127-128 (0): 172-177.
- Johnson, D. B. y Hallberg, K. B. 2003. The microbiology of acidic mine waters. *Research in Microbiology* 154 (7): 466-473.
- Johnson, D. B., Kanao, T. y Hedrich, S. 2012. Redox transformations of iron at extremely low pH: fundamental and applied aspects. *Frontiers in Microbiology* 3.
- Johnson, D. B. y McGinness, S. 1991. Ferric Iron Reduction by Acidophilic Heterotrophic Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (1): 207-211.

- Kalathil, S., Khan, M. M., Lee, J. y Cho, M. H. 2013. Production of bioelectricity, biohydrogen, high value chemicals and bioinspired nanomaterials by electrochemically active biofilms. *Biotechnology Advances* 31 (6): 915-924.
- Kappler, A., Benz, M., Schink, B. y Brune, A. 2004. Electron shuttling via humic acids in microbial iron(III) reduction in a freshwater sediment. *FEMS Microbiology Ecology* 47 (1): 85-92.
- Keene, A. F., Johnston, S. G., Bush, R. T., Sullivan, L. A. y Burton, E. D. 2010. Reductive dissolution of natural jarosite in a tidally inundated acid sulfate soil: geochemical implications. *19th World Congress of Soil Science, Soil Solution for a Changing World*. Brisbane, Australia.
- Koch, A. L. 2007. Growth Measurement. *En: Reddy, C. A., Beveridge, T. J., Breznak, J. A., Marzluf, G. A., Schmidt, T. M. y Snyder, L. R. (eds.) Methods for General and Molecular Microbiology*. 3th ed. Pp. 172-199 Washington D.C.: ASM Press.
- Konhauser, K. 2007. Microbial metabolism. *En: Konhauser, K. (ed.) Introduction to Geomicrobiology*. Pp. 36-92: Blackwell Publishing.
- Kostka, J. E. y Nealson, K. H. 1995. Dissolution and Reduction of Magnetite by Bacteria. *Environmental Science & Technology* 29 (10): 2535-2540.
- Kraemer, S. M. 2004. Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. *Aquatic Sciences* 66 (1): 3-18.
- Kucera, J., Zeman, J., Mandl, M. y Cerna, H. 2012. Stoichiometry of bacterial anaerobic oxidation of elemental sulfur by ferric iron. *Antonie van Leeuwenhoek* 101 (4): 919-922.
- Küsel, K., Dorsch, T., Acker, G. y Stackebrandt, E. 1999. Microbial Reduction of Fe(III) in Acidic Sediments: Isolation of *Acidiphilium cryptum* JF-5 Capable of Coupling the Reduction of Fe(III) to the Oxidation of Glucose. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (8): 3633-3640.
- Küsel, K., Roth, U. y Drake, H. L. 2002. Microbial reduction of Fe(III) in the presence of oxygen under low pH conditions. *Environmental Microbiology* 4 (7): 414-421.
- Kupka, D. y Škvarla, J. 2001. Kinetics of chemical oxidation of ferrous iron by oxygen in acidic sulfate solutions. *Acta Metallurgica Slovaca* (3): 243-248.
- Laguna, C., González, F., García-Balboa, C., Ballester, A., Blázquez, M. L. y Muñoz, J. A. 2011. Bioreduction of iron compounds as a possible clean environmental alternative for metal recovery. *Minerals Engineering* 24 (1): 10-18.
- Langmuir, D. 1997a. *Aqueous Environmental Geochemistry*, New Jersey, Prentice Hall.
- Langmuir, D. 1997b. Iron and Sulfur Geochemistry. *Aqueous Environmental Geochemistry*. Pp. 431-485: Prentice Hall.
- Lawrence, R. W. 1990. Biotreatment of Gold Ores. *En: Ehrlich, H. L. y Brierley, C. L. (eds.) Microbial Mineral Recovery*. Pp. 127-148: McGraw-Hill.
- Lee, E. Y., Noh, S.-R., Cho, K.-S. y Ryu, H. W. 2001. Leaching of Mn, Co, and Ni from manganese nodules using an anaerobic bioleaching method. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92 (4): 354-359.
- Lee, K. W. y Lee, J. B. 2013. Antidote for acquired methemoglobinemia: methylene blue. *Journal of the Korean Medical Association* 56 (12): 1084-1090.

Bibliografía

- Lee, S. O., Tran, T., Jung, B. H., Kim, S. J. y Kim, M. J. 2007. Dissolution of iron oxide using oxalic acid. *Hydrometallurgy* 87 (3–4): 91-99.
- Lee, S. O., Tran, T., Park, Y. Y., Kim, S. J. y Kim, M. J. 2006. Study on the kinetics of iron oxide leaching by oxalic acid. *International Journal of Mineral Processing* 80 (2–4): 144-152.
- Li, X., Liu, L., Liu, T., Yuan, T., Zhang, W., Li, F., Zhou, S. y Li, Y. 2013. Electron transfer capacity dependence of quinone-mediated Fe(III) reduction and current generation by *Klebsiella pneumoniae* L17. *Chemosphere* 92 (2): 218-224.
- Li, X., Liu, T., Liu, L. y Li, F. 2014. Dependence of the electron transfer capacity on the kinetics of quinone-mediated Fe(III) reduction by two iron/humic reducing bacteria. *RSC Advances* 4 (5): 2284-2290.
- Logan, B. E. 2008. Introduction. En: Logan, B. E. (ed.) *Microbial Fuel Cells*. Pp. 1-11: John Wiley & Sons.
- Logan, B. E. 2009. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nat Rev Micro* 7 (5): 375-381.
- Loi, G., Trois, P. y Rossi, G. 1995. Biorotor®: A new development for biohydrometallurgical processing. En: Vargas, T., Jerez, C. A., Wiertz, J. V. y Toledo, H., eds. *Biohydrometallurgical processing - 11th International Biohydrometallurgy Symposium, 1995 Viña del Mar, Chile*. Universidad de Chile, 263-271.
- Lovley, D. R. 1991. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiological Reviews* 55 (2): 259-287.
- Lovley, D. R. 2006. Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nat Rev Micro* 4 (7): 497-508.
- Lovley, D. R., Holmes, D. E. y Nevin, K. P. 2004. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) Reduction. *Advances in Microbial Physiology*. Pp. 219-286: Academic Press.
- Lovley, D. R., Ueki, T., Zhang, T., Malvankar, N. S., Shrestha, P. M., Flanagan, K. A., Aklujkar, M., Butler, J. E., Giloteaux, L., Rotaru, A. E., Holmes, D. E., Franks, A. E., Orellana, R., Risso, C. y Nevin, K. P. 2011. *Geobacter: The Microbe Electric's Physiology, Ecology, and Practical Applications*. En: Poole, R. K. (ed.) *Advances in Microbial Physiology, Vol 59*. Pp. 1-100 London: Academic Press Ltd-Elsevier Science Ltd.
- Lück, E. y Jager, M. 1997. Other Preservatives. *Antimicrobial Food Additives*. Pp. 222-252: Springer Berlin Heidelberg.
- Llorens-Molina, J. A. 1988. Photochemical reduction of Fe³⁺ by citrate ion. *Journal of Chemical Education* 65 (12): 1090.
- Lloyd, J. R. 2003. Microbial reduction of metals and radionuclides. *FEMS Microbiology Reviews* 27 (2-3): 411-425.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. y Parker, J. 2003. *Diversidad Metabólica. Brock. Biología de los Microorganismos*. 10ª ed. Pp. 539-605 Madrid: Pearson Education.
- Maier, U., Losen, M. y Büchs, J. 2004. Advances in understanding and modeling the gas-liquid mass transfer in shake flasks. *Biochemical Engineering Journal* 17 (3): 155-167.

- Malvankar, N. S. y Lovley, D. R. 2014. Microbial nanowires for bioenergy applications. *Current Opinion in Biotechnology* 27 (0): 88-95.
- Marken, F., Neudeck, A. y Bond, A. M. 2010. Cyclic Voltammetry. *En: Scholz, F. (ed.) Electroanalytical Methods*. Second ed. Pp. 57-106: Springer.
- MEI. 2014. *Biooxidation research challenges* [En línea]. Minerals Engineering International Online. Disponible: <http://min-eng.blogspot.com.es/2014/07/biooxidation-research-challenges.html> [Referido el 16 de Enero, 2015].
- Meier, H. 1971. Photochemistry of dyes. *En: Venkataraman, K. (ed.) The Chemistry of Synthetic Dyes*. Pp. 389-515: Academic Press.
- Miller, D. M., Buettner, G. R. y Aust, S. D. 1990. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radical Biology and Medicine* 8 (1): 95-108.
- Morgan, B. y Lahav, O. 2007. The effect of pH on the kinetics of spontaneous Fe(II) oxidation by O₂ in aqueous solution - basic principles and a simple heuristic description. *Chemosphere* 68 (11): 2080-2084.
- Morin, D. y d'Hugues, P. 2007. Bioleaching of a Cobalt-Containing Pyrite in Stirred Reactors: a Case Study from Laboratory Scale to Industrial Application. *En: Rawlings, D. E. y Johnson, B. D. (eds.) Biomining*. Pp. 35-55: Springer Berlin Heidelberg.
- Morra, C., Gondrexon, N., Magnin, J.-P., Deseure, J. y Ozil, P. 2003. Production of an *Acidithiobacillus ferrooxidans* biomass using electrochemical regeneration of energetic substrate. *En: Tsezos, M., Harzikioseyan, A. y Remoundaki, E., eds. Biohydrometallurgy: a sustainable technology in evolution - 15th International Biohydrometallurgy Symposium, September 14th-19th, 2003 2003 Athens, Greece. 337-344.*
- Mulder, J. y Cresser, M. S. 1994. Soil and Soil Solution Chemistry. *En: Moldan, B. y Černý, J. (eds.) Biochemistry of small catchments: a tool for environmental research*. Pp. 107-131: Wiley & Sons.
- Nelson, D. L. y Cox, M. M. 2008. The Citric Acid Cycle. *En: Nelson, D. L. y Cox, M. M. (eds.) Lehninger. Principles of Biochemistry*. 5th ed. Pp. 615-646 New York: W. H. Freeman and Company.
- Nicholls, D. G. y Ferguson, S. J. 1992. Quantitative bioenergetics: The measurement of driving forces. *En: Nicholls, D. G. y Ferguson, S. J. (eds.) Bioenergetics 2*. Pp. 39-63 Kent: Academic Press.
- Nikakhtari, H. y Hill, G. A. 2005. Modelling Oxygen Transfer and Aerobic Growth in Shake Flasks and Well-Mixed Bioreactors. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 83 (3): 493-499.
- Norgate, T. y Jahanshahi, S. 2010. Low grade ores – Smelt, leach or concentrate? *Minerals Engineering* 23 (2): 65-73.
- Ohmura, N., Matsumoto, N., Sasaki, K. y Saiki, H. 2002a. Electrochemical Regeneration of Fe(III) To Support Growth on Anaerobic Iron Respiration. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (1): 405-407.
- Ohmura, N., Sasaki, K., Matsumoto, N. y Saiki, H. 2002b. Anaerobic Respiration Using Fe³⁺, S⁰, and H₂ in the Chemolithoautotrophic Bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology* 184 (8): 2081-2087.

Bibliografía

- Pandey, A. K., Pandey, S. D. y Misra, V. 2000. Stability Constants of Metal–Humic Acid Complexes and Its Role in Environmental Detoxification. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 47 (2): 195-200.
- Panias, D., Taxiarchou, M., Douni, I., Paspaliaris, I. y Kontopoulos, A. 1996a. Thermodynamic analysis of the reactions of iron oxides: Dissolution in oxalic acid. *Canadian Metallurgical Quarterly* 35 (4): 363-373.
- Panias, D., Taxiarchou, M., Paspaliaris, I. y Kontopoulos, A. 1996b. Mechanisms of dissolution of iron oxides in aqueous oxalic acid solutions. *Hydrometallurgy* 42 (2): 257-265.
- Park, D. H., Laivenieks, M., Guettler, M. V., Jain, M. K. y Zeikus, J. G. 1999. Microbial Utilization of Electrically Reduced Neutral Red as the Sole Electron Donor for Growth and Metabolite Production. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (7): 2912-2917.
- Park, E.-S., Moon, W.-S., Song, M.-J., Kim, M.-N., Chung, K.-H. y Yoon, J.-S. 2001. Antimicrobial activity of phenol and benzoic acid derivatives. *International Biodeterioration & Biodegradation* 47 (4): 209-214.
- Patil, S., Hägerhäll, C. y Gorton, L. 2012. Electron transfer mechanisms between microorganisms and electrodes in bioelectrochemical systems. *Bioanalytical Reviews* 4 (2-4): 159-192.
- Pepper, S. E., Borkowski, M., Richmann, M. K. y Reed, D. T. 2010. Determination of ferrous and ferric iron in aqueous biological solutions. *Analytica Chimica Acta* 663 (2): 172-177.
- Pesic, B. y Kim, I. 1993. Electrochemistry of *Thiobacillus ferrooxidans* interactions with pyrite. *Metallurgical Transactions B* 24 (5): 717-727.
- Pham, A. N. y Waite, T. D. 2008. Modeling the Kinetics of Fe(II) Oxidation in the Presence of Citrate and Salicylate in Aqueous Solutions at pH 6.0–8.0 and 25 °C. *The Journal of Physical Chemistry A* 112 (24): 5395-5405.
- Piepenbrock, A., Schröder, C. y Kappler, A. 2014. Electron Transfer from Humic Substances to Biogenic and Abiogenic Fe(III) Oxyhydroxide Minerals. *Environmental Science & Technology* 48 (3): 1656-1664.
- Poljšak, B. 2008. The amount of active hydrogen in selected juices and teas on Slovenian market. *International Journal of Sanitary Engineering Research* 2 (1): 58-65.
- Pradhan, N., Nathsarma, K. C., Srinivasa Rao, K., Sukla, L. B. y Mishra, B. K. 2008. Heap bioleaching of chalcopyrite: A review. *Minerals Engineering* 21 (5): 355-365.
- Prince, R. C., Linkletter, S. J. G. y Dutton, P. L. 1981. The thermodynamic properties of some commonly used oxidation-reduction mediators, inhibitors and dyes, as determined by polarography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 635 (1): 132-148.
- Pronk, J. T., de Bruyn, J. C., Bos, P. y Kuenen, J. G. 1992. Anaerobic Growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology* 58 (7): 2227-2230.
- Pronk, J. T., Liem, K., Bos, P. y Kuenen, J. G. 1991. Energy Transduction by Anaerobic Ferric Iron Respiration in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (7): 2063-2068.

- Rabaey, K., Boon, N., Höfte, M. y Verstraete, W. 2005. Microbial Phenazine Production Enhances Electron Transfer in Biofuel Cells. *Environmental Science & Technology* 39 (9): 3401-3408.
- Rabaey, K. y Rozendal, R. A. 2010. Microbial electrosynthesis — revisiting the electrical route for microbial production. *Nat Rev Micro* 8 (10): 706-716.
- Rahimnejad, M., Najafpour, G. D., Ghoreyshi, A. A., Shakeri, M. y Zare, H. 2011. Methylene blue as electron promoters in microbial fuel cell. *International Journal of Hydrogen Energy* 36 (20): 13335-13341.
- Ranade, N. y Vining, L. C. 1993. Accumulation of intracellular carbon reserves in relation to chloramphenicol biosynthesis by *Streptomyces venezuelae*. *Canadian Journal of Microbiology* 39 (4): 377-383.
- Rodríguez, Y., Ballester, A., Blázquez, M. L., González, F. y Muñoz, J. A. 2003. New information on the pyrite bioleaching mechanism at low and high temperature. *Hydrometallurgy* 71 (1-2): 37-46.
- Roh, Y., Zhang, C.-L., Vali, H., Lauf, R. J., Zhou, J. y Phelps, T. J. 2003. Biogeochemical and environmental factors in Fe biomineralization: Magnetite and Siderite formation. *Clays and Clay Minerals* 51 (1): 83-95.
- Rosenbaum, M., Aulenta, F., Villano, M. y Angenent, L. T. 2011. Cathodes as electron donors for microbial metabolism: Which extracellular electron transfer mechanisms are involved? *Bioresource Technology* 102 (1): 324-333.
- Rossi, G. 1990a. Fundamentals. En: Rossi, G. (ed.) *Biohydrometallurgy*. Pp. 15-177: McGraw-Hill.
- Rossi, G. 1990b. Historical Background. En: Rossi, G. (ed.) *Biohydrometallurgy*. Pp. 1-13: McGraw-Hill.
- Rossi, G. 1990c. Preface. En: Rossi, G. (ed.) *Biohydrometallurgy*. Pp. xv-xvi: McGraw-Hill.
- Rossi, G. 1990d. Specific examples of ore and concentrate leaching. En: Rossi, G. (ed.) *Biohydrometallurgy*. Pp. 493-552: McGraw-Hill.
- Royer, R. A., Dempsey, B. A., Jeon, B.-H. y Burgos, W. D. 2003. Inhibition of Biological Reductive Dissolution of Hematite by Ferrous Iron. *Environmental Science & Technology* 38 (1): 187-193.
- Sancho, J. P. 2000. Metalurgia del Cobre. En: Sancho, J., Verdeja, L. F. y Ballester, A. (eds.) *Metalurgia extractiva*. Pp. 245-294: Editorial Síntesis.
- Sand, W. 1989. Ferric iron reduction by *Thiobacillus ferrooxidans* at extremely low pH-values. *Biogeochemistry* 7 (3): 195-201.
- Schippers, A., Hedrich, S., Vasters, J., Drobe, M., Sand, W. y Willscher, S. 2014. Biomining: Metal Recovery from Ores with Microorganisms. En: Schippers, A., Glombitza, F. y Sand, W. (eds.) *Geobiotechnology I*. Pp. 1-47: Springer Berlin Heidelberg.
- Schröder, U. 2007. Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency. *Physical Chemistry Chemical Physics* 9 (21): 2619-2629.
- Schrott, G. D., Bonanni, P. S., Robuschi, L., Esteve-Núñez, A. y Busalmen, J. P. 2011. Electrochemical insight into the mechanism of electron transport in biofilms of *Geobacter sulfurreducens*. *Electrochimica Acta* 56 (28): 10791-10795.

Bibliografía

- Senior, P. J., Beech, G. A., Ritchie, G. A. F. y Dawes, E. A. 1972. The role of oxygen limitation in formation of poly-beta-hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *azotobacter beijerinckii*. *Biochemical Journal* 128 (5): 1193-&.
- Shapiro, J. 1964. Effect of Yellow Organic Acids on Iron and Other Metals in Water. *Journal (American Water Works Association)* 56 (8): 1062-1082.
- Shimizu, K., Hutcheson, R., Engelmann, M. D. y Francis Cheng, I. 2007. Cyclic voltammetric and aqueous equilibria model study of the pH dependant iron(II/III)ethylenediaminetetraacetate complex reduction potential. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 603 (1): 44-50.
- Southam, G. y Beveridge, T. J. 1993. Examination of Lipopolysaccharide (O-Antigen) Populations of *Thiobacillus ferrooxidans* from Two Mine Tailings. *Applied and Environmental Microbiology* 59 (5): 1283-1288.
- Stone, A. T. 1997. Reactions of extracellular organic ligands with dissolved metal ions and mineral surfaces. *En: Banfield, J. F. y Nealson, K. H. (eds.) Geomicrobiology: Interactions between microbes and minerals*. Pp. 309-344: Mineralogical Society of America.
- Straub, K. L., Kappler, A. y Schink, B. 2005. Enrichment and Isolation of Ferric-Iron- and Humic-Acid-Reducing Bacteria. *En: Jared, R. L. (ed.) Methods in Enzymology*. Pp. 58-77: Academic Press.
- Straub, K. L. y Schink, B. 2003. Evaluation of electron-shuttling compounds in microbial ferric iron reduction. *FEMS Microbiology Letters* 220 (2): 229-233.
- Stumm, W. y Morgan, J. J. 1995a. *Aquatic Chemistry: Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters*, Wiley.
- Stumm, W. y Morgan, J. J. 1995b. Metal ions in aqueous solution: Aspects of coordination chemistry. *En: Stumm, W. y Morgan, J. J. (eds.) Aquatic Chemistry: Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters*. 3rd ed. Pp. 252-348: Wiley.
- Sulzberger, B., Suter, D., Siffert, C., Banwart, S. y Stumm, W. 1989. Dissolution of $Fe(III)$ (hydr)oxides in natural waters; laboratory assessment on the kinetics controlled by surface coordination. *Marine Chemistry* 28 (1-3): 127-144.
- Suter, D., Siffert, C., Sulzberger, B. y Stumm, W. 1988. Catalytic dissolution of iron(III)(hydr)oxides by oxalic acid in the presence of $Fe(II)$. *Naturwissenschaften* 75 (11): 571-573.
- Sydow, A., Krieg, T., Mayer, F., Schrader, J. y Holtmann, D. 2014. Electroactive bacteria—molecular mechanisms and genetic tools. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (20): 8481-8495.
- Syed, S. 2012. Recovery of gold from secondary sources—A review. *Hydrometallurgy* 115-116 (0): 30-51.
- Tan, K. H. 1998. Electrochemical cells and chemical potentials. *En: Tan, K. H. (ed.) Principles of Soil Chemistry* 3rd ed. Pp. 24-48: Marcel Dekker, Inc.
- Tanaka, K., Vega, C. A. y Tamamushi, R. 1983a. Mediating effects of ferric chelate compound in microbial fuel cells. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 11 (2-3): 135-143.

- Tanaka, K., Vega, C. A. y Tamamushi, R. 1983b. Thionine and ferric chelate compounds as coupled mediators in microbial fuel cells. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 11 (4-6): 289-297.
- Taxiarchou, M., Pantias, D., Douni, I., Paspaliaris, I. y Kontopoulos, A. 1997. Dissolution of hematite in acidic oxalate solutions. *Hydrometallurgy* 44 (3): 287-299.
- Taxiarchou, M., Pantias, D., Douni, I., Paspaliaris, I. y Kontopoulos, A. 1998. Dissolution of magnetite in acidic oxalate solutions. *Transactions of the Institution of Mining and Metallurgy Section C-Mineral Processing and Extractive Metallurgy* 107: C37-C41.
- Tebo, B., Geszvain, K. y Lee, S.-W. 2010. The Molecular Geomicrobiology of Bacterial Manganese(II) Oxidation. *En: Barton, L. L., Mandl, M. y Loy, A. (eds.) Geomicrobiology: Molecular and Environmental Perspective*. Pp. 285-308: Springer Netherlands.
- Tekin, T. y Bayramoğlu, M. 1993. Kinetics of the reduction of MnO_2 with Fe^{2+} ions in acidic solutions. *Hydrometallurgy* 32 (1): 9-20.
- Theis, T. L. y Singer, P. C. 1974. Complexation of iron(II) by organic matter and its effect on iron(II) oxygenation. *Environmental Science & Technology* 8 (6): 569-573.
- Torrent, J. y Barrón, V. 2002. Diffuse reflectance spectroscopy of iron oxides. *En: Hubbard, A. T. (ed.) Encyclopedia of Surface and Colloid Science*. New York: Marcel Dekker.
- Torres, C. I., Marcus, A. K., Lee, H.-S., Parameswaran, P., Krajmalnik-Brown, R. y Rittmann, B. E. 2010. A kinetic perspective on extracellular electron transfer by anode-respiring bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 34 (1): 3-17.
- Tredici, M. R. 1999. Bioreactors, Photo. *En: Flickinger, M. C. y Drew, S. W. (eds.) Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*. Pp. 395-419: John Wiley & Sons, Inc.
- Trotter, E. W., Rolfe, M. D., Hounslow, A. M., Craven, C. J., Williamson, M. P., Sanguinetti, G., Poole, R. K. y Green, J. 2011. Reprogramming of *Escherichia coli* K-12 Metabolism during the Initial Phase of Transition from an Anaerobic to a Micro-Aerobic Environment. *PLoS ONE* 6 (9): e25501.
- Turick, C. E., Tisa, L. S. y Caccavo, J., Frank 2002. Melanin Production and Use as a Soluble Electron Shuttle for Fe(III) Oxide Reduction and as a Terminal Electron Acceptor by *Shewanella* algae BrY. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (5): 2436-2444.
- Valdés, J., Pedroso, I., Quatrini, R., Dodson, R., Tettelin, H., Blake, R., Eisen, J. y Holmes, D. 2008. *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC Genomics* 9 (1): 597.
- van Aswegen, P., van Niekerk, J. y Olivier, W. 2007. The BIOX™ Process for the Treatment of Refractory Gold Concentrates. *En: Rawlings, D. E. y Johnson, B. D. (eds.) Biomining*. Pp. 1-33: Springer Berlin Heidelberg.
- Van der Zee, F. P. y Cervantes, F. J. 2009. Impact and application of electron shuttles on the redox (bio)transformation of contaminants: A review. *Biotechnology Advances* 27 (3): 256-277.
- Vega, C. A. y Fernández, I. 1987. Mediating effect of ferric chelate compounds in microbial fuel cells with *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus lactis*, and *Erwinia dissolvens*. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 17 (2): 217-222.

Bibliografía

- Vera, M., Schippers, A. y Sand, W. 2013. Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation—part A. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (17): 7529-7541.
- Vermaas, W. F. J. 2001. Photosynthesis and Respiration in Cyanobacteria. eLS. John Wiley & Sons, Ltd.
- Viera, M., Pogliani, C. y Donati, E. 2007. Recovery of zinc, nickel, cobalt and other metals by bioleaching. En: Donati, E. y Sand, W. (eds.) *Microbial Processing of Metal Sulfides*. Pp. 103-119: Springer Netherlands.
- Wang, Z., Liu, C., Wang, X., Marshall, M. J., Zachara, J. M., Rosso, K. M., Dupuis, M., Fredrickson, J. K., Heald, S. y Shi, L. 2008. Kinetics of Reduction of Fe(III) Complexes by Outer Membrane Cytochromes MtrC and OmcA of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (21): 6746-6755.
- Watanabe, K., Manefield, M., Lee, M. y Kouzuma, A. 2009. Electron shuttles in biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 20 (6): 633-641.
- Watling, H. R. 2006. The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides — A review. *Hydrometallurgy* 84 (1–2): 81-108.
- Weber, K. A., Achenbach, L. A. y Coates, J. D. 2006. Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nat Rev Micro* 4 (10): 752-764.
- Wehrli, B., Wieland, E. y Furrer, G. 1990. Chemical mechanisms in the dissolution kinetics of minerals; the aspect of active sites. *Aquatic Sciences* 52 (1): 3-31.
- Welch, K. D., Davis, T. Z. y Aust, S. D. 2002. Iron Autoxidation and Free Radical Generation: Effects of Buffers, Ligands, and Chelators. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 397 (2): 360-369.
- Wieland, E., Wehrli, B. y Stumm, W. 1988. The coordination chemistry of weathering: III. A generalization on the dissolution rates of minerals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 52 (8): 1969-1981.
- Wolf, M., Kappler, A., Jiang, J. y Meckenstock, R. U. 2009. Effects of Humic Substances and Quinones at Low Concentrations on Ferrihydrite Reduction by *Geobacter metallireducens*. *Environmental Science & Technology* 43 (15): 5679-5685.
- Wu, X.-y., Song, T.-s., Zhu, X.-j., Wei, P. y Zhou, C. 2013. Construction and Operation of Microbial Fuel Cell with *Chlorella vulgaris* Biocathode for Electricity Generation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 171 (8): 2082-2092.
- Wu, Y., Liu, T., Li, X. y Li, F. 2014. Exogenous Electron Shuttle-Mediated Extracellular Electron Transfer of *Shewanella putrefaciens* 200: Electrochemical Parameters and Thermodynamics. *Environmental Science & Technology* 48 (16): 9306-9314.
- Xin, B., Chen, B., Duan, N. y Zhou, C. 2011. Extraction of manganese from electrolytic manganese residue by bioleaching. *Bioresource Technology* 102 (2): 1683-1687.
- Xin, B., Li, T., Li, X., Dan, Z., Xu, F., Duan, N., Zhang, Y. y Zhang, H. 2015. Reductive dissolution of manganese from manganese dioxide ore by autotrophic mixed culture under aerobic conditions. *Journal of Cleaner Production* 92 (0): 54-64.
- Xu, A., Lao, Y., Zhang, Q., Li, J. y Xia, J. 2010. Extraction and characterization of PHB from *Acidiphilium cryptum* DX1-1. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.* 25 (6): 938-943.

- Yamanaka, T. 2008. General Considerations. *En*: Yamanaka, T. (ed.) *Chemolithoautotrophic Bacteria*. Pp. 1-10: Springer Japan.
- Yang, F., Hanna, M. y Sun, R. 2012. Value-added uses for crude glycerol--a byproduct of biodiesel production. *Biotechnology for Biofuels* 5 (1): 13.
- Yarlagadda, V. N., Gupta, A., Dodge, C. J. y Francis, A. J. 2012. Effect of exogenous electron shuttles on growth and fermentative metabolism in *Clostridium* sp. BC1. *Bioresource Technology* 108 (0): 295-299.
- Zang, V. y Van Eldik, R. 1990. Kinetics and mechanism of the autoxidation of iron(II) induced through chelation by ethylenediaminetetraacetate and related ligands. *Inorganic Chemistry* 29 (9): 1705-1711.
- Zeng, A.-P. y Deckwer, W.-D. 1996. Bioreaction techniques under microaerobic conditions: From molecular level to pilot plant reactors. *Chemical Engineering Science* 51 (10): 2305-2314.
- Zhang, L., Qiu, G.-z., Hu, Y.-h., Sun, X.-j., Li, J.-h. y Gu, G.-h. 2008. Bioleaching of pyrite by *A. ferrooxidans* and *L. ferriphilum*. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 18 (6): 1415-1420.
- Zhang, W. y Cheng, C. Y. 2007. Manganese metallurgy review. Part I: Leaching of ores/secondary materials and recovery of electrolytic/chemical manganese dioxide. *Hydrometallurgy* 89 (3-4): 137-159.
- Zinder, B., Furrer, G. y Stumm, W. 1986. The coordination chemistry of weathering: II. Dissolution of Fe(III) oxides. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 50 (9): 1861-1869.

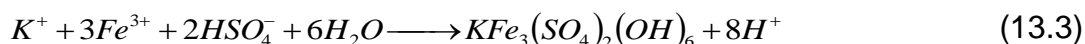
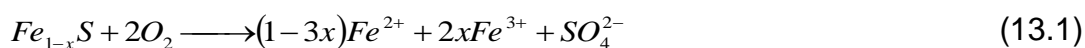
13 Apéndices

Apéndice I	Síntesis y caracterización de la jarosita	154
Apéndice II	Caracterización de los minerales	158
Apéndice III	Preparación de las muestras para la microscopía electrónica de barrido.....	163
Apéndice IV	Recuento microbiano	164
Apéndice V	Determinación de ión ferroso empleando ferrocina.....	166
Apéndice VI	Determinación de glucosa empleando ácido 3,5-dinitrosalicílico	167

Apéndice I Síntesis y caracterización de la jarosita

La jarosita es un mineral de color marrón amarillento, con fórmula $KFe_3(SO_4)_2(OH)_6$, descubierto en 1852 por August Breithaupt en el Barranco del Jaroso (Sierra Almagrera, España)¹. Actualmente, el término jarosita se utiliza para denominar una familia de hidroxisulfatos de Fe(III) con fórmula $MFe_3(SO_4)_2(OH)_6$, donde M representa cationes monovalentes (p.ej., Na^+ , K^+ , Rb^+ , H_3O^+ , NH_4^+ , Ag^+ , Tl^+), $0,5 Pb^{2+}$ o $0,5 Hg^{2+}$ ².

Este compuesto se forma “naturalmente” en los entornos mineros, donde los minerales sulfurados resultan expuestos a la atmósfera. Las condiciones ambientales y la proliferación de microorganismos oxidantes de hierro y azufre, causan: la disolución de estos sulfuros, la oxidación del Fe(II) y la precipitación de jarosita, según las ecuaciones 13.1 - 13.3³.



Además de esta generación natural, este hidroxisulfato de hierro puede generarse en algunos procesos industriales, entre los que destaca la hidrometalurgia del zinc. Ésta produce importantes cantidades de jarosita⁴ que podrían estimarse cercanas a las 5,7 Mt/año (35 % Fe), según la producción anual de zinc a partir de mineral, que se cifró en 2012 en 13,5 Mt/año⁵ y de la composición de los concentrados: más o menos 55 % Zn⁶ y 5-12 % Fe⁴. Debido a su peligrosidad, por su contenido de

¹ Swayze, G. A., Desborough, G. A., Smith, K. S., Lowers, H. A., Hammarstrom, J. M., Diehl, S. F., Leinz, R. W. y Driscoll, R. L. 2008. Understanding Jarosite - From Mine Waste to Mars. *En*: Verplanck, P. L. (ed.) *Understanding Contaminants Associated with Mineral Deposits*. Pp. 8-13 Reston, Virginia: U.S. Geological Survey.

² Dutrizac, J. E. 1999. The effectiveness of jarosite species for precipitating sodium jarosite. *JOM* 51 (12): 30-32.

³ Norlund, K. L. I., Baron, C. y Warren, L. A. 2010. Jarosite formation by an AMD sulphide-oxidizing environmental enrichment: Implications for biomarkers on Mars. *Chemical Geology* 275 (3-4): 235-242.

⁴ Arslan, C. y Arslan, F. 2003. Thermochemical Review of Jarosite and Goethite Stability Regions at 25 and 95°C. *Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences* 27 (1): 45-52.

⁵ USGS 2014. Mineral Commodity Summaries 2014. *En*: Interior, U. S. D. o. t. (ed.). U.S. Geological Survey.

⁶ IZA. 2011. *Zinc Production - From Ore to Metal* [En línea]. International Zinc Association. Disponible: http://www.zinc.org/basics/zinc_production [Referido el March 16th 2015].

metales, como Cd y Cu en formas ambientalmente móviles, además del propio Zn ⁷, este residuo es almacenado en estanques.

Síntesis de la jarosita

En el presente trabajo se empleó jarosita sintética de origen biogénico, generada mediante el cultivo de la arquea *Sulfolobus metallicus* en el medio de cultivo 9K a 65 °C ⁸. Para tal efecto se utilizó un reactor de vidrio de 4 L de capacidad, con volumen útil de 3,8 L, equipado con su respectiva manta calefactora. Para la agitación se empleó un agitador de hélice de acero inoxidable, unido a un motor Heidolph RZR 1, que rotaba a una velocidad de 700 rpm. La temperatura se controló mediante un termómetro de contacto de vidrio con imán giratorio, ubicado en una entrada lateral del reactor, acoplado al controlador de temperatura. La manta calefactora se conectó a este último dispositivo, de modo que cuando la temperatura estaba por debajo del punto de consigna ésta se encendía.

La tapa del reactor tenía cinco bocas, estando la central destinada a la agitación mediante el uso de un tapón perforado de teflón. Una segunda boca se utilizó para situar un tubo de distribución de gas, similar a un filtro de inmersión cilíndrico, que permitió burbujear aire a un caudal entre 2 y 3 L/min, de modo que se tuvo una aireación de 0,5-0,8 vvm (flujo volumétrico de aire por unidad de volumen de líquido por minuto). Este flujo se controló y midió intercalando en la línea de aire una válvula de aguja y un rotámetro, respectivamente. A fin de minimizar las pérdidas de líquido por evaporación, en la tercera boca (de mayor diámetro) se ubicó un condensador Dimroth enfriado con agua del grifo. En la cuarta boca se situó un tubo que llegaba casi al fondo del recipiente y que fue utilizado para la toma de muestras y el vaciado del reactor. Finalmente, la quinta boca, que se mantuvo tapada la mayor parte del tiempo, se utilizó para ajustar el pH.

Para el control del pH, que tendía a disminuir por la precipitación de la jarosita (ecuación 13.3), se agregó periódicamente NH₄OH. Para esto, el primer paso consistió en reponer con agua destilada el volumen de líquido que se había

⁷ Vyas, A. K. Year. Solidification- Stabilization Technique for Metal bearing Solid Waste from Zinc Industry - A case study. *En: International Conference on Environmental and Computer Science*, 2011 Singapore. IPCBEE, 151-155.

⁸ Silverman, M. P. y Lundgren, D. G. 1959. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology* 77 (5): 642-647.

evaporado y tomar una muestra de 100 mL. Esta muestra se valoró con NH_4OH (3 % p/v) hasta un pH final en el rango 1,8-2,0, lo que permitió calcular mediante una proporción simple el volumen de NH_4OH (30 % p/v) que se debía adicionar a los 3,7 L restantes contenidos en el reactor. Finalmente, se destapó la boca libre y se añadió lentamente esta cantidad de NH_4OH , a fin de minimizar la posibilidad de que se produjesen elevaciones locales de pH por sobre 2,7.

Cuando se apreció una cantidad significativa de jarosita y la concentración de Fe(II) era ya suficientemente baja, mediante el tubo ubicado en la cuarta boca se transvasó el contenido del reactor a otro recipiente, procurando mantener la agitación. El sólido se dejó sedimentar durante la noche en el interior del mencionado recipiente, tras lo que se procedió a retirar la mayor cantidad posible de sobrenadante y a verter el residuo a un embudo de separación. En este embudo el residuo se lavó adicionando porciones de agua destilada, agitando vigorosamente, dejando sedimentar y retirando el sobrenadante. Tras, al menos cuatro lavados, el sólido se transfirió a placas de Petri, se secó en una estufa a 105 °C durante la noche y se almacenó en condiciones ambientales.

Caracterización de la jarosita

La jarosita se caracterizó mediante difracción de rayos X (Figura 13.1) y microscopía electrónica de barrido (Figura 13.2) acoplada a espectroscopía de dispersión de energía de rayos X. Este último ensayo reveló que el cociente entre los porcentajes atómico de nitrógeno y potasio fue de 134, por lo que la fracción de amoniojarosita resultó significativamente mayoritaria. Finalmente, la digestión ácida del sólido, seguida de la medición de hierro total mediante absorción atómica, permitió determinar el contenido de este metal, $33,8 \pm 0,6$ % (p/p).

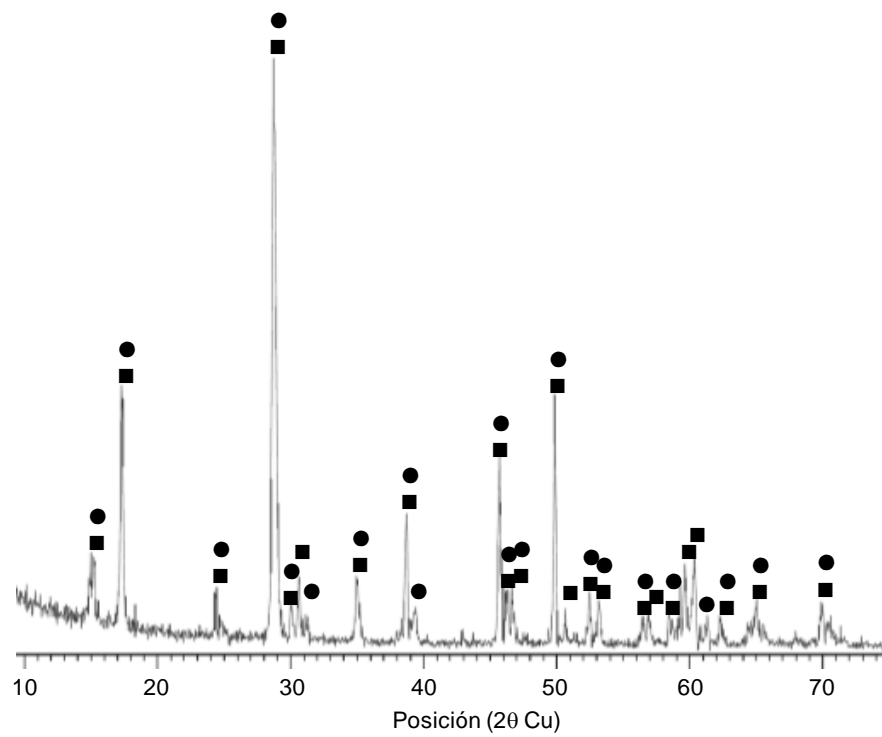


Figura 13.1: Difractograma de rayos X de la jarosita sintetizada. $\text{KFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$ (●) y $(\text{NH}_4)\text{Fe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$ (■).

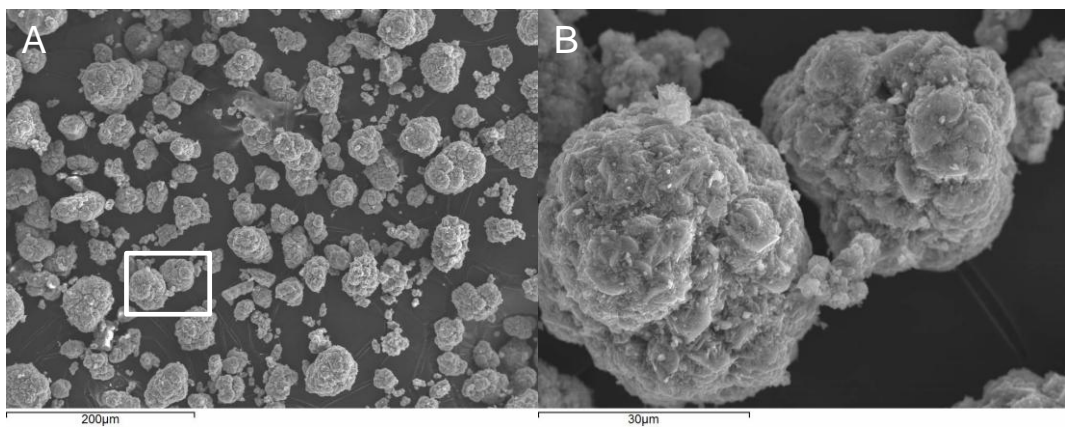


Figura 13.2: Micrografías electrónicas de barrido de la jarosita sintetizada. La sección marcada con un recuadro en A se muestra ampliada en B.

Apéndice II Caracterización de los minerales

Magnetita

El mineral de magnetita, gentilmente cedido por el Dr. Joan Viñals, de la Universidad de Barcelona, fue molido, recogiendo la fracción con un tamaño de partículas menor a 0,090 mm. La caracterización de este sólido mediante microscopía electrónica de barrido y XRD se presenta en las Figuras 13.3 y 13.4, respectivamente, mientras que el análisis de FRX y la digestión ácida de la muestra arrojaron la composición mostrada en la Tabla 13.1. El análisis de XRF indica que la magnetita empleada es un mineral con elevado grado de pureza, con pequeñas cantidades de hematites y wustita (Figura 13.4), dada la cercanía de los valores de composición obtenidos (Tabla 13.1) con aquellos correspondientes a la magnetita, 72 % Fe y 28 % O.

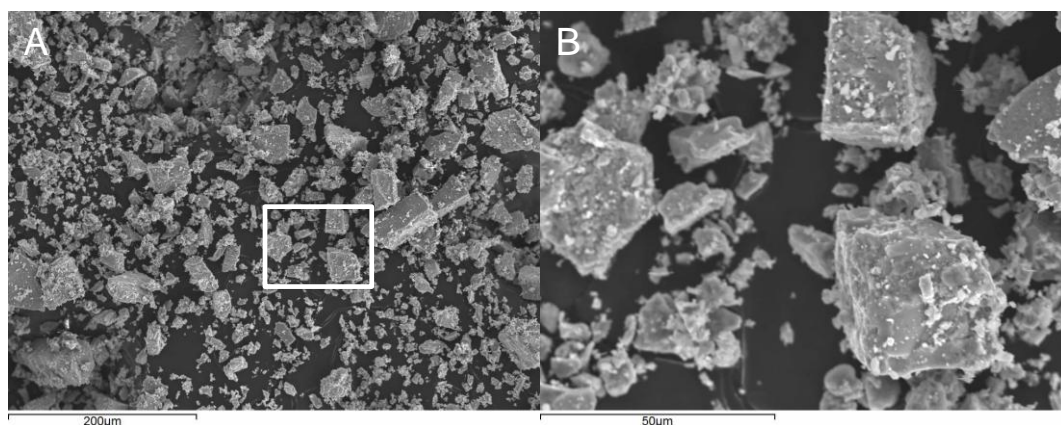


Figura 13.3: Micrografías electrónicas de barrido de la magnetita. La sección marcada con un recuadro en A se muestra ampliada en B.

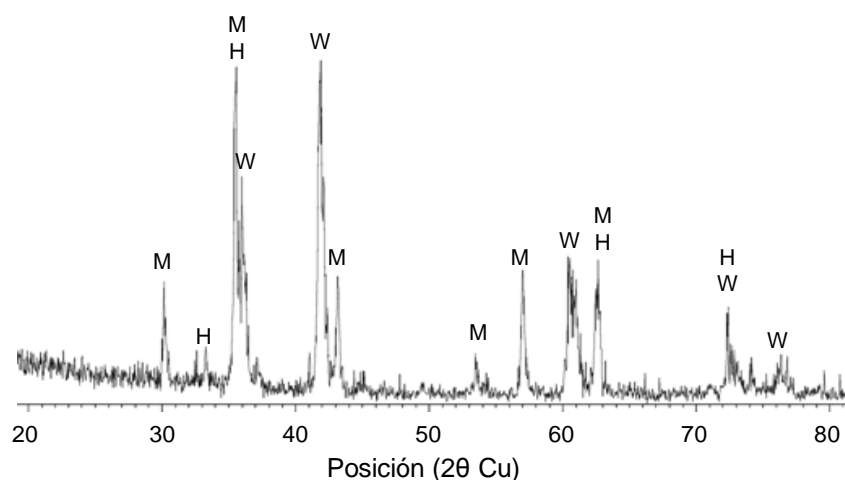


Figura 13.4: Difractograma de rayos X del mineral de magnetita. Magnetita (M), hematites (H) y wustita (W).

Tabla 13.1: Composición del mineral de magnetita (% p/p).

Elemento	XRF	Digestión ácida
Fe	68,8	71,7±2,1
O	30,2	-

Goethita

El mineral de goethita provino de Itinga (Mina Gerais), Brasil. Las Figuras 13.5 y 13.6 presentan su caracterización a través de microscopía electrónica de barrido y difracción de rayos X, respectivamente, mostrando esta última que se trata de un sólido con elevado grado de pureza.

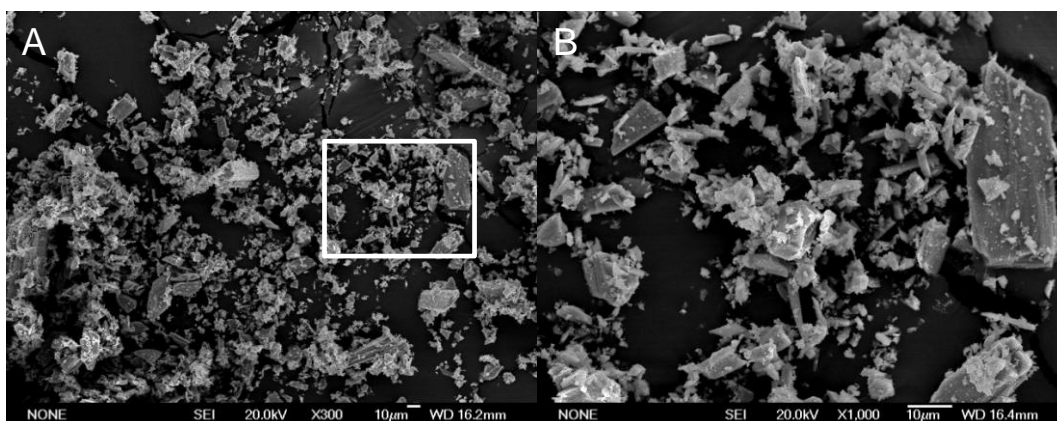


Figura 13.5: Micrografía electrónica de barrido del mineral de goethita. La sección marcada con un recuadro en A se muestra ampliada en B.

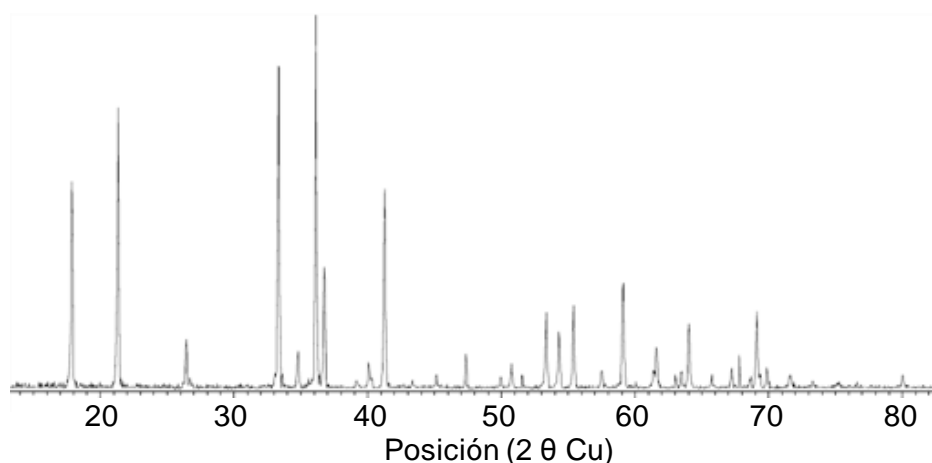


Figura 13.6: Difractograma de rayos X del mineral de goethita. Todos los picos fueron asignados a ésta fase cristalina.

Hematites

El mineral de hematites provino de la mina Jangada en Sarzedo (Minas Gerais), Brasil. Las Figuras 13.7 y 13.8 muestran su caracterización mediante microscopía electrónica de barrido y XRD, respectivamente, mientras que su composición elemental se reporta en la Tabla 13.2. En la tabla se puede ver que el mineral posee un alto contenido en fósforo, principalmente en forma de fosfatos (Figura 13.8).

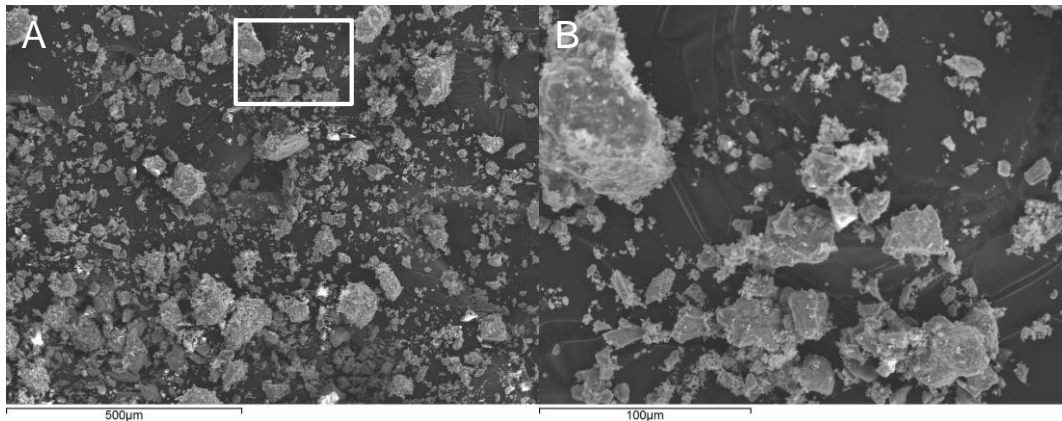


Figura 13.7: Micrográficas electrónicas de barrido del mineral de hematites. La sección marcada con un recuadro en A se muestra ampliada en B.

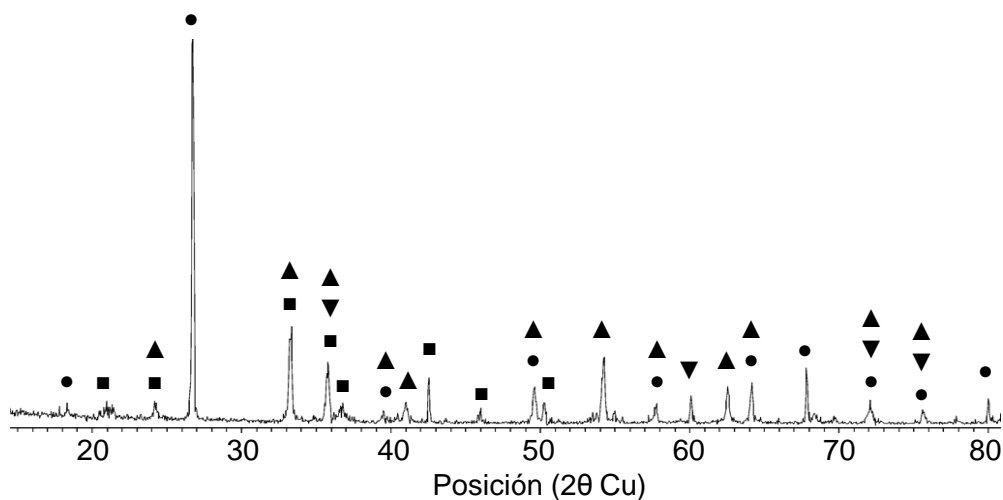


Figura 13.8: Difractograma de rayos X del mineral de hematites. Fe_2O_3 (▲), FeO (▼), $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (■), $\text{Fe}_{1,19}(\text{PO}_4)(\text{OH})_{0,57}(\text{H}_2\text{O})_{0,43}$ (●).

Tabla 13.2: Composición del mineral de hematites mediante XRF.

Elemento	% (p/p)
Fe	50,6
Si	10,5
Al	2,2
P	0,3
Mn	0,1
O	36,1

Manganeso

En los experimentos se utilizaron dos minerales de manganeso, uno proveniente de Brasil y otro de Costa de Marfil. Las Figuras 13.9 y 13.10 muestran los resultados de los análisis de difracción de rayos X y microscopía electrónica de barrido, respectivamente. Adicionalmente, en la Tabla 13.3 se reporta la composición de ambos minerales, donde se puede ver que el proveniente de Brasil tiene un contenido marginal de manganeso, mientras que el de Costa de Marfil posee una baja ley de este metal⁹.

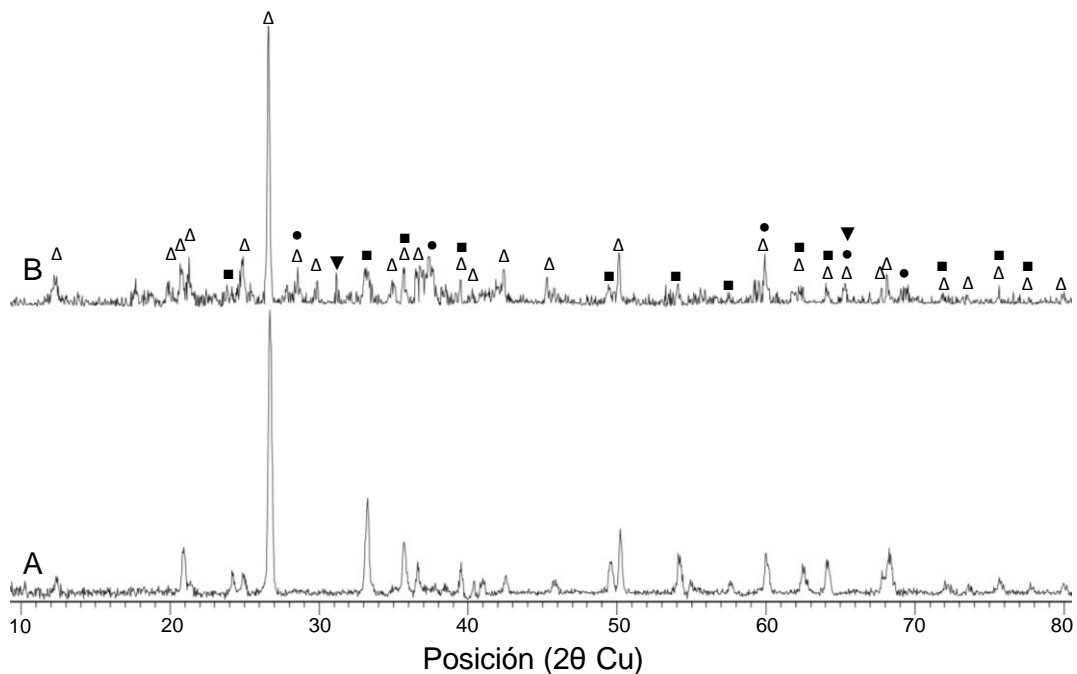


Figura 13.9: Difractograma de rayos X de los minerales de manganeso de Brasil (A) y Costa de Marfil (B) empleados en el estudio. $Mn_{0,176}Fe_{1,824}O_3$ (■), $MnO_{1,88}$ (●), Fe_3O_4 (▼) y SiO_2 (Δ).

⁹ Das, A. P., Sukla, L. B., Pradhan, N. y Nayak, S. 2011. Manganese biomining: A review. *Bioresource Technology* 102 (16): 7381-7387.

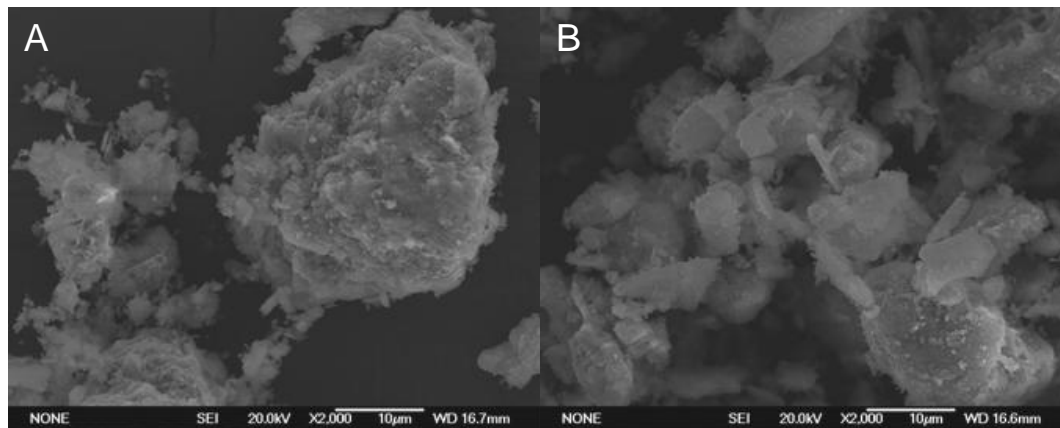


Figura 13.10: Micrografía electrónica de barrido de los minerales de manganeso procedentes de Brasil (A) y Costa de Marfil (B).

Tabla 13.3: Composición de los minerales de manganeso usados en este estudio (% p/p).

Elemento	Mineral de Brasil		Mineral de Costa de Marfil	
	XRF	Digestión ácida	XRF	Digestión ácida
Mn	7,25	7,56±0,08	24,03	25,1±0,2
Fe	25,09	24,4±0,0	11,09	9,86±0,08
Si	23,97	-	14,17	-
O	36,96	-	37,75	-
Al	5,60	-	10,14	-
K	0,47	-	1,34	-

Apéndice III Preparación de las muestras para la microscopía electrónica de barrido

El microscopio electrónico de barrido es una herramienta que permite obtener imágenes tridimensionales con alto grado de resolución debido a que emplea un haz de electrones en una cámara de alto vacío en lugar de luz. Esta técnica sólo requiere que la muestra sea conductora, lo que se consigue fácilmente tras recubrirla con una fina capa de carbono o metal, comúnmente oro.

Debido al gran contenido de agua de las muestras biológicas, el primer paso consistió en la deshidratación y reemplazo por acetona del agua contenida, lo que se consiguió poniendo en contacto la muestra con disoluciones de acetona-agua de concentración creciente. Para ello, se emplearon disoluciones con un 10, 30, 50, 70 y 90 % (v/v) de acetona, las que estuvieron en contacto con la muestra entre 30 y 60 min. Una vez que la muestra estaba en contacto con la disolución al 90 % (v/v) de acetona, se mantuvo durante la noche bajo refrigeración (4 °C); a la mañana siguiente, se puso en contacto con acetona pura durante al menos 30 min y se introdujo en el interior de un secador de punto crítico.

En el secador de punto crítico tuvieron lugar dos procesos: en primer lugar, el reemplazo de la acetona líquida por CO₂ líquido y, segundo, la elevación de la temperatura y presión sobre las del punto crítico del CO₂, a fin de evaporar este último y obtener una muestra totalmente seca. Finalmente, ésta se fijó en el portaobjeto con una cinta adhesiva de grafito y se recubrió con una capa conductora de metal (metalizado, por ejemplo con oro) o grafito.

Apéndice IV Recuento microbiano

Una cámara de recuento corresponde a un portaobjeto modificado de forma que entre el portaobjeto y el cubreobjeto existe una distancia específica constante, llamada profundidad de la cámara. El portaobjeto también tiene dibujado una cuadrícula formada por cuadros grandes y pequeños, con líneas que se ubican a distancias determinadas, que varían según el diseño de la cámara¹⁰.

Existen dos tipos de cámaras, el hemocitómetro (cámara para el recuento de células sanguíneas), apropiada para organismos con diámetro de 3 μm o superior, y la cámara de Petroff-Hausser, usada principalmente para bacterias¹¹. Independiente del tipo de cámara, la metodología consiste en contar bajo el microscopio el número de células presentes en una determinada área y calcular, posteriormente, la densidad celular mediante la fórmula 13.4¹².

$$\text{densidad celular} = \frac{\text{número de células}}{\text{superficie recontada} \cdot \text{profundidad de la cámara} \cdot \text{factor de dilución}} \quad (13.4)$$

Fuentes de error

Al utilizar esta técnica, se pueden cometer varios tipos de errores, que afectarán, en mayor o menor medida, la cuantificación celular. Algunos de los más comunes son¹³:

- Error en la adquisición de la muestra (que la muestra no represente el cultivo microbiano).
- Error en la dilución.
- Error por carga incorrecta de la cámara de recuento (que se tenga un sobrellenado de la cámara, burbujas de aire, resecaión de la cámara, etc.).
- Error en la distribución de las células en la cámara.
- Errores humanos.
- Error estadístico (que no se recuente un número significativo de microorganismos).

¹⁰ Marienfeld. 2013. *Rejillas de recuento* [En línea]. Disponible: http://www.marienfeld-superior.com/index.php/technical-information-402.html?file=tl_files/Infomaterial/Zeichnungen/description-reticulos.pdf [Referido el 23 Marzo 2015].

¹¹ Dutta, R. 2008. *Fundamentals of Biochemical Engineering*, Springer.

¹² Marienfeld. 2010. *Cámara de recuento* [En línea]. Disponible: http://www.marienfeld-superior.com/index.php/manuals-401.html?file=tl_files/Infomaterial/Anleitungen%20und%20Anwendung/Z%C3%A4hlkammern/2010-Marienfeld-info-camaras-de-recuento.pdf [Referido el 23 Marzo 2015].

¹³ Celeromics. 2013. *Los errores más comunes en recuentos celulares* [En línea]. Disponible: <http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Errores-Conteo-Celular.pdf> [Referido el 23 Marzo 2015].

Viabilidad y motilidad

Es importante destacar que este método no logra diferenciar los microorganismos viables de los que no lo son, debido a que ambos tienen el mismo aspecto frente al microscopio. Sin embargo, el uso de tinciones específicas, capaces de teñir diferencialmente ambos grupos, permite su diferenciación.

La motilidad de los microorganismos representa un problema en el momento de contarlos. De este modo, para disminuir la movilidad de bacterias, logrando diferenciar microorganismos viables de totales, se aconseja el uso de alcohol polivinílico al 4 % (p/v) o metilcelosolve (2-metoxietanol)¹⁴. Por el contrario, si no se desea tal diferenciación, se puede utilizar formaldehído hasta una concentración final del 1 % (p/v)¹⁴ o una disolución formol-salina (formaldehído y NaCl)¹⁵. Entre las disoluciones de utilidad histológica y microbiológica que contienen formaldehído, una disolución de formaldehído neutro tamponado, cuya composición se detalla en la Tabla 13.4, suele ser preferible a una disolución formol-salina (10 % de disolución de formalina en 0,9 % NaCl acuoso), dada su isotonicidad¹⁶.

Tabla 13.4: Composición de la disolución de formaldehído neutro tamponado¹⁶.

Componente	Cantidad
Formalina (~40 % formaldehído en agua)	100 mL
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	4,0 g
Na ₂ HPO ₄	6,5 g
Agua destilada	900 mL

¹⁴ Herbert, R. A. 1990. Methods for Enumerating Microorganisms and Determining Biomass in Natural Environments. En: Grigorova, R. & Norris, J. R. (eds.) *Methods in Microbiology*. London: Academic Press.

¹⁵ University of Leeds. 2012. *Counting microbes* [En línea]. Leeds: Faculty of Biological Sciences, University of Leeds. Disponible: http://www.fbs.leeds.ac.uk/institutes/ilse/movies/microbiology/transcript/Counting_microbes.html [Referido el 2012].

¹⁶ Bristol University. 2012. *Histological fixatives* [En línea]. Bristol: Veterinary Pathology, School of Veterinary Sciences, University of Bristol. Disponible: <http://www.bristol.ac.uk/vetpath/cpl/histfix.htm#NBF> [Referido el 2012].

Apéndice V Determinación de ión ferroso empleando ferrocina

El método espectrofotométrico para la determinación de Fe(II) empleando ferrocina¹⁷ se basa en que este compuesto, la sal disódica del ácido 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triacina 4'4''-disulfónico ($C_{20}H_{12}N_4Na_2O_6S_2$), reacciona con el hierro divalente para formar un complejo estable de color magenta, soluble en agua.

Los análisis se realizaron mezclando 0,1 mL de la disolución problema, cuya concentración de ion ferroso se deseaba determinar, con 3,0 mL de disolución de ferrocina. Esta mezcla se dejó reaccionar durante 15 s para lograr la formación del complejo color magenta, cuya absorbancia se midió a 562 nm. La determinación del ión ferroso se realizó por comparación con una curva de calibrado elaborada a concentraciones conocidas de un patrón de Fe(II), por ejemplo, sulfato ferroso de etilendiamonio ($C_2H_{10}N_2O_4S \cdot FeSO_4 \cdot 4H_2O$, PM = 382,15 g/mol).

La disolución de ferrocina antes mencionada, se preparó disolviendo 1 g de ferrocina en 1 L de un buffer HEPES (ácido 2-[4(2-hidroxi)etil]-1-piperasini] etanosulfónico, $C_8H_{18}N_2O_4S$) 50 mmol/L (11,92 g/L) ajustado previamente a pH 6,5 con NaOH.

La ecuación 13.5 presenta, a modo de ejemplo, el ajuste lineal de los datos de la curva de calibración en el rango de concentración de Fe(II) entre 0 y 3,3 mmol/L. Finalmente, es importante señalar que a elevados valores de pH y en un ambiente oxidante, como lo es la atmósfera, el Fe(II) se oxida fácilmente. Por esta razón, la muestra se estabilizaba realizando una dilución inmediata de ésta en HCl 1 mol/L.

$$Abs_{562nm} = 0,8635 \cdot C \text{ [mmol/L]} + 0,0087 \quad r^2 = 0,9999 \quad (13.5)$$

¹⁷ Stookey, L. L. 1970. Ferrozine - A new spectrophotometric reagent for iron. *Analytical Chemistry*, 42, 779-781.

Apéndice VI Determinación de glucosa empleando ácido 3,5-dinitrosalicílico

La glucosa es un azúcar reductor debido al grupo carbonilo que le permite reaccionar con otras moléculas. Aunque su cuantificación puede realizarse mediante HPLC y *kits* enzimáticos, también pueden utilizarse técnicas más rudimentarias como la del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS por sus siglas en inglés)¹⁸, debido a que este compuesto reacciona con los azúcares reductores formando un compuesto nitroamino altamente coloreado¹⁹.

Metodología de análisis para altas concentraciones

Los análisis se realizaron poniendo 0,5 mL de cada muestra problema y 0,5 mL del reactivo DNS en un tubo de ensayo de vidrio con tapa roscada. El tubo se tapó e incubó durante 15 min en un baño de agua a ebullición, al cabo de lo que se sumergió en un baño de agua con hielo. Cuando el contenido se hubo enfriado, se añadieron 5 mL de agua destilada, se dejó reposar durante 15 min y se midió la absorbancia a 540 nm. La determinación de la concentración de glucosa se llevó a cabo comparando con una curva de calibrado construida con concentraciones conocidas de glucosa, previamente secada a 105 °C, como la representada en la ecuación 13.6 para concentraciones de glucosa entre 0 y 3 g/L.

$$\text{Abs}_{540\text{nm}} = 0,4906 \cdot C \text{ [g/L]} - 0,0050 \quad r^2 = 0,9973 \quad (13.6)$$

El reactivo DNS antes referido se preparó disolviendo 1,6 g de NaOH y 30 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) en 75 mL de agua caliente. Posteriormente, se añadió lentamente 1 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico hasta su total disolución. Finalmente, la disolución se dejó enfriar, se aforó a 100 mL con agua destilada y se almacenó bajo refrigeración (4 °C) y protegida de la luz, para evitar su degradación.

Metodología de análisis para bajas concentraciones

Se realizaron variaciones del protocolo para altas concentraciones más arriba descrito, cambiando la cantidad de muestra y el volumen de agua adicionada tras

¹⁸ Miller, G. L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.

¹⁹ Sumner, J. B. y Graham, V. A. 1921. Dinitrosalicylic acid: A reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine. *Journal of Biological Chemistry*, 47, 5-9.

enfriar el tubo de ensayo, de modo que cada serie presentara igual volumen final. Con estas variantes, se analizó una disolución de glucosa 0,9 g/L, obteniendo los valores de absorbancia presentados en la Figura 13.11. A partir de estos resultados, se diseñó el protocolo para bajas concentraciones que se detalla a continuación.

El análisis se llevó a cabo poniendo 1,0 mL de la muestra problema y 0,5 mL del reactivo DNS en un tubo de ensayo de vidrio con tapa roscada. El tubo fue tapado e incubado durante 15 min en un baño de agua a ebullición y sumergido en un baño de agua con hielo. Cuando el contenido se había enfriado, se añadieron 0,5 mL de agua destilada, se dejó reposar durante 15 min y se midió la absorbancia a 540 nm. La determinación de la concentración de glucosa se realizó por comparación con una curva de calibrado construida con concentraciones conocidas de glucosa, previamente secada a 105 °C, como la mostrada en la ecuación 13.7 para concentraciones de glucosa entre 0 y 1 g/L.

$$\text{Abs}_{540\text{nm}} = 2,2765 \cdot C \text{ [g/L]} - 0,0640 \quad r^2 = 0,9981 \quad (13.7)$$

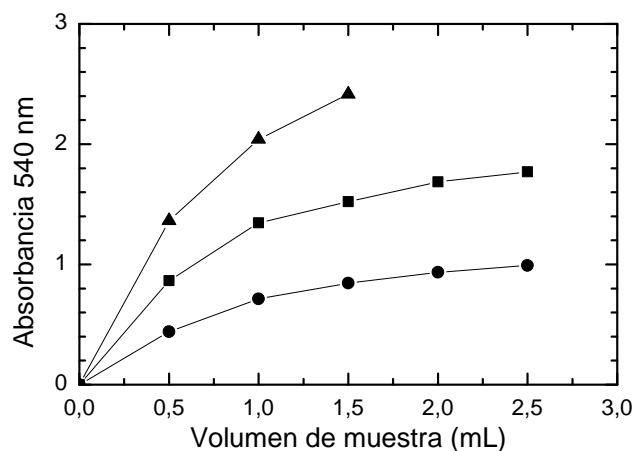


Figura 13.11: Perfiles de absorbancia obtenidos de aplicar las variantes del método a una disolución de glucosa 0,9 g/L. Volumen final posterior a la adición de agua: 2 (▲), 3 (■) y 6 mL (●).

Eliminación de la interferencia por Fe(II)

Se observó que el Fe(II) constituye una interferencia para este método, probablemente, por ser un agente reductor. Aplicando estos protocolos a una batería de disoluciones, con concentraciones crecientes de ion ferroso, se determinó la magnitud del error por la presencia de este ion, según se muestra en la Figura 13.12, determinándose que concentraciones de Fe(II) menores a 0,1 mmol/L y 0,05 mmol/L causan errores despreciables en los protocolos para altas y bajas

concentraciones, respectivamente. Para remover esta impureza, se evaluó la precipitación de compuestos de Fe(II) a través de sus valores de pK_{ps} , los que se presentan en la Tabla 13.5, resultando la posibilidad de precipitar el ion ferroso en forma de $Fe(OH)_2$ debido a su elevado valor de pK_{ps} .

Para estudiar la factibilidad de remover el Fe(II) de la disolución, se valoraron soluciones de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (100 mL de 30, 60 y 90 mmol/L de Fe(II)) con NaOH (1,0 y 2,0 mol/L). A lo largo del proceso se tomaron muestras (de 0,5 mL) que fueron analizadas para determinar el contenido de Fe(II) por el método de la ferrocina. De este modo, se obtuvo que para las disoluciones con concentraciones iniciales de 30, 60 y 90 mmol/L de Fe(II), se necesitaron 0,1, 0,16 y 0,22 mmol de NaOH/mL de disolución inicial, respectivamente, para que la concentración de Fe(II) cayese bajo 0,01 mmol/L, según se muestra en la Figura 13.13, valor que causa un error despreciable en ambos métodos. A pesar de esto, para asegurar niveles mínimos de

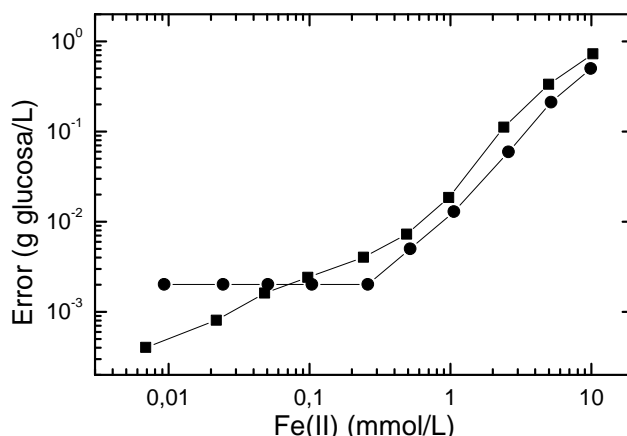


Figura 13.12: Determinación de glucosa por el método del DNS para altas (●) y bajas (■) concentraciones en soluciones con distinta concentración de ión ferroso.

Tabla 13.5: Constantes de producto de solubilidad de compuestos de Fe(II) ²⁰.

Compuesto de Fe(II)	Fórmula	pK_{ps}
Carbonato	$FeCO_3$	10,50
Fluoruro	FeF_2	5,63
Hidróxido	$Fe(OH)_2$	16,31
Oxalato dihidrato	$FeC_2O_4 \cdot 2H_2O$	6,50
Sulfuro	FeS	17,20

²⁰ Dean, J. A. 1999. *Lange's Handbook of Chemistry*, McGraw-Hill.

Fe(II), en lo subsecuente, se emplearon 0,2 mL de NaOH 2 mol/L por cada mL de muestra en la etapa de precipitación previa a la determinación de glucosa por el método del DNS.

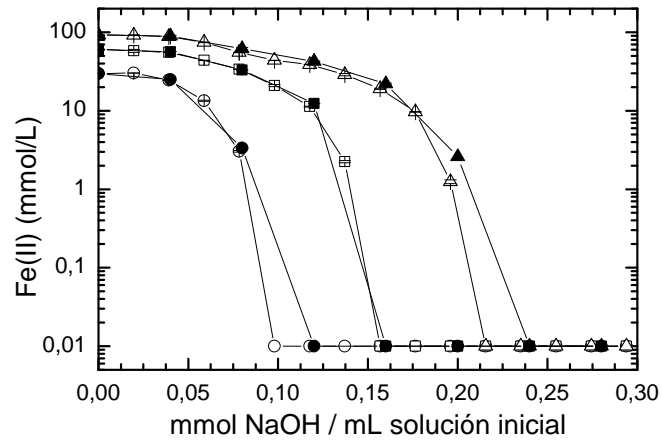


Figura 13.13: Perfiles de concentración de ión ferroso en la valoración con NaOH 1 y 2 mol/L (símbolos huecos y macizos, respectivamente) de soluciones de FeSO₄·7H₂O 30 (○,●), 60 (□,■) y 90 mmol/L (Δ,▲).