



Gargarello, Romina Mariel

Procesos de biomovilización y bioinmovilización de uranio(VI) para la remediación de suelos y aguas



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Gargarello, R. M. (2010). *Procesos de biomovilización y bioinmovilización de uranio(VI) para la remediación de suelos y aguas. (Tesis de maestría). Bernal, Argentina: Universidad Nacional de Quilmes. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/3908>*

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Procesos de biomovilización y bioinmovilización de uranio(VI) para la remediación de suelos y aguas

TESIS DOCTORAL

Romina Mariel Gargarello

rgargarello@gmail.com

Resumen

En la presente tesis doctoral se estudiaron ambos procesos de biorreducción- oxidación y biosorción de uranio, para especies bacterianas acidófilas, no utilizadas hasta el momento, en los procesos antes mencionados, y especies fúngicas resistentes de ocurrencia ambiental, respectivamente.

En primera instancia se estudió la resistencia a altas concentraciones de metal y capacidad reductora de uranio(VI) por las especies acidófilas y litoquimioautótrofas: *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

En segunda instancia se estudió la capacidad de retención de uranio por dos especies fúngicas ambientales, resistentes a uranio y a condiciones de elevada acidéz: *Acremonium sp.* y *Aphanocladium sp.*

Ambas metodologías estudiadas en esta tesis, bioprecipitación y biosorción, son potencialmente aplicables para separar compuestos solubles de uranio en cursos de agua y en efluentes líquidos (como el drenaje ácido de minas); o en suelos y sedimentos, evitando la migración hasta acuíferos y su contaminación.



*Procesos
de biomovilización y bioinmovilización
de uranio (VI)
para la remediación de suelos y aguas.*

Por:

Romina Mariel Gargarello

Licenciada en Biotecnología

*Trabajo final para acceder al título de Doctora mención en Ciencias Básicas y Aplicadas
de la Universidad Nacional de Quilmes.*

Dirección:

Dr. Gustavo A. Curutchet

Co- dirección:

Dr. Sebastián F. Cavalitto

Universidad Nacional de Quilmes

Procesos de
biomovilización y
bioinmovilización de
uranio(VI) para la
remediación de suelos y
aguas.

Romina Mariel Gargarello

Trabajo final para acceder al título de Doctora Mención en Ciencias
Básicas y Aplicadas de la Universidad Nacional de Quilmes

Director: Gustavo A. Curutchet
Co- director: Sebastián F. Cavalitto

Abril de 2010

Indice

	Página
Sobre el modo de lectura del presente trabajo	5
Introducción	7
Objetivos generales	15
Hipótesis de trabajo	17
Biorreducción y precipitación de uranio mediada por especies bacterianas	17
Biosorción de uranio por especies fúngicas	18
Materiales y Métodos Generales	19
A- Métodos analíticos de determinación de uranio	19
B- Estudio de la bioinmovilización en sistemas bacterianos	24
C- Estudio de la biosorción de uranio por especies fúngicas	31
Parte I: Biorreducción de uranio(VI) mediada por especies del género <i>Acidithiobacillus</i>	35
Características del género <i>Thiobacillus</i>	37
Cinética de crecimiento de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> en medios con concentración variable de fosfato	44
Adaptación de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> a concentraciones crecientes de uranio(VI). Reducción.	48
I- pH libre	48
II- pH controlado	55
Cinética de crecimiento de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> en medios con concentración variable de fosfato	61
Fe ²⁺ como sustrato	61
S ⁰ como sustrato	65

	Adaptación de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> a concentraciones crecientes de uranio(VI). Reducción.	68
	I- pH libre	68
	Crecimiento de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> en anaerobiosis	73
	hierro(III) como aceptor final	74
	uranio(VI) como aceptor final	77
Conclusiones		81
Expectativas de desarrollo a futuro		82
Parte II: Biosorción de uranio(VI) mediada por especies fúngicas resistentes		83
	Introducción	85
	Aislamiento y caracterización de especies fúngicas resistentes a altas concentraciones de uranio(VI)	90
	Cultivo en frascos agitados	93
	Estequiometría de crecimiento: Cultivo en tanque agitado	95
	Crecimiento de <i>Acremonium sp.</i> y <i>Aphanocladium sp.</i> en concentraciones crecientes de uranio(VI). Efecto del pH en la incorporación de uranio(VI).	102
	Biosorción de uranio(VI) por biomasa viable y biomasa seca de <i>Acremonium</i> y <i>Aphanocladium</i> . Experiencias en batch	108
	Biosorción de uranio(VI) por biomasa seca de <i>Acremonium</i> y <i>Aphanocladium</i> . Experiencias a flujo continuo	117
Conclusiones		127
Expectativas de desarrollo a futuro		129
Conclusión general		131
Bibliografía		133
Anexo I	Trabajos de difusión	141
Anexo II	Símbolos utilizados	143
Anexo III	Índice de figuras	145
Anexo IV	Índice de tablas	147
Anexo V	Índice de ecuaciones	149

Sobre el modo de lectura del presente trabajo

Durante el desarrollo del estudio de la relación de *Acidithiobacillus sp.* con uranio(VI), surgió una nueva línea de investigación basada en la interacción de especies fúngicas con dicho metal.

El presente trabajo de investigación engloba los resultados y conclusiones obtenidos en ambas líneas experimentales.

A fin de facilitar la lectura se ha editado de la siguiente forma:

- *Materiales y Métodos Generales*, donde se enumera la metodología común a todas las experiencias, los medios de cultivo utilizados y los métodos de cuantificación, entre otros.
- El desarrollo se divide en dos partes, a saber:

Parte I, dedicada al estudio de la relación *Acidithiobacillus sp.*- uranio(VI)

Parte II, dedicada al aislamiento y caracterización de especies fúngicas resistentes y los procesos de biosorción de uranio(VI) mediados por éstas.

- Cada *Parte* es precedida por su respectiva *Introducción*.
- Los experimentos correspondientes a cada *Parte*, se expresan como una *sección* con título, breve introducción (casualmente), objetivos particulares, materiales y métodos particulares, resultados, discusión y conclusiones particulares.
- Las conclusiones particulares, se encuentran escritas en itálica, centradas y en mayor tamaño a lo largo del texto.
- Al finalizar cada *Parte*, se expresan las *Conclusiones* de la misma, integrando todas las conclusiones particulares realizadas y se mencionan las *Expectativas de desarrollo a futuro*.

Introducción

Historia

El uranio fue descubierto como óxido en el año 1.789 por el químico alemán Martin Heinrich Klaproth. La especie encontrada fue UO_2 en el mineral conocido como *pechblenda* (UO_2 y U_3O_8 . Pech = una forma de alquitrán; blenden = lucir, brillar, cegar). Klaproth le puso el nombre *uranio* en alusión al planeta Urano.

El primero en aislarlo en estado metálico fue E.M. Peligot, en 1.841, que redujo con potasio su cloruro anhidro.

Las propiedades radioactivas del uranio fueron puestas de manifiesto en 1.896 cuando el físico francés Antoine Henri Becquerel produjo, por la acción de una sal fluorescente de uranio (sulfato de potasio y uranio), una imagen sobre una placa fotográfica cubierta con una sustancia absorbente de luz.

Existen yacimientos importantes de uranio en varios países del mundo, entre ellos, Canadá, Sudáfrica, República Checa, Alemania, Ucrania, Estados Unidos y Argentina (Merkel, B., et.al. 1995, en Meinrath, G., et. al. 1999).

Características y ocurrencia

El uranio es un metal pesado perteneciente a los elementos actínidos. El número atómico (Z) es 92 y el número másico (A) es 238.

La abundancia relativa (Tabla 1) en la naturaleza es comparable con la de elementos como plata y oro, y es aún mayor que la del estaño.

Isótopo	Vida media (millones de años)	Abundancia (%)	Actividad específica (Ci g ⁻¹) [†]
²³⁸ U	4500	99,2739	3,36 · 10 ⁻¹⁰
²³⁵ U	713	0,7204	1,922 · 10 ⁻⁰⁶
²³⁴ U	0,246	0,0055	6,25 · 10 ⁻¹²

Tabla 1: vida media y abundancia del uranio.

[†] (World Information Service on Energy- Uranium Project)

Todos los isótopos del uranio son radiactivos, decayendo por emisión de partículas alfa acompañado por radiación débil gama. El isótopo más abundante, ²³⁸U, forma una larga serie de productos de desintegración que incluyen torio (²³⁴Th), radio (²²⁶Ra) y radón (²²²Rd) hasta llegar al núcleo estable de plomo (Pb²⁰⁶).

Es interesante mencionar que la actividad específica del uranio en ocurrencia natural, aún la de sus isótopos, es menor que la de elementos tan comunes, como el potasio: la actividad específica del isótopo ⁴⁰K es 7,1 · 10⁻⁰⁶ Ci g⁻¹, cuya abundancia isotópica es 0,012%.

Teniendo en cuenta esta observación y considerando al uranio por sus características químicas como metal pesado, compuestos como el nitrato de uranilo o el óxido de uranio (IV) son considerados **químicamente tóxicos antes que radiotóxicos**.

Los estados de oxidación más comunes del uranio son +3, +4, +5 y +6 . Existe una gran variedad de compuestos de uranio: óxidos, uranatos, halogenuros, sulfuros, oxihalogenuros, hidruros, alcóxidos, alquilamidas, carboxilatos; predominando los estados de oxidación +4 y +6. Los potenciales estándar de reducción se indican en la figura 1.

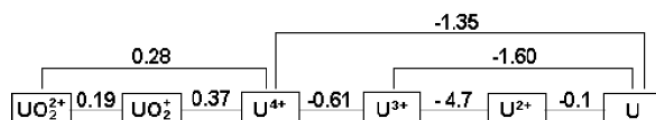


Figura 1: potenciales de reducción (E°) de las distintas especies del uranio. Tomado de (Meinrath, G. 1998)

De los iones del uranio, el ión U³⁺ se oxida rápidamente en solución, lo que lo convierte en un agente reductor poderoso, y constituye la excepción a la regla de los estados de oxidación comunes entre los actínidos. El ión U⁴⁺ es estable y se oxida lentamente al aire formando el catión uranilo (UO₂²⁺) en solución (Cotton, 1980; Meinrath, G. 1998)

En ecosistemas acuáticos naturales solo los estados de oxidación estables son +4 y +6. El uranio(IV) es extremadamente insoluble. De esta forma, el comportamiento en solución está gobernado exclusivamente por el uranio(VI). Estas diferencias en solubilidad entre los estados +4 y +6, determina si el uranio se encuentra soluble o móvil, precipitado, adsorbido o inmovilizado.

A pesar de ser más abundante que metales como plata, mercurio, cadmio o bismuto y estar ampliamente diseminado, existen relativamente pocos yacimientos explotables.

Los minerales más importantes son los formados por el óxido *uraninita* (UO₂). Suele encontrarse como constituyente de rocas graníticas y pegmatitas, rocas fosfáticas, o como mineral secundario asociado con minas de plata, plomo o cobre. También suele extraerse como contaminante junto con el crudo, en yacimientos petrolíferos (Paranhos Gazineu, M.H. et al., 2005).

En la actualidad es un metal pesado asociado exclusivamente a la actividad nuclear (U.S Environmental Protection Agency; National Center for Environmental Assessment, 1999; Antunes, S.C. et al., 2007; Merkel, B. et al., 1995 en Meinrath, G. et al., 1999).

Toxicología

La principal vía de ingreso al organismo es por inhalación de polvo de uranio en aire, por ingesta en agua y alimentos o, raramente, a través de heridas cutáneas. El uranio no se absorbe a través de la piel, y las partículas alfa no penetran este tejido. Según la EPA (U.S Environmental Protection Agency) la ingesta diaria de uranio se encuentra entre 0.07 y 1.1 µg totales.

Según la WHO (World Health Organization) la concentración de uranio en agua no debe exceder los 15 $\mu\text{g}/\text{L}$ (WHO 2004) y según lo establecido en el Acta de Agua Potable Segura (Safe Drinking Water Act) el límite de concentración es de 30 $\mu\text{g}/\text{L}$.

Cerca del 99% del uranio ingerido en comida y agua se elimina en las heces y el 1% restante ingresa en sangre. Luego de unos días es removido por el hígado y excretado en orina. Sin embargo parte de esta fracción se acumula en huesos, donde simula el metabolismo del calcio. Más aún, se cree que el ión uranilo se depositaría en la superficie del hueso y se intercambiaría por los iones calcio cristalizados en la misma, pero que no formaría por sí mismo una nueva capa de cristales (Kurtio, P. et al., 2005).

Los efectos del uranio en el organismo derivan en cáncer óseo, de hígado, riñón, pulmón (en caso de inhalación) y leucemia (ATSDR, 1999). La dosis ingerida se mide a través de análisis mensuales de orina o heces fecales, uñas y dedos. Sin embargo, no todos los centros de salud, a nivel mundial, poseen los elementos o *kits* de diagnóstico para realizar estos análisis rutinarios (U.S Environmental Protection Agency -EPA- 2006).

Problemática ambiental

Con el creciente uso del uranio para distintas causas, incluso para elaboración de armamento nuclear, ha aumentado considerablemente la presencia como contaminante en distintos ecosistemas. Pueden identificarse, al menos, tres actividades fuente de contaminación:

1. *Explotación minera*: generación de drenajes ácidos por la explotación; acumulación de minerales de baja ley y lixiviación de uranio; menas agotadas;
2. *Uso como combustible nuclear*: generación de residuos sólidos y líquidos con contenido de uranio y otros. Presencia de metales en el ambiente por accidentes laborales y de infraestructura.
3. *Uso militar*: como armamento nuclear.

En función de las actividades nombradas y las problemáticas generadas a partir del uso del uranio, la contaminación provocada puede clasificarse en función de:

- ❖ *El uranio por sus propiedades químicas*: donde la problemática recae sobre sus características como metal pesado. Por ejemplo, producto de la actividad minera.
- ❖ *El uranio como radionúclido*: relacionado a la dispersión de partículas radiactivas. Por ejemplo, por explosiones en plantas de energía nuclear; durante el traslado de residuos radiactivos; presencia en el ambiente como residuo peligroso, no controlado.

La contaminación de suelos y cursos de agua con uranio a partir de la explotación minera, constituye la principal causa de **contaminación química**, a raíz de la generación de drenajes ácidos mineros y la lixiviación a partir de minerales de baja ley, no utilizados y acumulados. Así, aquellas personas que viven en sitios cercanos a minas de uranio agotadas están expuestas a sus efectos, principalmente por ingesta de agua contaminada. Además, el suelo de alrededores queda inutilizado para su uso en agricultura, lo que provoca un impacto ambiental mayor (Groudev, S. et al. 1997).

La principal problemática de la **contaminación de uranio como radionúclido** es la disposición final de residuos líquidos y sólidos del ciclo del combustible nuclear (Macaskie, L., 1991). Los métodos de tratamiento suelen ser la compactación e incineración, seguida de la disposición final en rellenos. Este método requiere el control periódico durante la operación, el traslado de residuos y luego de cerrado el predio de enterramiento. En las últimas décadas, con el aumento en la densidad poblacional, surgieron asentamientos ubicados en los límites de estas zonas de disposición final, lo que constituye un verdadero riesgo para la salud de los habitantes. Tal es el caso de una instalación fabril, productora y comercializadora de polvo de UO_2 (*cake*) para uso en energía nuclear, en el Complejo Fabril de la ciudad de Córdoba, Argentina (Proyecto de Restitución Ambiental de la Minería del Uranio –PRAMU-, 2005).

Explosiones y otros accidentes en plantas de energía nuclear, como Chernovil, han provocado la expansión de polvo de uranio, disponiéndose en suelos, plantaciones, acuíferos y siendo inhalados por miles de habitantes. Estas situaciones también constituyen un evento de contaminación radiactiva, dado que tareas de mitigación solo son realizadas en el predio de la central, y no en los alrededores. Factores como vientos y lluvias, favorecen también la dispersión haciendo incontrolable la pluma de contaminación.

Estado actual en I+D y aplicación tecnológica

El agotamiento de yacimientos de uranio ha provocado el aumento en el interés de países más avanzados en la explotación minera para uso en energía nuclear, en generar procesos más efectivos de recuperación de radionúclidos, sobre todo desde minerales de baja ley y, desde el punto de vista ecológico, el desarrollo de procesos de remediación de suelos y aguas contaminadas con drenajes de minas en actividad o ya abandonadas y la mejora de los métodos de tratamiento de residuos generados por plantas nucleares (Merkel, B. et.al. 1995, en Meinrath, G. et. al. 1999).

Según las características del uranio, la remediación de sitios o acuíferos contaminados con uranio depende directamente de los equilibrios redox y ácido- base, ya que la movilidad del metal está dada por su estado de oxidación: la especie reducida uranio(IV), forma en condiciones naturales, el óxido insoluble $-UO_2-$ *uraninita*. En solución, predomina el catión uranilo $-UO_2^{2+}$ - libre o asociado a carbonatos (Kalin, M. et al., 2005).

Los procesos de remediación en los que se utilizan microorganismos, han sido ampliamente estudiados (Kalin, M. et al., 2005). Éstos son de especial interés en purificaciones con grandes volúmenes de trabajo y baja concentración de metal, donde los mecanismos convencionales, tales como:

- ❖ precipitación/ solubilización química,
- ❖ osmosis reversa,
- ❖ intercambio iónico,

no son tan efectivos o son económicamente costosos (Yang, J. et al., 1999; Pagnanelli, F. et al., 2001; Kalin, M. et al., 2005; Macaskie, L., 1991; Sar, P. et al., 2004; Rawlings, D., 1997). El objetivo perseguido en estos procesos biocatalizados, es el desarrollo de una alternativa:

- ❖ Económica
- ❖ De alta eficiencia
- ❖ Accesible
- ❖ De fácil manejo
- ❖ Robusta
- ❖ Segura
- ❖ Capaz de operar en condiciones de baja concentración de sustrato y grandes volúmenes

Para el caso particular del uranio, tuvo un rol predominante durante muchos años el estudio y desarrollo de procesos de **biosorción** (Yang, J. et al., 1999; Barkay, T. et al., 2001; Genç, Ö. et al., 2003; Kalin, M. et al., 2005; Macaskie, L., 1991; Sar, P. et al., 2004), altamente eficientes como complejos, y con rendimientos comparables con procesos fisicoquímicos (Volesky, B., 2007).

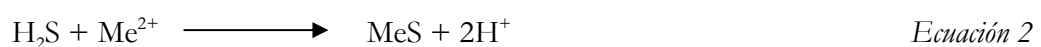
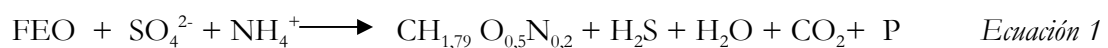
En la última década fueron caracterizadas especies mayormente bacterianas, resistentes a altas concentraciones de uranio y capaces de solubilizarlo o precipitarlo mediante mecanismos redox (¹⁻⁶ Lovley, D.):

- ❖ indirectos, mediante la producción de sulfuros, o
- ❖ directos, por transformación enzimática mediada por el citocromo c3.

que constituyen los procesos de biorremediación, denominados **biorreducción**, **bioprecipitación** o **bioinmovilización**.

Las especies involucradas en mecanismos de biorreducción y bioprecipitación de uranio(VI) son las pertenecientes al grupo de las sulfato- reductoras (SRB): *Desulfovibrio desulfuricans*, *Geobacter metallireducens* y *Shewanella putrefaciens* (² Lovley, D. et al., 1992; Ganesh, R. et al., 1999).

Las especies de este grupo habitan comúnmente los drenajes ácidos mineros, ricos en iones sulfato y provocando la precipitación de metales según describen las siguientes ecuaciones (a modo ilustrativo, sin balance de masa):



Donde $CH_{1,79}O_{0,5}N_{0,2}$ es la fórmula mínima de un microorganismo promedio, denominada *biomasa estándar* (Ertola, R. et al., 1994); Me^{2+} es el catión metálico; FEO es una fuente de electrones orgánica apropiada; P representa a uno o más productos carbonados resultantes de la reacción.

Como se describe, el proceso de oxidación de materia orgánica y reducción de metales, mediados por SRB's, se realiza en **condiciones anaeróbicas**.

Se han puesto a prueba procesos de biorremediación, principalmente en sitios manejados por el U. S. Department of Energy (DOE), con tecnología basada en procesos metabólicos de bacterias Sulfato Reductoras (SRB). Estas tecnologías son variadas dependiendo de la situación geográfica donde se encuentra la pluma de contaminación, por ejemplo:

- Humedales anaeróbicos con desechos como fuente de electrones orgánica (Brierley, 1997; Anderson, R. et al., 2002).
- *Biomaumentación*, adicionando fuente de energía como acetato (Acuífero Norman, Oklahoma. Wall, J. et al. 2006). Alternativamente, las fuentes de electrones utilizadas son lactato, citrato, y H_2 (Boonstra, J. et.al. 1997; Estrada Rendon, C. et al., 1997, Rawlings, D. 1997).
- Reactores en serie con sistemas de alcalinización y recuperación de sulfuros metálicos y azufre elemental (Boonstra, J. et al., 1997).

Cabe mencionar, que los microorganismos utilizados en estos procesos, son **heterótrofos y anaerobios** estrictos (Spear, J. R. et al., 2000; Ganesh, R. et al., 1999; ¹⁻⁶Lovley, D. et al), quedando al descubierto las desventajas de utilizarlos en tecnologías principalmente ex situ:

- El mantenimiento de condiciones anaeróbicas es complicado
- El volumen procesado es elevado
- Los costos de las fuentes de electrones utilizadas en muchos casos, también son elevados
- El exceso de H_2S generado debe ser tratado

El estudio de la recuperación de uranio por parte de otros organismos con conocida capacidad de reducción u oxidación de metales, por ejemplo especies del género *Acidithiobacillus*, en condiciones tanto anaeróbicas como aeróbicas, ha quedado relegado. Este aspecto, será desarrollado en el presente trabajo doctoral.

Aportes del presente trabajo

En la presente tesis doctoral, se estudiaron ambos procesos de **biorreducción- oxidación** y **biosorción** de uranio, para especies bacterianas acidófilas no utilizadas, hasta el momento, en los procesos antes mencionados, y especies fúngicas resistentes de ocurrencia ambiental, respectivamente.

En primera instancia se estudió la resistencia a altas concentraciones de metal y capacidad reductora de uranio(VI) por las especies acidófilas y litoquimioautótrofas: *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Ambos microorganismos han sido ampliamente utilizados en procesos de recuperación de metales (^{1,2}Bosecker, 1997; Cabrera, G. et al. 2007; Rawlings, D. 1997). Los mismos poseen elevada resistencia a metales, lo que les permite desarrollarse en altas concentraciones de

éstos (Das, A. et al., 1998; Takeuchi, M. et al., 2005; Novo, M. T. et al., 2000; Chen, B. et al., 2004).

Acidithiobacillus thiooxidans y *Acidithiobacillus ferrooxidans*, producen intermediarios en el metabolismo oxidativo del sustrato azufre elemental, altamente reductores, responsables de la recuperación de metales por reducción (op. cit).

Acidithiobacillus ferrooxidans es la responsable de la recuperación de metales a partir de sulfuros por los productos metabólicos H_2SO_4 y Fe^{3+} . Dado que es un microorganismo aerobio facultativo, adicionalmente utiliza iones metálicos como aceptores finales en la cadena respiratoria (Brock, T.; Madigan, M., 1993).

Con estos antecedentes surge la posibilidad de estudiar la factibilidad de procesos de tratamiento de suelos y aguas mediados por microorganismos **autótrofos aerobios** potencialmente más económicos, robustos y versátiles que un proceso con microorganismos heterótrofos anaerobios.

La utilización de *Acidithiobacillus sp.*, ofrece además la ventaja de que son microorganismos no patógenos para humanos o animales; adaptables a trabajo con agua de red (Di Nanno, M.P., 2003) y sin necesidad de manejo bajo estricta esterilidad (la extrema acidez alcanzada en cultivos impide el crecimiento de organismos organótrofos, salvo para otros acidófilos extremos, como ciertos hongos).

Cabe destacar que de los trabajos encontrados y tomados como antecedente (¹DiSpirito, A. et al., 1982; ²DiSpirito, A. et al., 1982; Tuovinen, O. et al., 1974) ninguno refiere a los últimos diez años, por lo que esta tesis representa una importante contribución al mayor conocimiento y caracterización del género en el marco de la investigación básica.

En segunda instancia se estudió la capacidad de retención de uranio por dos especies fúngicas ambientales, resistentes a uranio y a condiciones de elevada acidéz: *Acremonium sp.* y *Aphanocladium sp.*

El fenómeno de biosorción es uno de los grandes temas emergentes en procesos de biorremediación y recuperación, dado que existe una enorme cantidad de materiales que pueden utilizarse como sorbentes. El proceso está ligado directamente a las variadas interacciones moleculares entre la superficie del material (bio)sorbente y la sustancia de interés (metales, compuestos iónicos, proteínas, fármacos, etc). Por esta última característica -y por la rapidez y sencillez del proceso- es preferido por sobre procesos de bioacumulación, que implican el uso de células metabólicamente activas en las condiciones de trabajo.

La problemática ambiental y la búsqueda de métodos de tratamiento de efluentes más económicos (que reemplacen a los métodos fisicoquímicos nombrados con anterioridad en esta sección) marcaron el comienzo del interés en estos materiales. La mayoría de ellos son biológicos, como algas, hongos, bacterias; o productos de su crecimiento, como citrato, y exopolímeros (Ibañez, P.; Umetsu, Y.). Por lo general, la fuente de estos biosorbentes son desechos de actividades industriales.

En la actualidad, para determinados biosorbentes el proceso está altamente caracterizado y son propuestos a nivel industrial como un reemplazo económico de las tecnologías fisicoquímicas. Por ejemplo la biomasa de *Sargassum sp.*, es capaz de adsorber metales presentes en solución en un 99% (BV sorbex Inc., 2009).

Ambas metodologías estudiadas en esta tesis, **bioprecipitación** y **biosorción**, son potencialmente aplicables para separar compuestos solubles de uranio en cursos de agua y en efluentes líquidos (como el drenaje ácido de minas); o en suelos y sedimentos, evitando la migración hasta acuíferos y su contaminación.

Objetivos generales

A- Bioinmovilización de uranio por sistemas bacterianos

1. Optimización del medio de cultivo:
 - * Biodisponibilidad de uranio en solución a distintas concentraciones de fosfatos.
 - * Estudio de la cinética de crecimiento de *Acidithiobacillus thiooxidans* con azufre como fuente de electrones en medios de cultivo con distinta concentración de fosfato, en aerobiosis.
 - * Estudio de la cinética de crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* con hierro y con azufre como fuente de electrones en medios de cultivo con distinta concentración de fosfato, en aerobiosis.
2. Estudio de la cinética de crecimiento de *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Acidithiobacillus ferrooxidans*, en medios optimizados y con agregado de uranio(VI) en concentración creciente bajo condiciones aeróbicas. Adaptación a uranio(VI).
3. Estudio de la capacidad reductora de uranio(VI) de cada sistema de cultivo de *Acidithiobacillus thiooxidans*, en condiciones aeróbicas, a pH libre y a pH controlado.
4. Estudio de la capacidad de *Acidithiobacillus ferrooxidans* de utilizar uranio(VI) como aceptor final de la cadena respiratoria y S⁰ como sustrato.

B- Biosorción de uranio en sistemas fúngicos

1. Optimización del medio de cultivo.
2. Estudio de la cinética de crecimiento en frascos y biorreactor, con medios optimizados. Cálculo de parámetros estequiométricos.
3. Estudio de la cinética de crecimiento con uranio(VI) en concentración creciente. Resistencia y capacidad de adsorción *in vivo*.
4. Estudio de la capacidad máxima de adsorción estática de la biomasa activa y previamente desecada (Isotermas de adsorción).
5. Estudio de la capacidad máxima de adsorción dinámica de la biomasa previamente desecada y tamizada (Sistema de columnas).

Hipótesis de trabajo

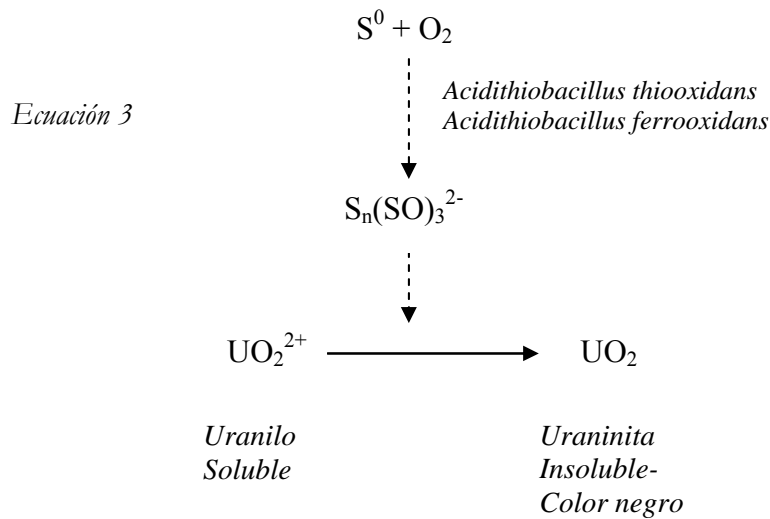
1- Biorreducción y precipitación de uranio mediada por especies bacterianas

1. Los compuestos reductores generados por el metabolismo de *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Acidithiobacillus ferrooxidans* median la reducción de uranio(VI) a uranio(IV) (reducción indirecta) como ocurre con cromo(VI) y vanadio(V) (Bredberg, K. et al., 2004; Viera, M. et al., 2003)

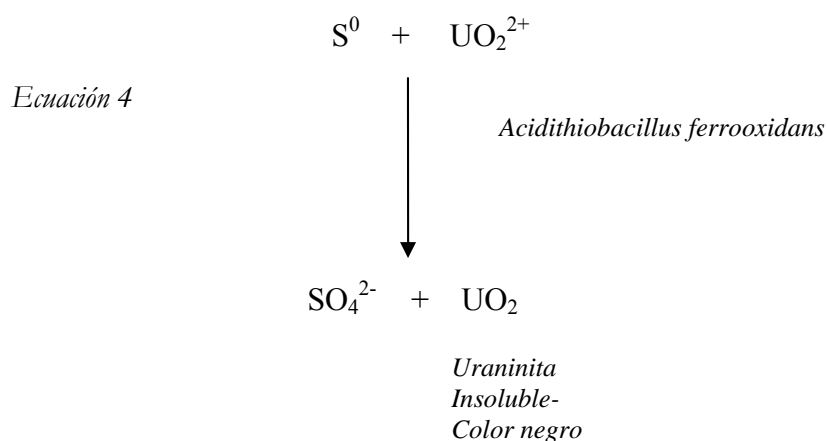
2. *Acidithiobacillus ferrooxidans* puede utilizar compuestos de uranio(VI) como aceptor de electrones en un proceso anaeróbico, precipitándolo en la forma UO_2 (uraninita), como ocurre con otros organismos hierro- reductores (Kashefi, K. et al., 2000; Mehta, T. et al., 2005; ² Lovley, D. et al., 1992).

Los procesos en estudio son los siguientes:

1- Reducción indirecta, en aerobiosis



2- Reducción directa en anaerobiosis



Dado que el uranio como metal pesado es tóxico y es necesario que el microorganismo utilizado en el proceso sea resistente a altas concentraciones del metal, se estudiará la resistencia y adaptación de *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Acidithiobacillus ferrooxidans* a concentraciones crecientes de uranio(VI).

Se tomarán como antecedentes, la adaptación lograda en laboratorio para *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Tuovinen, O. et al., 1974) y la resistencia de *Acidithiobacillus sp.* a altas concentraciones de otros metales pesados (Bredberg, K. et al. 2004; Das, A. et al., 1998; Takeuchi, M. et al., 2005; Novo, M. T. et al., 2000; Chen, B. et al., 2004).

La reducción de uranio, en ambos casos, se evidenciaría por la disminución de la masa total del mismo en la solución.

2- Biosorción de uranio por especies fúngicas

- i. *La biomasa viable y la biomasa seca (no viable) de las especies fúngicas resistentes a uranio(VI): Aphanocladium sp. y Acremonium sp. son capaces de adsorber uranio en solución, por mecanismos físicoquímicos o metabólicos como fue reportado para otros organismos* (Genç, Ö. et al., 2003; Kalin, M. et al., 2005; Yang, J. et al., 1999; Bengtsson, L. et al., 1995; Gonzalez Muñoz, M. et al., 1997; Akhtar, K. et al., 2007).

Materiales y Métodos Generales

A- Métodos analíticos de determinación de uranio

i- Determinación colorimétrica de uranio(VI) en solución por Arsenazo III

(Según Savvin, S.B, 1961 y Yong, P. et al., 1996.)

Breve comentario sobre métodos de determinación de uranio

Inicialmente, se estudiaron métodos colorimétricos reportados en literatura (Snell, F. et al.), basados en detección con reactivos de uso común: Tiocianato de amonio y Peróxido de Hidrógeno.

En solución alcalina, las especies más importantes del uranilo, UO_2OH^+ , $(\text{UO}_2)_2(\text{OH})_2^{2+}$ y $(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_5^+$, forman peroxo complejos estables y coloreados. Con este principio, se ensayaron tiempo de incubación y grado de alcalinización para muestras de distintas concentraciones de uranio(VI) tratadas con peróxido de hidrógeno. La linealidad se mantuvo a concentraciones bajas de uranio (0-20 ppm) pero la cuantificación en muestras provenientes de sistemas reales presentó efectos de matriz (interferencias por materia orgánica, sales del medio de cultivo, etc).

En soluciones de ácido sulfúrico o ácido clorhídrico, el complejo tiocianato- uranilo produce color amarillo- verdoso que permite cuantificar uranio colorimétricamente, sin que interfiera el complejo tiocianato-hierro. De manera que este método podría tenerse en cuenta para una determinación rápida y de fácil acceso, en forma económica y practica.

Para las cuantificaciones iniciales de uranio, por razones de disponibilidad del reactivo, este método fue el elegido, según Snell,F:

0.5 ml solución de metal (patrón o muestra)

0.9 ml de H_2SO_4 5%

0.14 ml de NH_4SCN 50% p/v.

Máximo de absorción determinado por barrido 400- 800 nm del complejo Tiocianato-uranilo: 365 nm.

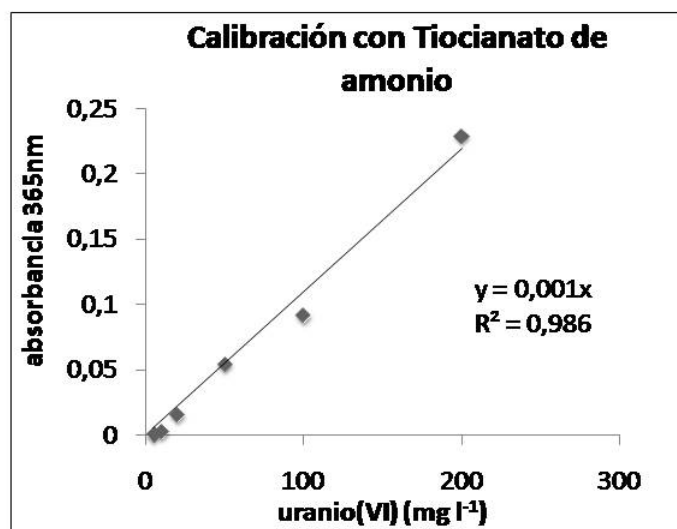


Figura 2: curva de calibración con tiocianato de amonio.

Sin embargo, el método colorimétrico más utilizado, estandarizado y **específico** desarrollado actualmente para medir uranio, se basa en una reacción con el compuesto sintético

Arsenazo III.

Arsenazo III (ácido 2,7- Bis arsenofenilazo- 1,8- dihidroxinaftalen- 3,6- disulfónico) es un reactivo fotométrico altamente específico para torio, circonio, lantano y uranio. Presenta también, alta selectividad para iones cuadrivalentes y también puede usarse para determinar otros lantánidos y actínidos (previo tratamiento de la muestra, dada la gran interferencia con compuestos que inhiben y que enmascaran la determinación. (Savvin, S.B., 1961).

La variación del color desarrollado por el complejo arsenazo- metal con la acidez del medio (relacionado con la capacidad de formar quelatos estables), lo hace aplicable para diseñar métodos de detección de metales en simultáneo (Yong, P. et al., 1996). Particularmente la posibilidad de trabajo en condiciones altamente ácidas, permite evitar problemas de hidrólisis de iones de los elementos a determinar. Al formar el complejo, el reactivo cambia de azul oscuro a fucsia, celeste o verde, según el pH y el metal en cuestión.

En el presente trabajo, para la determinación de uranio(VI) se siguió el método propuesto por Yong,P. et al. 1996, levemente modificado:

0.03 ml solución de metal (patrón o muestra)

1.95¹ ml HCl 0.1M

0.1 ml solución acuosa de Arsenazo III al 0.15% p/v.

Máximo de absorción determinado por barrido 400- 800 nm de la solución acuosa de Arsenazo: 532 nm.

Máximo de absorción determinado por barrido 400- 800 nm del complejo Arsenazo- uranilo: 650 nm.

Transición de color: azul oscuro a fucsia.

Tiempo de incubación: se mide al instante.

Estabilidad máxima observada del complejo: 2hs.

Desviación a rangos de concentración de uranio bajos (0. 75 mg/l uranio(VI)): ± 0.056

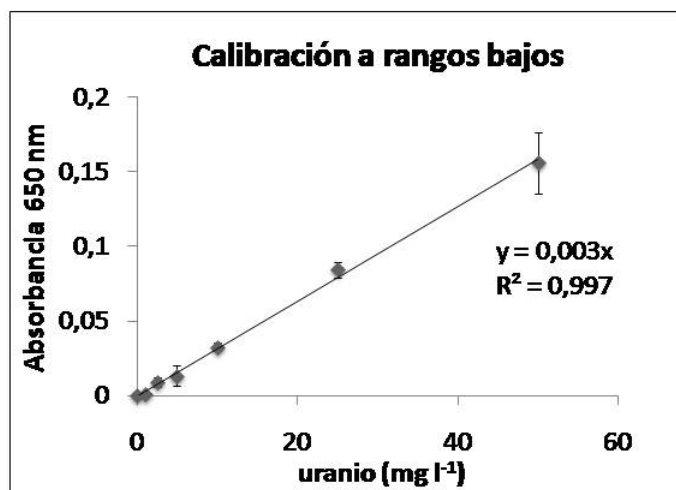


Figura 3: curva de calibración con Arsenazo III a rangos bajos de concentraciones de uranio(VI).

¹ volumen original en bibliografía: 1.97 ml

Desviación a rangos de concentración de uranio altos (100-300 mg/l uranio(VI)): ± 0.01

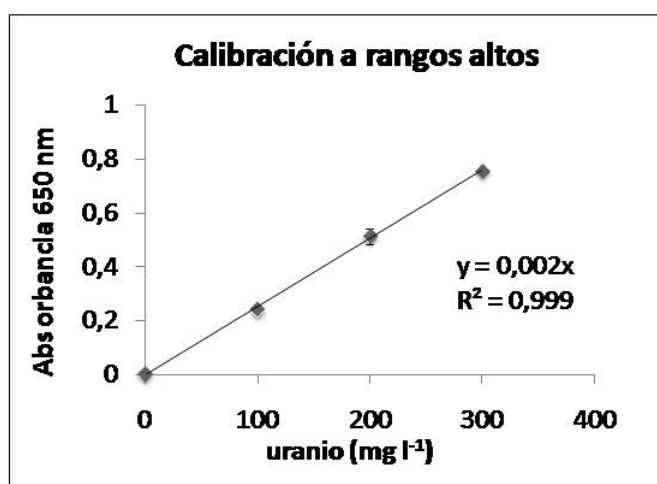


Figura 4: curva de calibración con Arsenazo III a rangos bajos de concentraciones de uranio(VI).

En todos los casos, las curvas de calibración se realizaron con patrones a partir una solución acuosa madre de Nitrato de Uranilo [(UO₂)(NO₃)₂·2H₂O] equivalente a 1000 mg l⁻¹ de uranio(VI). pH final: 3,6.

Los barridos espectrales se realizaron con cubeta de cuarzo y las medidas a longitud de onda fija con cubetas plásticas, ambas de 1 cm de ancho, en un Espectrofotómetro Beckman DU 640.

Todas las muestras líquidas fueron cuantificadas por este método.

ii- Determinación de uranio por Espectrometría gama

Además de métodos colorimétricos, existen otros mucho más sensibles y precisos: Espectrometría de Masa con Plasma Inducido (ICP-MS), Espectroscopía de Fluorescencia con lámpara de Xenón, Espectroscopía de Fluorescencia Láser en analizador SCINTREX; y en menor medida Espectroscopía de Absorción Atómica (Meinrath, G. et al. 1999).

Como alternativa, existen técnicas espectroscópicas que utilizan detectores más sofisticados, como el Detector de Emisión Gama. La cuantificación de uranio por Espectroscopía Gama, se realiza a partir de un espectro de emisión en Cuentas vs. Energía en KeV, a partir del decaimiento del isótopo con número másico 238 a ²³⁴Th; y en forma directa al isótopo de número másico 235. (Di Gregorio, D.E. et al., 2004; Payne, T.E. et al., 2001).

La cuantificación de uranio por este método fue realizada en la Comisión Nacional de Energía Atómica en colaboración con el Laboratorio de Física Experimental.

Las mediciones fueron efectuadas en un detector de germanio de alta pureza, con 40% de eficiencia. El criostato de cobre de alta pureza fue construido por Princeton Gamma-Tech. La tecnología ultrabajo fondo fue desarrollada por el Laboratorio de Física de la CNEA, en colaboración con Pacific Northwest Laboratory/University of South Carolina (Brodzinski, R. et al., 1990).

El detector fue rodeado por una pared de ladrillos de plomo de 50 cm de espesor, como protección contra la radiación de fondo.

Las muestras líquidas o sólidas (separadas o sobre un papel de filtro) fueron previamente depositadas en viales plásticos cilíndricos 5 cm de diámetro y luego posicionadas en el detector para el conteo.

A continuación se presenta un espectro clásico de emisión de una muestra con uranio (Figura 5):

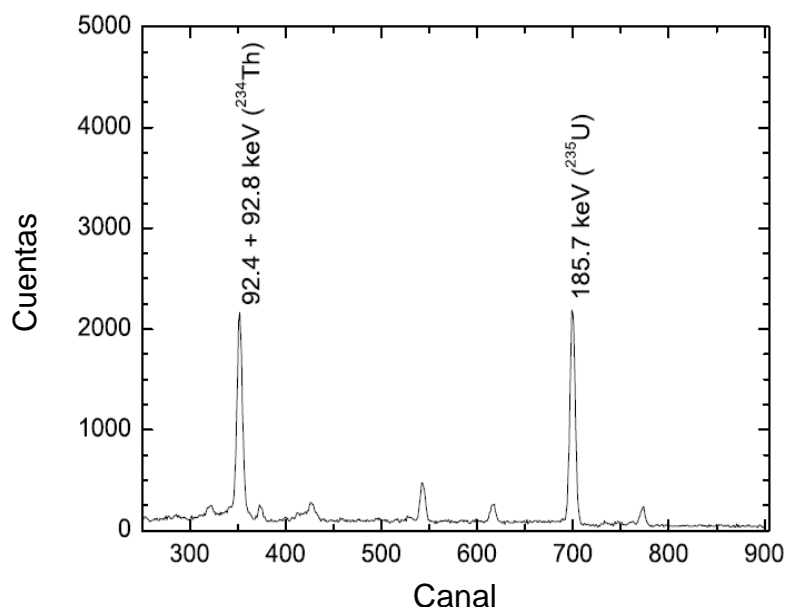


Figura 5: Porción de un espectro típico de emisión gama de una muestra con uranio. Los picos marcados en kiloelectrón voltios corresponden a los isótopos del decaimiento del uranio que los producen.

Como puede observarse, el decaimiento del uranio produce dos isótopos detectables: ²³⁵U y ²³⁴Th (hijo del ²³⁸U), de 185,7 KeV y 92,4 KeV respectivamente. El pico correspondiente a 92,4 KeV no se encuentra resuelto.

Para la presente investigación se utilizó solamente el pico de emisión gama correspondiente a 185.7 KeV para la cuantificación de uranio (transición más fuerte en el decaimiento), dado que el torio posee comportamientos químicos muy diferentes. Este método permite detectar cantidades de uranio desde 0.2 mg en la muestra con errores menores al 2%.

La correlación entre ambos métodos de medida (Arsenazo III y Espectrometría Gama) mostró una relación lineal para muestras líquidas (Figura 6).

Dada la correlación anterior, **todas las muestras sólidas fueron cuantificadas por Espectrometría Gama** (determinación de uranio en biomasa, filtros, etc), a partir de la curva de calibración de la figura 7.

Dado que en las experiencias las masas de las muestras sólidas recolectadas no son constantes, los resultados de la cuantificación se expresan en valores específicos, masa uranio . masa sólido⁻¹.

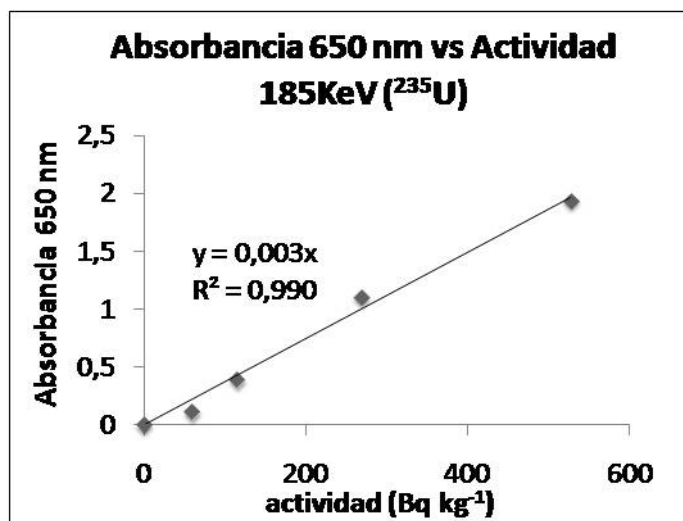


Figura 6: relación entre actividad medida por espectroscopía gama y absorbancia medida con Arsenazo III.

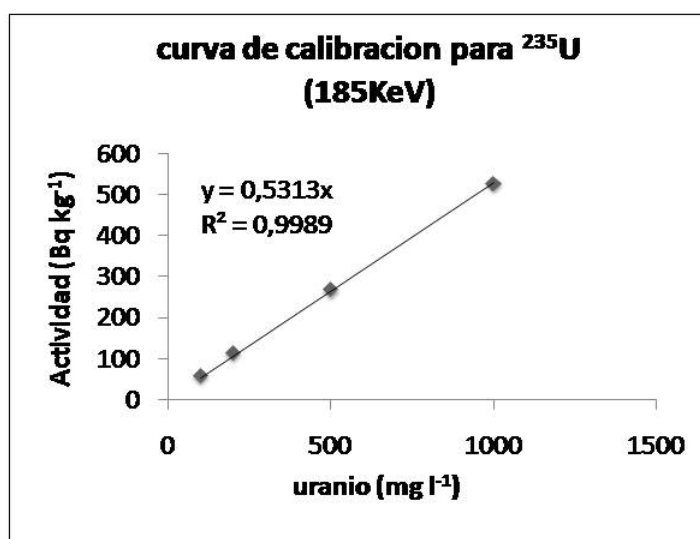


Figura 7: curva de calibración para muestras sólidas medidas por espectroscopía gama.

B- Estudio de la bioinmovilización de uranio en sistemas bacterianos

i- Microorganismos utilizados:

Acidithiobacillus thiooxidans DSM 11478

Acidithiobacillus ferrooxidans DSM 11477

ii- Medios de cultivo:

✚ Medio OK (Estándar para *Acidithiobacillus thiooxidans*)

Droga	Cantidad (g.l⁻¹)
K ₂ HPO ₄	0,50
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,50
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,00
KCl	0,10
CaCl ₂	0,01

pH = 2.5- 3 llevado con H₂SO₄ 10% v/v

✚ Medios bajo fosfato (LP) para *Acidithiobacillus thiooxidans*

Como se verá en la primera parte del presente trabajo, a fin de evitar la precipitación de uranio como UO₂PO₄- fosfato de uranilo- se ensayó el crecimiento de *Acidithiobacillus sp.* con medios reducidos en fosfato. A continuación se presenta el diseño y la formulación.

Diseño

Teniendo en cuenta que por cada 66 g de biomasa seca standard es necesario 1 g de fósforo, P, (Pirt, J.1975) y sabiendo que para un cultivo de *Acidithiobacillus*, se producen como máximo 0.023 g biomasa seca/l finales, la mínima concentración de fósforo necesaria en un cultivo es:

$$0,023 \text{ g} \cdot 1 \text{ g P} / 66 \text{ g} = 0,00034 \text{ g.l}^{-1} \text{ P} \quad \text{Ecuación 5}$$

equivalentes a 0,002 g.l⁻¹ de KH₂PO₄.

De esta manera se diseñaron medios de cultivo con menor concentración de fosfato di ácido de potasio que el estándar OK, pero mayor que 0,002 g.l⁻¹. A continuación se presenta la formulación de los medios reducidos en fosfato diseñados.

Formulación

LP 1-2

Droga	Cantidad (g.l ⁻¹)
K ₂ HPO ₄	0,01
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,01
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,10
CaCl ₂	trazas

pH = 2.5 -3 llevado con H₂SO₄ 10% v/v

LP 5-2

Droga	Cantidad (g.l ⁻¹)
K ₂ HPO ₄	0,05
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,01
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,10
CaCl ₂	trazas

pH = 2.5 -3 llevado con H₂SO₄ 10% v/v

LP 5-3

Droga	Cantidad (g.l ⁻¹)
K ₂ HPO ₄	0,005
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,01
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,10
CaCl ₂	trazas

pH = 2.5 -3 llevado con H₂SO₄ 10% v/v

Se utilizó Azufre elemental (S⁰) en polvo como fuente de electrones en relación 1% p/v del volumen final del cultivo.

Cálculo de rendimientos celulares teóricos

- Sabiendo que se requieren 1g P/ 66g biomasa seca,
- Sabiendo que 0,023g biomasa seca equivalen a 2·10⁺⁸ cel ml⁻¹
- Suponiendo que el fósforo, P, sea el sustrato limitante

Se calculó la biomasa final teórica para cada medio OK, LP 5-2, LP 1-2, LP 5-3 según:

$$\text{cel. ml}^{-1}_{\text{teóricos}} = \text{g. l}^{-1} P_{\text{medio}} * 66 \text{ g} * (1 \text{ g P})^{-1} * 2 \cdot 10^{+8} \text{ cel. ml}^{-1} * (0.023 \text{ g})^{-1} \text{ Ecuación 6}$$

Esterilización

El medio de cultivo y los erlenmeyers conteniendo la cantidad requerida de azufre elemental se esterilizaron en autoclave con vapor fluyente (100 °C) durante 10 minutos.

En caso de los sistemas contaminados posteriormente con uranio, la solución madre de uranio(VI) fue esterilizada por filtración (0,45 µm).

🚩 Medio 9K (Estándar para *Acidithiobacillus ferrooxidans*)

Droga	Cantidad (g.l ⁻¹)
K ₂ HPO ₄	0,50
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,50
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,00
KCl	0,10
CaCl ₂	0,01

pH= 1.8 H₂SO₄ 10% v/v, controlándolo a ese valor, y se agregó:

Droga	Cantidad (g.l ⁻¹)
FeSO ₄	45

🚩 Medio 9K-LP (Bajo fosfato para *Acidithiobacillus ferrooxidans*)

Tomando la consideración de diseño de medio bajo fosfato para *Acidithiobacillus thiooxidans* antes mencionada; sabiendo que a menor concentración de fosfato se evita la precipitación del uranio y evaluando previos resultados experimentales, se fijó la formulación del medio 9K-LP como sigue:

Medio base:

Droga	Cantidad (g.l ⁻¹)
K ₂ HPO ₄	0,005
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,01
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,10
CaCl ₂	trazas

pH= 1.8 H₂SO₄ 10% v/v, controlándolo a ese valor, y se agregó:

Droga	Cantidad (g.l ⁻¹)
FeSO ₄	45

Esterilización

Dado que en este medio sólo es capaz de crecer la especie *Acidithiobacillus ferrooxidans*, para los experimentos de rutina no se esterilizó el medio de cultivo completo. Se elaboró el mismo con agua estéril y los sistemas se construyeron en erlenmeyers esterilizados en autoclave a vapor fluente por 10 minutos.

Para mantenimiento de *stocks* el medio base se esterilizó en autoclave con vapor fluente por 10 minutos. La solución de sulfato ferroso se esterilizó por filtración (0,45 µm).

✚ Medio Bajo fosfato (LP) para *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Acidithiobacillus ferrooxidans también es capaz de crecer en medio estándar 0K (*Acidithiobacillus thiooxidans*) con azufre como fuente de energía. La formulación es la misma nombrada anteriormente.

Esterilización

Dada la posibilidad de contaminación con *Acidithiobacillus thiooxidans*, todo cultivo de *Acidithiobacillus ferrooxidans* con azufre como fuente de energía se manejó estrictamente en forma estéril. El proceso de esterilización se realizó como se describió anteriormente para cultivos de *Acidithiobacillus thiooxidans*.

Para conservar la identidad del inóculo, cada 4-5 subcultivos se realizó un subcultivo en medio 9K LP.

iii- Mantenimiento de stocks

Dada la baja capacidad del género *Acidithiobacillus* de conservar la viabilidad luego del congelamiento a temperaturas bajo cero, para los *stocks* a largo plazo se conservaron entre 15 y 25 ml de cultivo en fase exponencial tardía en heladera por no más de 3 meses.

iv- Cálculo de velocidades de crecimiento y rendimientos

Para cultivos de *Acidithiobacillus*, dado que el crecimiento es lineal (por limitación en oxígeno, Doran, P.), la velocidad de crecimiento, r_x , o productividad celular se calcula según la ecuación:

$$r_x = (\text{Cel ml}^{-1} \text{ fase exponencial tardía} - \text{Cel ml}^{-1} \text{ iniciales}) \text{ tiempo}^{-1} \quad \text{Ecuación 7}$$

La velocidad de producción de ácido (r_{H^+}), se calcula según:

$$r_{H^+} = (\text{mM H}^+ \text{ fase exponencial tardía} - \text{mM H}^+ \text{ iniciales}) \text{ tiempo}^{-1} \quad \text{Ecuación 8}$$

El rendimiento celular en relación a los equivalentes de Fe^{2+} ($Y_{x/s}$) para *Acidithiobacillus ferrooxidans* se calcula según:

$$Y_{x/s} = \text{cel. ml}^{-1} \text{ finales obtenidos} / \text{equivalentes } \text{Fe}^{2+} \text{ consumidos} \quad \text{Ecuación 9}$$

Los equivalentes de Fe^{2+} consumidos se calcularán por titulación con KMnO_4 o colorimétricamente, como se describirá más adelante en esta sección.

Para *Acidithiobacillus thiooxidans* el rendimiento celular se calcula en relación al sustrato S^0 , calculando su consumo a partir de los equivalentes de H_2SO_4 producidos, según la ecuación 10 (y como se describirá más adelante):



Sabiendo que en la oxidación de S^0 a SO_4^{2-} se transfieren 6 electrones y que por cada mol de H^+ producidos se consume $\frac{1}{2}$ mol S^0 , el cálculo del rendimiento en función de los equivalentes de sustrato puede calcularse según:

$$Y_{x/s} = \text{cel. ml}^{-1} \text{ finales obtenidos} / (\text{equivalentes } \text{H}^+ \text{ producidos}) * 3$$

Lo que resulta en:

$$Y_{x/s} = \text{cel. ml}^{-1} \text{ finales producidos} / \text{equivalentes } \text{S}^0 \text{ consumidos} \quad \text{Ecuación 11}$$

según la definición de rendimiento celular.

v- Metodología de adaptación

Según antecedentes bibliográficos, el subcultivo sucesivo de microorganismos en la misma condición estimula cambios fisiológicos y selección de mutantes, que se traducen en la adaptación al nuevo medio (Devers, M. et al., 2008; Sobecky, P. et al., 1992).

La adaptación a la nueva condición queda evidenciada por la obtención de valores de rendimiento celular ($Y_{x/s}$) y velocidad de crecimiento (r_x) similares a los de la cepa desarrollándose en las condiciones anteriores.

A la luz de estos antecedentes, en el presente trabajo se plantea el siguiente procedimiento para la adaptación de las especies bacterianas *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Acidithiobacillus ferrooxidans* a medios reducidos en nutrientes y en presencia de uranio.

Medios bajo fosfato

Para la adaptación de *Acidithiobacillus thiooxidans* a medio fajo fosfato se partió de un sistema crecido en medio estándar OK y subcultivado sucesivamente en el medio de cultivo deseado (LP), hasta que la velocidad de crecimiento (r_x) permaneció constante y dentro del mismo orden que la cepa control en medio estándar.

Para *Acidithiobacillus ferrooxidans* se procedió de igual manera, a partir de un cultivo en medio 9K que sirvió como inóculo para el subcultivo en 9K-LP.

En ambos casos se realizó un control en medio estándar (0K o 9K).

Uranio

Para la adaptación inicial a uranio(VI) se realizaron series de cultivos a diferentes concentraciones de uranio(VI), un control libre de metal y un sistema estéril con uranio(VI). Al finalizar el crecimiento en los sistemas de cada serie, aquél con más productividad se subcultivó en tres condiciones: control libre de uranio(VI), igual concentración de uranio(VI) que la previa y una concentración mayor de uranio(VI).

Se realizaron subcultivos sucesivos en la misma condición hasta que la velocidad específica de crecimiento permaneció constante (cepa considerada adaptada).

Se conservaron sistemas a dichas condiciones a fin de generar *stocks* de cepas adaptadas.

vi- Tratamiento de las muestras

En todas las experiencias cinéticas, cada muestra fue filtrada previamente a cualquier análisis. Los filtros utilizados, sus características y usos fueron:

- ✓ Whatman 41- Banda Blanca: retención de partículas mayores a 20- 25 μm . Separación de macropartículas de azufre. Acondicionamiento de la muestra para recuento celular en cámara.
- ✓ Membrana de acetato de celulosa 0,45 y 0,22 μm . Retención de células y coloides. Ensayo de uranio presente en la fracción coloidal.

vii- Cuantificación de compuestos reductores por titulación iodométrica

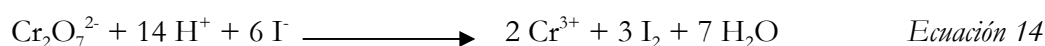
La producción de compuestos reductores (politionatos) en cultivos de *Acidithiobacillus* con azufre como fuente de energía, se midió por titulación iodométrica.

1 volumen de muestra se recibió en 1 volumen de solución I/ I⁻ 0,050 N, acidificada con dos gotas de H₂SO₄ 1/10. Se incubó entre 2 y 5 minutos en oscuridad. Luego se tituló el yodo remanente con solución Na₂S₂O₃ 0,010 N. En este punto, se produjo el viraje de marrón a marrón claro. El punto final de la titulación se reveló con almidón antes que la solución se torne completamente transparente, agregando unas gotas de solución 2% p/v. El punto final se tomó cuando la solución viró de azul oscuro a incoloro.

La reacción que tiene lugar en el vial es:



La solución de Na₂S₃O₂ se valoró a partir de la siguiente reacción con K₂Cr₂O₇.



Se colocó un volumen conocido de solución patrón de K_2CrO_4 0,0025 M, preparada en el momento de la valoración. Se agregó KI sólido (en exceso) y unas gotas de H_2SO_4 1/10. Se incubó en oscuridad por 2 a 5 minutos. Luego se agregó desde bureta la solución de $Na_2S_3O_2$. Cuando la solución del vial viró al marrón claro se agregó unas gotas de solución de almidón 2% p/v. El punto final se tomó cuando la solución viró del azul oscuro al incoloro.

La normalidad de la solución I/I se confrontó en cada serie de titulación de muestras, contra la solución valorada de $Na_2S_3O_2$.

Las soluciones de I/I, $Na_2S_3O_2$ y almidón se conservaron en heladera.

viii- Cuantificación de sulfatos

La producción de ácido sulfúrico en cultivos de *Acidithiobacillus*, se evaluó complementariamente a partir de la cuantificación espectrofotométrica de iones SO_4^{2-} en solución.

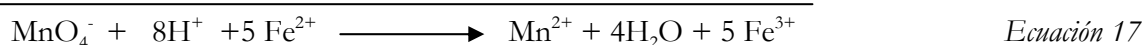
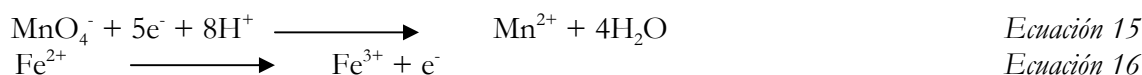
En un vial de vidrio se colocaron 2 volúmenes de muestra, 1 volumen de buffer de dilución y una punta de espátula de BaCl.

Se agitó vigorosamente y se midió la muestra en espectrofotómetro (Beckman) a 620 nm. Junto con las muestras se realizó una curva de calibración con patrones preparados a partir de $(NH_4)_2SO_4$ con concentraciones en el rango de 0- 250 $mg\ l^{-1} SO_4^{2-}$.

El buffer de dilución se preparó según: 11,25 g NaCl; 7,5 ml glicerol; 15 ml etanol; 4,5 ml HCl; 45 ml H_2O destilada.

ix- Cuantificación de hierro(II) por titulación con permanganato de potasio

Se tituló el Fe^{2+} remanente en los cultivos de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en medio 9K, 9K LP o 6K LP, con $KMnO_4$ según:



0.5 o 1 ml de muestra de cultivo se titularon con solución $KMnO_4$ 0,002M (0,01N). El punto final se evidenció por el viraje del incoloro al violeta.

La interferencia de cloruros se investigó previamente, resultando despreciable (Curutchet, G. 1996).

El catión Mn^{2+} formado, posee color rosado muy leve.

x- Cuantificación de hierro(II) y hierro total por orto-fenantrolina

La determinación de hierro por ortofenantrolina se realizó según Standard Methods of Chemical Analysis, con las modificaciones introducidas por Ohmura, N. et al., 2002.

Para la determinación de Fe^{2+} se agregaron en tubos plásticos, 2.5 ml de buffer, 2.5 ml de solución de ortofenantrolina al 0.2% p/v (preparada en etanol- agua 1:10) y 100 μ l de muestra. Se incubó en estufa a 30° C durante 30 minutos. Se midió la muestra en espectrofotómetro (Beckman) a 510 nm.

Para la determinación de Fe total, se agregaron en tubos plásticos, 2,5 ml de buffer, 1 ml de reductor NH_2OH 20% p/v, 100 μ l de muestra. Se incubó, agitando manualmente cada un intervalo de tiempo, durante 20 minutos a temperatura ambiente. La cuantificación luego prosiguió según lo descripto para Fe^{2+} .

La solución buffer se preparó según: 68 g Acetato de sodio, 28.8 ml ácido acético, H_2O hasta volumen final 1L.

Junto con las muestras, se realizaron patrones preparados en el momento, por dilución a partir de soluciones concentradas de $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ (sal de Mohr) para Fe^{2+} ; y $Fe(NH_4)(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ para Fe^{3+} .

La concentración de Fe^{3+} se midió por diferencia entre el Fe total y Fe^{2+} medidos.

Límite de detección: 0,04- 1,00 $mg\ l^{-1}$ Fe total.

C- Estudio de la biosorción de uranio en sistemas fúngicos

i- Microorganismos utilizados:

Aphanocladium sp. GAMS

Acremonium sp. GAMS

ii- Medios de cultivo:

Agar Papa- dextrosa para aislamiento de micelio

Droga- Compuesto	Cantidad ($g.l^{-1}$)
Papas en cubos	300
Glucosa	20
Agar	15
Agua destilada	1 L

Solución de micronutrientes ($g.l^{-1}$)	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,65
IK	0,1
BO_3H_3	0,1

Antibióticos	$\mu g.ml^{-1}$
Ampicilina	100
Kanamicina	100
Tetraciclina	100

✚ Medio Pachlewski P5 formulación original

Droga	Cantidad (g.l ⁻¹)
Di tartrato de amonio	0,5
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5
Maltosa D+	5
Glucosa D+	20
Tiamina-HCl 100 mg/l	1 ml
Cationes	1 ml

Solución de micronutrientes (g.l ⁻¹)	
Fe (III) quelado	6
Mo	0,27
B	8,45
Mn	5
Cu	0,625
Zn	2,27

pH 5.5

✚ Medio Pachlewski P5 modificado para crecimiento y stocks

Droga	Cantidad (g.l ⁻¹)
(NH ₄) ₂ SO ₄	3
K ₂ HPO ₄	1,28
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,25
Glucosa monohidrato	12,12
Tiamina	0,1
Cationes	1 ml l ⁻¹
Aniones	1 ml l ⁻¹
Agar	20

Solución de micronutrientes 1. "Cationes" (g.l ⁻¹) pH 1,5	
Acido cítrico	0,60
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,15
MnSO ₄ · H ₂ O	3,00
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	5,00
FeSO ₄ · 7H ₂ O	15,0
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,75

Solución de micronutrientes 2. "Aniones" (g l ⁻¹)	
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,65
IK	0,1
BO ₃ H ₃	0,1

pH final: 5.

✚ Medio mínimo LPFC

Droga	Cantidad (g.l ⁻¹)
K ₂ HPO ₄	0,005
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,01
Glucosa	2
Extracto de levadura	0,1

iii. Mantenimiento de stocks

Las mitosporas fueron conservadas en glicerol 20% a -80° C. Simultáneamente, se mantuvieron cultivos en medio sólido P5 modificado. Los mismos se repicaron cada mes, cortando un cuadrado de aproximadamente 0.25 mm² en el extremo de crecimiento apical y posándolo en una placa de petri con P5 agar fresco.

Cuantificación celular

En todos los casos, la cuantificación de células bacterianas o mitosporas fúngicas se realizó por recuento al microscopio (objetivo 40X) en cámara de Thoma. Las dimensiones son: 0.1mm alto, 0.0025 mm² de área del cuadrado mas pequeño y 0.1 µl de volumen en 1 mm². El retículo de recuento está conformado por 16 campos, de 16 celdas cada uno. La conversión a cel ml⁻¹ es la siguiente:

$$\text{Cel.ml}^{-1} = \text{células promedio en un campo} * 16 * 1,6 \cdot 10^{+5} \quad \text{Ecuación 18}$$

Parte I

*Biorreducción de
uranio(VI) mediada por
especies del género
Acidithiobacillus*

Características del género *Thiobacillus*

Las especies del género *Thiobacillus* son bacilos Gram negativos, de tamaño promedio 0.5 x 1.0 x 4.0 μm , móviles por flagelo polar, no formadoras de esporas. El valor de pH óptimo para el crecimiento se extiende entre 2 y 8, y la temperatura entre 20°C y 43°C.

Son organismos autótrofos, fijando CO_2 a través del Ciclo de Calvin. Dada esta característica, el crecimiento es sumamente lento.

A partir del año 200, las especies acidófilas del género fueron renombradas como *Acidithiobacillus*: *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus albertensis* y *Acidithiobacillus caldus* (Kelly, D.P. et al., 2000).

El género incluye:

- ✓ Aerobios estrictos: *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Thiobacillus neapolitanus*
- ✓ Aerobios facultativos: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus delicatus*, *Thiobacillus denitrificans*.
- ✓ Especies denitrificantes: *Thiobacillus denitrificans*, *Thiobacillus tepidarius*.
- ✓ Quimiolitautótrofos: obtienen energía a partir de la oxidación de uno o más compuestos reducidos del azufre (sulfuros, sulfatos, tiosulfatos, politionatos y tiocianato). El producto final de la oxidación es el ión sulfato. La mayoría de los organismos de este género lo son: *Thiobacillus tioparus*, *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus prosperus*, *Thiobacillus albertis* (obligados); *Thiobacillus acidophilus*, *Thiobacillus cuprinus* (facultativos)
- ✓ Quimioorganotrofos: *Thiobacillus novellus*, *Thiobacillus intermedius*, *Thiobacillus perometabolis*, *Thiobacillus delicatus*.

Las características principales de *Acidithiobacillus thiooxidans* se resumen en la tabla 2.

Forma , tamaño	Bacilos, 0.3 x 1.0 -1.2 μm
Coloración Gram	Negativo
pH óptimo	2.0 – 3.5
Rango de pH	0.5 – 6.0
Sustratos oxidables	S^0 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$, S^{2-}
Fuente de Carbono	CO_2
Fuente de Nitrógeno	NH_4^+
Aceptores electrónicos	O_2

Tabla 2: Características generales de la especie *Acidithiobacillus thiooxidans*
Tomado de Curutchet, G., 1996.

En la tabla 3 se resumen las principales características de *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Forma , tamaño	Bacilos, 0.3- 0.5 x 1.0-1.7 μm
Coloración Gram	Negativo
pH óptimo	1.5* - 2.3
Rango de pH	1.2- 6.0
Sustratos oxidables	Fe^{2+} , S^0 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$, S^{2-} , Cu^+ , Se^{2-} , Mo^{5+} , UO_2
Fuente de Carbono	CO_2
Fuente de Nitrógeno	NH_4^+
Aceptores electrónicos	O_2 , Fe^{3+}

Tabla 3: características generales de la especie *Acidithiobacillus ferrooxidans*.
* Para cepas adaptadas.
Tomado de Curutchet, G.,1996.

En la figura 8 se muestran imágenes obtenidas para *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

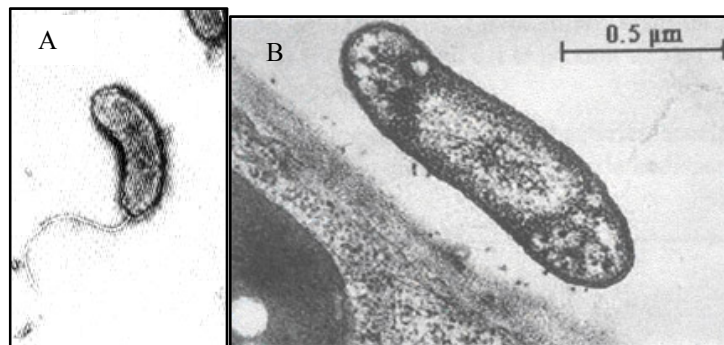


Figura 8: A- Fotomicrografía para *Acidithiobacillus ferrooxidans* crecida en Fe^{2+} (Mills, C., 2009). B- Microscopía electrónica para *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología).

✚ Metabolismo del azufre

Como puede observarse ambas especies son quimioautótrofas y acidófilas extremas, obteniendo su energía de la oxidación de compuestos reducidos de azufre. Cuando el azufre elemental es utilizado como fuente de energía, es necesario el contacto directo sustrato- bacteria. La internalización al espacio periplásmico y la posterior oxidación proceden utilizando glutatión como intermediario (figura 9) y sustrato de la oxidasa correspondiente.

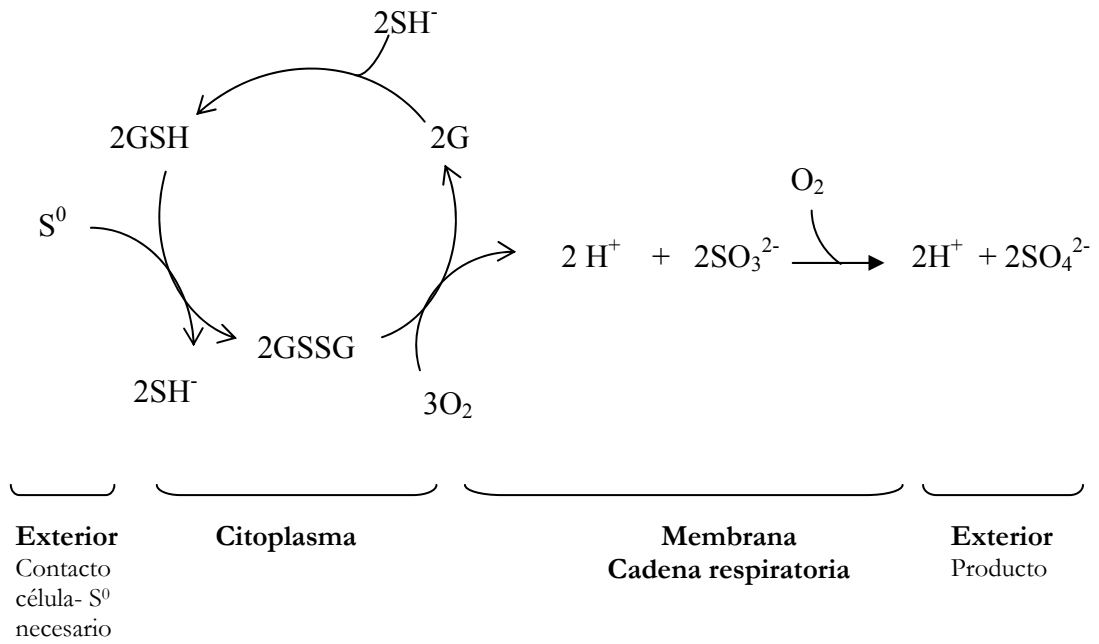


Figura 9: Esquema resumido del metabolismo del azufre en *Acidithiobacillus sp.*
GSH= glutatión reducido y GSSG= glutatión oxidado.

Los productos reductores coloidales formados como intermediarios del metabolismo del azufre se presentarían en forma de politionatos [S_n (SO₃²⁺)] de cadena larga (n hasta 140), formando micelas (figura 10). Como se verá más adelante, los politionatos son utilizados en procesos de reducción de metales.

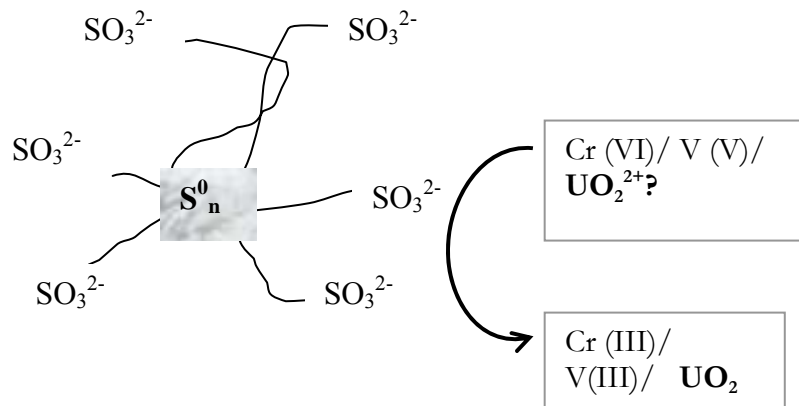
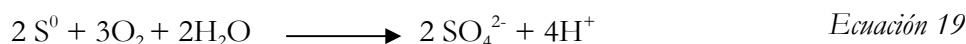


Figura 10: Modelo de Steudel (Steudel, R., 1989) para los politionatos y reducción acoplada.

Los politionatos generados como intermedios, son sucesivamente oxidados a diferentes compuestos (tiosulfato, sulfato, otros politionatos) hasta llegar al sulfato como producto final (figura 9 y ecuación 19).

La ecuación neta de oxidación de S⁰ es:

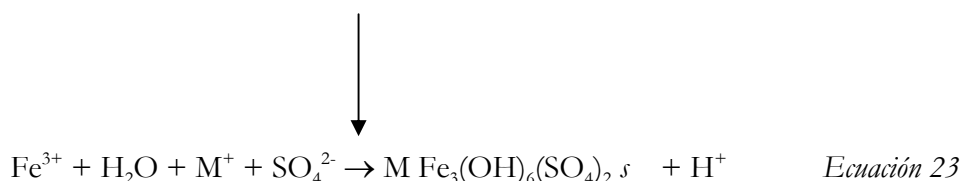
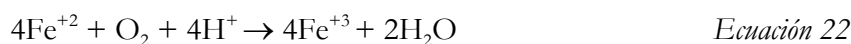


Acidithiobacillus sp. aprovecha la energía producida en la reacción descrita por la ecuación 19, acoplado el crecimiento celular (Kelly, D. P., 1971; Peck, H., 1968).

El proceso metabólico aquí descrito es el responsable del bajo valor de pH alcanzado en los cultivos de *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Acidithiobacillus ferrooxidans* (pH ≤ 1), dada la producción de ácido sulfúrico. La relación entre la producción de protones y de biomasa, permite seguir una cinética de crecimiento mediante una simple titulación ácido-base. *Acidithiobacillus* es resistente al producto, y el crecimiento se inhibe solamente cuando el pH es menor que 1.

✚ Metabolismo del hierro²

A diferencia de *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* es capaz de catalizar la oxidación de hierro(II) para la obtención de energía. Las reacciones metabólicas que caracterizan el uso del mismo como fuente de energía son:



Donde M Fe₃(OH)₆(SO₄)₂ es el mineral *jarosita* y M= K⁺; NH₄⁺.

La precipitación de fosfatos de hierro(III) podría existir, e incluso funcionar como núcleos de cristalización para la precipitación de *jarosita* (Curutchet, G. et al., 1992; Donati, E. et al., 2003).

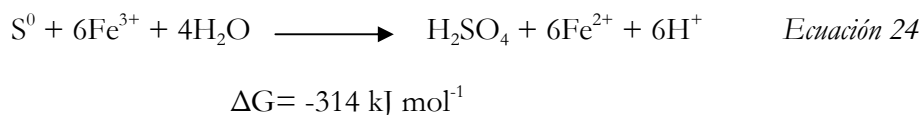
Para *A. ferrooxidans* creciendo con hierro(II) como fuente de energía, el cambio de pH del medio está gobernado por dos reacciones:

² A lo largo de este trabajo, por Fe²⁺ o Fe³⁺ se denotan todas las especies solubles de hierro(II) y hierro(III) respectivamente.

1. Al comienzo del cultivo se observa un aumento del pH, dado el consumo de H⁺ (ecuación 21).
2. Hacia el final del crecimiento (fase exponencial tardía) el pH vuelve a disminuir por la formación y precipitación de *jarosita* y otros hidróxidos de Fe(III), que libera H⁺ (ecuación 23).

La precipitación de los compuestos de hierro(III) provoca, en todos los casos, un rápido descenso del pH que puede compensar el ascenso ocasionado por la oxidación de hierro(II) (ecuación 21), aunque esto dependerá fuertemente del pH inicial y de otras características del medio. Cuando la concentración inicial de hierro(II) es 9 g.l⁻¹ y el pH inicial es 1,80 (condiciones habituales en los cultivos de *Acidithiobacillus ferrooxidans*), el pH del cultivo al final de la fase exponencial se estabiliza en un valor de aproximadamente 2,4 (Lancey, D. T. et al., 1970).

A pesar de que *Acidithiobacillus ferrooxidans* es generalmente asumido como un microorganismo aerobio, alternativamente, puede utilizar Fe³⁺ como aceptor final en la cadena respiratoria, con S⁰ como sustrato en condiciones de anaerobiosis:



Esta característica de *Acidithiobacillus ferrooxidans* fue inicialmente reportada en 1976 (Brock, T. D.; Gustafson, J., 1976). Sin embargo no fue demostrado hasta 1992 (Pronk, J. T. et al., 1992) que el crecimiento celular está ligado a la oxidación de azufre en anaerobiosis cuando el Fe³⁺ es el aceptor final.

Procesos de biomovilización y bioinmovilización de metales

Las especies acidófilas *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Acidithiobacillus ferrooxidans* son de particular importancia en procesos de lixiviación.

La capacidad de *Acidithiobacillus ferrooxidans* de solubilizar metales a partir de sulfuros (Cu₂S, ZnS, PbS, MoS, CoS), ha hecho que éste sea microorganismo clave en la industria minera.

Dado que como producto del metabolismo oxidativo de *Acidithiobacillus* se forman especies químicas oxidantes, reductoras y ácidas, a lo cuál se suma la capacidad de adaptación a elevadas concentraciones de metales pesados, es posible la aplicación de *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Acidithiobacillus ferrooxidans* en procesos de movilización y recuperación de metales en distintas áreas de actividad:

- ✓ *Minería*: recuperación a partir de minerales de baja ley (*biominería*) por biooxidación y/o biolixiviación, como es el caso de las instalaciones de Quebrada Blanca (21.658 Ton. año⁻¹. Compañía Minera Quebrada Blanca)³, Escondida y Cerro Colorado, Chile, para la obtención de Cobre; o Youanmi,

³ Producción total del año 2005.

Australia (150.000 Ton. año⁻¹. Apex Minerals NL)⁴ para la obtención de oro (Rawlings, D. R., 1997).

Los procesos operativos han sido patentados (BHP Billiton, 2009) para la recuperación de cobre (BioCop®), níquel (BioNic®), zinc (BioZinc®) y oro (Biox®). El proceso Biox® es utilizado en 6 plantas a nivel mundial (Sudáfrica, Ghana y Brasil). El proceso BioCop®, se encuentra en etapa de prueba comercial en las instalaciones de Chuquicamata y Mansa Mina, Chile (op. cit.).

- ✓ *Tratamiento ambiental*: Los compuestos reductores intermediarios de la reacción de oxidación de azufre son aprovechados para la biorreducción de metales como cromo(VI), vanadio(V)(Viera, M. et al., 2003; Quintana, M. et al., 2001; Curutchet, G. et al., 1995; Donati, E et al., 1996; Bredberg, K. et al., 2004) que en su forma oxidada son altamente tóxicos y móviles; o a la inversa para su solubilización y recuperación, como ocurre con el manganeso(IV) y el níquel(IV)(Cerruti, C. et al., 1998).

A diferencia de la aplicación en la industria minera, para el tratamiento ambiental no se encuentran descritos procesos de biorremediación aplicados a escala industrial. Diseños para la recuperación de cromo de efluentes de curtiembres, otros metales de pilas alcalinas y baterías agotadas y la solubilización a partir de residuos incinerados, han sido estudiados en laboratorio o planta piloto y propuestos como alternativa de biorremediación y control (Brierley, C., 1997; ¹Bosecker K., 1997; ²Bosecker, K., 1997; Ting, Y. et al., 2001; Cerruti, C. et al., 1998).

A continuación se resumen todos los mecanismos de movilización e inmovilización de metales en los cuáles *Acidithiobacillus sp.* está implicada (Tabla 4).

⁴ Producción estimada para la reapertura.

Mecanismo	Carácter	Intermediario involucrado	Reacción
Movilización- Lixiviación directa o de contacto.	Es necesario el contacto bacteria-sustrato oxidable.	bacteria	$MS + O_2 \longrightarrow M^{2+} + SO_4^{2-}$
Movilización- Lixiviación indirecta	Oxidante	Fe^{3+}	$4Fe^{2+} + O_2 + 4H^+ \rightarrow 4Fe^{3+} + 2H_2O$ $2 Fe^{3+} + MS \rightarrow 2 Fe^{2+} + S^0 + M^{2+}$
	Ácida	H^+	$2 S^0 + 3O_2 + 2 H_2O \rightarrow 2 SO_4^{2-} + 4H^+$ $M(OH)_2 + H_2SO_4 \rightarrow M^{2+} + SO_4^{2-} + H_2O$ $MS + 2H^+ \rightarrow M^{2+} + H_2S$
	Reductora	$S-(SO_3)S_n$	$2 S^0 + 3O_2 + 2 H_2O \xrightarrow{S-(SO_3)S_n} 2 SO_4^{2-} + 4H^+$ $Mn(IV)/ Ni(IV) \longrightarrow Mn(III)/ Ni(III)$
Inmovilización indirecta	Oxidante	Fe^{3+}	$4Fe^{2+} + O_2 + 4H^+ \rightarrow 4Fe^{3+} + 2H_2O$ $AsO_3^{3-} + Fe^{3+} \rightarrow AsO_4Fe_3 + Fe^{2+}$
	Reductora	$S-(SO_3)S_n$	$2 S^0 + 3O_2 + 2 H_2O \xrightarrow{S-(SO_3)S_n} 2 SO_4^{2-} + 4H^+$ $Cr(VI)/ V(V) \longrightarrow Cr(III)/ V(IV)$

Tabla 4: Resumen de procesos de movilización e inmovilización en los que *Acidithiobacillus sp.* se encuentra involucrada. En azul se presentan las reacciones biocatalizadas, de las cuales derivan mecanismos indirectos de oxido- reducción. En rojo se describe la ecuación del mecanismo directo de oxidación

Cinética de crecimiento de *Acidithiobacillus thiooxidans* en medios con concentración variable de fosfato

Cultivos preliminares de *Acidithiobacillus thiooxidans* en medio 0K, con S⁰ como fuente de energía y uranio, revelaron la presencia de un precipitado color amarillo- verdoso, en mayor cantidad a medida que aumentaba la concentración de uranio en el sistema.

Según bibliografía, este precipitado podría ser el resultado de la interacción del uranilo (UO₂²⁺) con componentes del medio de cultivo, probablemente con el anión fosfato (PO₄²⁻). Se sabe que el fosfato de uranilo es altamente insoluble, aún en medio ácido (Noubactep, C. et al., 2003; Cotton, 1980 ; Baes, C.; Mesmer, R.,1976).

En función de esta observación y de que la presencia del precipitado reduce considerablemente la disponibilidad del uranio en solución, se decidió modificar los componentes del medio de cultivo (principalmente reducir la concentración de fosfatos) a fin de evitar la precipitación del uranilo.

A raíz de esto, fue necesario estudiar la respuesta de *Acidithiobacillus* a la disminución de los componentes del medio de cultivo.

Objetivos

Reformular el medio de cultivo estándar para *Acidithiobacillus thiooxidans* en función de la solubilidad del uranilo, principalmente en relación a la concentración de fosfatos.

Estudiar la respuesta de *Acidithiobacillus thiooxidans* en los medios reformulados.

Adaptar una cepa de *Acidithiobacillus thiooxidans* a un medio de cultivo reducido en fosfatos para realizar futuras experiencias con uranio.

Materiales y métodos

A partir de un cultivo en medio estándar para *Acidithiobacillus thiooxidans* (0K) se realizaron subcultivos en medios con diferentes concentraciones de fosfato (LP 5-2, LP 1-2 y LP 5-3. Materiales y Métodos generales) y en medio 0K (control). Ambos con S⁰ (1% p/v) como sustrato.

Inóculo: Se filtró un sistema saturado de 100 ml (en medio estándar 0K) por filtro Whatman 41 y luego por membrana 0.22 µm. Se realizaron dos lavados de 5ml con agua destilada y se resuspendieron las células retenidas en el filtro en medio LP 5-3. Cada sistema se inoculó con 5 ml (1% v/v), a volumen final de 50 ml en erlenmeyers de 150 ml.

Condiciones de cultivo: 30°C; 200 rpm

Cinética: A distintos tiempos se tomaron 2 ml de muestra, se filtró por filtro Whatman 41 y se determinó: producción de ácido por titulación con NaOH; pH; población bacteriana por recuento en cámara de Thoma. (Materiales y métodos generales).

Resultados y discusión

A continuación se comparan gráficamente las cinéticas de producción de protones y crecimiento para los diferentes medios de cultivo (OK, LP 5-2, LP 1-2 y LP 5-3) con azufre elemental como fuente de electrones.

Para normalizar los resultados experimentales y facilitar la representación gráfica, las ordenadas se expresan como la diferencia (D) entre el valor a un tiempo determinado y el valor al tiempo inicial ($t - t_0$).

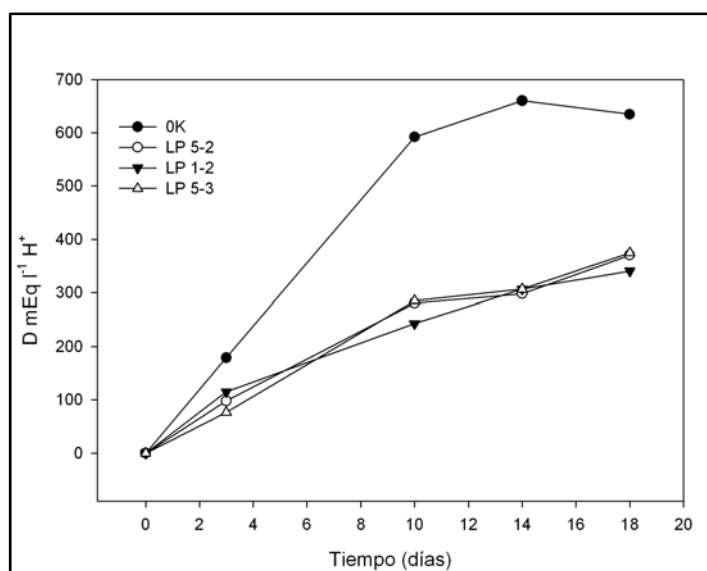


Figura 11: D mM H⁺ en función del tiempo para los sistemas con distinta concentración de fosfatos.

En la figura 12 se observa que el crecimiento es lineal y no exponencial. Este hecho se debe a que el sistema se encuentra limitado en oxígeno (Doran, P.). Esta observación se repetirá a lo largo de toda esta tesis, para los cultivos de *Acidithiobacillus sp.*

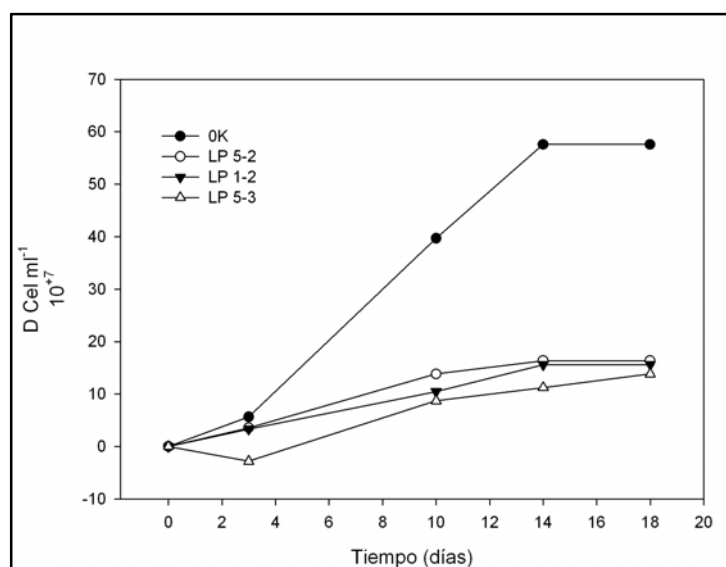


Figura 12: D células ml⁻¹ en función del tiempo para los sistemas con distintas concentraciones de fosfatos.

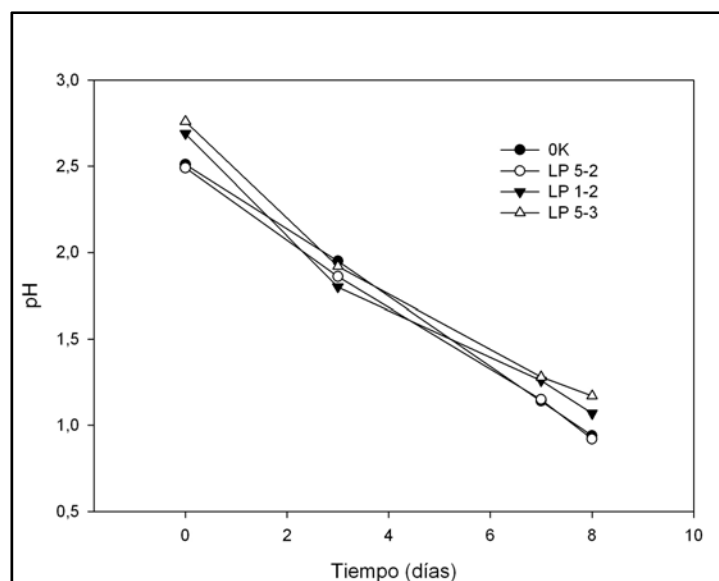


Figura 13: variación de pH en función del tiempo.

Las productividades calculadas entre 0 y 10 días y la variación de pH, se presentan en la siguiente tabla.

	r_{H^+} (mM día ⁻¹)	r_x (cel ml ⁻¹ día ⁻¹) 10 ⁺⁷	Velocidad de disminución de pH (unidad pH día ⁻¹)	pH final	Rendimiento Y _x /s (Cel ml ⁻¹ (Eq _s) ⁻¹) 10 ⁺⁸
OK	59,214	3,97	0,1971	1,0	2,72
LP 5-2	28,116	1,38	0,1927	1,0	1,33
LP 1-2	24,282	1,05	0,1929	1,1	1,37
LP 5-3	28,542	0,870	0,1952	1,2	1,11

Tabla 5: Comparación de productividades y velocidad de disminución de pH para la primera serie de adaptación a medios bajo fosfato.

Como muestra la tabla 5, para los cultivos con medio LP se obtuvieron menores rendimientos y productividades que para el control en medio OK.

La inhibición por producto (H⁺), que podría ser mayor al disminuir la capacidad buffer del sistema de cultivo, también queda excluida dado que para todos los sistemas la velocidad de disminución de pH fue similar, así como los valores de pH final alcanzados (tabla 5).

Los valores de rendimiento de la tabla 5 permiten concluir que *Acidithiobacillus thiooxidans* es capaz de crecer en medios limitados en fosfatos.

Si bien los rendimientos obtenidos para los medios LP son menores con respecto al control en medio OK, éstos se consideran suficientes para experiencias futuras, teniendo en cuenta que pueden mejorarse con un proceso de adaptación.

Dado que con el medio de cultivo más reducido en fosfatos, LP5-3, se obtuvo similar concentración celular que para el resto de los medios limitados, se decidió proseguir la adaptación de *Acidithiobacillus thiooxidans* en éste mismo.

Adaptación

La adaptación a medio bajo fosfato se realizó según se describió en Materiales y Métodos Generales.

A continuación se presentan productividades y velocidad específica promedio obtenidas en medio LP 5-3 para una cepa considerada adaptada (5 subcultivos):

$$r_{H^+}: \quad \mathbf{32,0 \text{ mM H}^+ \text{ día}^{-1}}$$

$$r_x: \quad \mathbf{1,97 \cdot 10^{+7} \text{ cel ml}^{-1} \text{ día}^{-1}}$$

$$\text{Rendimiento } Y_{x/s}: \quad \mathbf{1,30 \cdot 10^{+8} \text{ cel ml}^{-1} (\text{Eq}_{s_0})^{-1}}$$

Como puede observarse, los valores de r_x y r_{H^+} se acercaron más a los valores característicos para el medio estándar OK (tabla 5).

*Dado que los parámetros $Y_{x/s}$, r_x y r_{H^+} obtenidos son aceptables para los objetivos planteados, de aquí en más, se define al medio LP 5-3 (a partir de ahora denominado LP) como estándar para todos los cultivos de *Acidithiobacillus thiooxidans* a lo largo de esta tesis.*

Adaptación de Acidithiobacillus thiooxidans a concentraciones crecientes de uranio(VI). Reducción.

I- pH libre

Objetivos

Estudiar la capacidad de crecimiento de *Acidithiobacillus thiooxidans* en presencia de uranio(VI).

Adaptar la cepa a concentraciones crecientes de uranio(VI).

Estudiar la conservación de la adaptación.

Analizar la posible reducción de uranio(VI).

Materiales y métodos

A partir de un cultivo saturado en medio estándar LP para *Acidithiobacillus thiooxidans* se realizaron subcultivos en medio LP con S^0 (1% p/v) como fuente de energía y distintas concentraciones de uranio(VI) en solución (ver metodología de adaptación en Materiales y Métodos Generales).

En cada serie se incluyeron sistemas control estériles, a fin de descartar efectos no biocatalizados.

Para estudiar la conservación de la adaptación, se realizó un inóculo a partir de un sistema en fase exponencial tardía con uranio(VI). Se realizó un subcultivo en medio estándar LP, sin uranio(VI), como control positivo.

Inóculo: Se filtró un sistema de cultivo de *Acidithiobacillus thiooxidans* creciendo en medio estándar LP de 100 ml, por filtro tipo Whatman 41. Se realizó un lavado con 5 ml de agua destilada sobre el filtro. Cada sistema fue inoculado con 5 ml (1% v/v) del filtrado, volumen final 50 ml, en erlenmeyers de 150 ml.

Para estudiar la conservación de la adaptación, se filtró un sistema saturado de 50 ml con uranio(VI) por filtro tipo Whatman 41 y luego por membrana 0.22 μ m. Se realizaron dos lavados con 5 ml de agua destilada sobre el filtro. Las células retenidas en la membrana se resuspendieron en el volumen necesario de medio LP y se inoculó un sistema al 5% v/v.

Uranio(VI): a cada sistema se agregó el volumen necesario de una solución acuosa madre de 2000 mg l⁻¹ uranio(VI) y medio de cultivo LP 2X, a fin de evitar la dilución de los componentes del medio de cultivo original.

Condiciones de cultivo: 30° C; 200 rpm

Cinética: A distintos tiempos se tomaron 2 ml de muestra, se filtró por filtro tipo Whatman 41 y se determinó: pH; población bacteriana por recuento en cámara de Thoma; producción de ácido por titulación con NaOH; uranio(VI) en solución, colorimétricamente por tiocianato de amonio y espectrometría gama (Materiales y Métodos Generales).

Resultados y discusión

A continuación se presentan las cinéticas de producción de ácido y células ml^{-1} para la primera serie de adaptación de *Acidithiobacillus thiooxidans* a uranio(VI) (Figuras 14- 15). Para normalizar los resultados experimentales y facilitar la representación gráfica, las ordenadas se expresan como la diferencia (D) entre el valor a un tiempo determinado y el valor al tiempo inicial ($t - t_0$).

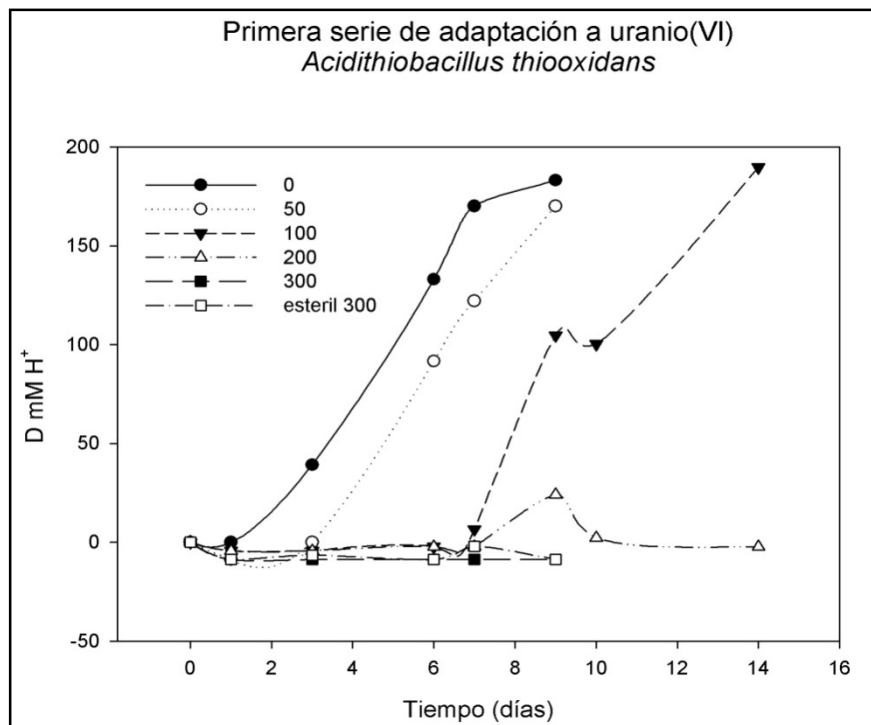


Figura 14: producción de ácido en función del tiempo para la primera serie de adaptación.

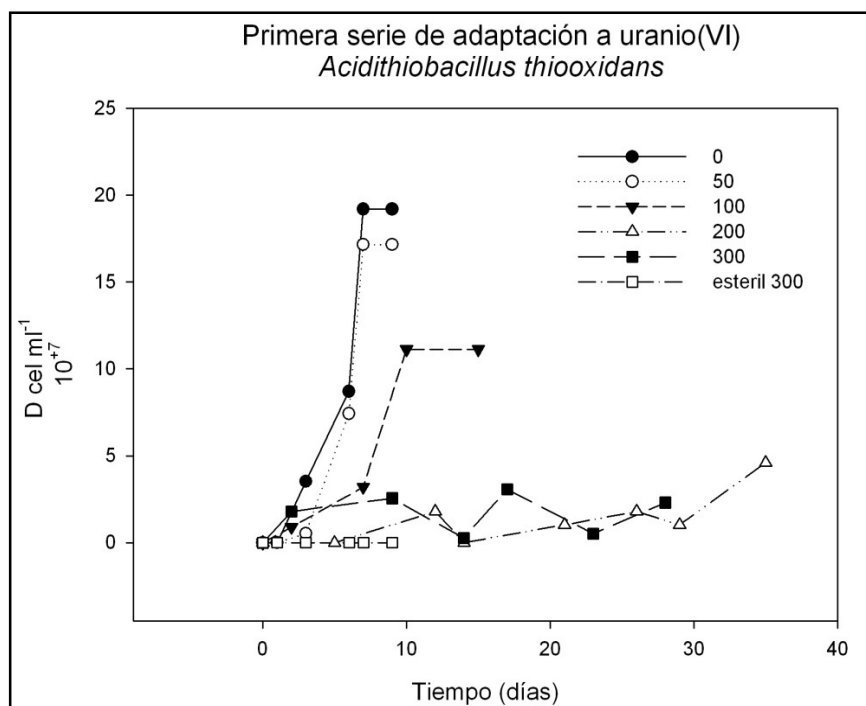


Figura 15: cinética de crecimiento para la primera serie de adaptación.

Como puede observarse, en la primera serie de adaptación *Acidithiobacillus thiooxidans* naturalmente es capaz de crecer en concentraciones de hasta 100 mg l⁻¹ de uranio, con un aumento del tiempo lag en los sistemas con presencia del metal.

En la tabla 6 se comparan las productividades obtenidas para esta serie:

Condición (mg l ⁻¹ uranio)	Productividad	
	r _{H+} (mEqH ⁺ día ⁻¹)	r _x (cel. ml ⁻¹ día ⁻¹)
0	20,35	1,97 10 ⁺⁷
50	18,89	1,19 10 ⁺⁷
100	11,63	3,69 10 ⁺⁶
200	2,66	9,33 10 ⁺⁵
300	0	0
estéril 300 ppm	0	0

Tabla 6: productividades para el primer subcultivo de *Acidithiobacillus thiooxidans* en uranio, a partir de un cultivo libre de metal.

Las productividades son menores que en el control sin uranio.

Éstas podrían mejorarse luego de sucesivos subcultivos en la misma condición, según lo establecido anteriormente por los antecedentes bibliográficos.

El número de subcultivos necesarios para generar una cepa adaptada aumentó conforme se aumentó la concentración de uranio en el medio.

Se lograron cepas adaptadas hasta 300 mg l⁻¹ de uranio, luego de un máximo de 4 subcultivos sucesivos en esa condición.

Los sistemas estériles, no mostraron crecimiento ni producción de ácido.

A continuación se presentan los datos cinéticos de cepas consideradas adaptadas (valores de productividades constantes luego de 2 a 3 subcultivos en esa condición).

Sistema (mg l⁻¹ uranio)	r_{H+} (mM H⁺ día⁻¹)	r_x (cél.ml⁻¹día⁻¹)
0	20,34	1,97 10 ⁺⁷
50	18,89	1,19 10 ⁺⁷
100	15,8	7,01 10 ⁺⁶
200	13,23	9,78 10 ⁺⁶
300	12,78	5,97 10 ⁺⁶

Tabla 7: productividades de sistemas adaptados hasta 300 mg l⁻¹ de uranio(VI).

Para los mismos sistemas, el aumento en las productividades fue acompañado con la disminución en el tiempo lag (Tabla 8) y un aumento en la velocidad específica de crecimiento, especialmente para las condiciones 100, 200 y 300 mg l⁻¹ de uranio.

Sistema (mg l⁻¹ uranio)	T_{lag} sin adaptar (días)	T_{lag} adaptado (días)
0	1	1
50	3	3
100	7	3
200	12	5
300	14	8

Tabla 8: tiempos lag de los sistemas con un solo subcultivo en uranio (en proceso de adaptación) y ya adaptados.

Cabe aclarar que la situación “ideal” de adaptación sería igualar las productividades de un cultivo libre de uranio. Sin embargo, no puede descartarse gasto energético en procesos metabólicos vinculados a la resistencia al metal como causa de valores de producción de biomasa menores al control, incluso al lograr la adaptación.

Para 400 ppm de uranio(VI), la productividad obtenida fue baja, aun luego de mas de 5 subcultivos (Tabla 9).

La biomasa final obtenida para los sistemas a 500 ppm resultó tan baja que no fue posible un subcultivo a la misma condición.

Sistema (mg l ⁻¹ uranio)	Productividad ácido (mM H ⁺ día ⁻¹)	Productividad biomasa (células ml ⁻¹ día ⁻¹)
0	20,34	1,97 10 ⁺⁷
400 ⁶	0,88	9,96 10 ⁺⁵
500 ¹	0,39	8,53 10 ⁺⁵

Tabla 9: productividades para 400 y 500 ppm de uranio(VI). Los superíndices indican cantidad de subcultivos en la misma condición.

Por lo tanto, puede concluirse que:

Acidithiobacillus thiooxidans es capaz de adaptarse a concentraciones de hasta 300 mg l⁻¹ de uranio(VI).

La adaptación ocurre entre 1 a 4 subcultivos en la misma condición, en proporción aumenta la concentración de uranio(VI) final.

La adaptación se traduce en una disminución del tiempo lag y en un aumento de productividades, en tendencia a igualar al control libre de uranio.

Dadas las bajas productividades obtenidas a 400 mg l⁻¹ de uranio(VI) y el crecimiento extremadamente bajo a 500 mg l⁻¹, puede suponerse que:

Concentraciones iguales o mayores a 400 mg l⁻¹ de uranio(VI) son inhibitorias del crecimiento para Acidithiobacillus thiooxidans.

Determinando así, un valor estimativo de toxicidad.

Conservación de la adaptación

Es interesante estudiar la conservación de la adaptación de *Acidithiobacillus thiooxidans* a uranio(VI), luego de uno o más periodos de cultivo libres de metal.

Se evaluaron las productividades de cepas adaptadas a 50 y 100 mg l⁻¹ de uranio luego de un subcultivo sin metal, y regreso a la condición inicial de contaminación.

Sistema (mg l ⁻¹ uranio)	r _{H+} (mM H ⁺ día ⁻¹)	r _X (Cél.ml ⁻¹ día ⁻¹) 10 ⁺⁶	T _{lag} (días)
50 adaptada	19,62	3,28	3.0
50 subcultivo sin metal	22,92	7,26	2.5
Regreso a condición inicial (50)	11,98	4,21	5.0
100 adaptada	11.63	3.69	2.0
100 subcultivo sin metal	18,98	4,80	1.0
Regreso a condición inicial (100)	8,79	3,35	3.0

Tabla 10: Conservación de la adaptación. Productividades calculadas.

Como puede observarse en la tabla 10, luego de un subcultivo en ausencia de uranio(VI) aumenta el tiempo lag (aproximadamente al doble) al volver a la condición inicial, mientras que el valor de la velocidad específica tiende a recuperarse.

Acidithiobacillus thiooxidans conserva parcialmente la capacidad de crecer en medio con uranio, una vez que fue adaptada.

Comentario

Es interesante mencionar que, hasta la fecha, no se han renovado trabajos que relacionen *Acidithiobacillus thiooxidans* y uranio, y que las publicaciones que datan de 1970 (Tuovinen et.al. 1974) reportan la adaptación de *Acidithiobacillus ferrooxidans* sólo hasta 5mM UO₂²⁺, equivalentes a 1.19 mg l⁻¹ de uranio(VI).

Reducción de uranio

Para los sistemas de la serie de adaptación se cuantificó el uranio inicial y final. Para esta experiencia en particular, el método utilizado fue basado en el complejo uranio- tiocianato, ya descrito en Materiales y Métodos Generales.

Se midió la concentración de uranio(VI) en solución en los sobrenadantes de dos cultivos de *Acidithiobacillus thiooxidans* adaptada a 100 y 200 mg l⁻¹ de uranio.

Los resultados se presentan en la tabla 11.

sistema	mg l ⁻¹ uranio(VI) inicial	Masa uranio(VI) [mg] inicial	mg l ⁻¹ uranio(VI) final	Masa uranio(VI) [mg] Final	Δ Uranio inicial - uranio final [mg]
100 mg l ⁻¹	102.0	5.1	64.1	2.6	2.5
200 mg l ⁻¹	221.1	11.1	166.8	6.7	4.4

Tabla 11: medidas de uranio(VI) en solución por el método con tiocianato de amonio.

Como se observa en la tabla 11, los sistemas presentaron disminución de la masa de uranio en solución de aproximadamente el 50 y 40%, respectivamente, que podría estar ligada a la reducción de uranio(VI) y precipitación de uranio(IV) como el mineral *uraninita*, UO₂ (¹Lovley, D. et al., 1991).

Los sedimentos y sobrenadantes fueron analizados mediante espectrometría gama. Se observó una disminución del 30% de uranio en solución y presencia del metal en el sedimento del sistema de 100 mg l⁻¹, coincidiendo con la hipótesis de reducción en dicho sistema. Sin embargo:

- 1- No se ha especiado el uranio presente en los sedimentos [uranio(VI) ó uranio(IV)]
- 2- A pesar de existir aparente “reducción”, la misma no resulto en la precipitación de uranio(IV) como *uraninita* (UO₂), dado que no se apreció precipitado negro, según lo reportado en bibliografía (¹ Lovley, D. et al.,1991).
La ausencia de precipitado podría deberse a la adsorción del UO₂ sobre el azufre (particulado y coloidal) presente en exceso en el sistema.
- 3- Para otra serie de sistemas en iguales condiciones, los resultados obtenidos fueron negativos para la reducción de uranio en solución y presencia en el sedimento (datos no incluidos).

La aleatoriedad del comportamiento de posible “reducción” hace pensar en la desestabilización de los compuestos reductores al disminuir el pH del cultivo de *Acidithiobacillus thiooxidans* (Donati,E. et al., 2000) con lo cuál existiría un proceso de reoxidación del uranio en las últimas etapas del cultivo.

Para comprobar si existe reducción indirecta (mediada por politionatos), se plantean posteriores ensayos de crecimiento pH controlado, a fin de estabilizar los compuestos reductores. Los resultados se expresan en la sección próxima.

Adaptación de Acidithiobacillus thiooxidans a concentraciones crecientes de uranio(VI). Reducción.

II- pH controlado

Como se concluyó en la sección anterior, no se observó reducción de uranio(VI) mediada por politionatos en cultivos de *Acidithiobacillus thiooxidans* a pH libre. Dadas las evidencias anteriores que reportan la baja estabilidad de los mismos a valores de pH muy bajos (Donati, E. et.al, 2000) se procedió a realizar cultivos de *Acidithiobacillus thiooxidans*, estabilizando el valor de pH en 2,5 y 4 por adición automática de KOH. Estos valores fueron elegidos considerando también que la solubilidad del nitrato de uranilo en agua disminuye considerablemente a partir de pH 5. Se sabe, por antecedentes bibliográficos, que *Acidithiobacillus* es capaz de crecer en las condiciones propuestas (op. cit.).

Objetivos

Estudiar los efectos del pH en los equilibrios del uranio(VI) en solución y la reacción de bio-reducción.

Materiales y métodos

Sistema de cultivo: *Acidithiobacillus thiooxidans* se cultivó en medio de cultivo estándar, con S⁰ como fuente de energía (1% p/v), a volumen final de 400 ml en erlenmeyer de 1 o 2L; agitación 200 rpm con agitador magnético; aireación asistida (1L min⁻¹) con aireador de pecera; control de temperatura a 30°C (sonda PT 100); control de pH a 2.5 o 4 con KOH 0.25 ó 0.5N, electrodo de vidrio combinado (Phoenix), bomba peristáltica (Apema) y controlador digital tipo ON- OFF (Consort).

Inóculo: 1% v/v a partir de un cultivo *stock* en medio estándar, saturado.

Uranio(VI): Cuando el cultivo alcanzó la fase saturada, se agregó el volumen necesario de una solución madre de 1000 mg l⁻¹ de uranio(VI), de manera de obtener concentraciones finales de 10,25, 50, 75, 150 y 300 mg l⁻¹.

Cinética: A distintos tiempos se tomaron 10 ml de muestra por duplicado. Cada muestra fue filtrada por filtro Whatman 41 (> 20- 25 µm) y luego por membrana 0,22 µm. La población bacteriana fue determinada por recuento en cámara de Thoma. La producción de ácido fue determinada en función de equivalentes de base consumidos. Los compuestos reductores se cuantificaron por titulación iodométrica. Se cuantificó uranio(VI) en solución y en sólidos.

Resultados y discusión

Crecimiento sin uranio

A partir de un cultivo de *Acidithiobacillus thiooxidans*, con S^0 como sustrato, en medio LP a pH controlado 2,5 o 4, sin agregado de uranio, se calcularon las velocidades de crecimiento (r_x). Los valores se presentan en la tabla 12.

<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> Cultivos sin uranio			
	pH libre	pH 2,5	pH 4
r_x (cel. ml ⁻¹ día ⁻¹) 10^{+7}	1,97	1,86	0,94

Tabla 12: velocidad de crecimiento de *Acidithiobacillus thiooxidans* a distintos valores de pH.

Crecimiento con uranio y reducción

En la figura 16 se muestran los perfiles de crecimiento y de producción de H^+ a pH 2,5 y 4, con uranio adicionado en la fase saturada.

La masa de uranio(VI) agregada al medio no superó la concentración final de 50 mg l^{-1} , condición no inhibitoria del crecimiento, según se vio previamente en este trabajo.

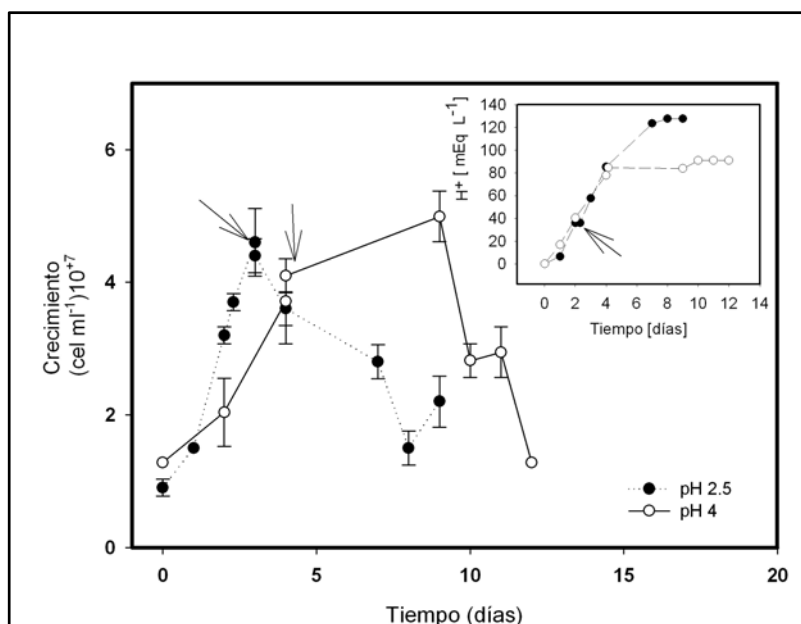


Figura 16: crecimiento de *Acidithiobacillus thiooxidans* a pH 2,5 y 4. La flecha indica el agregado de uranio(VI) al medio. Gráfico interior: producción de H^+ .

Según se observa en la figura 16, la producción celular a pH 2.5 disminuyó con el agregado de uranio al medio. A pH 4 la producción celular aumento levemente. La finalización del cultivo se evidenció por el cese en la producción de ácido (gráfico interno, figura 16).

Se analizó la variación de los compuestos reductores, el uranio en solución y la relación entre ambos parámetros para los sistemas a pH 2,5 y 4.

A pH 2,5 (figura 17) se observó una ligera disminución de los compuestos reductores producidos durante el crecimiento celular al adicionar uranio al medio, coincidente con una disminución de la cantidad de uranio en solución (flecha con línea entera en la figura 17). Esto es compatible con una reducción de uranio(VI) a uranio(IV), con precipitación del mismo mediada por los compuestos reductores previamente generados en el cultivo.

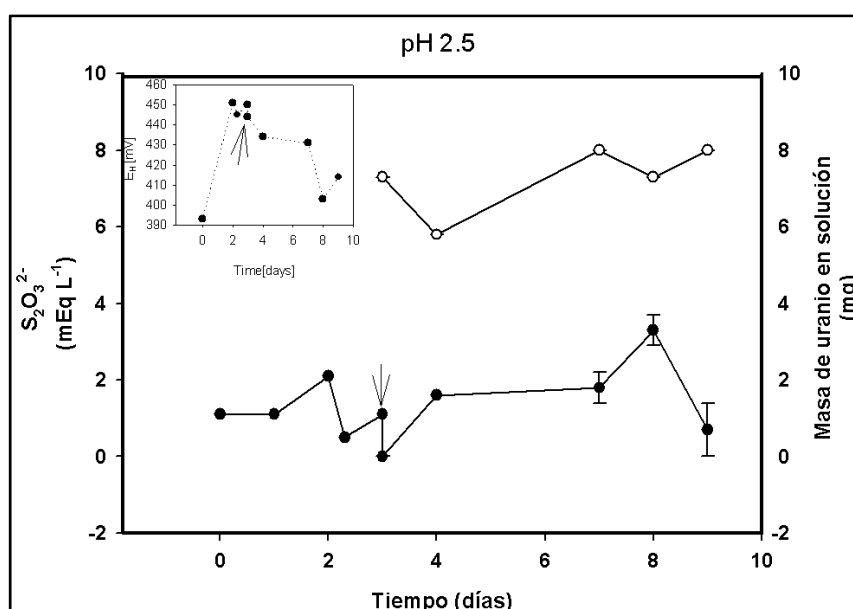


Figura 17: uranio en solución (○) y compuestos reductores (●) en función del tiempo para *Acidithiobacillus thiooxidans* creciendo a pH 2.5. Gráfico interno: evolución del potencial redox (E_H). Flecha con línea entera muestra adición de uranio(VI).

Sin embargo, a lo largo del cultivo el perfil de los reductores no muestra variaciones significativas, mientras que la población bacteriana disminuye y el uranio en solución recuperó el valor inicial (hacia el final del cultivo).

Estas observaciones sugieren una gran inestabilidad de los compuestos reductores, sumada a una disminución del crecimiento y producción de metabolitos por *Acidithiobacillus thiooxidans*. Al disminuir la concentración de reductores a este pH de trabajo (Donati, E. et.al, 2000), se produce re-oxidación del uranio.

Cuando *Acidithiobacillus thiooxidans* se cultivó a pH 4 (figura 18), al igual que en la experiencia anterior, se observa una disminución inicial de compuestos reductores al agregar uranio. A diferencia de lo observado a pH 2.5, el uranio en solución presentó una marcada tendencia a disminuir y los compuestos reductores a aumentar a lo largo de todo el cultivo. Un marcado descenso de la masa de uranio en solución coincidió con un evidente aumento en los compuestos reductores (flechas en la figura 18).

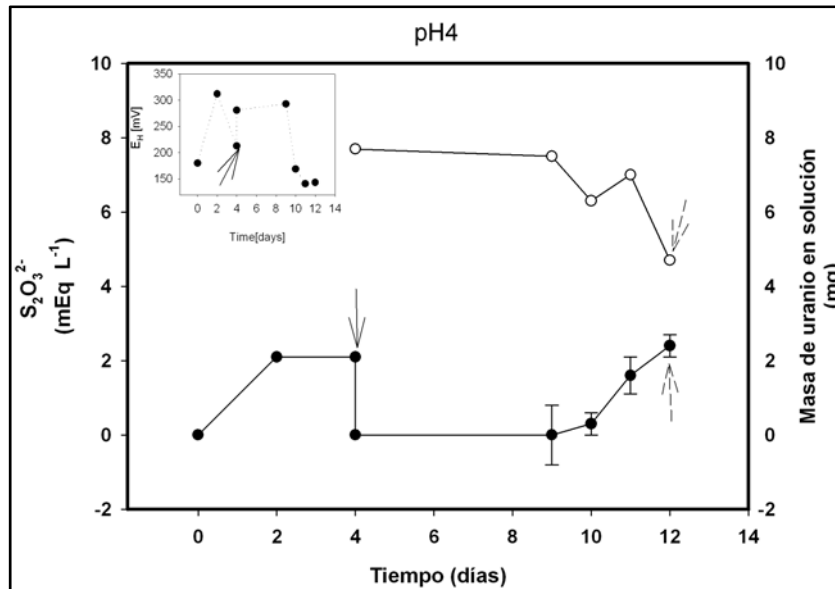
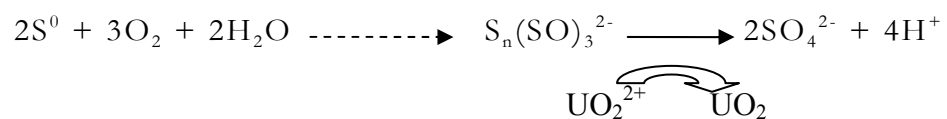


Figura 18: uranio en solución (○) y compuestos reductores (●) en función del tiempo para *Acidithiobacillus thiooxidans* creciendo a pH 2.5. Gráfico interno: evolución del potencial redox (E_H). Flecha con línea entera muestra adición de uranio(VI); flecha con línea cortada muestra coincidencia entre aumento de reductores y disminución del uranio en solución.

En esta condición de cultivo, se logra un evidente aumento en la estabilidad de los compuestos reductores, favoreciendo la interacción con el uranio(VI) y su reducción a uranio(IV), y consecuente precipitación. En conclusión:

A pH 4 se logra el proceso de reducción indirecta de uranio en solución,

según las ecuaciones antes mencionadas (ecuaciones 3 y 19):



El uranio presente en las diferentes fracciones de filtrado fue cuantificado por espectrometría gama. En las figuras 19 -20 se muestra la comparación entre las tres fracciones: menor que 0.22 μm (solución), retenido a 25 μm (Watman 41) y retenido a 0.22 μm (membrana acetato de celulosa), para las experiencias a pH 4 y 2.5.

El perfil de masa de uranio retenido en cada fracción (figura 19), confirma que la condición a pH 2.5 no es la mejor para la reducción de uranio(VI): la masa inicial de uranio presente en la fracción de azufre no coloidal ($> 25 \mu\text{m}$) vuelve a solución (fracción $< 0.22 \mu\text{m}$) hacia el fin del cultivo.

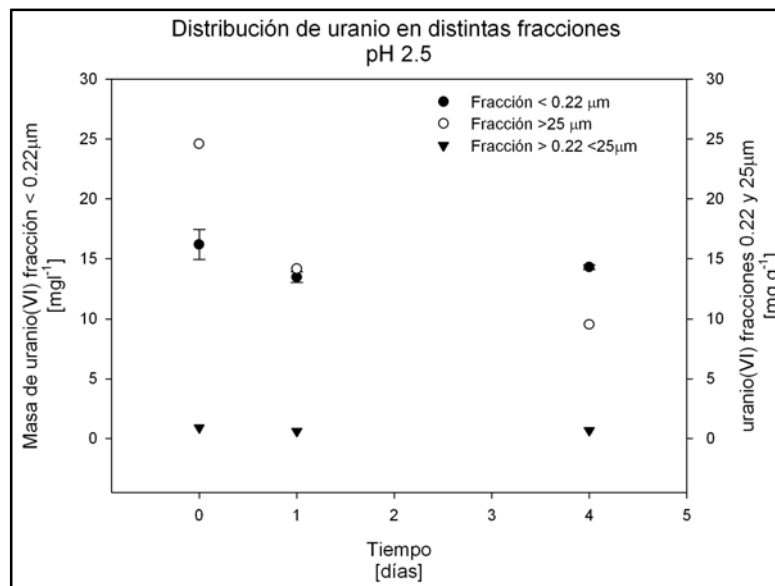


Figura 19: uranio en distintas fracciones a pH 2.5.

Según estos resultados, se confirman las observaciones de la figura 17 y se refuerza la conclusión que existe reoxidación de uranio y la reaparición en la fase soluble ($< 0.22 \mu\text{m}$) por inestabilidad de politionatos en solución a pH 2.5.

A pH 4, se observa (figura 20) que la mayor estabilidad en los compuestos reductores se traduce en la disminución de uranio en la fase soluble ($< 0.22 \mu\text{m}$) y retención en fases sólidas.

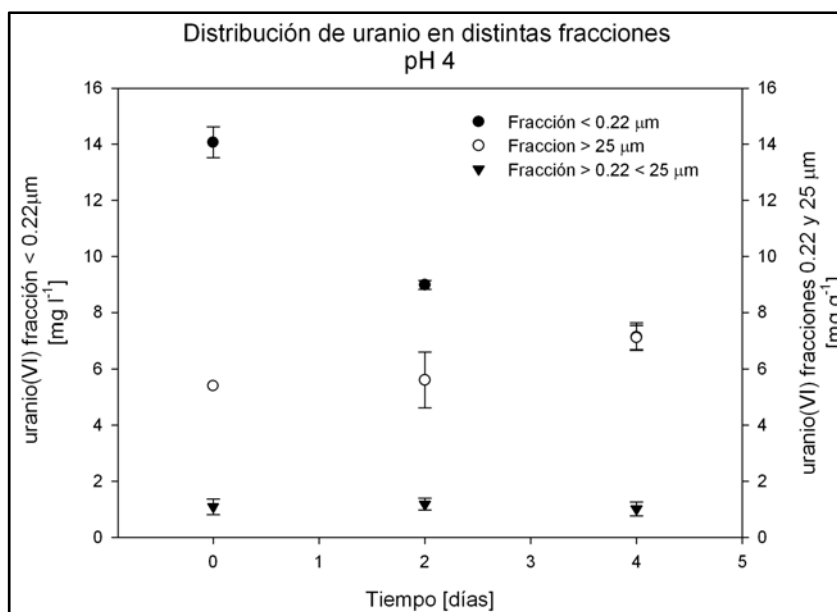


Figura 20: uranio en distintas fracciones a pH 4. Los valores de uranio en solución y de la fracción 25 μm, coinciden.

La relación inversamente proporcional entre el uranio en solución y en la fracción no coloidal, indica que éste fue retenido (reducido) en esta última.

Llamativamente, no ocurrió en la fracción de azufre coloidal, esperada que interviniera en la reducción por politionatos, según antecedentes bibliográficos (Quintana, M. et al., 2001): los valores que se presentan por espectrometría gama de la fracción coloidal (0.22 μm) se encuentran dentro de la línea de base del método.

Por lo tanto:

Acidithiobacillus thiooxidans creciendo a pH 4, es capaz de reducir uranio(VI) por un mecanismo indirecto mediado por reductores no coloidales, acumulándose en la fracción de azufre $\geq 25\mu\text{m}$

Como se planteó en la sección Hipótesis, como consecuencia de la reducción de uranio(VI) se esperaba la precipitación de UO_2 , de color negro (Lovley, D. et al.; Gorby, Y. et al.).

La ausencia del mismo probablemente se deba a la formación de microagregados de uranio(IV) y adsorción sobre el azufre en exceso de los sistemas estudiados.

Al respecto, es necesario mayor estudio en la caracterización química de los elementos presentes en cada fracción filtrada (<0,22 μm ; >0,22 <25 μm; >25 μm).

Cinética de crecimiento de Acidithiobacillus ferrooxidans en medios con concentración variable de fosfato

1- Crecimiento en medio reducido en fosfato con Fe^{2+} como sustrato

Análogamente a lo estudiado para *Acidithiobacillus thiooxidans*, es interesante conocer la interacción de la especie *Acidithiobacillus ferrooxidans* con uranio.

Se estudiará la reducción indirecta mediada por compuestos reductores derivados del azufre y la reducción directa utilizando uranio(VI) como aceptor final en la cadena respiratoria, con S^0 como sustrato.

Según lo planteado en las primeras secciones, la adaptación de *Acidithiobacillus ferrooxidans* a medios reducidos en fosfatos, es necesaria previamente a los estudios con uranio.

El manejo de los sistemas *Acidithiobacillus ferrooxidans* con S^0 como sustrato, posee una desventaja: la eventual contaminación con *Acidithiobacillus thiooxidans*, y el enriquecimiento inevitable con ésta última dado que posee una velocidad específica de crecimiento mayor en estas condiciones. Para ello, es necesario conservar *stocks* en medio ferroso guardando la identidad bacteriana y preparar a partir de ellos el inóculo para medios no ferrosos.

En esta primera sección se presenta el estudio de la capacidad de *Acidithiobacillus ferrooxidans* de crecer en medio ferroso reducido en fosfatos, para luego evaluar su crecimiento en medios sin hierro(II) con azufre como sustrato y el agregado de uranio.

Objetivos

Estudiar la capacidad de crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en medios reducidos en fosfato.

Adaptar la cepa a un medio de cultivo reducido en fosfatos a fin de disminuir la formación de fosfato de uranilo (insoluble) y aumentar la bio- disponibilidad y estabilidad del uranio en solución.

Materiales y métodos

A partir de un cultivo en medio estándar para *Acidithiobacillus ferrooxidans* (9K) se realizaron dos subcultivos: en medio 9KLP y en medio 9K (control). Ambos con Fe^{2+} como sustrato.

Inóculo: Se filtró un sistema de 100 ml, saturado, por filtro Whatman 41 y luego por membrana 0.22 μm . Se realizaron dos lavados de 5ml con agua destilada estéril y se resuspendieron las células retenidas en el filtro en medio de cultivo 9K LP. Cada sistema fue inoculado con 5 ml (1% v/v), a volumen final de 50 ml en erlenmeyers de 150 ml.

Condiciones de cultivo: 30° C; 200 rpm

Cinética: A distintos tiempos se tomaron 2 ml de muestra, se filtró por filtro Whatman 41 y se determinó: consumo de Fe^{2+} por titulación con $KMnO_4$; pH; población bacteriana por recuento en cámara de Thoma.

Resultados y discusión

En los gráficos de las figuras 21, 22 y 23 se presentan los parámetros medidos en función del tiempo, para sucesivos cultivos en la misma condición.

A partir de la comparación de las pendientes de las gráficas de la figura 21, luego de 2 subcultivos en medio reducido en fosfatos (9K LP x 2) la velocidad de crecimiento alcanza a la del control. Incluso, estos valores no se modifican para subcultivos posteriores (9K LP x 5).

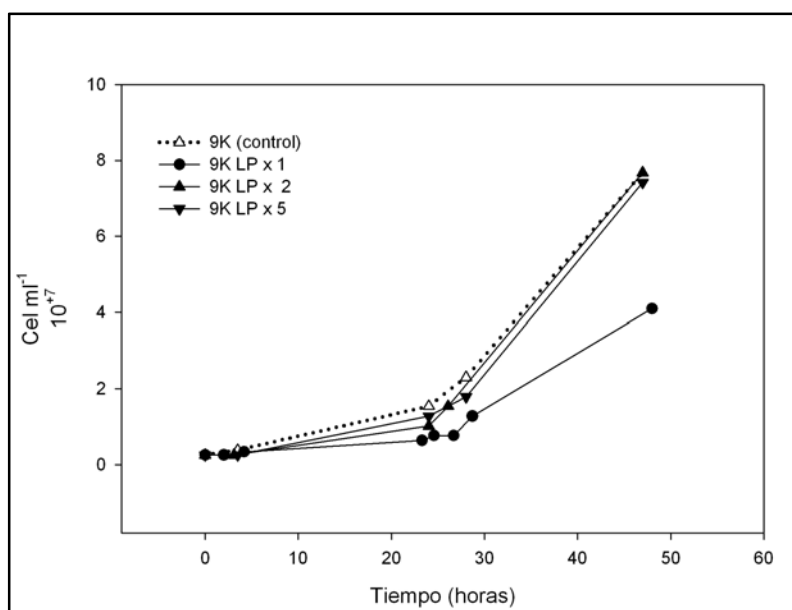


Figura 21: Crecimiento para *Acidithiobacillus ferrooxidans* subcultivado 1, 2 y 5 veces consecutivas (9KLP x 1, 9KLP x 2 y 9KLP x 5) en medio reducido en fosfatos.

Las productividades calculadas para una cepa control y una considerada adaptada a medio bajo fosfato 9KLP, son:

Velocidad de crecimiento

$$r_x \text{ 9K control: } 1,58 \cdot 10^6 \text{ cel ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$$

$$r_x \text{ 9K LP adaptada: } 1,53 \cdot 10^6 \text{ cel ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$$

Para el sustrato Fe^{2+} (figura 22), la cepa alcanza rápidamente velocidades de consumo similares al control después de un primer subcultivo en medio reducido.

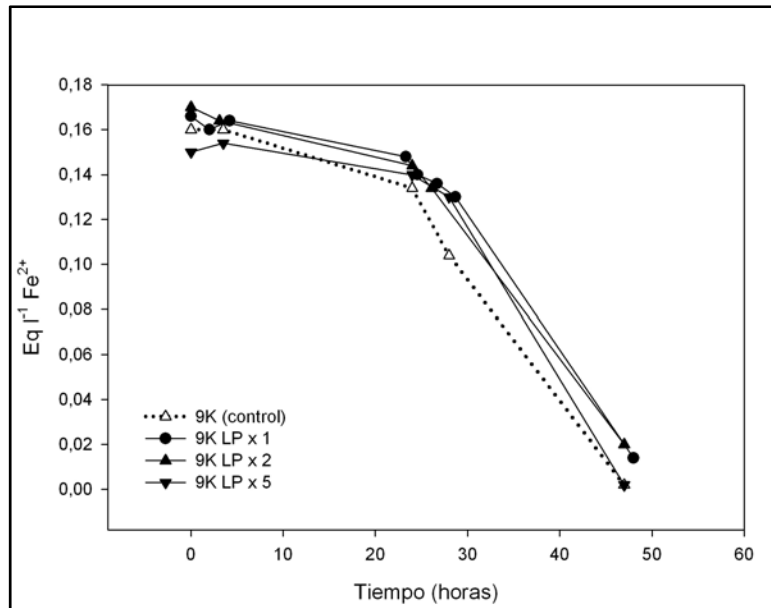


Figura 22: Consumo de Fe²⁺ para *Acidithiobacillus ferrooxidans* subcultivado 1, 2 y 5 veces consecutivas (9KLP1, 9KLP2 y 9KLP5) en medio reducido en fosfatos.

Consumo de sustrato

9K control: 0,0034 Eq l⁻¹ h⁻¹ Fe²⁺

9K LP adaptada: 0,0031 Eq l⁻¹ h⁻¹ Fe²⁺

Los rendimientos (biomasa producida · sustrato consumido⁻¹) obtenidos fueron también similares para ambos medios de cultivo:

Y_{x/s} 9K control: 4,82 · 10⁺¹¹ cel ml⁻¹ (Eq_{Fe2+})⁻¹

Y_{x/s} 9K LP adaptada: 4,51 · 10⁺¹¹ cel ml⁻¹ (Eq_{Fe2+})⁻¹

Los resultados obtenidos para la variación del pH (figura 23) son los típicos para la cepa control (9K). Sin embargo, los sistemas con medio 9KLP no presentan la caída de pH al final del cultivo como ocurre con el control.

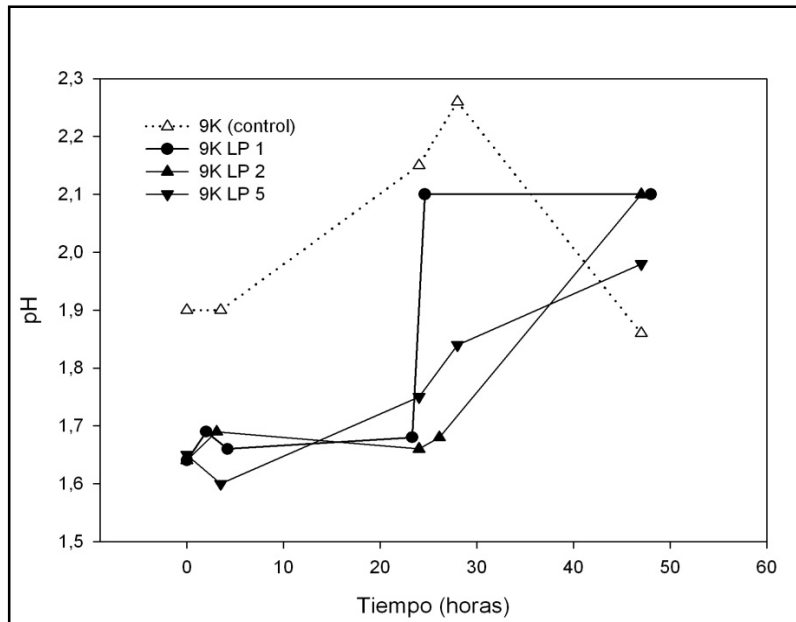
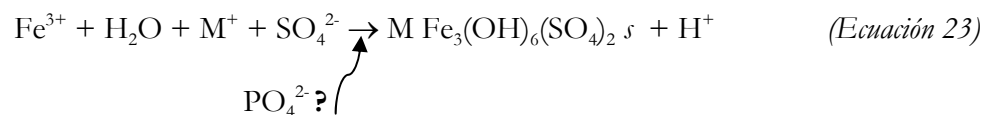


Figura 23: medida de pH para *Acidithiobacillus ferrooxidans* subcultivado 1, 2 y 5 veces consecutivas (9KLP1, 9KLP2 y 9KLP5) en medio reducido en fosfatos.

Paralelamente, se observó a simple vista, menor cantidad de precipitado de *jarosita* en los sistemas bajo fosfato.

Teniendo en cuenta lo reportado previamente (Donati, E. et al., 2003), podría inferirse que el el ión fosfato está involucrado en la formación de núcleos de cristalización que favorezcan la precipitación de *jarosita*, afectando la reacción:



La menor precipitación observada, sería además producto de la disminución de la hidrólisis, lo que justifica la menor producción de H^+ y la estabilización del pH hacia el final de los cultivos en medios LP (figura 23).

Esta observación sugiere mayores estudios sobre los precipitados obtenidos en medios reducidos en fosfato.

Con estos resultados, se concluye que:

Acidithiobacillus ferrooxidans es capaz de crecer en forma muy satisfactoria en medios reducidos en fósforo, con Fe^{2+} como fuente de energía.

En adelante, se establece el medio de cultivo 9KLP como estándar para la conservación de *stocks* para las experiencias con uranio.

2- Crecimiento en medio reducido en fosfato con S⁰ como sustrato

Objetivos

Estudiar la cinética de crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en medios reducidos en fosfatos y con S⁰ como sustrato.

Comparar la capacidad de crecimiento con la que posee *Acidithiobacillus thiooxidans* en estas condiciones, para futuros estudios de resistencia y reducción de uranio(VI).

Materiales y métodos

A partir de un cultivo en medio estándar para *Acidithiobacillus ferrooxidans* (9KLP) se realizaron dos subcultivos: en medio LP y en medio 0K (control), con S⁰ como sustrato.

Inóculo: Se filtraron 100 ml de un cultivo saturado de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en medio estándar (9KLP), por filtro Whatman 41 y luego por membrana 0.22 µm. Se realizaron dos lavados con 5 ml agua destilada estéril y se resuspendieron las células retenidas en el filtro en medio de cultivo LP. Cada sistema fue inoculado con 5 ml (1% v/v), a volumen final de 50 ml en erlenmeyers de 150 ml y 0,5g de S⁰ (1% p/v).

Condiciones de cultivo: 30° C; 160 rpm

Cinética: A distintos tiempos se tomaron 2 ml de muestra, se filtró por filtro Whatman 41 y se determinó: producción de ácido por titulación con NaOH; pH; población bacteriana por recuento en cámara de Thoma.

Resultados y discusión

A continuación se presentan los parámetros medidos en función del tiempo, para un solo pasaje de *Acidithiobacillus ferrooxidans* por medio bajo fosfato.

La razón de no haber utilizado la metodología de adaptación previamente descrita, fue para evitar el enriquecimiento por contaminación cruzada con *Acidithiobacillus thiooxidans*.

Para normalizar los resultados experimentales y facilitar la representación gráfica, las ordenadas se expresan como la diferencia (D) entre el valor a un tiempo determinado y el valor al tiempo inicial (t- t₀).

A partir de los valores de mM de H⁺ (figura 24) se calculó la productividad:

Productividad de H⁺

r_{H⁺} 0K (control): 11 mM día⁻¹

r_{H⁺} LP: 5 mM día⁻¹

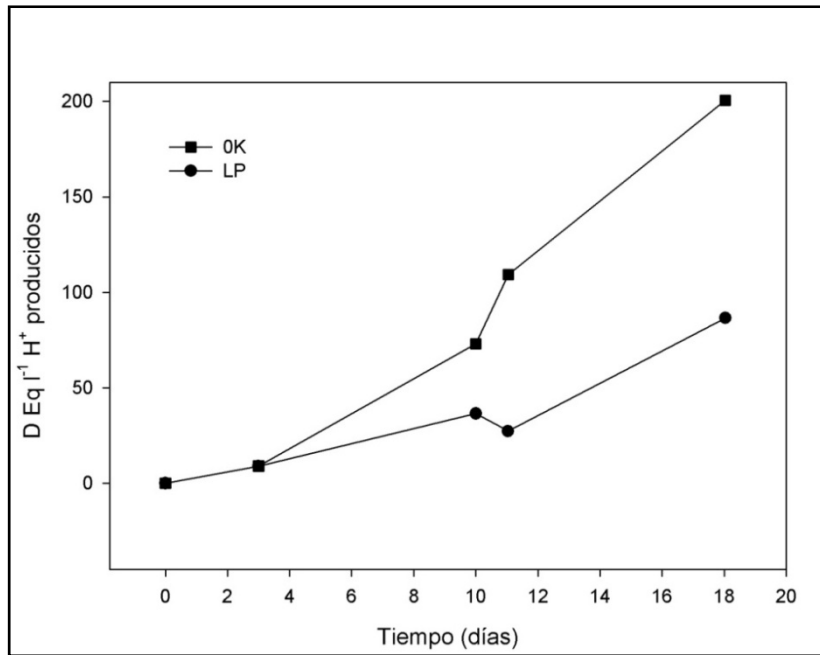


Figura 24: Producción de ácido para *Acidithiobacillus ferrooxidans* cultivado en medio 0K y LP con S⁰ como fuente de energía.

Como puede deducirse de la figura 25 y calculando, la velocidad de crecimiento es notablemente menor en medio bajo fosfato:

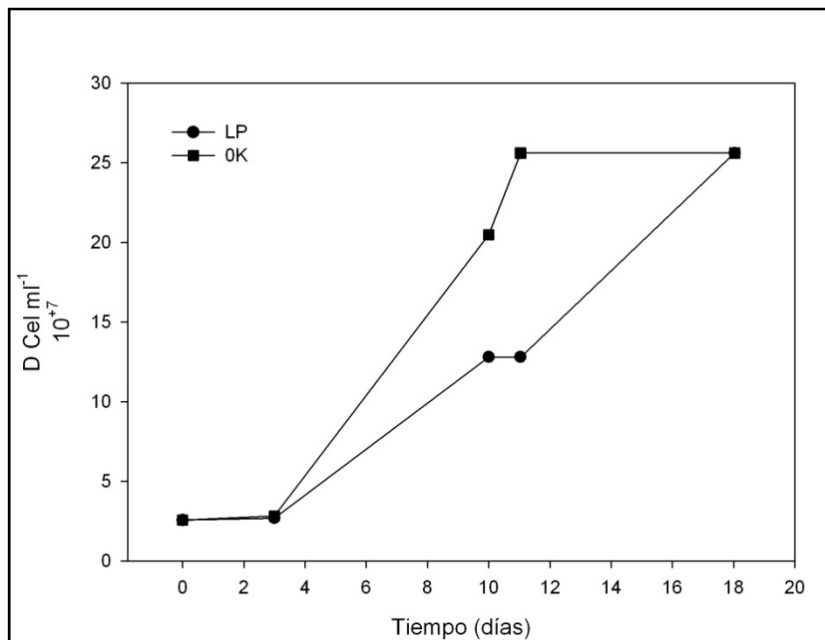


Figura 25: Crecimiento para *Acidithiobacillus ferrooxidans* cultivado en medio 0K y LP con S⁰ como fuente de energía.

Velocidad de crecimiento

r_x 0K (control)	$1,13 \cdot 10^{+8}$ cel ml ⁻¹ día ⁻¹
r_x LP	$9,27 \cdot 10^{+6}$ cel ml ⁻¹ día ⁻¹

Sin embargo, es comparable con la velocidad de crecimiento obtenida para *Acidithiobacillus thiooxidans* en las mismas condiciones (Tabla 5):

Velocidad de crecimiento Acidithiobacillus thiooxidans

$$r_x \text{ LP: } 8,7 \cdot 10^{+6} \text{ cel ml}^{-1} \text{ día}^{-1}$$

La productividad celular alcanzada hace factible el estudio del crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en medio bajo fosfato, con azufre como sustrato, y su interacción con uranio(VI).

Adaptación de Acidithiobacillus ferrooxidans a concentraciones crecientes de uranio(VI). Reducción.

pH libre

Objetivos

Estudiar la capacidad de crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en presencia de uranio(VI) con azufre como sustrato.

Analizar la posible reducción de uranio(VI) mediada por politionatos.

Evaluar la factibilidad de estudios de reducción en anaerobiosis.

Materiales y métodos

A partir de un cultivo en medio estándar para *Acidithiobacillus ferrooxidans* (9KLP) se realizaron subcultivos en medios LP con S⁰ (1% p/v) como fuente de energía y distintas concentraciones de uranio(VI) en solución.

En cada serie se incluyeron sistemas control estériles, a fin de descartar efectos no biocatalizados.

Inóculo: Se filtraron dos sistemas saturados de 100 ml por filtro Whatman 41 y luego por membrana 0.22 µm. Se realizaron dos lavados de 5ml con agua destilada y se resuspendieron las células retenidas en el filtro en medio de cultivo LP. Cada sistema fue inoculado con 10 ml (1% v/v), a volumen final 100 ml, en erlenmeyers de 250 ml.

Uranio(VI): a cada sistema se agregó el volumen necesario de una solución acuosa madre de 2000 mg l⁻¹ uranio(VI) y medio de cultivo LP 2X, a fin de evitar la dilución de los componentes del medio de cultivo original.

Condiciones de cultivo: 30° C; 200 rpm

Cinética: A distintos tiempos se tomaron 2 o 4 ml de muestra, se filtró por filtro Whatman 41 y se determinó: pH; población bacteriana por recuento en cámara de Thoma; producción de ácido por titulación con NaOH; compuestos reductores por titulación con Na₂S₂O₃; uranio(VI) en solución, colorimétricamente por Arsenazo III.

Resultados y discusión

Se ensayaron las condiciones 0, 10, 50, 100, 200, 300 y 400 mg l⁻¹ de uranio(VI).

Para cada serie se realizaron controles estériles, los cuales no presentaron crecimiento bacteriano (datos no incluidos).

Los sistemas a 200, 300 y 400 mg l⁻¹ de uranio(VI) no presentaron crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (datos no presentados).

A continuación se muestran los datos experimentales para las condiciones 0, 10, 50 y 100 mg l⁻¹ de uranio(VI).

Los resultados se expresan como la diferencia (D) entre tiempo inicial (t_0) y final (t_f) a fin de facilitar la comparación.

A partir de los valores de crecimiento de las figuras 26 y 27, se calcularon las productividades y velocidad específica de crecimiento (Tabla 13).

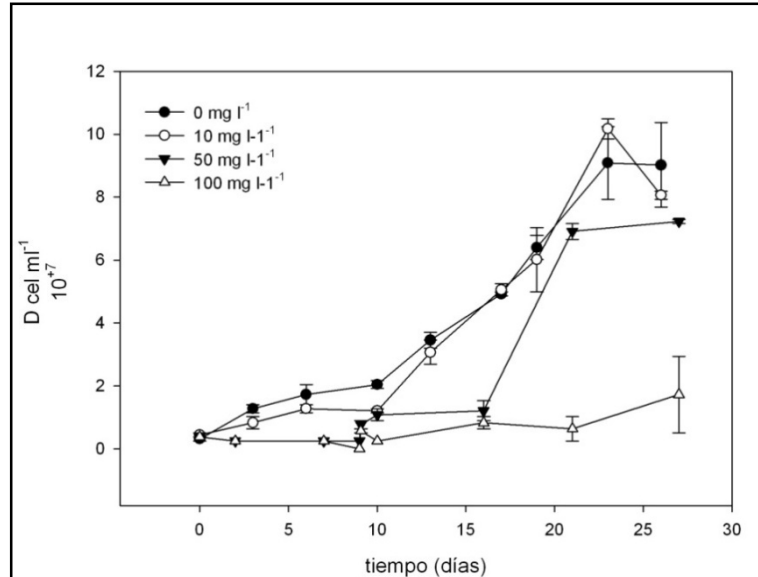


Figura 26: Crecimiento para *Acidithiobacillus ferrooxidans* cultivado en medio LP con S⁰ como fuente de energía y uranio(VI). Los sistemas estériles no presentaron crecimiento.

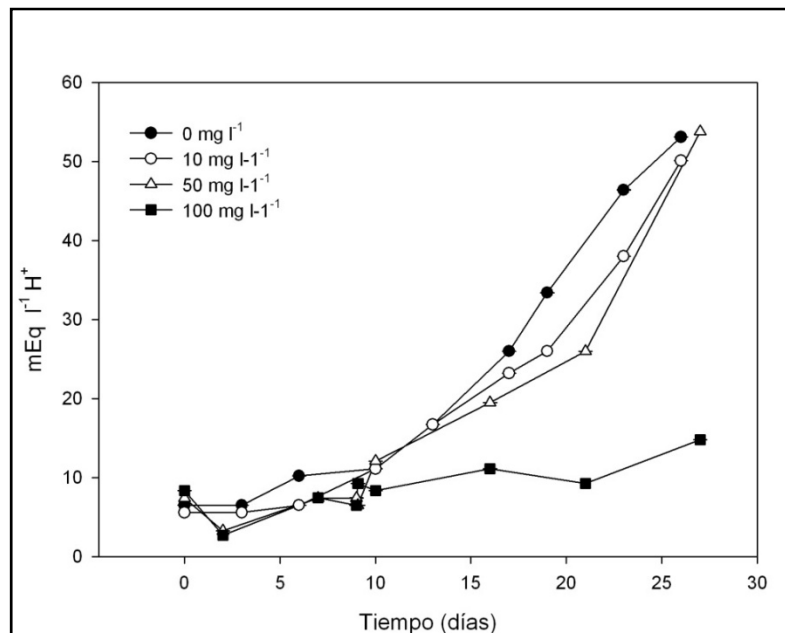


Figura 27: Producción de ácido para *Acidithiobacillus ferrooxidans* cultivado en medio LP con S⁰ como fuente de energía y uranio(VI).

<i>Condición (mg l⁻¹ uranio)</i>	<i>r_x (cel ml⁻¹ día⁻¹)</i>	<i>r_{H+} (mEq H⁺ día⁻¹)</i>	<i>pH final</i>	<i>Velocidad de disminución de pH (unidad pH día⁻¹)</i>
0	1,04 10 ⁺⁷	0,00456	1,5	0,056
10	1,03 10 ⁺⁷	0,00296	1,5	0,056
50	5,38 10 ⁺⁶	0,00203	1,5	0,056
100	4,98 10 ⁺⁵	0,00024	2,13	0,009

Tabla 13: valores cinéticos para el crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en concentraciones crecientes de uranio.

Como se dijo previamente, para *Acidithiobacillus ferrooxidans* no se probará la adaptación con la metodología descripta, dada la posibilidad de contaminación cruzada con *Acidithiobacillus thiooxidans*. Por lo tanto, todos los resultados se compararán para un único subcultivo en medio con uranio.

Según lo observado en la figura 26 y en la tabla 13, para la condición a 100 mg l⁻¹, puede establecerse que:

El crecimiento de Acidithiobacillus ferrooxidans se encuentra inhibido a concentraciones de uranio iguales a 100 mg l⁻¹.

La disminución de las velocidades de crecimiento y de productividades de ácido ocasionadas por inhibición por producto (H⁺) quedan descartadas, dado que el pH final en todos los sistemas fue similar.

Comparando los valores cinéticos para *Acidithiobacillus ferrooxidans* con los obtenidos para *Acidithiobacillus thiooxidans* (tabla 6), son evidentes las menores productividades y velocidad específica obtenidas para una misma condición.

Sin embargo, es notable la cercanía de r_x, cuando *Acidithiobacillus ferrooxidans* crece a concentración de 10 mg l⁻¹ de uranio, con respecto al control sin metal (tabla 13). A 50 mg l⁻¹ de uranio, r_x disminuyó notablemente con respecto al control, pero teniendo en cuenta que la biomasa final alcanzada (figura 26) es similar la obtenida para el control, se considera aceptable el crecimiento en condiciones de hasta 50 mg l⁻¹ de uranio. Esta concentración final se utilizará en adelante como límite superior para ensayos de reducción. Según lo analizado para r_x, y a diferencia de *Acidithiobacillus thiooxidans*, para quién se observaron mayores productividades y resistencia a un rango más amplio de concentraciones en un primer subcultivo en presencia de metal, en medio LP y S⁰ como sustrato, puede establecerse que:

Acidithiobacillus ferrooxidans es resistente a la presencia de uranio(VI) en el siguiente orden:

$$0 \text{ ppm} \approx 10 \text{ ppm} > 50 \text{ ppm}$$

Reducción de uranio

Se estudió la interacción de los politionatos generados en los cultivos de *Acidithiobacillus ferrooxidans* con uranio, en las concentraciones 10 y 50 mg l⁻¹, correspondientes a aquellas donde se observó desarrollo celular.

Para los sistemas nombrados, la masa de uranio en solución no varió considerablemente a lo largo del cultivo (figura 28).

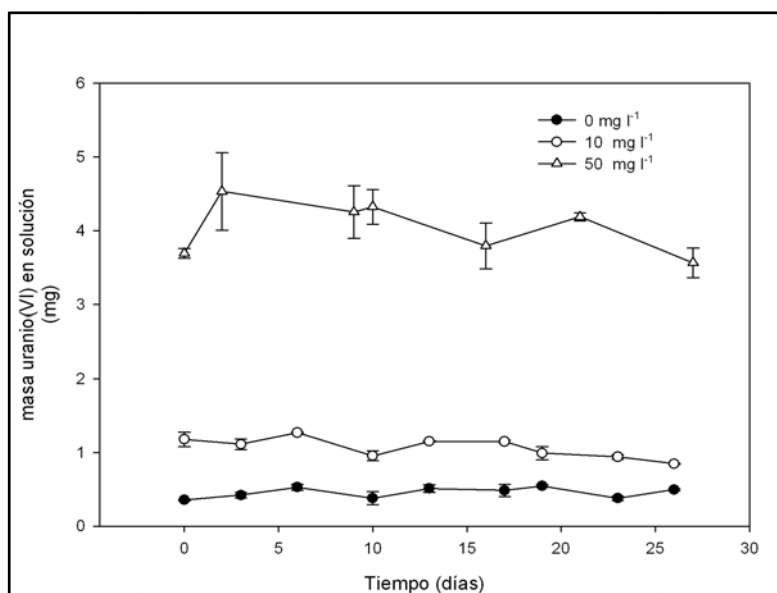


Figura 28: Masa de uranio(VI) en solución, para *Acidithiobacillus ferrooxidans* cultivado en medio LP con S⁰ como fuente de energía y uranio(VI).

Asimismo, y como se comentó para *Acidithiobacillus thiooxidans*:

- ✓ los compuestos reductores oscilan durante el cultivo (figura 29), por inestabilidad relacionada al aumento de la acidez.
- ✓ de existir reducción uranio(VI) a uranio(IV), la inestabilidad de los reductores y la presencia de oxígeno, favorecerían la re- oxidarían a uranio(VI).

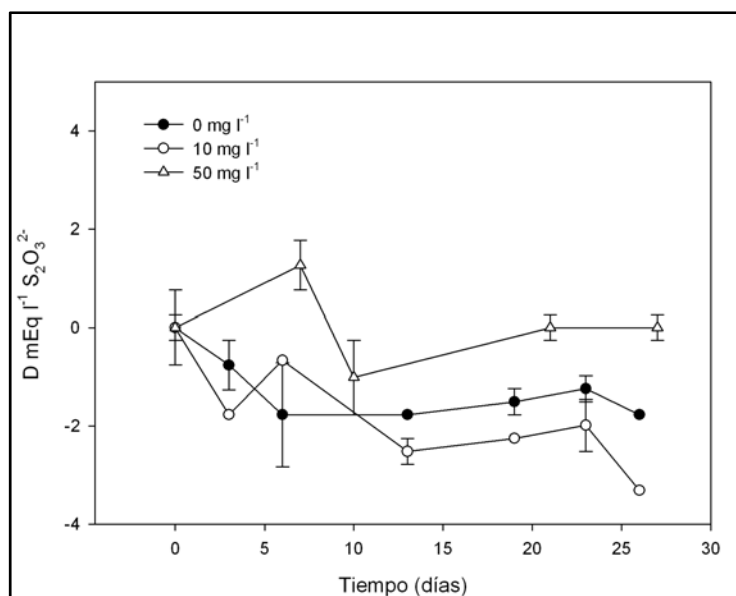


Figura 29: Compuestos reductores (en equivalentes de tiosulfato) para *Acidithiobacillus ferrooxidans* cultivado en medio LP con S⁰ como fuente de energía y uranio(VI).

Según lo observado en esta sección, y como se discutiera para *Acidithiobacillus thiooxidans* anteriormente, en los cultivos de *Acidithiobacillus ferrooxidans* aeróbicos a pH libre, no existe reducción neta de uranio mediada por politionatos.

Análogamente a lo planteado en secciones anteriores, podría estudiarse la reducción a pH 4, valor que resultó favorable para la estabilidad de los politionatos y la reducción de uranio. Sin embargo, dado que las productividades celulares y de ácido obtenidas para *Acidithiobacillus ferrooxidans* (tabla 13) son menores en estas condiciones, con respecto a las obtenidas para *Acidithiobacillus thiooxidans* (tabla 5), a pH controlado se esperaría menor producción de politionatos (Curutchet, G., 1996). Con esto, la reducción de uranio sería menos efectiva.

A continuación se presenta el estudio de la capacidad de *Acidithiobacillus ferrooxidans* de reducir uranio(VI) a uranio(IV) en un proceso directo, utilizándolo como aceptor final en la cadena respiratoria, según los antecedentes oportunamente mencionados.

Crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en anaerobiosis

Sabiendo que *Acidithiobacillus ferrooxidans* es resistente a uranio (según se evidenció en la sección anterior) resulta interesante estudiar la capacidad de utilización de uranio(VI) como aceptor final en la cadena respiratoria, como ocurre con el Fe^{3+} para esta especie, y con el uranio para otras especies hierro- reductoras (Kashefi, K. et al., 2000; Mehta, T. et al., 2005; Lovley, D. et al., 1992).

Objetivos

Evaluar la eficiencia del sistema de crecimiento en anaerobiosis con Fe^{3+} como aceptor final. Evaluar la capacidad de *Acidithiobacillus ferrooxidans* de utilizar uranio(VI) como aceptor final y la reducción directa a uranio(IV).

Materiales y métodos

Sistema de cultivo: Se cultivó *Acidithiobacillus ferrooxidans* en medio de cultivo estándar (LP o 6K LP), con S^0 como fuente de energía (1% p/v), a volumen final de 400 ml en erlenmeyer de 1L; agitación 200 rpm con agitador magnético; aireación asistida (1L min^{-1}) con aireador de pecera o bajo flujo de N_2 - CO_2 y control de temperatura a 30°C (sonda PT 100). En la figura 30 se muestra un esquema del sistema de cultivo utilizado.

Fe (III): Se cultivó *Acidithiobacillus ferrooxidans* aeróbicamente en medio de cultivo 6K LP (Fe(II) como fuente de energía). Una vez oxidado el Fe(II) , se cultivó anaeróbicamente, bajo flujo de N_2 - CO_2 forzando la utilización de Fe (III) como aceptor final, con S^0 como sustrato (1% p/v).

U(VI): Se cultivó *Acidithiobacillus ferrooxidans* aeróbicamente en medio de cultivo LP con S^0 (1% p/v) como sustrato. Previo a alcanzar la saturación, se cultivó anaeróbicamente, bajo flujo de N_2 - CO_2 agregando uranio(VI) a una concentración de 50 mg l^{-1} , forzando la utilización de U(VI) como aceptor final.

Inóculo: Se filtraron dos cultivos saturados en medio 9K- LP de 100 ml por filtro Whatman 41 y luego por membrana $0.22\text{ }\mu\text{m}$. Se realizaron dos lavados de 5ml con agua destilada a fin de eliminar el Fe(III) remanente. Las células retenidas en el filtro se resuspendieron en medio de cultivo LP.

Cinética: A distintos tiempos se tomaron 3- 4 ml de muestra, por duplicado; se filtró por filtro Whatman 41 y membrana $0.45\text{ }\mu\text{m}$. Los filtros se lavaron con 1 volumen de agua destilada. Se determinó: consumo de Fe^{2+} por titulación con KMnO_4 ; Fe total colorimétricamente con ortofenantrolina; pH; E_{H} ; producción de ácido por titulación con NaOH ; producción de compuestos reductores en la etapa aeróbica por iodometría; producción de sulfatos; población bacteriana por recuento en cámara de Thoma; uranio en solución por colorimetría con Arsenazo III.

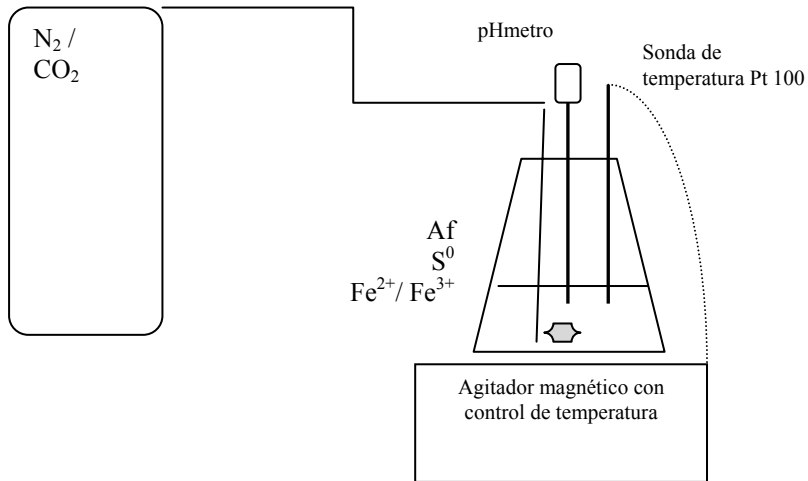


Figura 30: esquema del sistema de cultivo para *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Resultados y discusión

I- Fe^{3+} como aceptor final y S^0 como sustrato

A continuación se presenta la gráfica para el crecimiento (figura 31) y la evolución de Fe^{2+} (figura 32) para un cultivo de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en anaerobiosis. Según se observa, el crecimiento celular continúa, en paralelo aumenta la cantidad de Fe^{2+} (como resultado de la reducción del Fe^{3+} en la cadena respiratoria. Figura 32).

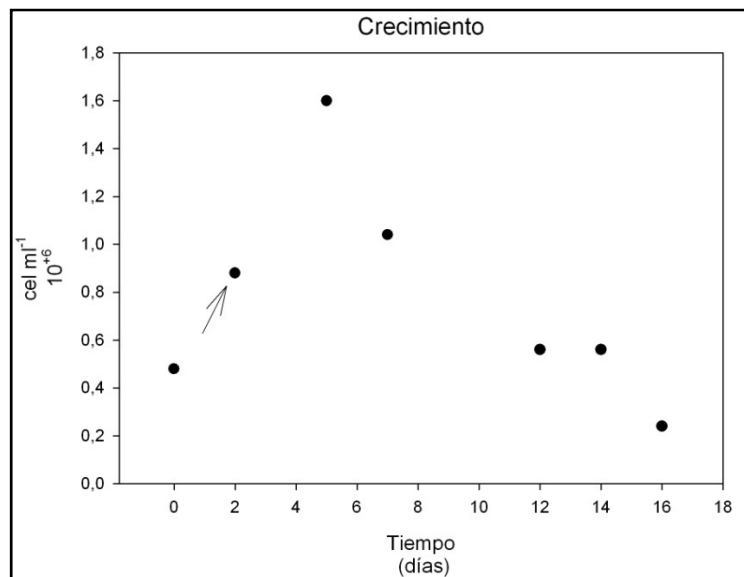


Figura 31: crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* con Fe^{2+} (aerobiosis) y con S^0 (anaerobiosis) como sustrato. La flecha indica el inicio de la etapa anaeróbica.

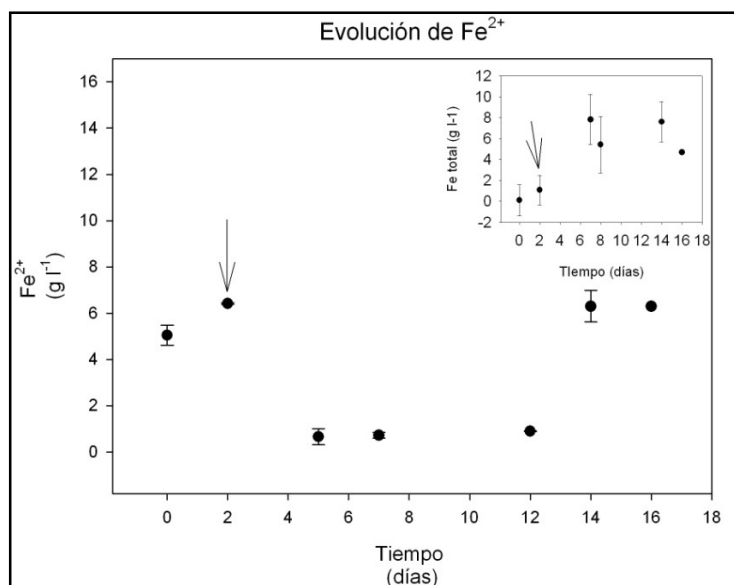


Figura 32: Evolución de Fe²⁺ y Fe total durante el cultivo de *Acidithiobacillus ferrooxidans*. La flecha indica inicio de la etapa anaeróbica.

En función de lo observado y teniendo en cuenta la ecuación 24, se confirmó que *Acidithiobacillus ferrooxidans* es capaz de acoplar el crecimiento a la utilización de Fe³⁺ como aceptor final.

Como resultado de esta experiencia se pudo evaluar el sistema de cultivo diseñado, considerando su funcionamiento como satisfactorio para los objetivos planteados.

Como se ve en la figura 31, el valor máximo de biomasa alcanzado en estas condiciones es de $1,6 \cdot 10^{+06}$ cel ml⁻¹; valor un orden de magnitud menor comparado con la biomasa producida con S⁰ como sustrato y O₂ como aceptor final.

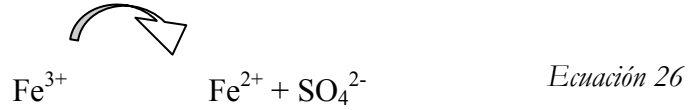
El menor rendimiento en biomasa cuando *Acidithiobacillus ferrooxidans* crece en estas con S⁰ como sustrato y Fe²⁺ como aceptor final, comparado con el promedio obtenido en condiciones aeróbicas (S⁰- O₂) fue reportado por Pronk, J. T. et al., 1992. Los autores de este trabajo coinciden con el modelo presentado anteriormente por Pronk, J. T. et al., 1991, donde la enzima implicada en la reducción de Fe³⁺ acepta electrones en un potencial menor que la oxidorreductasa, resultando en menor eficiencia energética para el crecimiento.

De la misma manera, para los sistemas estudiados en la presente tesis:

$$Y_{x/s} \text{ aerobiosis } S^0 \text{ sustrato } O_2 \text{ aceptor} = 5,96 \cdot 10^{+9} \text{ cel ml}^{-1} (\text{Eq l}^{-1}_{s_0})^{-1}$$

$$Y_{x/s} \text{ en anaerobiosis } S^0 \text{ sustrato y } Fe^{3+} \text{ aceptor} = 4,49 \cdot 10^{+7} \text{ cel ml}^{-1} (\text{Eq l}^{-1}_{s_0})^{-1}$$

No se observó producción neta de compuestos reductores durante toda la cinética (datos no incluidos). Este hecho se atribuye a la reacción química de reducción del Fe^{3+} en solución, según:



El pH final alcanzado también fue bajo (equivalente a 1,2; gráfico interno figura 33), sumando este factor a la estabilidad de los reductores, según fue discutido anteriormente para *Acidithiobacillus thiooxidans*.

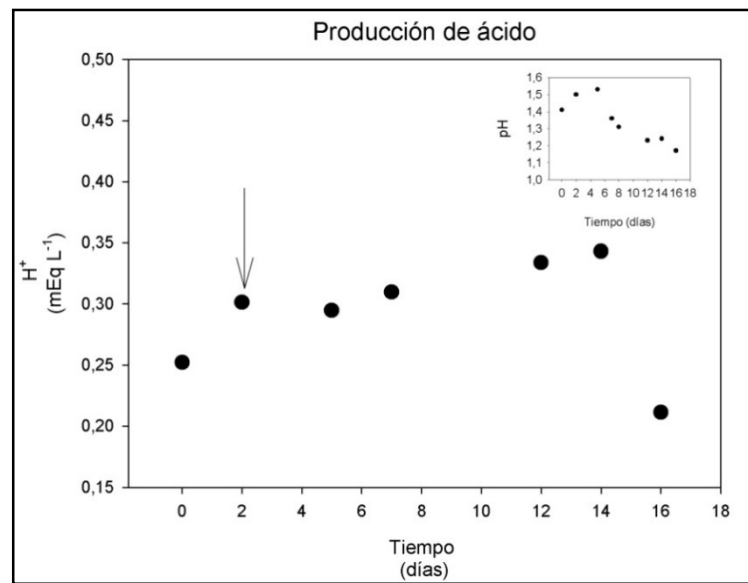


Figura 33: Producción de ácido y variación del pH (gráfico interior) durante el cultivo de *Acidithiobacillus ferrooxidans* con $\text{Fe}^{2+}/\text{S}^0$ como sustrato. La flecha indica el inicio de la etapa anaeróbica.

II-uranio(VI) como aceptor final y S⁰ como sustrato

En la figura 34 se presenta el perfil de crecimiento obtenido para *Acidithiobacillus ferrooxidans* en anaerobiosis con S⁰ como sustrato y uranio(VI) como aceptor final.

A diferencia de lo observado con hierro(III) y otros metales como cromo(VI) (Quintana, M. et al., 2001) como aceptor final en la cadena respiratoria, se observó aumento en el crecimiento celular en la etapa anaeróbica (figura 34).

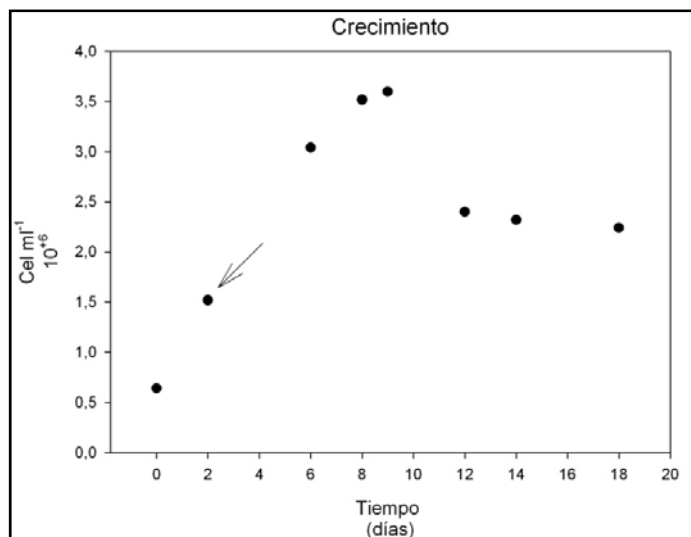


Figura 34: Crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* con U(VI)/S⁰. La flecha indica el inicio de la etapa anaeróbica.

Como puede observarse en la figura 35, alrededor de un 20% de la masa de uranio(VI) inicialmente presente en solución, fue consumida durante el crecimiento en anaerobiosis.

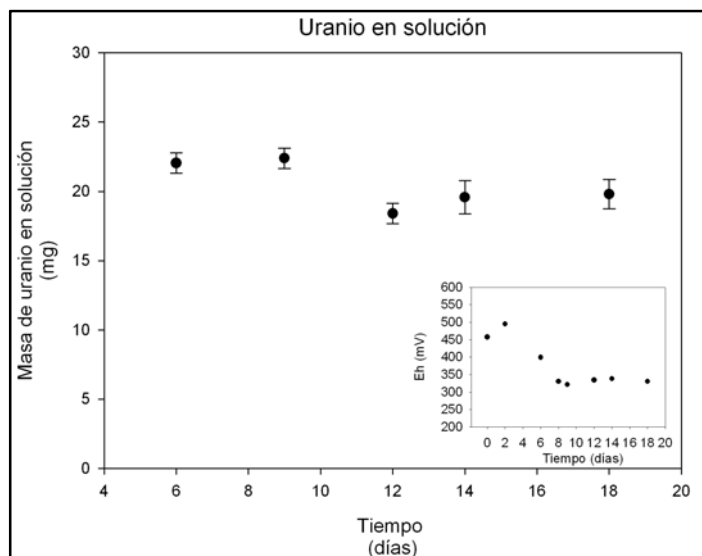


Figura 35: Masa de uranio en solución durante el crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en anaerobiosis.

A diferencia de lo observado para *Acidithiobacillus thiooxidans* en aerobiosis, el uranio no fue re-oxidado (y consecuentemente re-solubilizado) en estos sistemas como consecuencia de la acidez alcanzada (figura 36) posiblemente por formación de un compuesto estable, insoluble, como UO_2 .

Esta particularidad encontrada para la reducción en anaerobiosis, presenta la ventaja de permitir separar física y definitivamente al uranio de la fase líquida.

La reducción se vería favorecida además, por un bajo potencial redox, E_{H^+} . Según se observa en el gráfico interno de la figura 35, rápidamente el cultivo muestra una disminución de potencial, alcanzando valores alrededor de 300 mV.

Sin embargo, estos valores de potencial son mucho mayores que el potencial teórico de reducción mencionado con anterioridad (figura 1). Esta observación fue discutida con anterioridad por Kalin, M., et al.: los potenciales observados en procesos naturales biocatalizados para la reducción del par uranio(VI)- uranio(IV) son mayores (más positivos) que los teóricos calculados en un diagrama E_{H^+} -pH.

La producción de ácido y de sulfatos aumentó proporcionalmente al crecimiento (figuras 36 y 37).

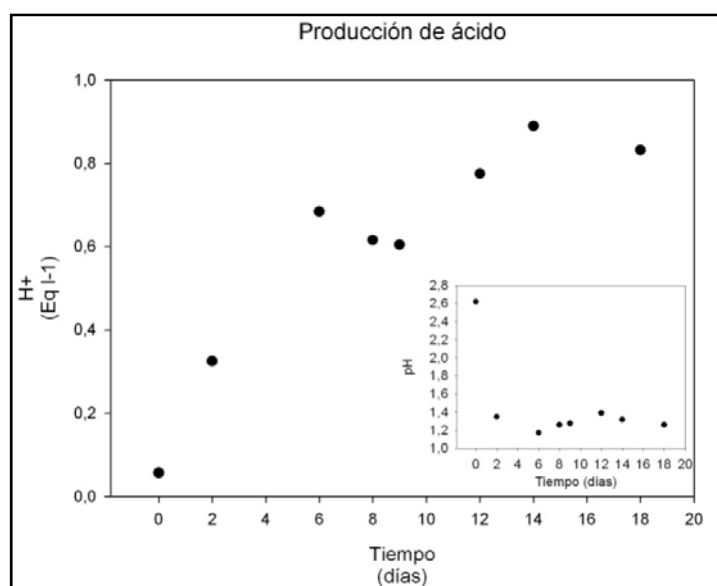


Figura 36: Producción de ácido y evolución del pH para *Acidithiobacillus ferrooxidans* en anaerobiosis.

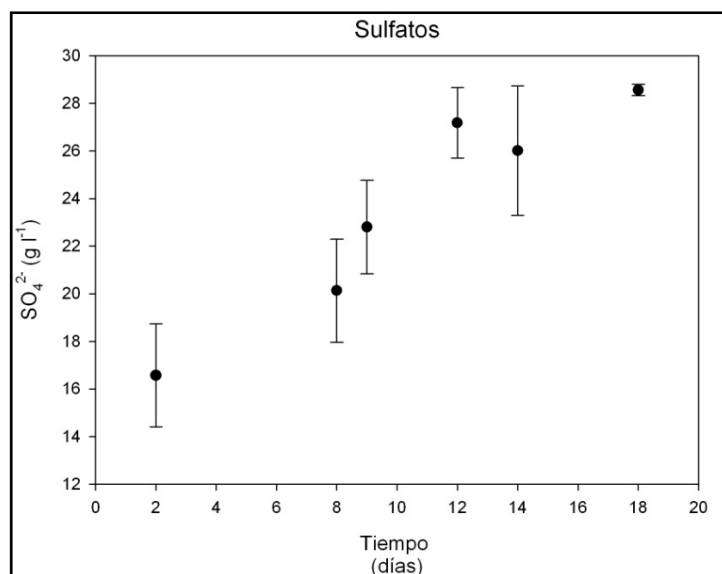


Figura 37: sulfatos producidos durante el crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en anaerobiosis

Todas estas observaciones indican que se cumple lo hipotetizado en la ecuación 4:

Acidithiobacillus ferrooxidans es capaz de utilizar uranio(VI) como aceptor final en la cadena respiratoria y acoplar el crecimiento.

Este proceso sería descrito por la ecuación:



Se calculó el rendimiento para *Acidithiobacillus ferrooxidans* en anaerobiosis con S⁰ como sustrato y uranio(VI) como aceptor final:

$$Y_{X/s} \text{ en anaerobiosis } S^0 \text{ sustrato y U(VI) aceptor} = 1,62 \cdot 10^{+7} \text{ cel ml}^{-1} (\text{Eq l}^{-1} s_0)^{-1}$$

Este valor resultó menor⁵ que para la condición con Fe³⁺ como aceptor⁶, con lo que puede suponerse que la observación realizada por Pronk, J. T. et al., 1992, es también aplicable para el caso en que el uranio sea el aceptor final:

⁵ Si bien la biomasa producida, en el caso de cultivo con uranio(VI) como aceptor, es mayor que para el caso con hierro(III), el consumo de sustrato S⁰ con uranio(VI) supera considerablemente al consumo con hierro(III).

⁶ Ver página 75.

Teniendo en cuenta que la cadena de transporte de electrones (por la cuál la energía derivada de oxidaciones biológicas se utiliza para producir un compuesto de alta energía como el ATP) es la resultante de la suma de reacciones individuales de menor a mayor potencial redox, la eficiencia energética de la oxidación de un sustrato disminuye conforme sea menor el potencial redox del aceptor final:

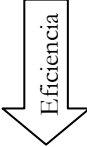
			<i>Y_{x/s} experimental</i> <i>cel. ml⁻¹ (Eq l⁻¹ s₀)⁻¹</i>
	O ² / H ₂ O	E= 0,815 V	5,96. 10 ⁺⁹
	Fe ³⁺ / Fe ²⁺	E= 0,771 V	4,49 10 ⁺⁷
	UO ₂ ²⁺ / U ⁴⁺	E= 0,334 V	1,62.10 ⁺⁷

Figura 38: potenciales redox (E) para los pares estudiados como aceptores finales en la cadena de transporte de electrones bacteriana.

En consecuencia, los rendimientos celulares obtenidos son menores. En la figura 38 se resume este concepto.

Conclusiones

1- Se estudió la resistencia a uranio de *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Se logró obtener cepas adaptadas a 300 mg l⁻¹ para *Acidithiobacillus thiooxidans* y se estudió el crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* hasta 100 mg l⁻¹ para un primer subcultivo con metal. En función de la bibliografía consultada, esta sería la primera vez que se reportan concentraciones de este rango en las cuales ambas especies son cultivadas en laboratorio (Tuovinen, O. et al, 1974).

2- Se estudió la posibilidad de existencia de reducción de uranio(VI) mediada por reductores producto del metabolismo oxidativo de *Acidithiobacillus*.

Los resultados obtenidos evidenciaron la capacidad de los intermediarios en el metabolismo del azufre de reducir uranio(VI) en condiciones *aeróbicas* controladas (pH 4). Hasta el momento no se accedió a bibliografía que reporte una interacción de este estilo. La mayor parte está relegada al estudio de las interacciones en *anaerobiosis* con bacterias sulfato- reductoras (¹ Lovley, D. et al, 1991).

3- Se describió el uso de uranio(VI) como aceptor final alternativo de la cadena respiratoria para *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Acidithiobacillus ferrooxidans fue capaz de utilizar uranio(VI) como aceptor final. A diferencia de lo observado con cromo(VI) (Quintana, M. et al., 2001) la utilización de uranio(VI) como aceptor final estuvo ligada al crecimiento celular. Hasta el momento, los trabajos encontrados relacionando *Acidithiobacillus ferrooxidans* con uranio, se basan en la utilización de *uranio(IV)* como *sustrato* (^{1,2} DiSpirito, A. et al., 1982).

Expectativas de desarrollo a futuro

A partir de lo caracterizado en el presente trabajo, resulta interesante la ampliación de la investigación básica en:

- ✓ La reducción de uranio(VI) en aerobiosis mediada por *Acidithiobacillus thiooxidans*
- ✓ La utilización de uranio(VI) como aceptor final en la cadena respiratoria de *Acidithiobacillus ferrooxidans*,

a fin de aplicar los conocimientos a la dinámica de ecosistemas contaminados donde *Acidithiobacillus* sea una de las especies presentes en el consorcio bacteriano; y a la planificación de posibles procesos de remediación con cepas de colección o a partir de aislamientos del sitio contaminado.

Dentro de la investigación posterior a la realizada en este periodo doctoral, se consideran primordiales:

- ✓ El estudio de condiciones que favorezcan la separación física completa del uranio en solución
- ✓ Identificación del compuesto de uranio que precipita o se separa, tanto en la reducción indirecta (en aerobiosis) como en la directa (anaerobiosis).

Los resultados hasta aquí obtenidos, hacen de *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Acidithiobacillus ferrooxidans* microorganismos a considerar en futuros procesos de remediación, teniendo en cuenta las ventajas operativas que representan:

- ✓ Organismos no patógenos
- ✓ Fácilmente cultivables
- ✓ No requiere manejo en condiciones extremas de esterilidad, dado el alto nivel de acidez alcanzado en los cultivos. Sólo requeriría esterilización y leve cuidado en el manejo, en caso que se trabaje con *Acidithiobacillus ferrooxidans*.
- ✓ Capaces de crecer en medios de cultivo mínimos, con bajas cantidades de nutrientes, que representan insumos químicos en la industria.
- ✓ Presentes normalmente en sitios con problemas de contaminación por metales y drenajes ácidos mineros (Haferburg, G. et al., 2007).

Parte II

*Biosorción de uranio(VI)
mediada por especies
fúngicas resistentes*

Introducción

Una célula ofrece numerosos mecanismos de interacción fisicoquímica con componentes presentes en el ambiente circundante (Tsezos, M., 2009):

- ✓ Como resultado de su metabolismo: *bioacumulación, biodegradación, biolixiviación, biotransformación, bioprecipitación*
- ✓ Como resultado de interacciones fisicoquímicas en la superficie celular: *biotransformación, biosorción.*

El proceso de *bioacumulación*, involucra la internalización por transporte activo o pasivo y acumulación intracelular de moléculas.

El fenómeno de *biodegradación* consiste en la utilización de compuestos orgánicos de alto peso molecular como co- sustrato o sustratos alternativos para el crecimiento celular. Como resultado se producen compuestos orgánicos de menor peso molecular.

La *biolixiviación*, es el proceso por el cual se solubilizan metales a partir de sulfuros, según ya fue descrito en la parte 1 del presente trabajo.

Un proceso de *biotransformación* involucra enzimas intra o extracelulares para el agregado o eliminación de grupos funcionales (metilaciones, hidroxilaciones, etc.) o procesos de reducción- oxidación.

Diversos microorganismos producen especies inorgánicas como resultado de su metabolismo (HCO_3^- , PO_4^{2-}) los cuáles al interactuar con moléculas del medio, forman especies insolubles. Este fenómeno se denomina *bioprecipitación*.

El proceso denominado biosorción

La *biosorción* se define como “*la propiedad de biomoléculas o diferentes tipos de biomasa de unir y concentrar selectivamente iones u otras moléculas de soluciones acuosas*” (Volesky, B., 2007) poco a muy diluidas.

La principal característica de este fenómeno, es que es un proceso de concentración, pasivo y basado principalmente en la afinidad entre el biosorbente y el sorbato, como resultado de interacciones fisicoquímicas con componentes celulares y sus ligandos expuestos.

El proceso de biosorción es, además, generalmente mucho mas rápido que los procesos de captación metabólicamente acoplados.

En la figura 39 se muestran esquemas de los componentes de pared y membrana celular de diversos organismos. El fenómeno de biosorción se da principalmente en este sector para una célula entera.

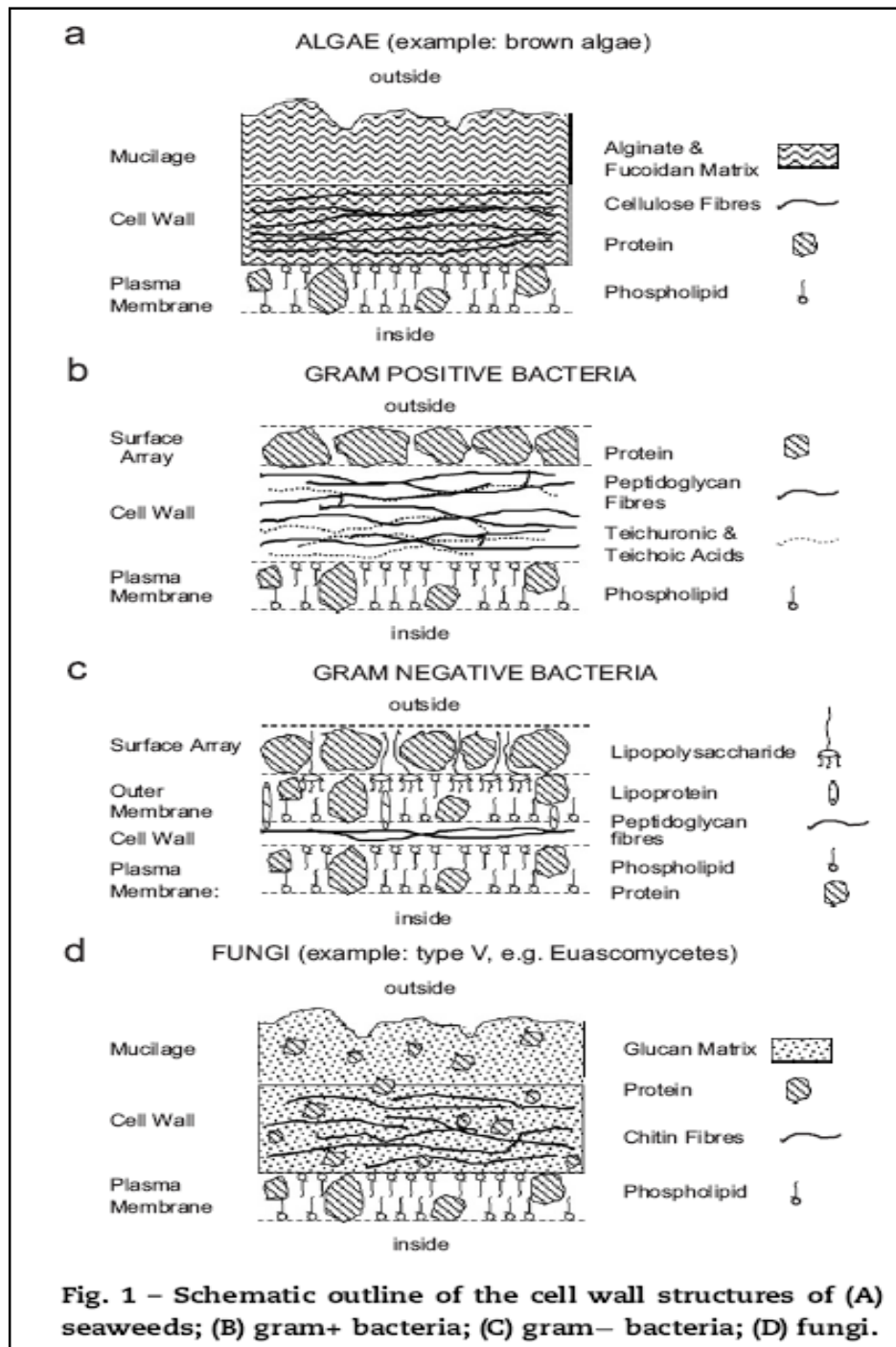


Figura 39: Esquema de los componentes de pared/ membrana celular de organismos utilizados comúnmente en biosorción. (Tomado de Volesky, B., 2007).

La diferencia estructural entre los organismos utilizados (o potencialmente utilizables) en biosorción, ofrece una amplia lista de grupos funcionales involucrados en el proceso. En la tabla 14 se nombran algunos de los grupos más relevantes, con sus respectivas constantes de disociación ácido- base (pK_a).

List of ligand groups and their pK_s (Hunt, 1986; Segel, 1976)

Ligand group	Location	pK_s
Carboxyl	Protein c-terminal	3.5–4
Carboxyl	Beta aspartic	4–5
Carboxyl	Gamma glutamic	4–5
Carboxyl	Uronic acid	3–4.4
Carboxyl	<i>N</i> -Acetylneuraminic	2.6
Carboxyl	Lactate	3.8
Sulphonic acid	Cysteic acid	1.3
Phosphate	Serine as ester	6.8, 2.0
Phosphate	Polyol mono ester	0.9–2.1
Phosphate	Polysaccharide diester	1.5, 6.0
Amino	Cytidine (pyrimidine)	4.11
Amino	Adenosine (purine)	3.45
Imidazole	Histidine	6–7
Hydroxyl	Tyrosine-phenolic	9.5–10.5
Hydroxyl	Saccharide-alcoholic	12.0–13.0
Sulphide	Cysteine	8.3
Amino	Protein N-terminal	7.5–8.0
Amino	Lysine	8.9, 10.5
Imino	Peptide	13

Tabla 14: grupos funcionales involucrados en la biosorción.
(Tomado de Meinrath, G. et al, 2005).

A partir de la interacción con los grupos funcionales de la superficie celular, los mecanismos que pueden contribuir a la biosorción de metales son (Schiewer, S. et al., 1995; Tsezos, M., 2009):

- ✓ intercambio iónico
- ✓ formación de complejos
- ✓ quelación
- ✓ atracción electrostática
- ✓ microprecipitación
- ✓ reducción- oxidación

En la figura 40, se resumen estos procesos.

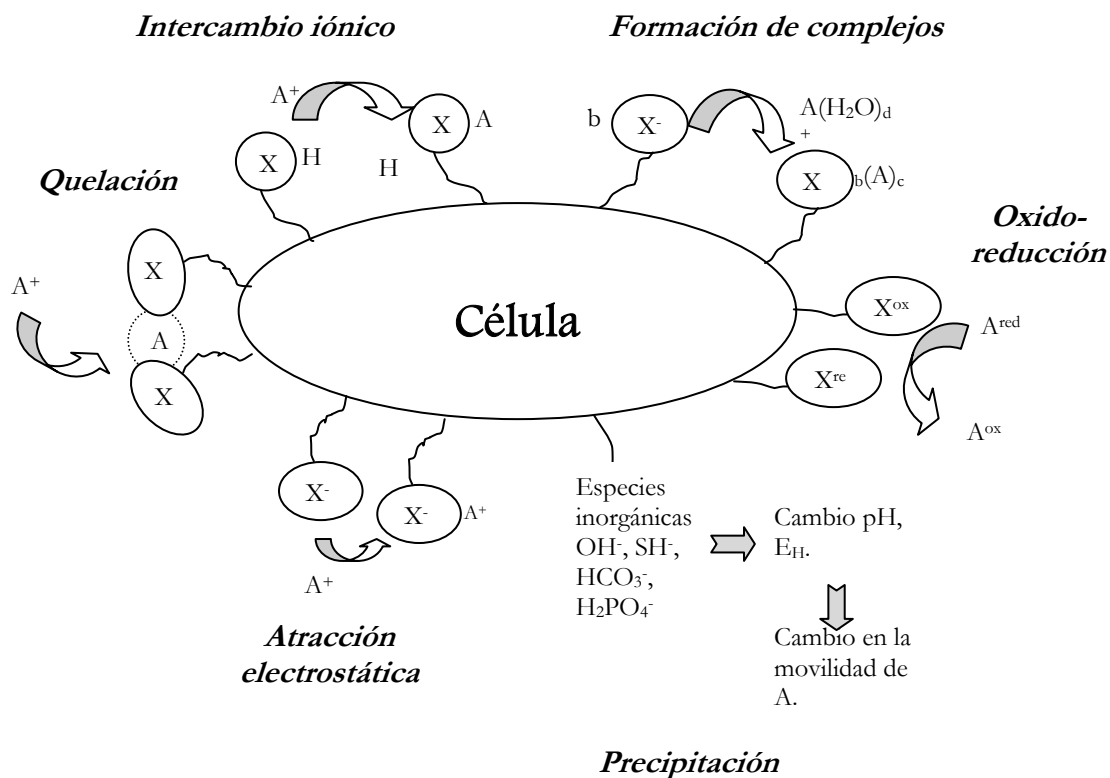


Figura 40: Resumen de los fenómenos fisicoquímicos que intervienen en el proceso de biosorción.

El proceso global de biosorción depende fuertemente de las condiciones del medio. Teniendo en cuenta la identidad de los grupos funcionales (ácidos o bases débiles), cambios en el valor de pH del medio se traducen en cambios de carga, producto de desplazamiento de equilibrios ácido-base. Asimismo, la presencia de contraiones y otras moléculas con igual o mayor afinidad aporta a la competencia por la interacción con los mismos.

Las características o parámetros que definen un buen biomaterial para utilizar en biosorción, son:

- ✓ Máxima capacidad de carga
- ✓ Alta velocidad a la que ocurre el proceso (cinética del proceso)
- ✓ Alta afinidad
- ✓ Especificidad

Estado del arte

El fenómeno de biosorción ha tomado gran importancia, como alternativa sumamente económica de recuperación y remediación de metales u otros compuestos, tanto tóxicos como valiosos industrialmente (Volesky, B., 2007).

En la última década se han estudiado y caracterizado numerosos organismos (Bektas, S. et al 2003; Veglio, F. et al 2000; Jalali, R. et al, 2006; Khalid, A.M. et al, 2007; McHale, A.P. et al, 1995; Volesky, B. et al, 1999; Meinrath, G. et al, 2005) aplicados a procesos de

biorremediación por biosorción, altamente competitivos con procesos fisicoquímicos históricamente utilizados industrialmente (Volesky, B., 2007).

Aplicado a procesos de tratamiento de efluentes industriales, por ejemplo, es comparable con la tecnología de intercambio iónico (Volesky, B., 2007):

- ✓ Se utiliza el mismo equipamiento
- ✓ Los biosorbentes pueden llegar a ser 10 veces más baratos
- ✓ Pueden reutilizarse
- ✓ Poseen similares rendimientos
- ✓ La base técnica de operación es la misma: en batch o en columnas a flujo continuo
En general, la biomasa es pre- tratada con soluciones que involucren contraiones que ocupen los grupos funcionales expuestos para el intercambio: Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , H^+ . El pre- tratamiento con ácido es muy utilizado, el cuál permite seguimiento del proceso mediante titulación de H^+ liberados al medio o medida de pH (Volesky, B., 2007; Bengtsson, L. et al., 1995; Yang, J. et al., 1999). Para la elución del metal retenido y la regeneración de los sitios de intercambio se utilizan soluciones de HCl, NaOH, Na_2CO_3 , NaHCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, entre otros (Akhtar, K.; et al., 2007).

En función de lo mencionado, la mayoría de los procesos de biosorción son modelados a partir del fenómeno de intercambio iónico, dado que el mismo se encuentra ampliamente caracterizado (op. cit.).

Ventajas de la biosorción

Las principales ventajas que atraen a elegir este método son la abundancia, el bajo costo y la alta especificidad de los biomateriales (productos de desecho de industrias y procesos biológicos, tal como algas marinas, restos de caparazón de moluscos, algas) sumando la posibilidad de recuperación del adsorbente de la solución y reutilización.

Para procesos de biorremediación, la biomasa puede o bien reutilizarse desorbiendo el contaminante o descartarse como residuo peligroso.

En esta segunda parte del presente trabajo, se presenta el estudio de la capacidad de adsorción de uranio de dos especies fúngicas, *Acremonium* y *Aphanocladium*, aisladas de un medio contaminado con este metal.

Se evaluará la posibilidad de utilizarlas como biosorbentes, en función de:

- ✓ rendimientos de biomasa obtenidos en cultivos
- ✓ capacidad de carga de metal

como primera aproximación para un proceso de biorremediación de efluentes contaminados con uranio.

Según se mencionó anteriormente, en la actualidad la mayoría de los procesos de biorremediación de sitios contaminados con uranio utilizan bacterias heterótrofas y anaerobias (Sulfato reductoras) siendo los costos de materiales y operación, elevados. La biosorción ofrecería una alternativa más económica a esta problemática.

Aislamiento y caracterización de especies fúngicas resistentes a altas concentraciones de uranio(VI)

Dos especies fúngicas fueron aisladas a partir de un cultivo de *Acidithiobacillus thiooxidans* a pH 1.5 y 300 mg l⁻¹ uranio(VI). En estas condiciones, la única fuente de carbono para el desarrollo fúngico, fue la biomasa bacteriana (formada a partir de la fijación de CO₂). La fuente de carbono aportada por la biomasa bacteriana, se calculó según:

Sabiendo que para *Acidithiobacillus thiooxidans*: $2 \cdot 10^{+8}$ cel ml⁻¹ \approx 0,023 g l⁻¹

y el recuento bacteriano final del cultivo de origen fue $7,7 \cdot 10^{+7}$ cel ml⁻¹, la biomasa final obtenida resultó en:

$$7,7 \cdot 10^{+7} * 0,023 * (2 \cdot 10^{+8})^{-1} = \mathbf{8,8 \cdot 10^{-3} \text{ g l}^{-1}}$$

Teniendo en cuenta la biomasa estándar: CH_{1,8}O_{0,5}N_{0,2} 25.8 g/cmol, el equivalente en cmol obtenido resultó:

$$8,8 \cdot 10^{-3} * (25.8)^{-1} = \mathbf{3,432 \cdot 10^{-4} \text{ cmol l}^{-1}}$$

Sabiendo que 1 cmol de glucosa es igual a 30 g, el equivalente de biomasa en cmol de glucosa es:

$$3,432 \cdot 10^{-4} * 30 = \mathbf{0,010 \text{ gl}^{-1}}$$

equivalente a 10 mg l⁻¹ de glucosa.

Asimismo, se observó a simple vista que la biomasa fúngica adquirió una coloración verdosa al desarrollarse en los cultivos de origen, con lo cuál se sospechó acerca de su capacidad de acumulación de uranio.

Resultó llamativa, también, la capacidad de desarrollo a tan elevada concentración de uranio y a un valor de pH extremadamente ácido.

Teniendo en cuenta:

- ✓ los antecedentes en biosorción (mencionados en la introducción a esta parte),
- ✓ sabiendo que las especies fúngicas son muy utilizadas en dichos procesos y
- ✓ que las especies encontradas en los cultivos de *Acidithiobacillus thiooxidans* presentaron inicialmente una gran capacidad de desarrollo en condiciones extremas,

resultó interesante aislar e identificar las especies desarrolladas en el cultivo mencionado y estudiar la capacidad de adsorción de uranio, como potenciales organismos utilizables en procesos de remediación por biosorción

Metodología de aislamiento

El aislamiento fue realizado en el Laboratorio de Micología Molecular, Departamento de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes, por el Dr. Guillermo Pardo. El micelio fue recuperado desde el cultivo líquido de origen y cultivado en PDA. Luego de 5 días de cultivo se visualizaron hifas con 2 diferentes morfologías. Cada una fue repicada por separado, cortando cuadrados de 5mm² desde los márgenes de cada colonia. Una vez desarrollado cada cultivo, se conservaron a 4°C hasta su caracterización.

Caracterización

La caracterización fue realizada por la Prof. Alicia Godeas, Laboratorio de Microbiología del Suelo, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Universidad Nacional de Buenos Aires.

Según la morfología observada al microscopio, ambos micelios se identificaron como **ascomicetes mitospóricos** clasificados como (Domsch, K., Gams, W. and Anderson, T., 1980- Gams, W. et al, 1998):

Acremonium sp. GAMS

Aphanocladium sp. GAMS

La reproducción es asexual (mitótica) mediante la producción de conidios que generan mitosporas.

El aspecto morfológico macroscópico se observa en la figura 41.



Figura 41: Colonias de *Aphanocladium* sp. (izquierda) y *Acremonium* sp. (derecha)

En la figura 42 se observan micrografías de ambas especies.

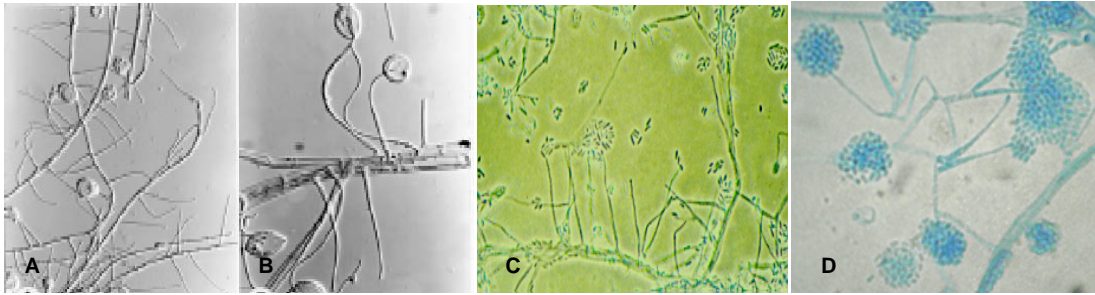


Figura 42: A-B. *Aphanocladium macrosporum* (tomado de (Chen, J.L. et al., 1999). C-D. *Acremonium sp.* (University of Adelaide, 2009 y Mould Facts, 2009 respectivamente).

Dada la alta concentración de uranio(VI) y las condiciones extremadamente acidas a la que fue observada capacidad de desarrollo, resultó de interés el estudio de la estequiometría de crecimiento, el desarrollo micelar en concentraciones crecientes de uranio y la caracterización de la capacidad de acumulación/ adsorción de uranio de la biomasa viva y seca de ambas especies (secciones siguientes) **a fin de proponer sistemas útiles para procesos de biorremediación mediados con estos organismos.**

Cultivo en frascos agitados

Objetivo

Caracterizar el crecimiento de *Acremonium sp.* y *Aphanocladium sp.* en frascos agitados

Materiales y Métodos

Cultivo: *Acremonium sp.* y *Aphanocladium sp.* fueron cultivados en 50 ml de medio P5 (materiales y métodos generales), en frascos de vidrio de 125 ml, en shaker orbital a 200 rpm y 30° C. Se prepararon 14 sistemas en total, cada uno representando un punto de la cinética, realizado por duplicado. El inóculo se preparó a partir de cultivos en fase exponencial tardía, filtrados por filtro Whatman 41 y membrana 0.22 μm , resuspendido en cantidad necesaria de medio de cultivo fresco. Cada sistema se inoculó con $0.5 \cdot 10^{+07}$ conidioforos, cuantificados por recuento en cámara de Thoma.

Cinética: A determinado tiempo cada sistema y su réplica, se filtraron por filtro tipo Whatman 41 y membrana 0.45 μm en vacío. Ambos se conservaron en desecador hasta peso constante. El crecimiento se evaluó por pesada de la biomasa retenida en filtro y membrana 0.45 μm . Se midió pH con electrodo combinado de vidrio (Phoenix).

Resultados y discusión

A continuación se presenta el gráfico para el crecimiento de *Acremonium* y *Aphanocladium* en frascos (Figura 43):

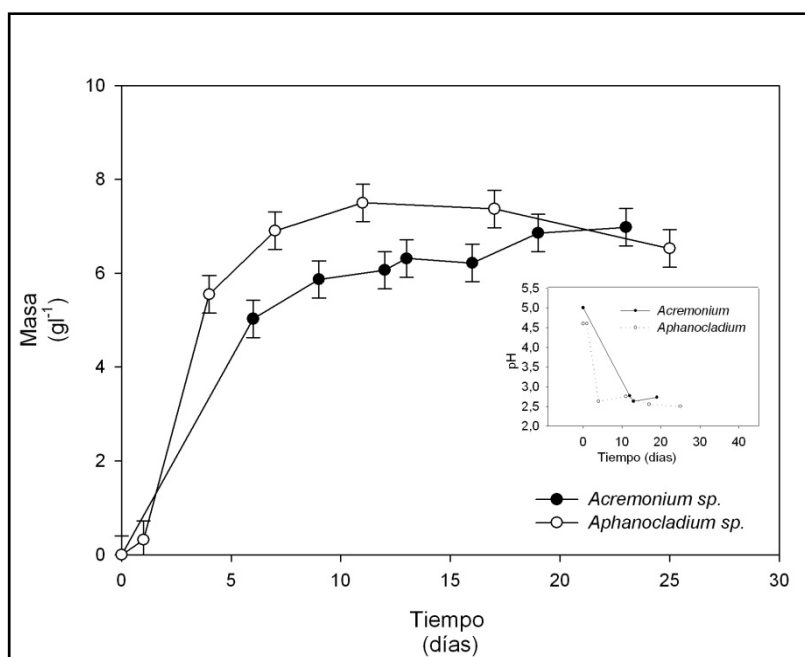


Figura 43: crecimiento de *Acremonium* y *Aphanocladium* en frascos agitados. Inbax: variación del pH.

Como se observa en la figura 43, la fase exponencial tardía se alcanza aproximadamente a los 6 días.

La velocidad de crecimiento calculada en estas condiciones es:

<i>Acremonium</i>	0.12 g l ⁻¹ día ⁻¹
<i>Aphanocladium</i>	0.44 g l ⁻¹ día ⁻¹

La biomasa final alcanzada fue:

<i>Acremonium</i>	6.98 g l ⁻¹
<i>Aphanocladium</i>	7.50 g l ⁻¹

Se observó también un drástico descenso del pH, causado probablemente por la hidrólisis del catión NH₄⁺, agregado como fuente de nitrógeno. Dado que los sistemas no se encuentran limitados por oxígeno (en ese caso la curva de crecimiento sería lineal (Doran, P.), el descenso abrupto del pH del cultivo podría inhibir el crecimiento, afectando el rendimiento de biomasa producida.

A partir de esta observación, los cultivos en biorreactor se realizarán a pH controlado.

Estequiometría de crecimiento: Cultivo en tanque agitado

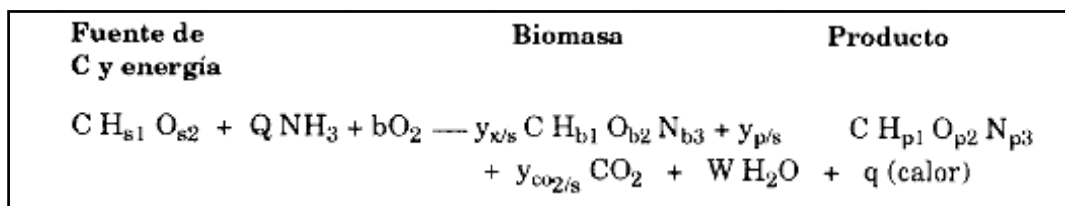
Cuando se cultivan microorganismos en un medio de cultivo apropiado existen dos aspectos que determinan y caracterizan su crecimiento:

- ✓ Estequiométrico: relación entre la biomasa final y productos obtenidos con la composición del medio de cultivo.
- ✓ Cinético: velocidad a la que se lleva a cabo el proceso.

Ambos pueden calcularse a partir de la medida de determinados parámetros del cultivo, a saber:

- ✓ Concentración de sustrato
- ✓ Generación de producto
- ✓ Oxígeno consumido
- ✓ Dióxido de carbono producido
- ✓ Biomasa producida

Los **cálculos estequiométricos** son referidos siempre a los rendimientos obtenidos con respecto al sustrato limitante (en general, la fuente de carbono y energía) según la ecuación general:



Ecuación 28

donde todos los coeficientes estequiométricos se expresan con respecto a 1 carbono- mol de la fuente de carbono y energía (Doran, 1995; Pirt, 1975)

Así se definen los distintos rendimientos en función al sustrato:

Biomasa	$y^{x/s} = dx / ds = \Delta x / \Delta s$
Producto	$y^{P/s} = dP / ds$
Dióxido de carbono	$y^{CO_2/s} = dCO_2 / ds$

Donde:

- X= biomasa
- S= sustrato o fuente de carbono y energía
- P= producto

De la ecuación estequiométrica de crecimiento, puede establecerse el balance de materia (expresado siempre en carbono mol) para el carbono, suponiendo cumplimiento de la ley de conservación de materia (Erikson, L.E. et al., 1978).

$$y^x/s + y^{CO_2}/s + y^P/s = 1$$

Ecuación 29
Balance de carbonos

También es posible realizar un balance de energía (op. cit.), considerando los electrones transferidos desde la fuente de carbono y energía. Para esto se define el *grado de reducción* de un compuesto, γ , como el número de electrones transferidos al oxígeno en la reacción de oxidación del mismo a CO_2 y H_2O .

Considerando, entonces, que se cumple el principio de conservación de materia, los electrones puestos en juego por los sustratos deben ir necesariamente a los productos, es decir, los electrones disponibles a la izquierda y a la derecha en la Ecuación 30 deben ser iguales:

$$\gamma_s - 4b = y_{x/s} \gamma_x + y_{p/s} \gamma_p \quad \text{Ecuación 30}$$

Reordenando la Ecuación 32, se obtiene la ecuación de balance de energía:

$$\frac{y_{x/s} \gamma_x}{\gamma_s} + \frac{y_{p/s} \gamma_p}{\gamma_s} + \frac{4b}{\gamma_s} = 1 \quad \text{Ecuación 31}$$

Equivalente a:

$$\eta + \xi + \varepsilon = 1 \quad \text{Ecuación 32}$$

Donde η , ξ y ε representan la fracción de energía transferida a la biomasa, el producto y el oxígeno respectivamente.

El cálculo de estos parámetros es de importancia dado que establece la factibilidad de un proceso industrial y es una herramienta útil para la optimización del mismo. Sin embargo, éstos no informan acerca de la velocidad con la que transcurre el proceso. Así, se establecen también **cálculos cinéticos**.

Se definen velocidades volumétricas de producción de biomasa, producto y dióxido de carbono, y de consumo de oxígeno:

$$\begin{aligned} r_x &= dx/dt \\ r_p &= dP/dt \\ r_{CO_2} &= dCO_2/dt \\ r_{O_2} &= -dO_2/dt \end{aligned}$$

en $Cmol. L. h^{-1}$ o $mol. L. h^{-1}$.

Es posible establecer relaciones entre los parámetros cinéticos y estequiométricos. Por ejemplo, para la biomasa, reordenando se obtiene:

$$y^{x/s} = dx/ds * dt/dt = r_x/r_s$$

También pueden establecerse velocidades específicas, relacionadas con la biomasa producida. Entonces:

$$\begin{aligned} r_x/x &= \mu \\ r_s/x &= q_s \\ r_p/x &= q_p \end{aligned}$$

Particularmente para el crecimiento microbiano se cumple que:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \quad \text{Ecuación 33}$$

Donde μ_{max} , es la velocidad específica máxima de crecimiento. En un cultivo tipo batch, como la concentración de sustrato es mucho mayor que la constante de saturación (K_s), el microorganismo crece a una velocidad específica constante igual al valor máximo, μ_{max} :

$$x = x_0 e^{\mu_{max} \cdot t} \quad \text{Ecuación 34}$$

Integrando la ecuación 36:

$$\ln x = \ln x_0 + \mu_{max} t \quad \text{Ecuación 35}$$

Del gráfico $\ln x$ vs t , pueden distinguirse cuatro fases para un cultivo batch:

- 1- Fase lag o de retardo; $\mu=0$
- 2- Fase exponencial; $\mu= \mu_{max}$
- 3- Fase estacionaria; $\mu=0$
- 4- Fase de decaimiento o muerte celular,

Donde la pendiente de la recta para la fase exponencial corresponde a μ_{max} .

El valor de μ_{max} tiene relevancia como valor crítico o límite para otros sistemas de cultivo, como cultivo continuo. Para cultivo en batch establece la velocidad a la que se desarrolla el mismo y, por lo tanto, el tiempo que durará el proceso.

Medida de parámetros fisicoquímicos del cultivo

Los parámetros que se pueden medirse rutinariamente en un cultivo (tanto en frascos agitados como en planta) suelen ser:

- ✓ pH
- ✓ potencial redox (E)
- ✓ oxígeno disuelto (OD)
- ✓ oxígeno gaseoso (en caso de aireación asistida), calculando la velocidad de consumo de oxígeno.
- ✓ dióxido de carbono gaseoso producido, calculando la velocidad de producción de dióxido de carbono.

Para un cultivo en biorreactor o tanque agitado, interesa particularmente conocer los valores de oxígeno gaseoso consumido y dióxido de carbono gaseoso producido, ya que permiten calcular las velocidades de consumo de oxígeno (r_{O_2}) y producción de dióxido de carbono (r_{CO_2}).

Estos valores son útiles para luego obtener relaciones que caracterizan al proceso, tal como rendimientos (como ya se mencionó), velocidades específicas y cociente respiratorio ($CR = r_{CO_2} / r_{O_2}$), entre otros.

Para ello se utilizan sensores ubicados exteriormente del biorreactor. Para la medida de oxígeno pueden usarse sensores galvanométricos o paramagnéticos; para la medida de dióxido de carbono se utiliza un detector de Infra-rojo.

Objetivos

Determinar parámetros estequiométricos y cinéticos que caractericen el crecimiento de *Acremonium* sp y *Aphanocladium* sp.

Establecer la factibilidad de producción a escala industrial.

Materiales y métodos

Cultivo en biorreactor: Se realizaron cultivos batch en biorreactor LH (SET 002, Inceltech, Francia) a 30°C con aireación (0.2 vvm) y agitación (500 rpm) en un volumen de 1.2 litros en medio P5 modificado (materiales y métodos generales, con 5 g l⁻¹ de glucosa. La fuente de nitrógeno fue reemplazada por NH₄OH, también utilizado para regular el pH del cultivo.

Cinética: Se midió pH con electrodo de vidrio (Ingold 625) y se controló automáticamente a un valor 5.5 ± 0.2 con NH₄OH 5M. El oxígeno disuelto (fase líquida) se midió con electrodo polarográfico (Mettler Toledo). Se midió O₂ y CO₂ en fase gaseosa a la salida del biorreactor con un detector de O₂ paramagnético (Serie 1100 Servomex, USA) y un detector infrarrojo de CO₂ (PIR 2000 Horiba, Japón). El consumo de O₂ y producción de CO₂ se calcularon según Cooney, C. et.al. A diferentes tiempos se tomó una muestra de 10 ml, se centrifugó a 10.000 rpm, 4°C por 10 minutos. El pellet recuperado se lavó con agua destilada y se secó a 105°C para determinar biomasa por gravimetría; en el sobrenadante se determinó glucosa por el método de la glucosa oxidasa– peroxidasa (Glicemia, Wiener Argentina).

Inóculo: 50 ml de un cultivo en fase exponencial tardía, filtrado por Whatman 41, en medio P5 (Materiales y Métodos generales).

Resultados y discusión

A continuación se presentan los perfiles de crecimiento obtenidos para ambas especies (Figura 44y 45).

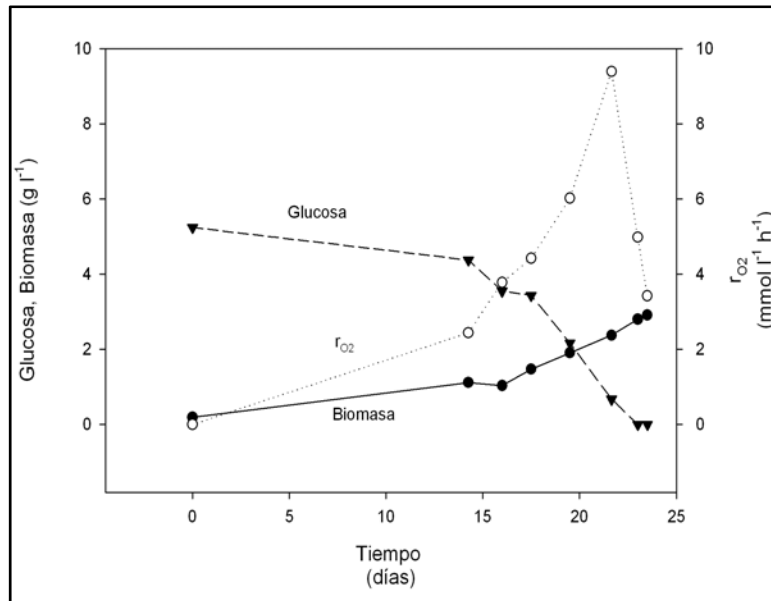


Figura 44: Consumo de sustrato, producción de biomasa y consumo de oxígeno para *Acremonium* sp. (Publicado en Gargarello, R. et.al 2008).

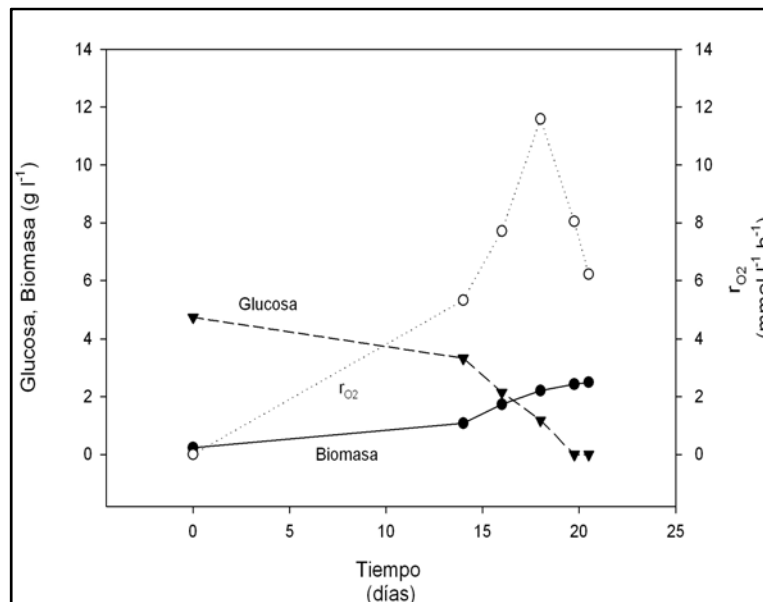


Figura 45: Consumo de sustrato, producción de biomasa y consumo de oxígeno para *Aphanocladium* sp. (Publicado en Gargarello, R. et.al 2008).

A partir de los datos, se calculó la velocidad de crecimiento específica máxima (μ_{\max}) para cada especie, resultando en:

$$Acremonium \quad \mu_{\max}: 0.178 \text{ h}^{-1}$$

$$Aphanocladium \quad \mu_{\max}: 0.172 \text{ h}^{-1}$$

Estos valores de μ_{\max} denotan la factibilidad de un proceso a escala industrial, donde aproximadamente el 18% del cultivo se realiza en 1 hora y el proceso total en 5,5 horas, tiempo suficiente para cumplirlo en una jornada laboral normal.

Obsérvese también que los valores obtenidos están dentro del rango de velocidades específicas de otras especies fúngicas, entre las que se encuentran algunas utilizadas en procesos industriales (Tabla15).

Organismo	Velocidad específica de crecimiento en cultivo sumergido, μ . (h^{-1})	Uso industrial/ ocurrencia
<i>Rhizopus stolonifer</i> (+)	0.135	Ácido fumárico y cortisona
<i>Mucor racemosus</i>	0.102	Etanol (cultivos mixtos)/Tofu ¹
<i>Actinomucor repens</i>	0.181	Fermentación de Tofu ¹
<i>Absidia glauca</i> (+)	0.124	Fertilizantes/ abonos ²
<i>Geotrichum lactis</i>	0.353	Fermentación de vino de palma ³
<i>Aspergillus wentii</i>	0.147	Acido cítrico/Ind. lechera (lactasas) ⁴
<i>Aspergillus niger</i>	0.119	Acido cítrico/ Ind. lechera (lactasas) ⁴
<i>Penicillium chrysogenum</i>	0.164	Penicilina
<i>Neurospora crassa</i>	0.353	Ind. lechera (lactasas) ⁴

Tabla 15: velocidades específicas de crecimiento (μ) de especies fúngicas.

¹Han, B. et al., 2004

²Bertsch, F., 2003

³Dayo-Owoyemi, I. et al, 2008

⁴Reyes-González,G.; et al., 2006

Teniendo en cuenta los valores de μ de otras especies fúngicas utilizadas comúnmente (tabla 15) y los valores obtenidos para *Acremonium* y *Aphanocladium* se establece que:

Es factible el cultivo de Acremonium sp. y Aphanocladium sp. para la obtención de biomasa a escala piloto e industrial

En la tabla 16 se resumen los parámetros estequiométricos obtenidos para cada especie fúngica.

	ΔX (g l ⁻¹)	ΔS (g l ⁻¹)	O ₂ tot (mmole l ⁻¹)	CO ₂ tot (mmole l ⁻¹)	$y_{x/s}$	$y_{CO_2/s}$	b	CB	B _γ
Acr.	2.264	4.745	67.77	73.65	0.555	0.466	0.428	1.020	1.011
Aph.	2.720	5.244	64.14	70.03	0.603	0.401	0.367	1.003	1.000

Tabla 16: parámetros estequiométricos para *Acremonium* (Acr.) y *Aphanocladium* (Aph). Producción de biomasa (ΔX), consumo de glucosa (ΔS), oxígeno consumido (O₂ tot.), dióxido de carbono producido (CO₂ tot), rendimiento de biomasa ($y_{x/s}$), rendimiento de CO₂ ($y_{CO_2/s}$), rendimiento de oxígeno (b), balance de carbonos (CB), balance de grados de reducción (B_γ). (Publicado en Gargarello, R. et al, 2008).

De estos parámetros se deduce que:

Ambas especies poseen un metabolismo típico de respiración de carbohidratos, sin formación de producto distinto a CO₂ (CB= 1 y $y^P/s = 0$; B_γ=1)

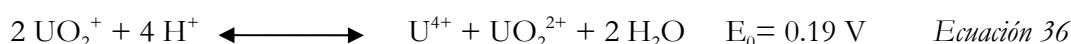
A partir de los valores de ΔS , se modificó la relación de sustrato en el medio de cultivo inicialmente utilizado, P5 (glucosa 20 g l⁻¹, maltosa 5 g l⁻¹), definiendo el medio de cultivo estándar como P5 modificado (glucosa 10 g l⁻¹).

Dada la factibilidad de producción de biomasa se decidió proseguir con el estudio y caracterización de la interacción de ambas especies con uranio(VI).

Crecimiento de *Acremonium sp.* y *Aphanocladium sp.* en concentraciones crecientes de uranio(VI)

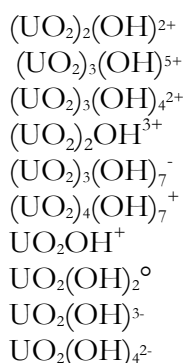
Efecto del pH en la incorporación de uranio(VI)

La química del uranio en solución está gobernada por la formación de iones dioxo (UO_2^{2+}) siendo el estado de oxidación más estable y común el 6+. Su estabilidad en solución acuosa está determinada por:

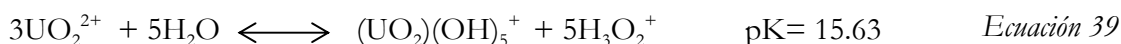
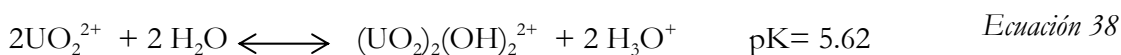


Con lo cual se explica la inestabilidad del uranio con otros estados de oxidación como 3+ y 5+ (Wilkinson, 1980).

En solución acuosa forma especies oligoméricas como resultado de la hidrólisis (Meinrath, G., 1998):

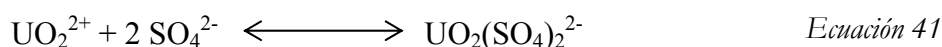


A valores de pH ácidos a neutro, las principales especies en equilibrio son (Baes, C. et al. 1976 en Yang, J. et al., 1999):



En soluciones por encima de 10^{-3} M , donde el uranio(VI) forma especies oligoméricas, la hidrólisis es observada incluso a pH 3, a diferencia de otros actínidos, donde la hidrólisis ocurre a $\text{pH} > 9$.

Estudios espectroscópicos han demostrado que en soluciones acuosas de uranio (UO_2^{2+}) y U^{4+} rápidamente se forman complejos con sulfatos (Wilkinson, 1980; Meinrath, G. 1998):



$$K = 7,1 \cdot 10^{2+} \quad (25^\circ\text{C}; \mu = 2.0)$$

También se ha descrito complejos con citrato y los aniones de otros ácidos orgánicos, tiocianatos, fosfatos, bicarbonato, EDTA y otros agentes quelantes (op. cit).

En ecosistemas naturales, la biodisponibilidad del uranio está gobernada por el valor de pH y la formación de complejos.

Como puede observarse en el diagrama de la figura 46, variaciones de pH dan origen a diferentes especies solubles del uranio.

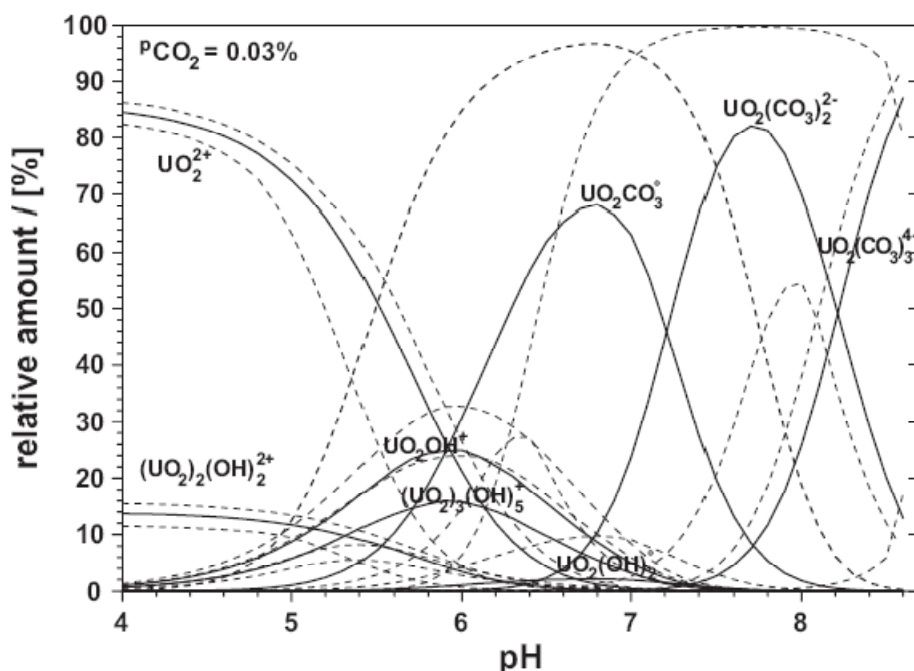


Figura 46: diagrama de distribución de complejos solubles de uranio(VI) según el pH. (Tomado de Kalin, M. et al, 2005)

Elias, D. et al., 2003, comentan la existencia de dos reservorios separados del uranio en sistemas ecológicos: uno soluble y otro insoluble. El límite entre ambos, está determinado por el estado de oxidación del uranio, cuya forma uranio(IV) es insoluble, y por los complejos que forma el uranio(VI) en función del pH y otros componentes del medio. A pH neutro y levemente alcalino, la complejación con aniones fosfato y oxidrilo es termodinámicamente favorable y causa la precipitación de las especies, disminuyendo así el uranio soluble disponible. Asimismo el catión uranilo, forma complejos con oxi-hidróxidos, goetitas [α -FeO(OH)], silicatos, arcillas y pizarras, hecho que favorece su adsorción sobre dichas superficies.

Objetivos

Estudiar la capacidad de crecimiento de *Acremonium* y *Aphanocladium* en presencia de uranio(VI).

Evaluar la influencia del pH en el proceso de incorporación por células fúngicas metabólicamente activas.

Materiales y métodos

Cultivo en frascos agitados: *Acremonium* y *Aphanocladium* fueron cultivados en 50 ml de medio mínimo LPC (materiales y métodos generales) en frascos de vidrio de 125 ml, a concentración final de 300 mg l⁻¹ de uranio(VI); pH inicial 2.5, 5.5 y 7, en shaker orbital a 200 rpm y 30° C. El inóculo se preparó a partir de cultivos en fase exponencial tardía, filtrados por filtro Whatman 41 y membrana 0.22 µm, resuspendido en cantidad necesaria de medio de cultivo fresco. Cada sistema se inoculó con 1.7 10⁺⁷ conidioforos, cuantificados por recuento en cámara de Thoma. Se incluyeron en la serie controles de pérdida abiótica (sin inocular) para cada concentración de uranio(VI). Se incluyeron controles sin uranio(VI) e inoculados con micelio inactivo (micelio calentado a 100° C por 10 minutos) para eliminar adsorción por efectos fisicoquímicos sobre la superficie celular. Cada sistema se realizó por duplicado.

Cinética: Cada sistema se incubó durante 7 días. Cada uno se filtró por filtro tipo Whatman 41 y membrana 0.45 µm. La biomasa recuperada se lavó con 10 ml totales de agua destilada. Se evaluó la producción de biomasa por peso seco a 80° C. El valor de pH se midió a los 0, 5 y 7 días, con electrodo de vidrio combinado (Phoenix). Se midió uranio en solución por Arsenazo III y en biomasa por espectrometría gama. Se evaluó consumo de glucosa por cuantificación enzimática (GT Lab)

Resultados y discusión

Para evaluar la incorporación por células vivas y la influencia del pH en este proceso, se eligió la concentración de uranio(VI) igual a 300 mg l⁻¹, ya que por encima de ésta se observó disminución de uranio en solución por precipitación (experiencias preliminares no mostradas).

El medio de cultivo P5 original, se modificó para esta experiencia disminuyendo la concentración de fosfatos y glucosa (LPC) a fin de aproximar el sistema a aquél de donde se aislaron inicialmente ambas especies fúngicas y disminuir las interacciones con el uranio.

El consumo de glucosa de ambas especies en 0 y 300 mg l⁻¹ de uranio(VI) a pH 2.5, 5.5 y 7 se presenta en la Figura 47.

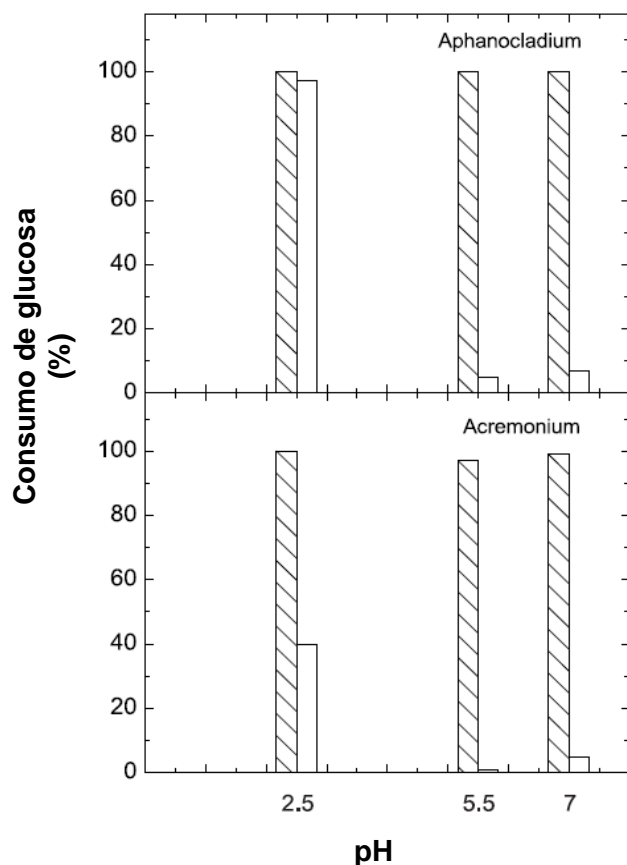


Figura 47: Consumo de glucosa para *Acremonium* y *Aphanocladium* a 0 (barras rayadas) y 300 (barras blancas) mg l⁻¹ de uranio(VI); pH 2.5, 5.5 y 7. (Publicado en Gargarello, R. et al, 2008).

Experimentalmente, se observó precipitado amarillo en los sistemas a pH 5.5 y 7. Este hecho está de acuerdo con los principios de la química del uranio en solución reportados con anterioridad (Noubactep, C. et al, 2003; Baes, C.; Mesmer, R., 1976). La cuantificación con Arsenazo III reveló concentraciones entre 3 y 4 veces por debajo de la concentración preparada. A pH 2.5, no se observó precipitación de uranio, asegurando que el mismo permaneció en solución durante la experiencia.

De aquí en adelante, se establecieron valores de pH de trabajo menores o iguales a 4.

Sorprendentemente, a pesar de la menor concentración inicial de uranio(VI) y valores de pH que tienden a la neutralidad y son menos agresivos, el crecimiento en las condiciones pH 5.5 y 7 fue mayoritariamente inhibido (nótese que el consumo de glucosa es bajo a nulo, en la figura 49) mientras que a pH 2.5, el consumo de glucosa fue leve a moderadamente disminuido: 1% para *Aphanocladium* y 60% para *Acremonium* (donde la concentración real de uranio es mayor y el medio más agresivo, debido a la acidéz).

Como se observa en la tabla 17, la biomasa recuperada fue mayor en estas condiciones.

pH	Biomasa obtenida (g l ⁻¹)	
	<i>Acremonium</i>	<i>Aphanocladium</i>
2,5	0,43	0,74
5,5	0,24	0,32
7	0,38	0,43

Tabla 17: Biomasa obtenida en cultivos con medio LPC, uranio(VI) 300 mg l⁻¹, pH 2.5, 5.5 y 7.

Dado que a pH 2.5 la cantidad de biomasa recuperada fue mayor, fue posible cuantificar el uranio retenido en la misma, tanto para la biomasa metabólicamente activa (micelio activo) como para el control con biomasa inactiva (micelio inactivo). Los resultados se muestran en la tabla 18.

	uranio(VI) retenido en biomasa a pH 2.5 (mg g ⁻¹)	
	<i>Acremonium</i>	<i>Aphanocladium</i>
Micelio activo húmedo	40	40
Micelio inactivo húmedo	155	250

Tabla 18: masa de uranio (mg) incorporada por masa seca de micelio (g), medido por espectrometría gama.

Como resultado se observó menor incorporación de uranio por parte de células metabólicamente activas. Es decir, teniendo en cuenta las definiciones de la página 79, la *bioacumulación* no se vio favorecida en las condiciones estudiadas.

La mayor incorporación observada por micelio inactivo es atribuida en este caso a interacciones con la pared celular y otros componentes de la biomasa, dado que el pre-tratamiento realizado inhibe la actividad metabólica celular. En este caso, predominan fenómenos de *adsorción fisicoquímica* (que se denominará *biosorción* de aquí en adelante).

El mayor crecimiento celular y la no retención de uranio por parte del micelio activo, sugieren la existencia de un mecanismo activo de eliminación de uranio (en este caso catión uranilo UO₂²⁺) en células metabólicamente activas.

La activación a pH 2.5, sugiere un mecanismo inespecífico mediado por un gradiente de H⁺ (en relación a la resistencia a bajos valores de pH). Este fenómeno deberá ser estudiado en profundidad en etapas posteriores al presente trabajo.

En función de los resultados mostrados en la tabla 17, sería más factible un proceso de biosorción por biomasa metabólicamente inactiva con cierto porcentaje acuoso, o bien previamente secada. Como se observa, la capacidad de adsorción es entre 3 y 4 veces mayor con respecto a la observada por micelio activo.

La elección de utilizar el proceso de biosorción tiene por ventaja que la recuperación de la biomasa puede realizarse por métodos rápidos y económicos como la filtración, incluso optimizarse el proceso si ésta se encuentra inmovilizada en carriers o pelletizada, evitando el agregado de fuente de carbono al sistema.

Dentro de las desventajas para un proceso que utilice el adsorbente estudiado en esta tesis, se encuentran: inicialmente se requiere una etapa previa de producción de la biomasa adsorbente, y luego otra etapa de eventual secado.

La biosorción es preferible a la utilización de un proceso de bioacumulación, que requiere:

1. Conservación de actividad metabólica en el tiempo (a lo largo de un único proceso y para las etapas de tratamiento sucesivas), a fin de asegurar igual rendimiento en el proceso.
2. Organismos naturalmente resistentes al contaminante
3. Utilización de medios de cultivo adecuados, ya que generalmente los organismos utilizados no son capaces de desarrollarse en condiciones naturales o el efluente a tratar.

En las secciones siguientes, se caracterizó el proceso de biosorción de uranio(VI) de la biomasa viable y previamente secada de *Acremonium* y *Aphanocladium*.

Biosorción de uranio(VI) por biomasa viable y biomasa seca de Acremonium y Aphanocladium

Experiencias en batch

El equilibrio establecido entre el metal adsorbido en una matriz y el remanente en solución, como así la capacidad de adsorción, pueden ser representados en *isotermas de adsorción*.

Existen numerosos métodos matemáticos para modelar la adsorción de metales, entre ellos, los más utilizados son los desarrollados por Langmuir y Freundlich (Volesky, B, 2001; Genç, Ö. et al, 2003; Akhtar, K. et al, 2007).

La isoterma de Langmuir puede expresarse por la siguiente ecuación:

$$q = q_{\max} K_L C_{\text{eq}} / 1 + K_L C_{\text{eq}} \quad \text{Ecuación 42}$$

donde:

q: capacidad específica de adsorción [masa de metal adsorbido (masa de adsorbente)⁻¹ en mg g⁻¹]

q_{max}: capacidad máxima específica de adsorción [masa de metal adsorbido (masa de adsorbente)⁻¹ en mg g⁻¹]

K_L: constante [l mg⁻¹] relacionada a la afinidad de adsorción y la capacidad de saturación de la monocapa

C_{eq}: concentración final en equilibrio del metal [mg l⁻¹]

La gráfica de la isoterma de Langmuir resulta en una curva sigmoideal con asíntota superior en q_{max}.

Los valores teóricos de q_{max} y K_L pueden calcularse a través de un gráfico C_{eq}/q vs C_{eq}, de la forma linealizada de la ecuación 42:

$$C_{\text{eq}} / q = 1/q_{\max} C_{\text{eq}} + 1/ K_L q_{\max} \quad \text{Ecuación 43}$$

El modelo de Langmuir supone un mecanismo de adsorción en monocapa de un componente, en un sistema homogéneo, con igual energía de activación para todos los sitios activos. La aproximación de datos experimentales a este modelo, revela que la adsorción termina una vez saturada la monocapa. Los procesos de adsorción por afinidad presentan este comportamiento.

El modelo de Freundlich es también muy utilizado para el modelado de adsorción de metales por intercambio iónico. Es una ecuación empírica basada en la adsorción de un componente en monocapa sobre una superficie heterogénea.

$$q = K_F C_{\text{eq}}^{1/n_F} \quad \text{Ecuación 44}$$

donde:

q: capacidad específica de adsorción [masa de metal adsorbido (masa de adsorbente)⁻¹ en mg g⁻¹]

K_F: constante de Freundlich [(mg g⁻¹)(l g⁻¹)^{1/n_F}], relacionada con la capacidad de adsorción

n_F: exponente de Freundlich, relacionado con la intensidad del adsorbente

Los parámetros teóricos que caracterizan a la isoterma de Freundlich pueden calcularse graficando log(q) vs log(C_{eq}) de la forma linealizada de la ecuación 44:

$$\log(q) = \log(K_F) + 1/n_F \log(C_{eq}) \quad \text{Ecuación 45}$$

La principal diferencia entre Langmuir y Freundlich, es que éste último modelado no brinda información acerca de la capacidad de adsorción de la monocapa.

Sin embargo, ambos son siempre usados como complemento uno del otro, aunque no todos los biomateriales poseen mecanismos de adsorción caracterizables por Langmuir o Freundlich. Incluso, un modelado satisfactorio en laboratorio con uno o dos componentes, no es reflejo de los procesos de adsorción e interacciones en un sistema real, donde existen numerosos sitios posibles de adsorción con distintas constantes de afinidad.

En esta instancia, siempre es útil el valor *experimental* hallado para q_{max} y la velocidad a la que ocurre el proceso de adsorción, para evaluar la factibilidad en métodos de biorremediación o recuperación.

En las secciones siguientes, y a los fines de los objetivos principales de la presente tesis, se han estudiado solamente las interacciones de la biomasa fúngica de *Acremonium* y *Aphanocladium* con uranio en soluciones modelo de nitrato de uranilo.

Objetivos

Caracterizar el proceso de adsorción de uranio(VI) por biomasa seca y biomasa viable de *Acremonium* y *Aphanocladium*.

Materiales y métodos

Caracterización de la biomasa: A fin de determinar los sitios activos para intercambio de la biomasa seca y viable, se realizó una titulación potenciométrica con electrodo de vidrio combinado (Phoenix) adicionando con bureta NaOH o HCl 0.10 N, sobre 1 gramo de biomasa equivalente en peso seco, para ambas especies fúngicas. Dado que el tiempo de respuesta del electrodo resultó, aproximadamente, de 10 segundos, cada medida se registró luego de ese lapso de tiempo una vez agregado el ácido o la base.

Cinética de adsorción: A fin de establecer el tiempo de contacto mínimo para garantizar la adsorción se realizó un experimento cinético. 40 mg de biomasa seca o su equivalente en biomasa viable, se incubaron con 40 ml de solución acuosa 100 mg l⁻¹ de uranio(VI) pH 3.6. Se tomó 1 ml de muestra a distintos tiempos, se centrifugó a 10.000 rpm (Beckman) y se midió uranio(VI) en sobrenadante por Arsenazo III. Del gráfico uranio en solución vs tiempo, se calculó el tiempo de equilibrio de adsorción como aquél correspondiente al punto medio entre t y t_{final} cuando la masa de uranio en solución permanece constante.

Isotermas de adsorción: Se utilizó biomasa recuperada de cultivo en biorreactor en fase exponencial tardía, filtrada por filtro tipo Whatman 41, lavada con agua destilada, alternativamente secada a 50° C, molida y tamizada (diámetro de partícula 0.5 mm - 0.18 mm).

Se incubaron 40 mg de biomasa seca (o su equivalente en biomasa viable) con 40 ml de solución acuosa de uranio(VI) 0 a 300 mg l⁻¹; pH inicial 2.5 y 3.6; en agitador recíproco a 160 rpm durante 240 minutos. Cada sistema se realizó por duplicado.

La razón de la elección de estos dos valores de pH para el ensayo, reside en el hecho de que a partir de valores de pH 4.5, se produce la hidrólisis y precipitación del uranio. Además, el pH de las aguas contaminadas con uranio suele encontrarse entre estos valores, como es el caso de los drenajes ácidos de minas.

Luego de la incubación, se filtró por membrana 0.45 µm y lavó dos veces con 5 ml de agua destilada. La concentración inicial y final de uranio en solución se midió por Arsenazo III, mientras que el uranio acumulado en la biomasa se cuantificó por espectrometría gama. Para el modelado de la isoterma se consideró la concentración de equilibrio (C_{eq}) como la diferencia de entre la concentración inicial y final de uranio(VI) en solución cuantificado por Arsenazo III, y la capacidad de adsorción (q) como el uranio adsorbido en la biomasa, cuantificado por espectrometría gama

Resultados y discusión

✚ Caracterización de la biomasa

Los gráficos de titulación ácido- base se presentan en la figura 48.

A partir de los milimoles de H⁺ u OH⁻ empleados en la titulación de la biomasa, se calculó la capacidad de intercambio expresada en moles de H⁺ intercambiados en el rango de pH 2,5 y 4,5. Los resultados se expresan en equivalentes de masa fúngica seca.

Acremonium y *Aphanocladium* seca: 1.34 ± 0.05 mmol H⁺ g⁻¹

Acremonium y *Aphanocladium* viable: 0.0176 ± 0.01 mmol H⁺ g⁻¹.

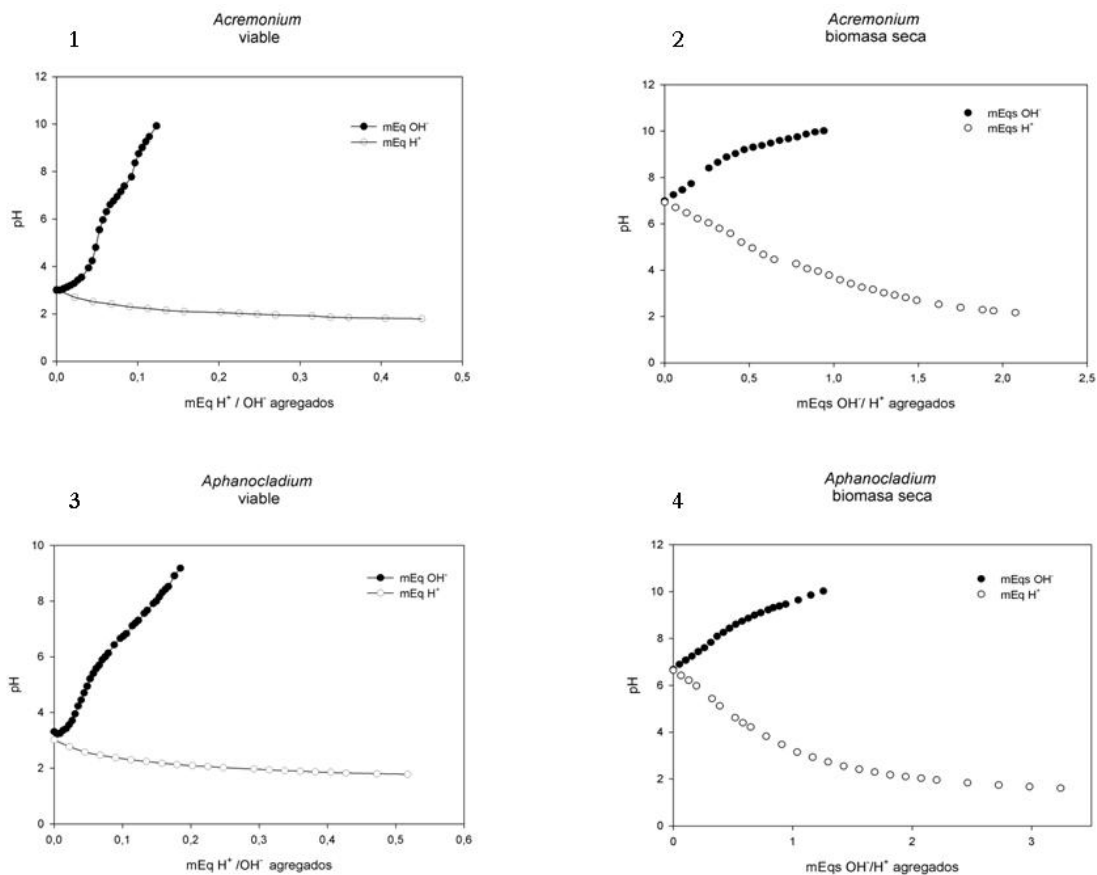


Figura 48: Titulación ácido-base *Acremonium* biomasa viable (1) y biomasa seca (2), *Aphanocladium* biomasa viable (3) y biomasa seca (4).

Como se observa, es mayor la capacidad de intercambio para la biomasa seca. En función de estos y otros resultados preliminares del capítulo anterior, se estudiará la capacidad de adsorción de uranio de la biomasa seca, como potencial matriz a utilizar en procesos de biorremediación. Las experiencias relacionadas se presentarán a lo largo de esta sección.

✚ Cinética de adsorción

Se evaluó el tiempo mínimo necesario de contacto biomasa- uranio(VI) para asegurar el fenómeno de adsorción (figura 49).

Los controles sin biomasa no presentaron disminución detectable de uranio en solución. Para todos los casos, el valor de pH final presentó una disminución despreciable (0.5%) con respecto al valor inicial.

La masa de uranio en el control sin biomasa y en el sistema con biomasa a tiempo= 0 minutos, no presentó diferencias significativas.

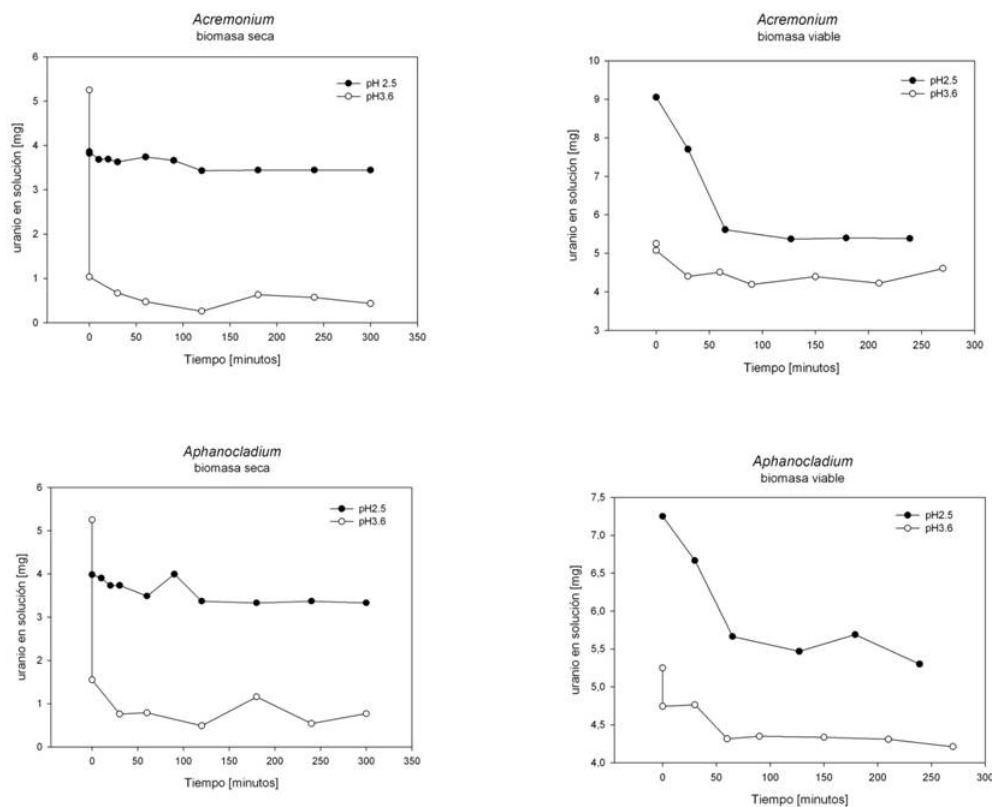


Figura 49: cinética de adsorción de la biomasa viable y seca de *Acremonium* y *Aphanocladium* a pH 2.5 y 3.6. En el tiempo $t=0$ min, se representa la masa de uranio en solución antes y después del agregado de la biomasa.

En función de la cinética de adsorción, se estimó el tiempo mínimo necesario de contacto para realizar las isotermas de adsorción. Los tiempos estimados se presentan en la tabla 19.

	pH 2.5	pH 3.6
<i>Acremonium</i> seca	150	180
<i>Acremonium</i> viable	152	120
<i>Aphanocladium</i> seca	120	210
<i>Aphanocladium</i> viable	152	165

Tabla 19: Tiempos de mínimos de contacto (en minutos) para la adsorción de uranio por ambas especies fúngicas a distintos pH.

Al realizar el experimento de adsorción estática (*isotermas de adsorción*) se unificó el tiempo de contacto a 200 minutos para todos los sistemas.

Es notable en esta experiencia, el abrupto descenso de la masa de uranio en solución para la condición a pH 3.6 usando biomasa seca.

✚ Isotermas de adsorción. pH 3.6

Se evaluó la capacidad máxima de adsorción para la biomasa de ambas especies fúngicas. En una experiencia preliminar, realizada a pH 3.6 (valor que toma naturalmente una solución acuosa de nitrato de uranilo) se comparó la capacidad de adsorción de la biomasa viable de ambas especies con la capacidad de la biomasa seca.

Los valores obtenidos de capacidad máxima de adsorción para la biomasa viable son:

$$\textit{Aphanocladium} \ q_{\max} = 0.32 \text{ mg g}^{-1} \pm 0.02$$

$$\textit{Acremonium} \ q_{\max} = 0.25 \text{ mg g}^{-1} \pm 0.02$$

A continuación se presenta la gráfica para la isoterma de adsorción de la biomasa seca de *Acremonium* y *Aphanocladium* (Figura 50). Nótese un perfil muy similar de adsorción para ambas especies, llegando a valores de q_{\max} próximos entre sí.

El valor de pH de la solución de contacto no se modificó considerablemente durante esta experiencia.

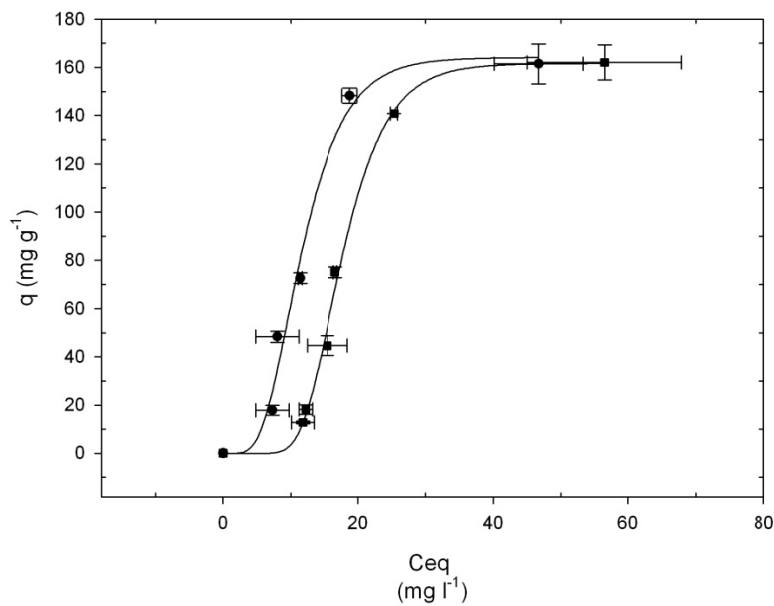


Figura 50: Isoterma de adsorción para la biomasa seca de *Acremonium* (■) y *Aphanocladium* (●) a pH 3.6. (Publicado en Gargarello, R. et al, 2008).

Las ecuaciones que corresponden al ajuste de datos son:

$$q_{\text{Acremonium}} = 161.5 (1 - e^{-0.2166 C_{eq}})^{31.253}$$

$$R^2 = 0.9976$$

$$q_{\text{Aphanocladium}} = 164.1 (1 - e^{-0.2150 C_{\text{eq}}})^{37.8576}$$

$$R^2 = 0.9923$$

A partir de las ecuaciones anteriores para las gráficas de la figura 50, y calculando la asíntota horizontal de cada una (cuando C_{eq} tiende a infinito), se desprende que la capacidad de adsorción para la biomasa seca es:

$$\text{Acremonium } q_{\text{max}} = 161.5 \text{ mg g}^{-1} \pm 0.2$$

$$\text{Aphanocladium } q_{\text{max}} = 164.1 \text{ mg g}^{-1} \pm 0.2$$

Estos valores, expresados en mili moles de UO_2^{2+} adsorbido, equivalen a:

$$0.678 \text{ mmol UO}_2^{2+} \text{ g}^{-1} \quad \text{para } \text{Acremonium}$$

$$0.689 \text{ mmol UO}_2^{2+} \text{ g}^{-1} \quad \text{para } \text{Aphanocladium}$$

Analizando los sitios totales de adsorción calculados en la titulación potenciométrica ($1.34 \text{ mmol H}^+ \text{ g}^{-1}$ para ambas especies) y las capacidades máximas de adsorción a pH 3.6, se observa una relación de intercambio cercana a 2:1, confirmando que la especie predominante fue el catión divalente uranilo UO_2^{2+} .

Siguiendo la tendencia de la capacidad de intercambio observada, q_{max} es mayor para la biomasa seca y con valores similares para ambas especies. Asimismo, los valores obtenidos se encuentran dentro del rango observado para otras especies fúngicas (Tabla 20), como *Kluyveromyces* y *Saccharomyces*, en rangos de pH similares a los estudiados en este trabajo.

Sorption capacities of uranium(VI) for different taxa (pH is pH at			
Taxon	Model	Sorption capacity (mg U gdm ⁻¹)	Measured pH
<i>Scenedesmus</i>	Measured	75	
<i>Chlorella</i>	Measured	15.6	
<i>Chlorella</i>	Measured	28.5	(pH 3.5)
<i>Sargassum</i>	Langmuir	560	(pH 4.0)
<i>Sargassum</i>	Langmuir	330	(pH 3.2)
<i>Sargassum</i>	Langmuir	150	(pH 2.6)
<i>Sargassum</i>	Measured	524	
<i>Pseudomonas</i>	Measured	96,000	
<i>Pseudomonas</i>	Measured	541	Lyophilized
<i>Pseudomonas</i>	Measured	410	Live at pH 5
<i>Saccharomyces</i>	Measured	571	
<i>Saccharomyces</i>	Measured	360	
<i>Saccharomyces</i>	Measured	138	
<i>Kluyveromyces</i>	Measured	180	
<i>Talaromyces</i>	Langmuir	323	(pH 5)
<i>Aspergillus</i>	Langmuir	423	
<i>Aspergillus</i>	Measured	40	(pH 4-5)
<i>Rhizopus</i>	Measured	> 180	(pH 4)
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Measured	42.3	(pH 3.5)
<i>Penicillium spp.</i>	Measured	20.3	(pH 3.5)
<i>Peltigera</i>	Measured	42	(pH 4-5)
<i>Cladonia</i>	Measured	29	
<i>Umbilicaria</i>	Measured	10	

Tabla 20: valores de capacidad de adsorción estática (q) obtenidos para biomasa obtenida de diferentes organismos. (Tomado de Kalin, M. et al, 2005).

Los datos obtenidos para las isotermas a pH 3.6 no ajustaron a los modelos de Langmuir o Freundlich, tanto en sus aproximaciones por linealización como por la función Solver® Excel- Microsoft (datos no incluidos).

La causa de que los datos no ajusten a ambos modelos, podría deberse al incumplimiento del supuesto de adsorción en monocapa que exigen ambos. De hecho, para especies fúngicas, se ha discutido la existencia de múltiples mecanismos actuando en simultáneo, que impiden una caracterización adecuada (Barkay, T. et al, 2001).

Gadd, G.M et al, reconocen que **“las interacciones heterogéneas no equivalentes, son aún más complejas dado el gran número de sitios de unión, cargas, accesibilidad por disposición estérica y propiedades del metal unido a la matriz adsorbente”** (Gadd, G.M. et al, 2000 en Barkay, T.; et al, 2001).

El hecho de que los datos no ajustan a ninguno de los modelos mencionados, descarta la posibilidad de modelado del proceso como intercambio iónico o afinidad exclusivamente, dado que la adsorción es una suma de todos los fenómenos de interacción posibles.

Isotermas de adsorción. pH 2.5.

En la tabla 21 se muestran los valores de q_{\max} calculados para la biomasa viable y seca de *Acremonium* y *Aphanocladium*, a pH 2.5.

Según se observa, los valores de q_{\max} obtenidos fueron mucho más bajos con respecto a los calculados a pH 3.6. Este hecho se atribuye a que en esta condición determinados grupos funcionales, como aminas y carboxilatos, se encuentran protonados (Tabla 14), influyendo la interacción del uranilo con ellos.

Especie	q_{\max} [mg g ⁻¹] pH 2.5	
	Viable	Seca
<i>Acremonium</i>	0.23 ± 0.01	33 ± 0.01
<i>Aphanocladium</i>	0.23 ± 0.01	17 ± 0.01

Tabla 21: valores de q_{\max} obtenidos para *Acremonium* y *Aphanocladium* a pH 2.5.

Teniendo en cuenta los resultados presentados en esta sección, se concluye que:

Un proceso de biorremediación en batch puede diseñarse utilizando la biomasa seca de Acremonium o Aphanocladium, a pH 3.6, dado que en estas condiciones se observó un valor aceptable de capacidad estática de adsorción.

Estas condiciones son favorables para un proceso de biorremediación, dado que este valor de pH es cercano a los que posee cualquier efluente contaminado por uranio, con lo que no sería necesaria una corrección inicial de este parámetro.

Las ventajas de utilizar *Acremonium* o *Aphanocladium*, residen principalmente en su fácil producción, requerimientos mínimos de nutrientes para el crecimiento y las condiciones extremas a las que son capaces de desarrollarse, lo que disminuye el rango de otras especies contaminantes.

El uso de micelio seco, no viable también aporta ventajas:

- ✓ La separación de la biomasa del medio de cultivo líquido requiere una operación simple.
- ✓ La biomasa seca puede conservarse en forma compacta, dada la reducción de volumen con respecto a la biomasa viable.
- ✓ La biomasa puede someterse a tratamientos para mejorar su capacidad de adsorción.
- ✓ La biomasa puede asociarse a diferentes soportes.
- ✓ El tamaño de partícula puede optimizarse.

Teniendo en cuenta los resultados favorables para la adsorción en batch de la biomasa seca de *Acremonium* y *Aphanocladium*, y con el objetivo de establecer un proceso potencialmente aplicable de biorremediación de efluentes líquidos contaminados con uranio(VI), se procedió a estudiar el fenómeno de adsorción en sistemas de columnas a flujo continuo.

*Biosorción de uranio(VI) por biomasa seca de
Acremonium y Aphanocladium*

Experiencias en flujo continuo

El estudio de adsorción de metales u otras sustancias a flujo continuo se realiza empaquetando la biomasa en columnas.

Cuando se trabaja con columnas es inevitable la magnificación de fenómenos de transporte de masa, de carácter cinético, que disminuyen el valor calculado para la capacidad máxima de adsorción (q_{\max}) en las experiencias en batch. Por este hecho, es necesario calcular un nuevo parámetro, denominado *capacidad máxima dinámica de adsorción* (q_{\max}^{din}).

La capacidad máxima dinámica de adsorción, se calcula experimentalmente realizando curvas de ruptura o corte, para la matriz de interés empaquetada en columnas. Esto consiste en cargar la columna con una solución del metal o sustancia de interés, determinando en distintas fracciones colectadas su concentración. En las primeras fracciones, la concentración de la misma será cercana o igual a cero, dado que toda ella queda adsorbida en la matriz. Un drástico aumento de la concentración de la sustancia en el eluido evidencia el punto de corte, donde se iguala la concentración de la solución madre cargada. Si se graficara concentración (C) o concentración del eluido/ concentración inicial (C/C_0) vs volumen cargado (V) o masa cargada (m), se obtendría una curva teórica como la de la Figura 51.

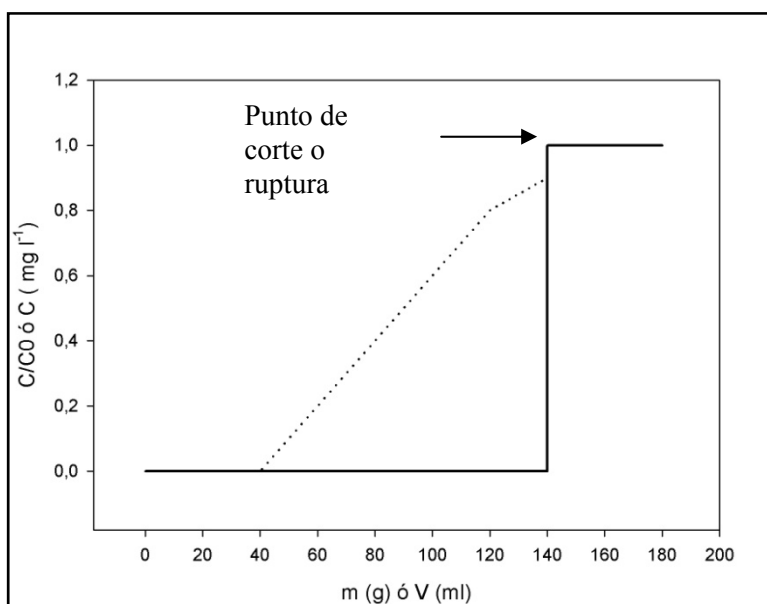


Figura 51: gráfico teórico (línea completa) y real (línea punteada) para el cálculo del punto de corte.

Nótese que, experimentalmente, la curva tiende a ser una sigmoide, debido a los problemas de difusión a través de la columna. Para este caso se define el punto de corte como el 20% del valor de C_0 (Merrit, R.C. 1971 en Ladeira, A.C.Q., et al., 2005).

El dato del punto de corte es importante, porque da una idea del volumen total de solución que puede cargarse en la columna, antes que ésta quede saturada.

A partir del valor del punto de corte, puede calcularse también el valor para q_{\max}^{din} , siendo, cuando $C = 0.2 C_0$ y calculando la masa de sorbato correspondiente en esa condición:

$$q_{\max}^{\text{din}} = \text{masa de sorbato retenida (masa de matriz)}^{-1} \quad \text{Ecuación 46}$$

De la relación de las capacidades máximas de adsorción estática y dinámica, se define el *aprovechamiento* de la columna.

$$\text{Aprovechamiento} = 100 \, q_{\max}^{\text{din}} (q_{\max})^{-1} \quad \text{Ecuación 47}$$

Un valor de aprovechamiento igual o mayor al 50% es aceptable; un valor menor indica que es necesario mejorar el sistema, cambiando variables como pH, fuerza iónica, flujo, tamaño de partícula, características de la matriz, altura de la columna.

Objetivos

Evaluar la factibilidad del uso de la biomasa seca de *Acremonium* y *Aphanocladium* para un proceso de adsorción de uranio en flujo continuo.

Caracterizar la adsorción en estos sistemas.

Materiales y Métodos

Armado y operación de las columnas: Se utilizó biomasa seca tamizada a +18, -18+35, -35+80 y -80 mallas, equivalentes a >0.99 mm, 0.99- 0.5mm, 0.5- 0.18 mm y <0.18 mm de diámetro de partícula respectivamente. 0.77 ± 0.01 g de biomasa seca fueron empaquetados en jeringas de 3 ml, con un filtro de lana de vidrio en la parte inferior, volumen de lecho final 1.3- 1.4 ml.

Previo uso, la biomasa empaquetada (a la que se referirá como *columna* de aquí en adelante) fue estabilizada con 3- 4 volúmenes de agua destilada. La carga se realizó con 1.4 volúmenes cada vez, de solución de $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ equivalente a 500 mg l^{-1} de uranio(VI), pH 3.6 y 2.5. Se calculó el punto de corte como el 20% de la masa cargada. El valor de q_{\max}^{din} se calculó según la ecuación 48. El aprovechamiento se calculó según la ecuación 49. El tiempo de retención se calculó como aquél que tarda una fracción de volumen conocido en eluir de la columna. En cada ciclo de operación se midió entre 3 y 4 veces, y el promedio entre éstos se tomó como tiempo de retención de la columna.

Desorción de uranio retenido: se realizó la elución con distintos extractantes, HNO_3 0.1N, HCO_3^- 1M, HCO_3^- 0.25 M, H_2SO_4 0.2 N y H_2SO_4 0.20 N generado por bacterias acidófilas (biogenerado). El H_2SO_4 biogenerado fue recuperado de un cultivo de *Acidithiobacillus thiooxidans* a partir del medio líquido, filtrado por filtro Whatman 41 y membrana $0.22 \mu\text{m}$ (a fin de separar los microorganismos en solución) y valorado por titulación ácido- base con NaOH 0.01N.

Cuantificación de uranio: el uranio en solución se cuantificó por el método de Arsenazo III, en cada fracción. La masa de uranio adsorbido en cada fracción se calculó como la diferencia entre la masa cargada y la no retenida. El uranio adsorbido en la matriz en el punto de corte se cuantificó por espectrometría gama.

Se realizó SEM- EDAX (XL 30 ESEM Phillips) sobre la biomasa sin metal, con metal adsorbido luego de un ciclo de carga y elución.

Resultados y discusión

✚ Elección del tamaño de partícula óptimo

El tamaño de partícula óptimo para la operación en columna, se eligió en función del tiempo de retención observado y la adsorción resultante en dicho período.

De los cuatro rangos ensayados, las columnas armadas con partículas de diámetro entre 0.5-0.18 mm, resultaron óptimas, con tiempos de retención promedio de 10 minutos, y adsorción inicial del 100%.

Con respecto a los tamaños de partícula restantes, se observaron tiempos de retención excesivamente largos para aquellas con diámetro menor 0.18 mm (promedio 1 día) que resultaron en el taponamiento de la columna. Las columnas armadas con partículas de diámetro mayor a 0.99 mm y 0.99- 0.5 mm presentaron tiempos de retención promedio muy bajos (20 segundos y 1 minuto respectivamente). La adsorción observada en estas últimas, resultó despreciable.

Por lo tanto,

Se utilizó biomasa seca tamizada con tamaño de partícula entre 0.5 y 0.18 mm de diámetro para los ensayos de adsorción y desorción de uranio en columnas.

✚ Cálculo del tiempo de retención

El tiempo de retención promedio obtenido para estas columnas en la primera carga fue:

Acremonium 16.2 ± 6 minutos

Aphanocladium 8.8 ± 5 minutos

Existe una desviación considerable (cercana al 50%) para los tiempos de retención calculados, producto de la variación de los mismos dentro de un mismo ciclo. Este hecho es atribuido a problemas de difusión a lo largo de la columna, también observados para las curvas de corte (presencia de repetidas mesetas para la adsorción en el proceso de carga con solución de uranio(VI). Figuras 54- 55).

Como se comentará más adelante, para una misma columna el tiempo de retención se vio modificado a lo largo de varios ciclos de carga y elución.

Estos resultados sugieren la necesidad de un pretratamiento para la biomasa, tal como pelletización o inmovilización en otras matrices.

✚ Cálculo de la capacidad máxima dinámica de adsorción

A continuación se presentan las curvas de corte experimentales obtenidas para las columnas con biomasa de *Acremonium* y *Aphanocladium*, a pH 3,6 y 2,5 (Figuras 52- 53).

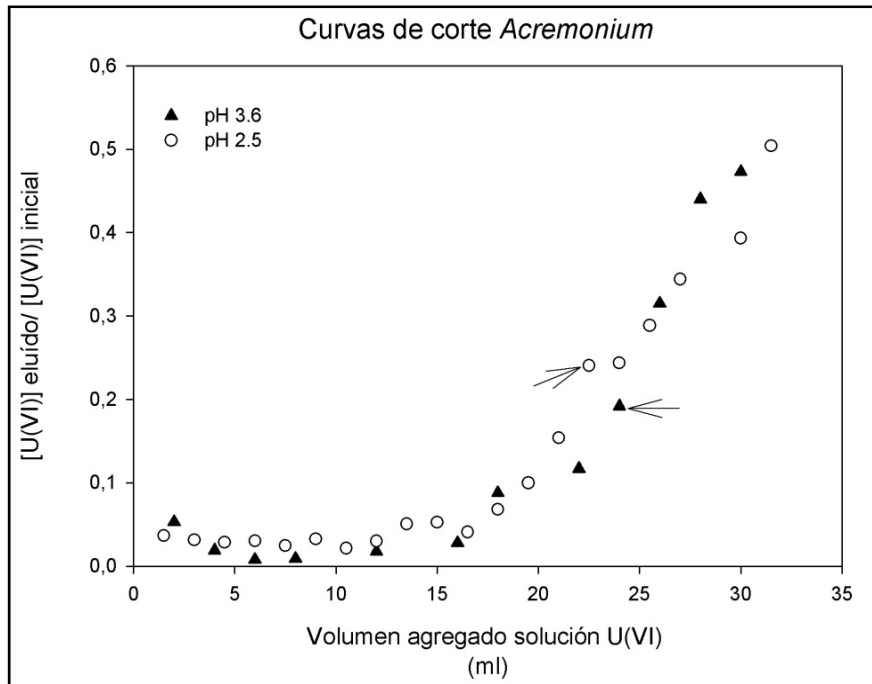


Figura 52: curvas de corte a pH 2.5 y 3.6 para columnas de biomasa seca de *Acremonium* sp. Las flechas indican el punto de corte.

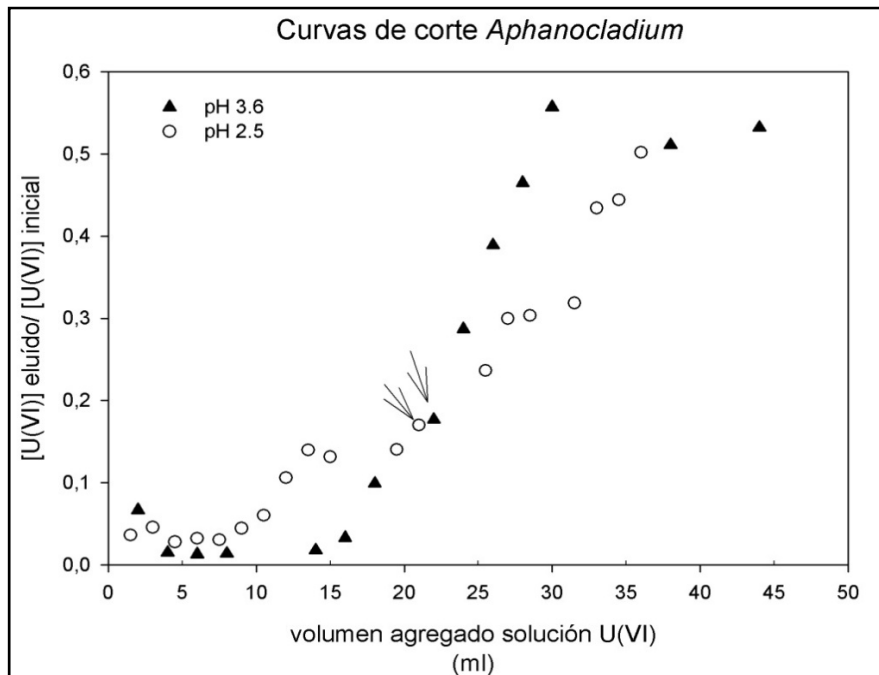


Figura 53: curvas de corte a pH 2.5 y 3.6 para columnas de biomasa seca de *Aphanocladium* sp. Las flechas indican el punto de corte.

A partir del punto de corte para cada columna, se calcularon q_{\max}^{din} y el aprovechamiento para cada condición (Tabla 21).

<i>Especie fúngica</i>	<i>pH</i>	q_{\max}^{din} (mg g^{-1})	<i>Aprovechamiento</i> (%)	<i>Punto de corte</i> (<i>ml agregados</i>)
<i>Acremonium</i>	3.6	15	9	26
	2.5	14.6	44	22.5
<i>Aphanocladium</i>	3.6	14	8.7	24
	2.5	16.3	95	25.5

Tabla 21: Capacidad máxima dinámica de adsorción y aprovechamiento para columnas armadas con biomasa seca de *Acremonium* y *Aphanocladium*, cargadas con solución de uranio(VI) a pH 3.6 y pH 2.5.

Como puede observarse, y como se discutió en la introducción de la presente sección, el valor de la capacidad máxima dinámica de adsorción es menor que el obtenido para la capacidad máxima estática, hecho que se refleja en los aprovechamientos calculados para las columnas a pH 3.6, y razón por la cuál, a pH 2.5 éstos son tan altos.

La cuantificación de uranio retenido en el punto de corte fue contrastada por espectrometría gama, obteniendo:

1. Similar adsorción a pH 3.6:

$$q_{\max}^{\text{din}} \text{Acremonium} = 38 \pm 2 \text{ mg g}^{-1}$$

$$q_{\max}^{\text{din}} \text{Aphanocladium} = 32 \pm 1 \text{ mg g}^{-1}$$

2. Similar adsorción a pH 2.5, con valores similares obtenidos para $q_{\max}^{\text{estática}}$, hecho que justifica el alto aprovechamiento encontrado para esta condición:

$$q_{\max}^{\text{din}} \text{Acremonium} = 26 \pm 0.1$$

$$q_{\max}^{\text{din}} \text{Aphanocladium} = 27 \pm 0.1$$

Como se ve, los valores de adsorción calculados por balance de masas, a partir de medidas colorimétricas en solución difieren considerablemente de lo cuantificado por espectrometría gama.

Según se nombró en la introducción general, este último método posee la ventaja de ser directo, no destructivo y altamente sensible, en este caso a uranio presente en la muestra. Por el contrario, la cuantificación por Arsenazo III posee numerosas interferencias, entre ellas, compuestos orgánicos (Savvin, S., 1961).

La sobreestimación en la cuantificación de uranio en las fracciones, posiblemente proviene de interferencias en el método colorimétrico causada por liberación de compuestos como resultado de la inestabilidad estructural de la biomasa.

En conclusión, los valores de $q_{\text{máx}}^{\text{din}}$ obtenidos a partir de la cuantificación por espectrometría gama, fueron privilegiados con respecto a los colorimétricos.

Teniendo en cuenta esto último y los altos porcentajes de aprovechamiento obtenidos,

Es factible el uso de Acremonium o Aphanocladium, a pH de trabajo 2.5 en procesos de biosorción en columna

El aprovechamiento de las columnas a pH 3.6 podría eventualmente mejorarse, como ya se mencionó, mediante la incorporación de un pre- tratamiento a la biomasa. Esta observación, es también válida para la adsorción a pH 2.5 a flujo continuo, dado que mayores aprovechamientos fueron simplemente el resultado de una baja $q_{\text{máx}}$ estática (parámetro objeto de posibles modificaciones también).

Desorción

Se ensayaron distintas soluciones extractantes a fin de recuperar el uranio retenido en las columnas.

Las soluciones se eligieron en función a: costo, disponibilidad en laboratorio y efectividad reportada en otros procesos de recuperación de uranio u otros metales pesados (Volesky, B., 2007; Bengtsson, L.et al., 1995; Yang, J. et al., 1999).

Se probaron, como máximo, 5 ciclos de carga y elución con cada solución.

1. Análisis por tiempos de retención

Se observó variación en los tiempos de retención medidos para cada columna a lo largo de los ciclos de operación (tabla 22), signo de cambios en la estabilidad de las partículas de biomasa empaquetada.

Especie	Tiempo de retención promedio en 5 ciclos de carga y elución (minutos)				
	HNO ₃ 0.1 N	HCO ₃ ⁻ 1 M	HCO ₃ ⁻ 0.25 M	H ₂ SO ₄ 0.2 N biogenerado	H ₂ SO ₄ 0.2 N comercial
<i>Acremonium</i>	11 ± 5	10 ± 7	13 ± 10	8 ± 4	20 ± 9
<i>Aphanocladium</i>	10 ± 9	15 ± 9	7 ± 6	5 ± 2	14 ± 9

Tabla 22: tiempos de retención promedio para los 5 ciclos de operación de columnas empaquetadas con biomasa de *Aphanocladium* y *Acremonium*, cargadas con solución de uranio(VI) a pH 3.6 y eluidas con distintas soluciones.

Como puede observarse en la tabla 22, la desviación estándar de los tiempos de retención medidos durante los 5 ciclos de operación, raramente es menor al 50%.

Se tomaron para analizar más detalladamente las columnas que presentaron menor desviación en los tiempos de retención, considerando que este fenómeno está ligado a pérdida de la estabilidad de la biomasa, producto de agresividad de la solución extractante. Las soluciones elegidas, en función a lo observado en la tabla 25, fueron: H₂SO₄ 0.2N biogenerado, HCO₃⁻ 1M, HCO₃⁻ 0.25M.

A partir de las observaciones realizadas hasta el momento surge que:

Se considera necesario implementar un pre- tratamiento a la biomasa a fin de mejorar la capacidad de adsorción, la calidad de la matriz y la resistencia a varios ciclos de reuso.

La operación en columnas puede mejorarse aumentando la estabilidad de la biomasa, mejorando la calidad de la matriz y los tiempos de retención. Para ello pueden realizarse pre-tratamientos sobre la misma: pelletización; inmovilización en soportes sintéticos y naturales (como arcillas); entrapamiento en geles naturales (agar, agarosa, alginato y carragenano), o sintéticos (poliacrilamida, poliuretanos).

Al realizar un pre- tratamiento debe considerarse la posibilidad de adsorción por parte del soporte o matriz donde se encuentra inmovilizada. Por ejemplo, el alginato posee una considerable capacidad de adsorción dados los grupos funcionales (-COO⁻) que quedan expuestos.

La pelletización es una buena opción, al quedar completamente cubierta la matriz. El mismo resultado puede obtenerse en la inmovilización por adsorción sobre matrices inorgánicas. Por último,

la elección del eluyente de uranio adsorbido, se basa en una relación costo- beneficio según: el efecto agresivo sobre la biomasa (con los sucesivos cambios tridimensionales y en los tiempos de retención) y la capacidad de desorción de la solución en cuestión.

2. Análisis por balance de masa

Como ya se discutió anteriormente, la cuantificación del uranio retenido y remanente en columna luego de la elución, se realizó por espectrometría gama.

Se analizó la biomasa empaquetada en columnas eluidas con H₂SO₄ 0.2N biogenerado, HCO₃⁻ 1M, HCO₃⁻ 0.25M, según se estableció en la sección anterior.

El análisis permitió establecer que:

*las mejores soluciones extractantes ensayadas fueron HCO₃⁻ 1M,
HCO₃⁻ 0.25 M y H₂SO₄ biogenerado,*

dado que presentaron la menor cantidad de uranio remanente en la biomasa empaquetada, luego de un ciclo de carga y elución.

En la tabla 23, se muestran los resultados de la cuantificación de uranio por espectrometría gama para las soluciones elegidas.

<i>Solución Extractante</i>	<i>Masa uranio remanente (mg g⁻¹)</i>	<i>% recuperación</i>
HCO ₃ ⁻ 1M-0.25M	0.36	99
H ₂ SO ₄ 0.2N biog.	15.30	86

Tabla 23: Resultados de la cuantificación de uranio remanente en columnas de biomasa de *Aphanocladium* y *Acremonium* luego de un ciclo de operación a pH 3.6.

En las siguientes figuras se observan fotografías electrónicas de la biomasa sin utilizar, cargada con metal a pH 3.6 y eluída con ácido sulfúrico biogenerado (Figuras 54- 56).

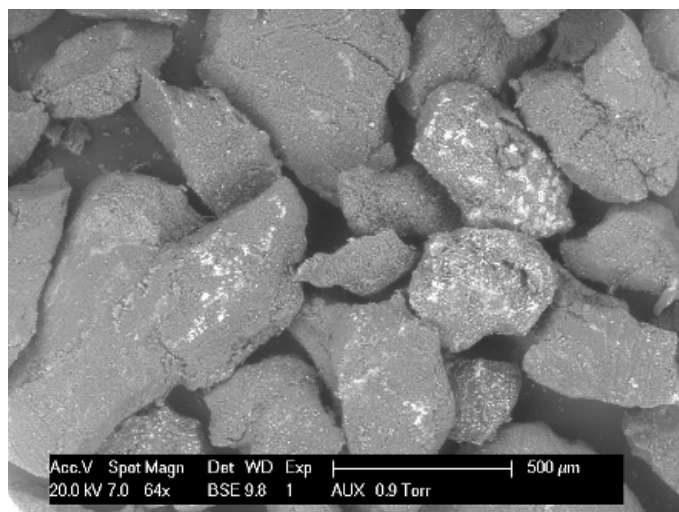


Figura 54: fotografía electrónica de la biomasa empaquetada de *Acremonium*

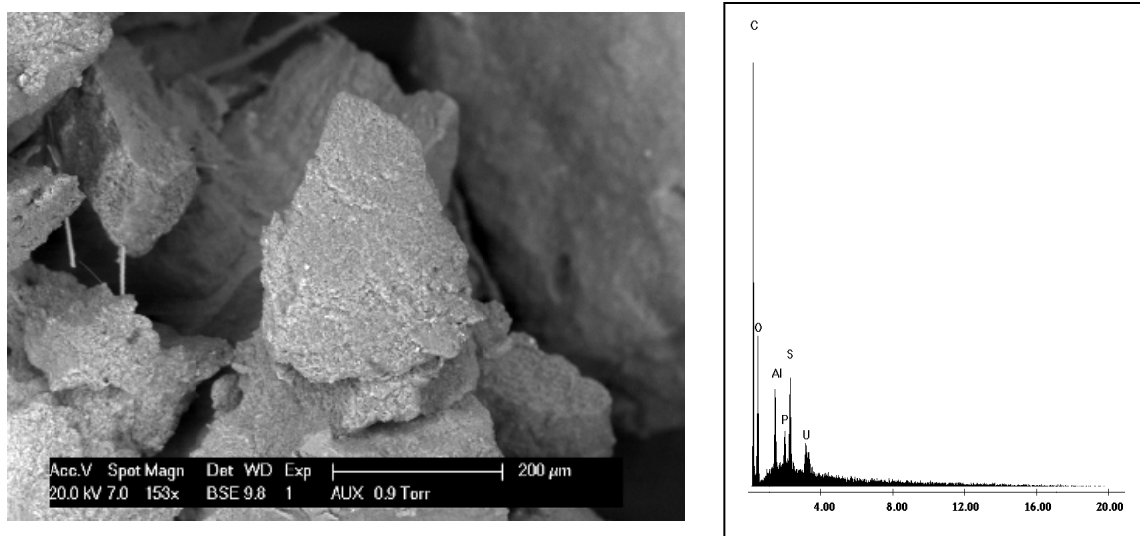


Figura 55: fotografía electrónica de la biomasa empaquetada de *Acremonium* cargada con uranio a pH 3.6 (izq.). Espectro EDAX (der.).

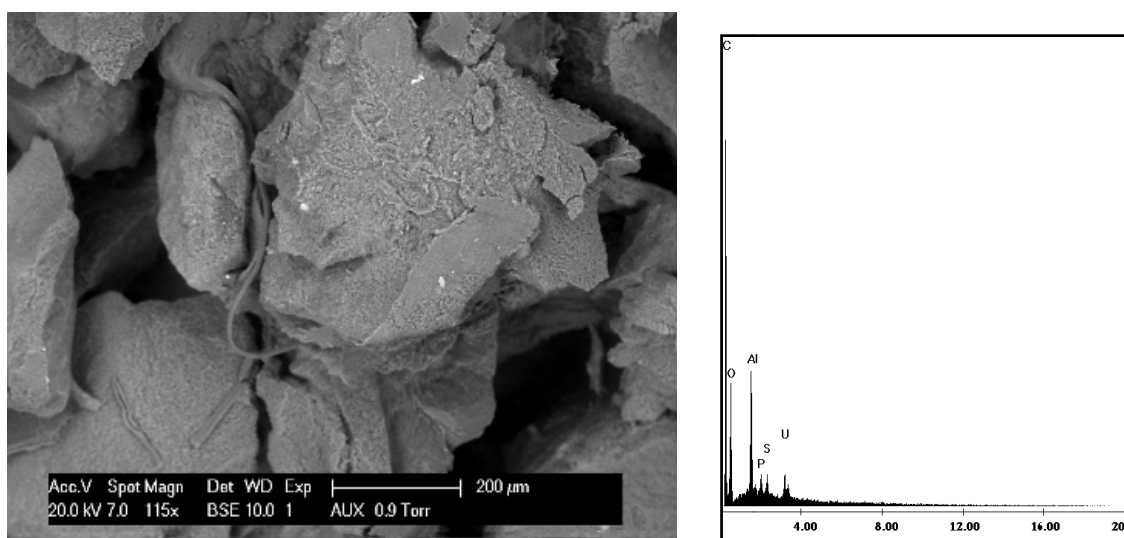


Figura 56: fotografía electrónica de la biomasa empaquetada de *Acremonium* luego de un ciclo de carga y elución con H_2SO_4 biogenerado (izq.). Espectro EDAX (der.).

Como se observa en los espectros EDAX, existe uranio remanente adsorbido en la biomasa, luego de la elución con H_2SO_4 biogenerado, coincidente con los observado por la cuantificación por espectrometría gama y con los balances de masa realizados (no incluidos).

En función de lo observado en esta sección, en el análisis por tiempos de retención (tabla 25) y realizando una relación costo beneficio, a pesar de que el uranio remanente en la biomasa al ser eluido con HCO_3^- fue mucho menor, puede concluirse que:

El H_2SO_4 biogenerado es uno de los mejores eluyentes ensayados, dado que la baja agresividad sobre la biomasa empaquetada permite mayores ciclos de utilización de la columna

El uso de bicarbonato o carbonato para la precipitación química de uranio, utilizado para la remediación de aguas, ya ha sido reportado por otros autores (Groudev, S. N. et al., 1997; Gabelle, F. et al., 2001).

La solubilización por ácidos fuertes como el ácido nítrico o sulfúrico, también ha sido estudiada y es la que actualmente, se utiliza en el proceso de lixiviación en la industria minera (Gabelle, F.; et al. 2001; Plaza, H. C., 2003).

Novedosamente para la elución de columnas con biomasa de *Acremonium* y *Aphanocladium*, el ácido sulfúrico biogenerado presentó uno de los mejores perfiles de elución sin agresividad para la biomasa empaquetada, compitiendo en su elección con otras soluciones ya caracterizadas y más utilizadas en la actualidad, como se ha citado.

Particularmente, el ácido sulfúrico biogenerado (recuperado de cultivos de bacterias acidófilas *Acidithiobacillus thiooxidans*) ha sido utilizado en numerosos procesos de biolixiviación (Rawlings, D., 1997; Pereyra, V., 2006; Di Nanno, M.P. 2003) en biohidrometalurgia (Rawlings, D., 1997; Bosecker, K., 1997^a; Bosecker, K., 1997^b) en biorremediación y a escala piloto para la recuperación de metales de pilas alcalinas (Cerruti, C. et al., 1998).

Éste último, representa una alternativa sumamente económica para procesos de lixiviación ácida, ya que su obtención es continua a partir de un cultivo con mínimos requerimientos:

- ✓ Se realiza a temperatura ambiente
- ✓ Contenido mínimo de sales, ya que se utilizan microorganismos autótrofos
- ✓ Mínimos requerimientos de esterilidad, dadas las condiciones extremas de crecimiento
- ✓ Posibilidad de utilizar agua de red (Di Nanno, M.P, 2003).
- ✓ Cinética fácilmente controlable, a partir de pH o titulación ácido- base.
- ✓ Microorganismos no patógenos.
- ✓ La solución ácida se recupera por filtración

Conclusiones

1. Se aislaron dos especies fúngicas de ocurrencia ambiental, *Acremonium* sp. y *Aphanocladium* sp. potencialmente aplicables a procesos de biorremediación.

El hecho de que ambas especies sean de ocurrencia ambiental (aisladas como contaminantes de un cultivo) presenta la ventaja adicional de no patogenicidad al ser humano.

No son hongos filamentosos, facilitando aún más su cultivo a diferentes escalas.

La recuperación de biomasa es sencilla, mediante un paso de filtración.

Las características del grupo al cuál pertenecen (mitospóricos) hacen simple y fácil su cultivo, dada la ausencia de una fase sexual, evitando la generación de condiciones óptimas para la producción de esporas a utilizar como inóculo y la presencia de dimorfismos durante un proceso. Sin embargo, debe cuidarse el ámbito de trabajo dada la volatilidad de los conidios y la concomitante contaminación de otros cultivos, bacterianos o fúngicos, o la contaminación cruzada entre cultivos de *Acremonium* y *Aphanocladium* para la conservación de *stocks*.

2. *Acremonium* y *Aphanocladium* presentaron parámetros óptimos de producción en biorreactor.

Las velocidades específicas de crecimiento obtenidas, son comparables con la de otros microorganismos utilizados a nivel industrial, fortaleciendo su aptitud para la producción.

3. *Acremonium* y *Aphanocladium* presentaron parámetros óptimos de adsorción de uranio(VI) en batch, a pH 3.6.

Las capacidades de adsorción obtenidas para la biomasa seca a pH 3.6 son óptimas, comparadas con las obtenidas para otros organismos de uso común en biosorción.

4. Ambas especies presentaron similar perfil de adsorción en flujo continuo a pH 2.5 y 3.6.

A pesar de que se observó reducción considerable en la adsorción a pH 3.6, el uso de la biomasa de una u otra especie empaquetada en columnas es indistinto, lo mismo que el pH de operación de las mismas (2.5 o 3.6).

5. La mejor solución extractante probada para la recuperación del uranio retenido en la biomasa fue H_2SO_4 0.2N biogenerado.

H_2SO_4 0.2N biogenerado y HCO_3^- 0.25 M presentaron los mejores perfiles de extracción. Sin embargo, la elución con H_2SO_4 biogenerado conservó la estructura de la biomasa, siendo menos agresivo.

El uso de éste último, permitiría más ciclos de carga y elución para la biomasa empaquetada en las condiciones ensayadas.

6. Es necesaria la implementación de un pre- tratamiento para mejorar la operación en flujo continuo,

Un pre- tratamiento adecuado permitiría mejorar los tiempos de retención de las columnas y evitar la variabilidad estructural de la biomasa a lo largo de los sucesivos ciclos de operación.

Expectativas de desarrollo a futuro

Lo presentado en esta sección, constituye un aporte en la lista de organismos potencialmente utilizables en procesos de biosorción.

La optimización de las características de la biomasa, influirá en la factibilidad de un proceso a flujo continuo con biomasa seca o incluso, con biomasa viable. Como se mencionó oportunamente, es necesaria la implementación de pre- tratamientos o uso de soportes para la mejora del proceso de adsorción en continuo⁷. La disposición de un número de columnas en serie, también permitiría la mejora en la eficiencia de un proceso de adsorción a flujo continuo.

Por último, a nivel de investigación básica es interesante la caracterización de los mecanismos moleculares activados en relación a la resistencia a uranio observada a bajos valores de pH en este trabajo.

⁷ Con respecto a la consideración de los resultados obtenidos en la presente tesis, se ha desprendido un trabajo de investigación doctoral dedicado a la caracterización de las interacciones de la biomasa fúngica con arcillas como posibles soportes, potencialmente aplicables a procesos de biosorción.

Conclusión general

En términos generales, en este trabajo se han estudiado dos procesos potencialmente aplicables como técnicas de biorremediación: *Biorreducción* (llamado también *Bioestabilización*) y *Biosorción*.

- 1- Los resultados obtenidos indican que *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Acidithiobacillus ferrooxidans* son microorganismos potencialmente aplicable en procesos de biorreducción de uranio
- 2- *Acremonium sp.* y *Aphanocladium sp.* representan otra opción para la utilización de microorganismos en procesos de biosorción.

Como punto en común, y en función de los resultados obtenidos, ambos procesos pueden ocurrir en condiciones de aerobiosis.

La posibilidad de diseñar procesos en estas condiciones ofrece ventajas operativas y económicas: fácilmente controlable y operable, con bajos costos en insumos.

Particularmente, los organismos utilizados (especies bacterianas y fúngicas) no son patógenos para el ser humano.

El proceso de biorreducción (en sus dos modalidades: en aerobiosis o en anaerobiosis) es útil en diseños de tratamiento *in situ*, por ejemplo, para grandes volúmenes de efluentes líquidos o para estabilización de metales en acuíferos subterráneos (McCullough, J. et al., 1999).

El proceso de biosorción, es uno de los más utilizados en la industria, y por lo tanto más caracterizado. Diseños a flujo continuo, por ejemplo, con biomasa de algas invasivas (*Sargassum sp.*) son elegidos como alternativa a procesos de purificación con resinas sintéticas de intercambio iónico.

La biosorción, es utilizada (casi excluyentemente) en procesos *ex situ*.

Las diferencias nombradas, sumando la necesidad de mayor caracterización del proceso de biorreducción de uranio mediado por *Acidithiobacillus sp.*, hacen imposible establecer un juicio de valor sobre el mejor proceso a emplear para la remediación de uranio.

En todos los casos, superados los no menos importantes detalles inherentes a la caracterización de cada proceso, la mejor elección dependerá de la situación del efluente a remediar, los recursos económicos y el tiempo en el cuál se esperan resultados satisfactorios.

A nivel académico y de investigación básica, el presente trabajo se considera como fuente de aportes considerables, siendo el primero en reportar indicios del fenómeno de biorreducción en condiciones aeróbicas.

Asimismo, se ha estandarizado la cuantificación de uranio por un método no destructivo y altamente sensible, como es la Espectrometría Gama.

Bibliografía

Akhtar, K.; Akhtar, M.; Kalid, A. (2007). Removal and recovery of uranium from aqueous solutions by *Trichoderma harzianum*. *Water Research* , 41, 1366- 1378.

Anderson, R.; Lovley, D. (2002). Microbial redox interactions with uranium: an environmental perspective. En M. Keith- Roach, & F. Livens (Edits.), *Interactions of microorganisms with radionuclides* (págs. 205- 222). Elsevier Science.

Antunes, S.C.; de Figueiredo, D.R.; Marques S.M.; Castro, B.; Pereira, R.; Gonçalves F. (2007). Evaluation of water column and sediment toxicity from an abandoned uranium mine using a battery of bioassays. *Science of The Total Environment* , 374 (2), 252- 259.

Apex Minerals NL. (s.f.). Recuperado el 31 de 08 de 2009, de <http://www.apexminerals.com>

BHP Billiton. Recuperado el 17 de Noviembre de 2009, de www.bhpbilliton.com.

BV Sorbex. Inc. Recuperado el 11 de Septiembre de 2009, de www.bvsorbex.net.

Baes, C.; Mesmer, R.,. (1976). *The Hydrolysis of Cations*. New York, USA.: Wiley Interscience.

Barkay, T.; Schaefer, J. (2001). Metal and radionuclide bioremediation: issues, considerations and potentials. *Current Opinion in Microbiology* , 4, 318-323.

Bengtsson, L.; Johansson, B.; Hackett, T.; Mc Hale, L.; Mc Hale, A. (1995). Studies in the biosorption of uranium by *Talaromyces emersonii* CBS 814.70 biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 42, 807- 811.

Boonstra, J.; van Lier, R.; Jansen, G.; Dijkman, H.; Busiman, C. (1997). Biological treatment of acid mine drainage. *International Bihydrometallurgy Symposium*.

¹Bosecker, K. (1997). Microbial leaching in environmental clean- up programmes. *International Bihydrometallurgy Symposium* , 533- 536.

²Bosecker, K. (1997). Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews* , 20, 591- 604.

Bredberg, K.; Karlson, H.; Holst, O. (2004). Reduction of vanadium (V) with *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Bioresurse Technology* , 92, 93- 96.

Brierley, C. (1997). Mining Biotechnology: Research to Comercial Development and Beyond. En D. Rawlings, *Biomining: Theory, Microbes and Industrial Processes*. Springer.

Brock, T. D.; Gustafson, J. (1976). Ferric iron reduction by sulfur- and iron- oxidizing bacteria. *Applied Environmental Microbiology* , 32, 567- 571.

Brock, T.; Madigan, M. (1993). *Microbiología* (6ta. ed.). Prentice Hall Hispanoamericana.

- Brodzinski, R.; Miley, H.; Reeves, J.; Avignone III, F. (1990). Further reduction of radioactive backgrounds in ultrasensitive germanium spectrometers. *Nuclear Instrumental Methods* , *A292*, 337-342.
- Cabrera, G.; Viera, M.; Gómez, J. M.; Cantero, D.; Donati, E. (2007). Baterial removal of chromium(VI) and (III) in a continuous system. *Biodegradation* , *18*, 505- 5113.
- Cerruti C.; Curutchet, G.; Donati, E. (1998). Bio-dissolution of Spent Nickel- Cadmium Batteries using *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Biotechnology* , *62* (3), 209- 219.
- Chen, B.; Liu, H. L.; Chen, Y. W.; Cheng, Y. C. (2004). Dose- response assessment of metal toxicity upon indigenous *Thiobacillus thiooxidans* BC 1. *Process Biochemistry* , *39* (6), 1- 12.
- Chen, J.L.; Lin, W.S.; Tzean, S.S. (1999). *Aphanocladium macrosporum* sp. nov. from Taiwan. *Botanic Bulletin Academia Sinica* *40*, 333-336. Taipei. Taiwan.
- Compañía Minera Quebrada Blanca*. (s.f). Recuperado el 31 de 08 de 2009, de <http://www.qblanca.cl/>
- Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología*. Recuperado el 24 de Noviembre de 2009 de <http://www.argenbio.org>
- Curutchet, G. (1996). *Comparación de dos especies del género Thiobacillus en la biolixiviación de sulfuros metálicos*. Universidad Nacional de La Plata , Facultad de Ciencias Exactas.
- Curutchet, G.; Pogliani, C.; Donati, E. (1995). Indirect bioleaching of covellite by *Thiobacillus thiooxidans* with an oxidant agent. *Biotechnology Letters* , *11* (17), 1251- 1256.
- Curutchet,G., Donati,E.; Pogliani, C; Tedesco, P. (1992). Effect of iron (III) and its hidrolisis products (jarosites) on *Thiobacillus ferrooxidans* growth and on bacterial leaching. *Biotechnology Letters* , *14* (4), 329-334.
- Das,A.; Modak, J.; Natarajan, K. (1998). Surface chemical studies of *Thiobacillus ferrooxidans* with reference to cooper tolerance. *Antonie van Leeuwenhoek* , *73*, 215– 222.
- Devers,M.;Rouard, N.; Martin-Laurent, F. (2008). Fitness drift of an atrazine-degrading population under atrazine selection pressure. *Environmental Microbiology* , *10* (3), 676- 684.
- Di Gregorio, D.E.; Huck, H.; Aristegui, R.; De Lazzari, G.; Jech, A. (2004). 137Cs contamination in tea and yerba mate in South America. *Journal of Environmental Radioactivity* , *76* (3), 273- 281.
- ¹DiSpirito, A.; Tuovinen, O. (1982). Uranous Ion Oxidation and Carbon Dioxide Fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Archives of Microbiology* , *113*, 28- 32.
- ²DiSpirito, A.; Tuovinen, O. (1982). Kinetics of Uranous Ion and Ferrous Iron Oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Archives of Microbiology* , *113*, 33- 37.
- Donati, E.; Curutchet, G.; Pogliani, C.; Tedesco, P. (1996). Bioleaching of covellite using pure and mixed cultures of *Thiobacillus ferrooxidans* an *Thiobacillus thiooxidans*. *Process Biochemistry*, *31* (2), 129- 134.

- Donati, E.; Martínez, L.; Curutchet, G. (2003). Immobilisation and growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on refractory clay tiles. *Proceedings of International Symposium Biohydrometallurgy 2003*. Atenas, Grecia.
- Donati, E.; Oliver, C.; Curutchet, G. (2000). Chromium(VI) reduction by two species of *Thiobacilli*. En M. Sánchez, F. Vergara, & F. Castro (Edits.), *Environmental Improvements in Mineral Processing and Extractive Metallurgy*. Chile: University of Concepción.
- Elias, D.; Senko, J.; Krumholz, L. (2003). A procedure for quantitation of total oxidized uranium for bioremediation studies. *Journal of Microbiological Methods*, 53, 343- 353.
- Erikson, L.E.; Minkevich, I.G.; Eroshin, V.K. (1978). Application of mass and energy balance regularities in fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* 20, 1595-1621
- Estrada Rendon, C.; Amara, G.; Leonard, P.; Tobin, J. Roussy, J.; Degorce- Dumas, J. (1997). Acid Mine Drainage (AMD) treatment by Sulfate Reducing Bacteria. *International Biohydrometallurgy Symposium*.
- Ganesh, R.; Robinson, K.; Lingling, C.; Kucsmas, D.; Reed, G. (1999). Reductive precipitation of uranium by *Desulfovibrio desulfuricans*: evaluation of cocontaminant effects and selective precipitation. *Water Research*, 33 (16), 3447-3458.
- Genç, Ö.; Yalçinkaya, Y.; Büyüktuncel, E.; Denizli, A.; Arica, M.Y.; Bektas, S. (2003). Uranium recovery by immobilized and dried powdered biomass: characterization and comparison. *International Journal of Mineral Processing*, 68, 93-107.
- Gonzalez Muñoz, M.; Merroun, M.; Ben Omar, N.; Arias, J. (1997). Biosorption of uranium by *Myxococcus xanthus*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 40 (2), 107- 114.
- Groudev, S.; Georgiev, P.; Spasova, I.; Komnitsas, K. (1997). Bioremediation of a soil contaminated with radioactive elements. *International Biohydrometallurgy Symposium*, (págs. 627-633).
- Haferburg, G.; Reinicke, M.; Merten, D.; Büchel, G.; Kothe, E. (2007). Microbes adapted to acid mine drainage as source for strains active in retention of aluminum or uranium. *Journal of Geochemical Exploration*, 92, 196-204.
- Ibañez, P.; Umetsu, Y. Removal of heavy metals using alginate beads. En M. Sanchez, F. Vergara, & S. H. Castro (Edits.), *Waste Treatment and Environmental Impact in the Mining Industry* (págs. 49-58). Chile: University of Concepción.
- Inc., V. N. (Ed.). *Standar Methods of Chemical Analysis* (6ta. edición ed., Vol. 1). Furman. Kalin, M.; Wheeler, W.N; Meinrath, G. (2005). The removal of uranium from mining waste water using algal/ microbial biomass. *Journal of Environmental Radioactivity*, 78, 151- 177.
- Kashefi, K.; Lovley, D. (2000). Reduction of Fe(III), Mn(IV), and Toxic Metals at 100°C by *Pyrobaculum islandicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (3), 1050–1056.
- Kelly, D.P.; Wood, A.P. (2000). Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated *Acidithiobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic Evolution Microbiology*, 50, 511-516.

Kurttio, P.; Kumulainen, H.; Leino, A.; Salonen, L.; Auvinen, A.; Saha, H. (2005). Bone as possible target of chemical toxicity of natural uranium in drinking water. *Environmental Health Perspectives* , 113, 68- 72.

Lancey, D. T.; Lawson, F. (1970). Kinetics of the liquid-phase oxidation of acid ferrous sulphate by the bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnology and Bioengineering* , 12, 29- 50.

Lodi, A.; Del Borghi, M.; Ferraiolo, G. (1989). Biological leaching of inorganic materials. *Advances in Biotechnological Processes* , 12, 133- 158.

¹ Lovley, D.; Phillips, E.; Gorby, Y.; Landa, E. (1991). Microbial Reduction of Uranium. *Nature* , 350, 413-416.

² Lovley, D. and Phillips, E. (1992). Reduction of Uranium by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Applied and Environmental Microbiology* , 850- 856.

³ Lovley, D.; Phillips E. (1992). Bioremediation of Uranium Contamination with Enzymatic Uranium Reduction. *Environmental Science and Technology* , 2228-2234.

⁴ Lovley, D.; Widman, P.; Woodard, J.; Phillips, E. (1993). Reduction of Uranium by Cytochrome c3 of *Desulfovibrio vulgaris*. *Applied and Environmental Microbiology* , 59 (11), 3572-3576.

⁵ Lovley, D.; Coates, J. (1997). Bioremediation of metal contamination. *Current Opinion in Biotechnology* , 8, 285-289.

⁶ Lovley, D.; Lloyd, J. (2001). Microbial detoxification of metals and radionuclides. *Current Opinion in Biotechnology* , 12, 248-253.

Macaskie, L. (1991). The application of biotechnology to the treatment of wastes produced from nuclear fuel cycle: biodegradation and bioaccumulation as means of treating radionuclide-containing streams. *Critical Reviews in Biotechnology* , 11 (1), 41- 112.

Mc McCullough, J.; Hazen, T.; Benson, S. (1999). Bioremediation of metals and radionuclides: What it is and How it Works. Lawrence Berkeley National Laboratory. LBNL Paper LBNL-42595. Recuperado de: <http://escholarship.org/uc/item/8s57v0cs>. 17/02/2010.

Mehta, T.; Coppi, M. V.; Childers, S. E.; Lovley, D. (2005). Outer membrane c-type cytochromes required for Fe(III) and Mn(IV) oxide reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *Applied and Environmental Microbiology* , 71 (12), 8634–8641.

Meinrath, G. (1998). *Aquatic Chemistry of Uranium. A review focusing on environmental chemistry*. Alemania: Freiberg University.

Meinrath, G.; Volke, P.; Helling, C.; Dudel, G.; Merkel, B.J. (1999). Determination and interpretation of environmental water samples contaminated by uranium mining activities. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* , 364, 191- 202.

- Merkel, B.; Hurst, S.; Löhnert, E.H.P.; Struckmeyer, W. (1995). Uranium mining and hidrogeology. *GeoCongress, 1*. Sven von Loga, Köln.
- Mills, C. The role of micro-organisms in acid rock mine drainage. Recuperado el 24 de Noviembre de 2009 de <http://technology.infomine.com>
- Moulds Facts*. Recuperado el 24 de Noviembre de 2009 de <http://www.mouldfacts.ca>
- National Center for Environmental Assessment, O. o. (1999). *U.S. Environmental Protection Agency*. Recuperado el 2005.
- Noubactep, C.; Meinrath, G.; Dietrich, P.; Merkel, B. (2003). Mitigating uranium in groundwater: Prospects and limitations. *Environmental Science and Technology*, 37, 4304- 4312.
- Novo, M. T.; Da Silva, A.; Moreto, R.; Cabral, P.; Costacurta, A.; García, O. (2000). *Thiobacillus ferrooxidans* response to copper and other heavy metals: growth, protein synthesis and protein phosphorylation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 77, 187–195.
- Ohmura, N.; Sasaki, K.; Marsumoto, N.; Saiki, H. (2002). Anaerobic respiration using Fe³⁺, S⁰ and H₂ in the chemolithoautotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology*, 184 (8), 2081- 2087.
- Pagnanelli, F.; Trifoni, M.; Beolchini, F.; Esposito, A.; Toro, L.; Veglio, F. (2001). Equilibrium biosorption studies in single and multi-metal systems. *Process Biochemistry*, 83 (2), 115- 124.
- Paranhos Gazineu, M.H.; Arruda de Araújo, A.; Batista Brandão, Y.; Hazin, C.A.; O. Godoy, de J.M. (2005). Radioactivity concentration in liquid and solid phases of scale and sludge generated in the petroleum industry. *Journal of Environmental Radioactivity*, 81, 47- 54.
- Payne, T.E.; Edisb,R.; Fenton, B.R.; Waite, T.W. (2001). Comparison of laboratory uranium sorption data with ‘in situ distribution coefficients’ at the Koongarra uranium deposit, Northern Australia. *Journal of Environmental Radioactivity*, 57 (1), 35- 55.
- Peck, H.D. (1968). Energy Coupling mechanisms in chemolithotrophic bacteria. *Annual Reviews in Biochemistry* 22, 489- 518.
- Pirt, J. (1975). *Principles of Microbe and Cell Cultivation*. Londres: Blackwell Scientific Publications.
- Pronk, J. T.; De Bruyn, J. C.; Bos, P.; Kuenen, J. G. (1992). Anaerobic growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (7), 2227- 2230.
- Pronk, J. T.; Liem, K.; Bos, P.; Kuenen, J. G. (1991). Energy transduction by anaerobic ferric iron respiration in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied Environmental Microbiology*, 57, 2063- 2068.
- (2005). *Proyecto de Restitución Ambiental de la Minería del Uranio (PRAMU)*. Comisión Nacional de Energía Atómica.
- Quintana, M.; Curutchet, G.; Donati, E. (2001). Factors affecting chromium (VI) reduction by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biochemical Engineering Journal*, 9, 11- 15.

- Rawlings, D. E. (1997). *Biomining: Theory, Microbes and Industrial Processes*. Springer- Verlag.
- Sar, P.; Sufia, K.; D'Sousa, S. (2004). Radionuclide remediation using a bacterial biosorbent. *International Biodeterioration and Biodegradation* , 54, 193- 202.
- Savvin, S. (1961). Analytical use of Arsenazo III. Determination of thorium, zirconium, uranium and rare earth elements. *Talanta* , 8, 673- 685.
- Snell, Foster Dee; Snell, Cornelia T; Snell, Chester Arthur. *Colorimetric methods of analysis including photometric methods*.
- Sobecky, P.; Schell, M.; Moran, M.A.; Hodson, R. (1992). Adaptation of model genetically engineered microorganisms to lake water: growth rate enhancements and plasmid loss. *Applied and Environmental Microbiology* , 58 (11), 3630- 3637.
- Spear, J. R.; Figueroa, L.; Honeyman, B. (2000). Modeling Reduction of Uranium U(VI) under Variable Sulfate Concentrations by Sulfate- Reducing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* , 66 (9), 3711-3721.
- Steudel, R. (1989). On the nature of the "elemental sulphur" (S₀) produced by sulfur-oxidizing bacteria. A model for S₀ globules. En H. G. Schegel, & B. Bowien (Edits.), *Biology of Autotrophic Bacteria* (págs. 289-303). Science Tech Publication.
- Takeuchi, M.; Negishi, A.; Nakamura, S.; Kanao, T.; Kamimura, K.; Sugio, T. (2005). Existence of an iron-oxidizing bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* resistant to organomercurial compounds. *Journal of Bioscience and Bioengineering* , 99 (6), 586–591.
- Ting, Y.; Wong, S.; Senior, E.; Wu, H. (2001). Metal leaching of fly ash from incineration wastes by *Thiobacillus ferrooxidans*. En *Biobidrometallurgy: Fundamentals, Technology and sustainable Development. Part B*.
- Toxicological Profile for Uranium*. (1999). Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta.
- Tsezos, M. (2009). Metal- microbes interactions: beyond environmental protection. En E. Donati, M. Viera, E. Tavani, M. Giaveno, T. Lavallo, & P. Chiacciarini (Ed.), *Biobidrometallurgy: a Meeting Point Between Microbial Ecology, Metal Recovery Processes and Environmental Remediation. Proceedings of the 18th. International Biobidrometallurgy Symposium* (págs. 527-532). Argentina: Trans Tech Publications.
- Tuovinen, O.; Kelly, D. (1974). Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. II: Toxicity of uranium to growing cultures and tolerance conferred by mutation, other metal cations and EDTA. *Archives of Microbiology* , 95, 153-164.
- U.S Environmental Protection Agency. (s.f). Recuperado el 2005, de www.epa.gov/radiation/radionuclides/uranium
- University of Adelaide. Mycology online. Recuperado el 24 de noviembre de 2009 de <http://www.mycology.adelaide.edu.au>

Viera, M.; Curutchet, G.; Donati, E. (2003). A combined bacterial process for the reduction and immobilization of chromium. *International Biodeterioration and Biodegradation* , 52 (1), 31- 34.

Volesky, B. (2007). Biosorption and me. *Water Research* , 41, 4017- 4029.

Wall, J.; Krumholtz, L. (2006). Uranium Reduction. *Annual Review in Microbiology* , 60, 149-166.

Wilkinson, Cotton. (1980). *Química Inorgánica Avanzada* (4ta. Edición ed.). Limusa.

World Information Service on Energy- Uranium Project. (s.f.). Recuperado el 2008, de <http://www.wise-uranium.org/index.html>

Yang, J.; Volesky, B. (1999). Biosorption of uranium on *Sargassum biomass*. *Water Research* , 33 (15), 3357- 3363.

Yong, P.; Eccles, H.; Macaskie, L.E. (1996). Determination of uranium, thorium and lanthanum in mixed solutions using simultaneous spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta*. (329), 173-179.

Anexo I

Trabajos de difusión

1. Publicaciones internacionales

Curutchet, G.; Di Gregorio, D.E.; Fernández Niello, J.O.; Gargarello, R.; Huck, H.; Somacal, H. (2007). Applications of the gamma detection technique in environmental sciences. VI Latin American Symposium on Nuclear Physics and Applications (Oct. 3-7, 2005) Iguazú, Argentina. AIP Conf. Proc. 884, 492.

Gargarello, R.; Cavallitto, S.; DiGregorio, D.; Fernández Niello, J.; Huck, H.; Pardo, A.; Somacal, H.; Curutchet, G. (2008). Characterization of uranium(VI) sorption by two environmental fungal species using gamma-ray spectroscopy. *Environmental Technology*. 29 (12), 1341- 1348.

Gargarello, R.; Di Gregorio, D. E.; Fernández Niello, J. O.; Huck, H.; Somacal, H.; Curutchet, G. (2009). Estudio de la biorreducción de uranio(VI) por bacterias autótrofas monitoreado por emisión gama. En: *Química y Toxicología Ambiental en América Latina*. Tercer Libro Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC). En prensa.

Gargarello, R.; Di Gregorio, D.; Huck, H.; Fernandez Niello, J.; Curutchet, G. (2009). Aerobic reduction of uranium(VI) by *Acidithiobacillus thiooxidans* cultures. En: *Biohydrometallurgy: a Meeting Point Between Microbial Ecology, Metal Recovery Processes and Environmental Remediation*. Donati, E.; Viera, M.; Tavani, E.; Giaverno, M.; Lavalle, T.; Chiacchiarini, P. (Eds.). Trans Tech Publications.

Gargarello, R.; Di Gregorio, D.; Huck, H.; Fernandez Niello, J.; Curutchet, G. (2009). Aerobic reduction of uranium(VI) by *Acidithiobacillus thiooxidans* cultures. *Advanced Materials Research* 71- 73, 641- 644. On line en [http//www.scientific.net](http://www.scientific.net) desde Mayo 2009.

Gargarello, R.; Di Gregorio, D.; Huck, H.; Fernandez Niello, J.; Curutchet, G. (2009). Reduction of uranium(VI) by *Acidithiobacillus sp.* *Biohydrometallurgy*. En revisión.

2. Presentaciones a congresos

Gargarello, R.; Pardo, A., Cavalitto, S., Di Gregorio, D., Somacal, H., Fernández Niello, J., Huck, H., Curutchet, G. Aislamiento, cultivo y caracterización del potencial de biosorción de radionúclidos de hongos de ocurrencia ambiental (Poster). *Workshop Internacional sobre Microbiología Ambiental*. Universidad Estadual do Campinas. Campinas. Brasil. 2005.

Gargarello, R., Di Gregorio, D., Fernández Niello, J., Huck, H., Somacal, H., Curutchet, G. Estudio de la biorreducción de uranio(VI) por bacterias autótrofas monitoreado por emisión gama (Poster). VII Congreso Setac LA. Universidad Andrés Bello. Santiago. Chile. 2005.

Curutchet, G., Di Gregorio, D., Fernández Niello, J., Gargarello, R., Huck, H., Somacal, H. Applications of the gamma detection technique in environmental sciences. VI Latin American Symposium on Nuclear Physics and Applications. Iguazú. Argentina. 2005.

Gargarello, R., Curutchet, G. *Acremonium* sp y *Aphanocladium* sp. : Posible aplicación tecnológica para remediación de efluentes contaminados con uranio(VI). (Poster). IV Congreso Argentino de Microbiología. SAMIGE. Buenos Aires. Argentina. 2007.

Gargarello, R.; Huck, H.; DiGregorio, D.; F. Niello, J.; Cavallito, S.; Curutchet, G. Biosorción de uranio por hongos acidófilos. (Presentación oral). V Congreso Iberoamericano de Física y Química Ambiental. Mar del Plata. Argentina. 2008.

Gargarello, R.; Di Gregorio, D.; Huck, H.; Fernandez Niello, J.; Curutchet, G. Aerobic reduction of uranium(VI) by *Acidithiobacillus thiooxidans* cultures. (Poster). 18th International Biohydrometallurgy Symposium. Bariloche. Argentina. 2009.

Anexo II

Simbolos utilizados

Ci g⁻¹: Curie por gramo

μg: microgramo

mg l⁻¹= miligramo por litro

g l⁻¹= gramo por litro

eq l⁻¹= equivalente por litro

p/v= peso en volumen

v/v= volumen en volumen

cel. ml⁻¹= células por mililitro

Cmol= carbono mol

mmol= mili mol

h= hora

Anexo III

Indice de figuras

Figura nº	Página	Figura nº	Página
1	8	30	74
2	19	31	74
3	20	32	75
4	21	33	75
5	22	34	77
6	23	35	77
7	23	36	78
8	38	37	79
9	39	38	80
10	39	39	86
11	45	40	88
12	45	41	91
13	46	42	92
14	49	43	93
15	50	44	99
16	56	45	99
17	57	46	103
18	58	47	105
19	59	48	111
20	60	49	112
21	62	50	113
22	63	51	117
23	64	52	120
24	66	53	120
25	66	54	124
26	69	55	125
27	69	56	125
28	71		
29	72		

Anexo IV

Indice de tablas

Tabla nº	Página
1	7
2	37
3	38
4	43
5	46
6	50
7	51
8	51
9	52
10	53
11	54
12	56
13	70
14	87
15	100
16	101
17	100
18	106
19	112
20	114
21	121
22	122
23	123

Anexo V

Indice de ecuaciones

Ecuación nº	Página	Ecuación nº	Página
1	11	25	76
2	11	26	76
3	17	27	80
4	18	28	95
5	24	29	96
6	25	30	96
7	27	31	96
8	27	32	96
9	28	33	97
10	28	34	97
11	28	35	97
12	29	36	102
13	29	37	102
14	29	38	102
15	30	39	102
16	30	40	103
17	30	41	103
18	33	42	108
19	40	43	108
20	40	44	108
21	40	45	109
22	40	46	118
23	40	47	118
24	41		

El presente trabajo ha sido realizado en el Laboratorio de Análisis Ambiental,
Escuela de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de San Martín.

El desarrollo del mismo ha sido posible gracias a la financiación del
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)
y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.



Universidad
Nacional de
Quilmes



Universidad
Nacional de
San Martín

AGENCIA



CONICET



Imágenes de tapa

Segundo plano

Superior: Vista del Complejo Fabril Malargüe, Mendoza, Argentina. (Procesamiento de minerales de uranio).

Inferior: Dique y pileta de tratamiento de efluentes. Complejo Minero Fabril Los Gigantes, Córdoba, Argentina.

Primer plano

Superior izquierda: Fotografía electrónica de *Acremonium* sp.

Inferior derecha: Fotografía electrónica de *Acidithiobacillus ferrooxidans*