

Euskarrien hautaketa eta erabilera biomekanizazio eraginkorragoa

lortzeko

(Support selection and application to improve biomachining efficiency)

Arrate Santaolalla^{1*}, Junkal Gutierrez², Astrid Barona³, Naiara Rojo¹

¹Ingeniaritza Kimikoa eta Ingurumenaren Ingeniaritza Saila, Vitoria-Gasteizko Ingeniaritza

² Ingeniaritza Kimikoa eta Ingurumenaren Ingeniaritza Saila, Gipuzkoako Ingeniaritza

³ Ingeniaritza Kimikoa eta Ingurumenaren Ingeniaritza Saila, Bilboko Ingeniaritza Eskola,

^{1,2,3} Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)


LABURPENA: Prozesu mikrobiologiko kontrolatua den biomekanizazioari esker mikroegiturak sor daitezke pieza metalikoen gainazalean kalte termikorik edo mekanikorik eragin gabe. Edozein bioprozesutan bezala, biomekanizazioan ere mikroorganismoak aktibo mantentzeak garrantzi handia du, bakterioek oxidatzailea (burdina ferrikoa) birsortzen baitute, prozesuak era ziklikoan aurrera egin dezan. Zelula aktiboaren dentsitatea handitzeko eta biomasaren ordezkapena errazteko asmoz, euskarrietan immobilizatu ohi dira mikroorganismoak, eta horretarako, matrize egokien gainean finkatu edo barruan sartu behar dira zelulak. Beraz, immobilizaziorako euskarri-material aproposa aukeratzea funtsezko erabakia da, biomekanizazioaren eraginkortasuna erabat alda dezakeelako. Ikerketa lan honetan, *Acidithiobacillus ferrooxidans* bakterioaren immobilizazioaren bideragarritasuna aztertu da eta horretarako hainbat material prestatu dira laborategian. Guztien artean, haren propietate bikainetan oinarrituta, zelulosa bakterianoa aukeratu da euskarri aktiboaren prestaketa-prozesuaren operazio-baldintzak optimizatzeko. Azkenik, biomasa immobilizatuaren eraginkortasuna egiaztatzeko kobrezko pieza bat biomekanizatu da biozelulosazko euskarri aktiboa erabiliz.

HITZ GAKOAK: Biomekanizazioa, immobilizazioa, euskarriak, bideragarritasun-protokoloa, birsortze-prozesua

ABSTRACT: Biomachining is a controlled microbiological process that can be used to engrave microstructures with no thermal or mechanical damage to the surface of the metal piece. As in every biological process, it is crucial to keep the microorganisms active, as they are responsible for the oxidant (ferric iron) regeneration that enables the process to proceed cyclically. In order to increase the density of active cells and facilitate biomass replacement, the microorganisms are usually immobilized on support materials, which requires adapted protocols to fix or insert the cells into suitable carriers. Therefore, the choice of the ideal carrier for immobilization purposes is an overriding decision, as it can completely alter the efficiency of the biomachining process. In this research work, several materials have been prepared in the laboratory to study the feasibility of immobilization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* bacteria. On the basis of its outstanding properties, the bacterial biocellulose has been selected among all the tested materials, and it has been used to optimize the operating conditions of the active support preparation process. Finally, the active biocellulose support material has been used for biomachining a copper piece, so that the efficiency of the immobilization strategy can be assessed.

KEYWORDS: Biomachining, immobilization, support material, feasibility-protocol, regeneration process

1

***Harremanetan jartzeko/ Corresponding author:** Arrate Santaolalla, Ingeniaritza Kimikoa eta Ingurumenaren Ingeniaritza Saila, Vitoria-Gasteizko Ingeniaritza Eskola, UPV/EHU.  <https://orcid.org/0000-0002-1091-1241>, arrate.santaolalla@ehu.eus.

Nola aipatu / How to cite: Santaolalla, Arrate; Gutierrez, Junkal; Barona, Astrid; Rojo, Naiara. (2024). <<Euskarrien hautaketa eta erabilera biomekanizazio eraginkorragoa lortzeko>>, Ekaia, 47, xx-xx. (<https://doi.org/10.1387/ekaia.26839>)

Jasoa: uztailak 30, 2024; Onartua: urriak 24, 2024

ISSN 0214-9001-eISSN 2444-3225 / © 2024 UPV/EHU



Obra Creative Commons Atribución 4.0 Internacional-en lizentziapean dago

1. SARRERA

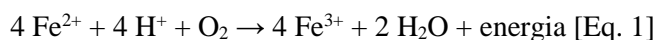
Mikrofabrikazioaren industriak berebiziko garrantzia du gaur egun, giza bizitzari eusten dioten gailu ugari garatzen baititu, hala nola sentsoareak, eragingailuak eta transduktoreak [1]. Hala ere, mikrofabrikazioko ikerketaren joera gero eta zuzenduago dago fabrikazio ekologikora. Izan ere, modu jasangarrian ekoizturiko materialen eskaria gero eta handiagoa da giza beharrak asetzeko eta bizi-kalitatea hobetzeko nahian [2,3].

Testuinguru horretan, biomekanizazioa erabili da azken urteotan mikromekanizazio-metodo tradizionalen aukera gisa pieza metalikoak (bereziki, kobrea) erabiltzen dituzten prozesuetan. Biomekanizazioa prozesu mikrobiologiko kontrolatua da, non mikroorganismoen laguntzari esker, pieza solidoen metalak oxidatu eta disolbatu egiten diren era ziklikoan [4]. Horrela, mikroegiturak sor daitezke materialari kalte termikorik edo mekanikorik eragin gabe [5].

Bioerauzketa-prozesuaren indargune nagusiak haren iraunkortasun eta eraginkortasun handiak, energia-kontsumo txikia eta ekipamendu- eta mantentze-baldintza errazak dira. Mekanizazio biologikoaren beste abantaila bat geometria eta funtzionaltasun desberdineko piezak lortzeko moldakortasuna da [6-8].

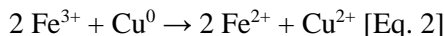
Biomekanizazioan erabiltzen diren mikroorganismo-motei dagokionez, *Acidithiobacillus ferrooxidans* (*A. ferrooxidans*) aztertuenaren izan da [1,2,9,10]. Mikroorganismo extremofilo honen erresistentzia-mailak eta gaitasun metabolikoek abantaila nabarmenak eskaintzen dituzte; adibidez, metal-kontzentrazio handietan biziraun dezake. Gaitasun horiek, industria-mailan baldintza gogorretan jarduteko gaitasuna ahalbidetuko lukete, prozesuaren kontrol zorrotzen beharra eta kostuak potentzialki murriztuz [11].

A. ferrooxidans bakterio kimiolitotrofikoa da eta, beraz, hazteko behar duen energia burdina ferrosoa (Fe^{2+}) burdina ferrikora (Fe^{3+}) oxidatuz [Eq. 1] lor dezake ingurunea azidoa denean [12-14].



Mikroorganismoek lagundutako biomekanizazioan erauzketa-mekanismo nagusia zeharkakoa da, hau da, prozesua bakterioen eta solidoaren arteko kontaktu fisikorik gabe gertatzen da [15-17]. Horrela, metala ioi ferrikoaren (agente oxidatzailearen) eraginez oxidatzen da [Eq. 2] eta bakterioek etengabe birsortzen dute metalaren disoluzioaren erantzule den agente oxidatzailea [Eq. 1]. Beraz, teorian,

oxidatzailea ez da inoiz agortzen eta etengabeko erauzketa ahalbidetzen da ingurunean kobre metalikoa dagoen bitartean edo bakterioak inaktibatu egiten ez diren bitartean [Eq. 1-2] [18,19].



A. ferrooxidans-en hazkuntzan burdina ferrosoaren oxidazioak energia eta hidrogeno-ioiak sortzen ditu [Eq. 1] eta ondorioz, hazkunde-ingurunearen pH-a handitu egiten da denboran zehar. Bakterio-hazkuntzako ingurunean pH azidoa mantentzea funtsezkoa da jarosita bezalako hauspeakinik ager ez dadin ($\text{MFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$) [20]. Jarosita prezipitatuaren pilaketak burdina ferriko disolbatuaren eskuragarritasunaren murrizketa ekar lezake [21].

Sistema biologiko orok bezala, prozesuak hainbat faktoreren eragina jasaten du: tenperatura, pH-a, agitazio-abiadura, bakterio-kontzentrazioa, eta inhibitzaileen presentzia [2,22,23]. Gainera, pieza metalikoen biomekanizazioaren kasu zehatzean, burdina-kontzentrazioa, hauspeakinen sorrera, tratamendu-denborarekin metala erauzteko tasaren aldaketa, eta gainazal-akaberaren kalitatea eta zimurtasuna kontuan hartu beharreko parametroak dira.

Parametro horien guztien artean, bakterio-dentsitateak garrantzi handia du, bakterioek burdina ferrosoa burdina ferrikora oxidatzeko behar duten denbora zehazten baitu [24]. Sistema biologikoetan zelula-dentsitatea handitzeko asmoz, mikroorganismoak euskarrietan immobilizatu ohi dira. Immobilizazioa zelulak matrize baten gainean finkatzea edo barruan sartzea da; horrela, zelulen galera eragozten da substratuen eta produktuen difusioa ahalbidetu behar dela kontuan hartuta [25,26].

Immobilizazioaren erabilerak zelula libreen (esekiduran) aukerarekin alderatuta abantaila potentzialak ditu, besteak beste, egonkortasun eta aktibitate handiagoak eta ordezkapena errazagoa. Biomasa immobilizatua hainbat helburutarako aplikatu ohi da, bai laborategian, bai industria-eskalan, hala nola esnearen, edarien eta elikagaien industrian, biodieselaren ekoizpenean, farmakoen ekoizpenean, nekazaritza-industrian, hondakin-uren tratamenduan eta medikuntzan [27-34]. Erabilitako materialen artean 1. taulan laburbildutakoak aipa daitezke.

1. taula. Biomاسaren immobilizazioan erabilitako hainbat material.

Mikroorganismoa	Euskarria	Erabilera	Egilea
<i>Isochrysis galbana</i>	Alginato gela	Ur-disoluzioen Cr(III)-aren biosortzioa	[27]
<i>Aspergillus niger lipase</i>	Poliestirenoa	Biodieselaren sintesia	[28]

<i>enzyme cocktail</i>	Kitosano perlak	Zukuen klarifikazioa	[29]
<i>Trametes versicolor laccase</i>	Arrautzaren mintza	Azido siringikoaren eliminazioa	[30]
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Polibinil alkohola	Azido laktikoaren ekoizpena	[31]
<i>A. ferrooxidans</i>	Kotoizko gasa	Zirkuitu inprimatuko plaken biolixibiazioa	[32]
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Biozelulosa	Azido zitrikoaren ekoizpena	[33]
<i>Lactobacillus spp.</i>	Biozelulosa	Urdail-zukuen eta behazun-gatzen disoluzioa aurkako babesa	[34]

Hala ere, oraindik hainbat erronkari aurre egin behar zaio, hala nola, euskarri-matrizearen egonkortasuna hobetzea, substratu-masaren eta oxigenoaren transferentzia indartzea eta immobilizazio-materialen toxikotasuna murriztea.

Beraz, ikerketa honen helburua *A. ferrooxidans* bakterioa immobilizatzeko hiru euskarrien potentziala aztertzea da, egokitutako bideragarritasun-protokoloa aplikatuz. Euskarririk egokiena hautatu ostean, immobilizazio-protokoloa eta operazio-baldintzak optimizatu nahi dira kobrezko pieza baten biomekanizazioa eraginkorragoa eta azkarragoa izan dadin.

2. MATERIALAK ETA METODOAK

2.1. Mikroorganismoak eta hazkuntza-ingurunea

Burdinaren biooxidazio-prozesurako aukeratutako bakterioa *A. ferrooxidans* izan zen, DSM 14882 anduaia, bere biosegurtasun-mailagatik eta metal kontzentrazio altuak jasateko duen gaitasunagatik.

Mikroorganismoa Silvermanek eta Lundgrenek erabilitako hazkuntza-ingurunean hazi zen [35]. Ingurune hori ondoko bi disoluzioak nahastuz prestatu zen: alde batetik, mantenugaiak dituen gatz ez-organikoen disoluzioa (3,0 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄; 0,5 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O; 0,5 g L⁻¹ K₂HPO₄; 0,1 g L⁻¹ KCl; 0,01 g L⁻¹ Ca(NO₃)₂·4H₂O) eta, bestetik, energia-iturria (Fe²⁺ ioia) duen sulfato ferroso heptahidratatuaren (FeSO₄·7H₂O) disoluzioa. Aipatzekoa da burdinaren hasierako bi kontzentrazio erabili zirela: 6 eta 9 g Fe²⁺ L⁻¹ (6K eta 9K hazkuntza-inguruneak, hurrenez hurren). Hazkuntza-ingurunekeo pH-a 1,7-1,8-ko gehieneko baliora doitu zen azido sulfurikoa (H₂SO₄) gehituz (% 25 v:v).

2.2. Euskarriak eta horien aukeraketarako protokoloa

Bakterioen euskarri gisa jardun zezaketen eta, horrela, horiek immobilizatzen lagun zezaketen hiru material hautatu eta laborategian sintetizatu edo eratu ziren: bakterio-zelulosa edo biozelulosa (BZ), polibinil alkohola (PVA) eta zelulosa-triazetatoa (ZTA). Ondoren, konparaketa egin ahal izateko, material guztiak 4,6-4,8 cm²-ko kanpo-gainazala izan zezaten moztu edo prestatu ziren.

2.2.1. Euskarrien prestaketa

Bakterio-zelulosa mintzak. BZ laborategian biosintetizatu zen *Gluconacetobacter xylinus* bakterioa erabiliz. BZ mintza uretan disolbatutako panela eta anana zituen inguruneari (% 13 m:v) % 1 inokulo gehituz lortu zen. 25 eguneko hartzidura prozesua burutu ostean (baldintza estatikoetan, 28 °C, pH = 3,5) 0,7 cm-ko lodiera zuen BZ mintza lortu zen [36]. Erabili aurretik BZ mintza sodio hidroxido soluzio urtsua erabiliz garbitu zen, giro-tenperaturaren eta agitazio orbitalarekin (24 ordu). Azkenik, ur desionizatuan murgildu zen pH-a erabat neutralizatu arte [37]. Garbiketa-prozesuaren ondoren, BZ mintz (hidrogel) erabat zuria lortu zen.

Polibinil alkohol hidrogelak. PVA komertziala erabili zen hidrogelak prestatzeko (Mm 130000 g mol⁻¹, Sigma-Aldrich). Lehenik eta behin, % 5 eta % 10 PVA m:v zituzten disoluzio urtsuak prestatu ziren (95 °C, 3 orduz irabiatuz). Ondoren PVA soluzio homogeneoak Petri plaka banara isuri ziren giro-tenperaturaren hoztu arte. Bi teknika erabili ziren PVA hidrogelak sintetizatzen: Freeze-Thawing (FT, izoztu-desioztu zikloak) eta Freeze-Drying (FD, liofilizazioa). FT metodoan [38] guztira 3 ziklo burutu ziren, 24 orduko izozketak (-21 °C) eta 3 orduko epelketak (25 °C) tartekatuz. Prozedura honek PVA domeinuen kristalizazioa sustatzen du eta, ondorioz, egonkortasun mekaniko handiagoa duten hidrogelak lortzea ahalbidetzen du [39,40]. Aldiz, FD metodoan, PVA disoluzioak 24 orduz izoztu (-21 °C) ondoren liofilizazio-ekipoan (Alpha 1_4LD Martin Christ modelo) sartu ziren, -85 °C-an eta 0,1 mbar-ean.

Zelulosa-triazetatoa. Kaiser et al.-ek [41] argitaratutako prozedura abiapuntutzat hartuz zelulosa-triazetato (ZTA) mintzak prestatu ziren ZTA eta azetona (% 99,5, Panreac) erabiliz. Hasteko, % 10 (m:v) ZTA kontzentrazioa zuen disoluzioa prestatu zen. Ondoren, 20,5 g kaltzio karbonatorekin (% 99,5, Panreac) eta 8,8 g glizerolekin (% 99, Labkem) nahastu zen irabiagailu magnetikoa erabiliz. Lortutako polimero likidoa 1-2 mm-ko lodierako beira lau batean zabaldu eta 5 minutuz lehortzen utzi ostean, 0,25 M HCl (% 99) bainuan 10 minutuz murgildu zen kontu handiz. Prozedura honen bidez, kaltzio karbonatoa disolbatu eta ondorioz, CO₂ burbuilak askatu ziren, poroak eratuz. Jarraian, lortutako mintza ur desionizatuko bainuan sartu zen beste 10 minutuz eta, azkenik, erauzi eta paper xurgatzailean jarri zen, mintz porotsu lehorra lortu arte (M-ZTA).

Bestalde, zelulosa-triazetato esferak (E-ZTA) ere fabrikatu ziren, aurretik prestatutako ZTA disoluzioa (% 10 m:v) erabiliz. Kasu honetan, azetonaren lurruntzeak eragindako burbuilei esker poroak lortu ziren, 2,5 mL soluzio 95 °C-an zegoen ur-desionizatuan murgilduz. Esferak eskuz biribildu ziren eta labean (T = 45 °C) sartu ziren azetona erabat lurrundu arte. Azkenik, lortutako esferen sailkapena egin zen, pisu eta tamainaren arabera. Ikerketa-lan honetarako, batez beste 4,6±0,4 cm²-ko azalera zuten esferak aukeratu ziren.

2.2.2. Euskarria aukeratzeko protokoloa

Bideragarritasun-protokoloa diseinatu zen prestatutako bost euskarrietan (BZ, FD-PVA, FT-PVA, M-ZTA eta E-ZTA) *A. ferrooxidans* bakterioa immobilizatzeko gaitasuna aztertzeko. Prozedura elkarren segidako hainbat etapaz osatuta egon zen, 2. taulan laburtu den bezala. Etapa guztiak agitazio orbitala erabiliz (130 bira min⁻¹) burutu ziren. Bigarren eta hirugarren etapetan prozesuaren ondorioz pH-aren igoera gertatu zenean, balioa 1,7-1,8-ra doitu zen. Etapa hauetan mikroorganismoen hazkuntza Fe²⁺-aren oxidazioa neurtuz konprobatu zen.

Etapa bakoitzeko helburua lortu ez zuten materialak zuzenean baztertu ziren, eta besteak hurrengo etapara igaro ziren.

2. taula. Bideragarritasun-protokoloaren etapak eta operazio-baldintzak.

Etapa	Helburua	Operazio baldintzak
Materialaren degradazioa	Materiala hazkuntza-ingurunean murgiltzean degradatu da?	Materialak 9K hazkuntza-ingurunean sartu. ✓ 24 ordu ✓ Bakterio-inokulaziorik ez
Mikrobioen hazkundera	Materialak mikrobioen hazkundera eragin kaltegarririk du?	Euskarriak 9K hazkuntza-ingurunean murgildu. ✓ <i>A. ferrooxidans</i> inokulua (% 5 v:v) ✓ T = 31 °C
Immobilizazioa	Mikrobioek euskarria kolonizatu dute?	Aurreko urratsean erabilitako euskarriak disoluziotik atera, 9K hazkuntza-ingurune "garbian" sartu. ✓ T = 31 °C

2.3. Mikroorganismoen immobilizazio-protokoloa eta operazio-baldintzen aukeraketa

Bideragarritasun-protokoloa bete zuten materialetariko bat aukeratu zen mikroorganismoen immobilizazio protokoloa eta operazio-baldintzen optimizazioa burutzeko. Kontrol moduan, beste saiakuntza bat egin zen zelulak esekiduran (finkatu gabe) zeudela.

Hasteko, bakterioak immobilizatzeko protokoloari ekin zitzaion (immobilizazio fasea). Prozedura hori euskarriak hazkuntza-ingurunean murgiltzearekin hasi zen, hazkuntza-ingurunearen bolumenaren (HIB-aren) eta materialen kanpo-gainazalaren (KG-ren) arteko 1:0.2 ml:cm² erlazioan. Gero, *A. ferrooxidans* kultiboa inokulatu zen (%5 v:v, hazkunde esponentzialeko fasean) eta burdinaren erabateko oxidazioa gertatu arte inkubatu zen (T = 31 °C; pH = 1,8; agitazio orbitala = 130 bira min⁻¹).

Ondoren, immobilizazio fasean erabilitako euskarriak (euskarri aktiboak, EAKTIBak) mikroorganismoak egoki immobilizatuta zituela egiaztatu zen. Horretarako, aurreko fasean erabilitako EAKTIB bera hazkuntza-ingurune garbian murgildu zen, beste inokulaziorik gabe, eta burdinaren erabateko oxidazioa gertatu arte inkubatu zen. EAKTIB bakoitza ondoz-ondoko bi oxidazio-prozesutan erabili zen. Entseguak 2. taulan jasotako baldintzetan gauzatu ziren, EAKTIBak prozesua osatzeko behar zuen denbora murrizten zituzten baldintzak hautatzeko helburuarekin.

2. Taula. Burdinaren biooxidazio-entseguetan erabilitako operazio-baldintzak, EAKTIB erabiliz. Entsegu guztietan T = 31 °C eta pH = 1,8 izan zen.

Entsegua	Operazio-baldintza			
	Agitazio-modua	HIB:KG erlazioa (mL:cm ²)	Hasierako [Fe ²⁺] (g L ⁻¹)	Agitazio-abiadura (bira min ⁻¹)
Agitazio-modua	Orbitala	1:0,2	6	130
	Lineala	1:0,1		
HIB:KG erlazioa	Orbitala	1:0,2	6	130
		1:0,3		
		1:0,6		
Hasierako [Fe ²⁺]	Orbitala	1:0,6	6	130
			9	
Agitazio-abiadura	Orbitala	1:0,6	9	130
				170

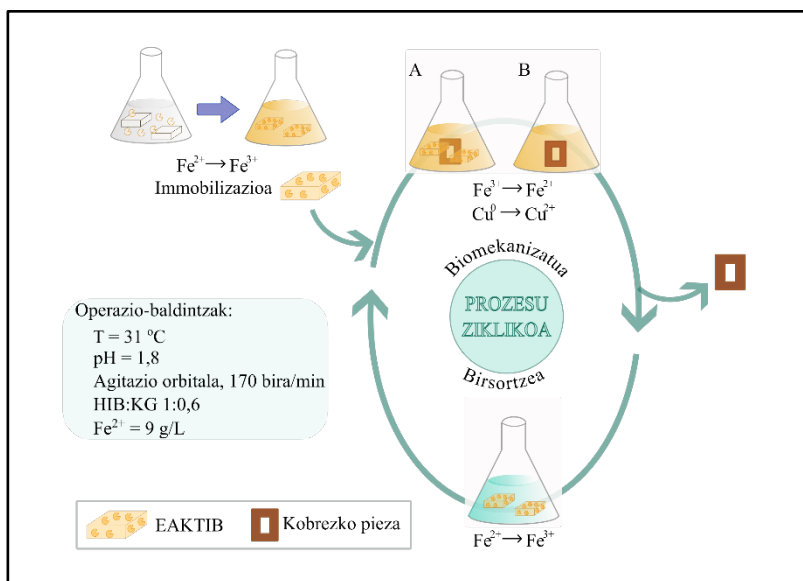
HIB:KG erlazioari eta agitazio-abiadurari dagokionez, ez zen erlazio eta balio altuagorik aukeratu baldintza bortitzegiek materiala kaltetu zezaketelako.

2.4. Immobilizatutako mikroorganismoen erabilera: kobrezko piezen biomekanizazioa

Biozelulosazko EAKTIBak erabili ziren kobrezko piezak biomekanizatzeke. Horretarako, lehenik eta behin, kobrezko piezak honela prestatu ziren: egitura angeluzuzeneko maskara itsasgarri bat piezaren gainazal bati (20 mm luze x 7 mm zabal) itsatsi zitzaion eta beste gainazala berniz-babeslearekin estali zen.

Ondoren, piezak honako ondoz ondoko etapaz osatutako biomekanizazio-prozesuari jarraituz tratatu ziren (1. irudia):

1. Immobilizazioa. EAKTIBak prestatu ziren, 2.3. puntuan azaldutako protokoloa jarraituz.
2. Biomekanizazioa. Aurreko etapan sortutako ingurune likidoan murgildu zen kobrezko pieza, bi orduz. Disoluzioan EAKTIBak egoteak gainazal metalikoaren eta burdin ioien arteko kontaktua zaildu edota jarositaren eraketa erraztu dezakeenez, ikerketa honetan bi konfigurazio desberdin probatu ziren. Lehenengoan (A aukera), biomekanizazioa EAKTIBaren presentzian egin zen eta bigarrean (B aukera), aldiz, EAKTIBa hazkuntza-ingurunetik atera zen biomekanizazio-etaparen aurretik.
3. Oxidatzailearen (Fe^{3+} -aren) birsortzea. Metalezko pieza disoluziotik atera zen eta aurreko etapan sortutako Fe^{2+} -a (bio)oxidatu zen EAKTIBa erabiliz; hau da, EAKTIBan immobilizatutako mikroorganismoen metabolismoaren ondorioz Fe^{2+} -a Fe^{3+} -ra oxidatu zen.



1. irudia. Biomekanizazio ziklikoaren prozesuaren eskema

Hiru urratseko prozesua osatu ondoren, metal-pieza bera birsortutako disoluzioan murgildu zen, eta prozesuaren 2. eta 3. pausoak lau aldiz errepikatu ziren EAKTIBak hainbat zikloen ostean burdina oxidatzeko duen gaitasuna zehazteko helburuarekin. Prozesuan zehar, pH-aren balioa 1,7-1,8-ra doitu zen.

2.5. Metodo analitikoak

Burdinaren kontzentrazioa (Fe^{2+} eta $\text{Fe}_{\text{totala}}$) espektrofotometriaren bidez neurtu zen, 2,2/dipiridilo metodoa jarraituz (Jenway 6305) [42]. Absortzio atomiko bidezko espektrofotometria erabili zen burdina kontzentrazio totala kuantifikatzeko (Perkin Elmer AAnalyst 100 AAS). pH-a (Crison Basic 20, pH SENSION + 5010 T elektrodoak) eta oxidazio-erredukzio potentziala (Thermo-Orion 920+) ere neurtu ziren.

Biomekanizazio-prozesuan, piezan sortutako mikroegituraren altuera profil-neurgailuarekin (DektakXT, Alemania) eta piezaren masa balantzarekin (Denver, SI-234 230 g/0,1 mg) neurtu ziren. Metalaren erauzketa-tasa espezifikoak (ETE) kalkulatu ziren [Eq. 3], grabatze-prozesuaren eraginkortasuna kuantifikatzeko.

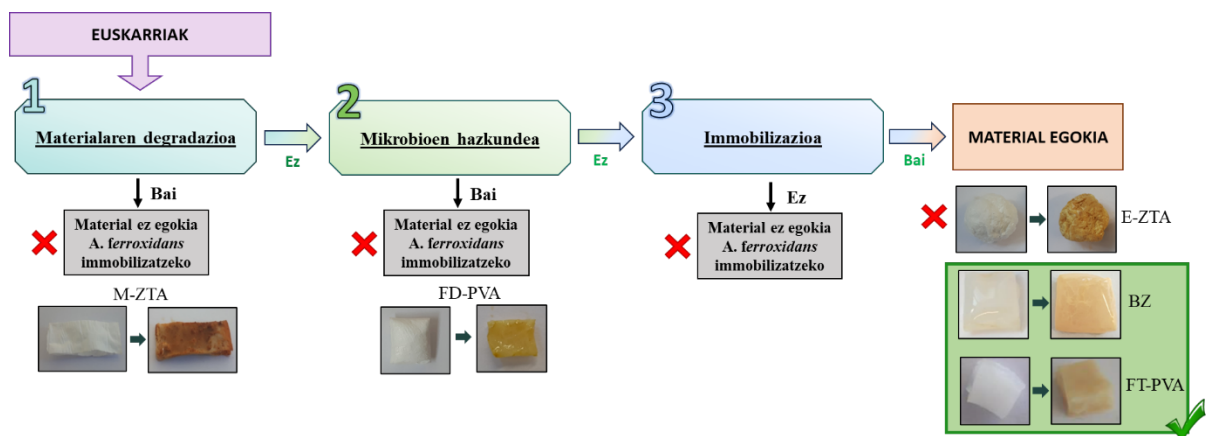
$$\text{ETE (mg h}^{-1} \text{ cm}^{-2}) = \frac{\text{Erauзитako metal-masa (mg)}}{\text{denbora (h) azalera (cm}^2\text{)}} \quad [\text{Eq. 3}]$$

3. EMAITZAK

3.1. Euskarriaren aukeraketa

Euskarrien hautaketari dagokionez, 2. irudian bideragarritasun-protokoloan lortutako emaitzak eta euskarrien argazkiak (protokoloa aplikatu aurretik -ezkerrezko argazkiak- eta ondoren -eskuineko argazkiak) bildu dira. Irudi horretan erakusten denez, 9K hazkuntza-inguruneak M-ZTAren integritate fisikoa kaltetu zuen (begibistaz), eta FD-PVAk bakterioen hazkuntza galarazi zuen (ez zen oxidazio-aktibitatekerik detektatu mikroorganismoak esekiduran zeudenean). Bestalde, bakterioak E-ZTA esferatan arrakastaz immobilizatu ziren; hala ere, material horren gainazalean marroi koloreko hauspeakin ugari agertu zen. Prezipitatu hori bateragarria izan daiteke jarosita gisa identifikatutako konposatuarekin [43]. Jarosita agertzeak burdinaren galera eta tratatu beharreko metalen gainazala estaltzeko arriskua ekar lezake, metalaren disoluzioa eragotziz eta bakterio-jarduera kaltetuz.

Beraz, FT-PVA eta BZ hidrogelak izan ziren protokoloaren baldintza guztiak bete zituzten materialak (2. irudia). BZk ezaugarri kimiko eta fisiko paregabeak ditu eta, ondorioz, material funtzional berri gisa erakarri ohi du arreta hainbat aplikazio bioteknologikotean [44,45]. BZk daukan propietate nabarmenen artean daude, adibidez, geruza anitzeko egitura, erresistentzia mekaniko, azalera espezifiko eta porositate handia, edo biodegradagarritasuna [46-48]. Horregatik, hautatu zen material hori operazio-baldintzak optimizatzeko eta, ondoren, PVA erabili zen bi materialen arteko eraginkortasuna alderatzeko.



2. irudia. Euskarriaren aukeraketarako protokoloaren emaitzak eta materialen argazkiak.

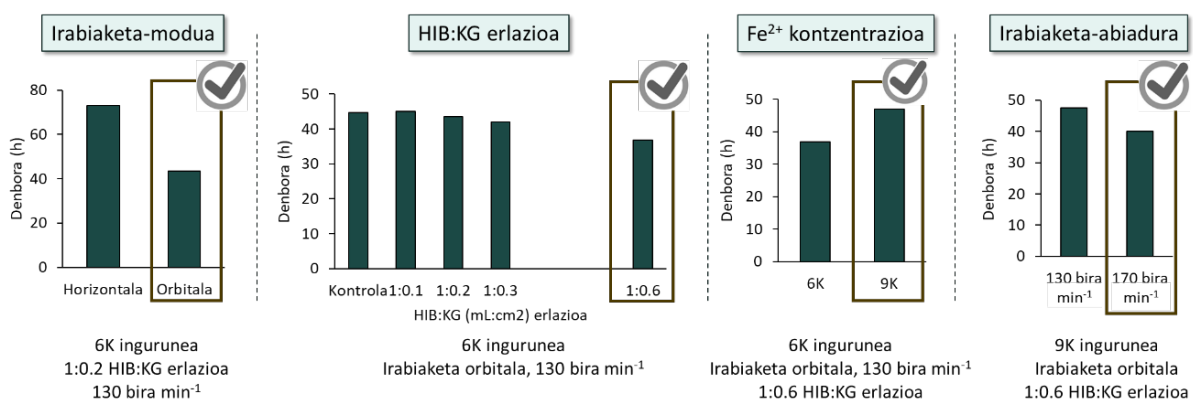
3.2. Mikroorganismoen immobilizazioa eta operazio-baldintzen optimizazioa

Bakterioak BZn immobilizatzeari dagokionez, 79 eta 97 ordu behar izan ziren, hurrenez hurren, 6 eta 9 g L⁻¹ Fe²⁺ biooxidatzeko eta EAKTIBa lortzeko

Operazio-baldintzen optimizazio-entseguetan lortutako emaitzak 3. irudian aurkeztu dira. Burdinaren oxidazioa osatzeko denbora % 40 murriztu zen modu orbitala erabili zenean horizontalarekin alderatuta eta, beraz, agitazio orbitala aukeratu zen hurrengo saiakuntzetarako. Ondoren, burdina ferrosoaren biooxidazioan HIB:KG erlazioaren eragina aztertu zen eta, 3. irudian ikus daitekeen bezala, erlazio horren hazkuntzak 6 g L⁻¹ burdin ferrosoa oxidatzeko behar zen denbora murriztu zuen. Izan ere, material aktiboaren kantitatea handitzeak erreaktorearen barruan ia 8 ordu murriztu zuen Fe²⁺ oxidaziorako behar zen denbora [49]. Gainera, EAKTIBaren erabilerak biooxidazioa osatzeko beharrezko denbora murriztu zuen zelula-esekidurarekin alderatuta (kontrola). Horrela, hautatutako erlazioa 1:0,6 izan zen. Bestalde, espero bezala, ingurunean burdina kontzentrazioa zenbat eta handiagoa izan denbora luzeagoak behar izan ziren erreaktibo guztia oxidatzeko. Hala ere, 9 g L⁻¹ Fe²⁺ erabiltzeak

metalaren erauzketa-tasa handiagoa ekar lezake biolixibiazio- eta biomekanizazio-prozesuetan, oso interesgarria izan litekeena industria-mailan. Azkenik, oxidazio-denbora % 15 murriztu zen agitazio-abiadura 130 bira min^{-1} -tik 170 bira min^{-1} -ra igo zenean, euskarri-materialaren eta hazkuntza-ingurunearen arteko kontaktu eraginkorragoari egotz dakiokoena. Beraz, azken balio hori hautatu zen hurrengo entseguetarako.

Hortaz, BZrekin lan egiteko erabili beharreko baldintza operatibo egokienak hauek izan ziren: 170 bira min^{-1} agitazio orbitala, 9 g L^{-1} Fe^{2+} eta 1:0,6 hazkuntza-ingurune bolumena eta materialaren azaleraren arteko erlazioa.



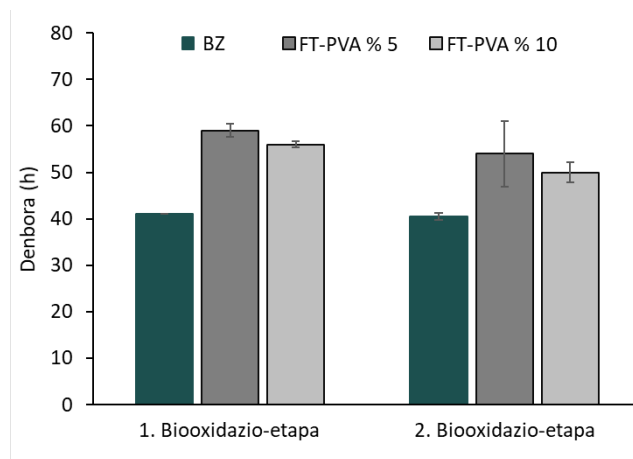
3. irudia. Operazio-baldintzen eragina Fe^{2+} -aren biooxidazioan.

Azkenik, EAKTIBarekin eta zelula-esekidurarekin 9 g L^{-1} Fe^{2+} oxidatzeko behar den denbora alderatu zen. Hautatutako operazio-baldintzetan, biomasa immobilizatua erabiltzean prozesua % 30 azkarragoa zela ondorioztatu zen esekitako biomasaren alternatiban baino. Beraz, BZ euskarria behin betiko hautatu zen burdinaren biooxidazio denbora murrizteko aukerarik egokiena bezala. Izan ere, dagoeneko, onddoak, legamiak, entzimak edo bakterioak immobilizatzeko euskarri gisa erabil daitekeela frogatu da. Adibidez, Ton eta Le ikertzaileek [50] determinatu zuten BZn immobilizatutako *Saccharomyces Cerevisiae* legamiak, legamia askeak baino jarduera metaboliko hobeak erakusten zituela 10 ziklo hartidura eten errepikatuaren ondoren. Chen eta lankideek [51] aurkitu zuten BZn immobilizatutako *Tramete Versicoloren* lakasa fungikoak jatorrizko jardueraren % 69 mantentzeko gaitasuna zuela zazpi aldiz berrerabili ondoren, eta Tamek eta Huongek [52] zortzi aldiz erabili ahal izan zituzten BZn immobilizatutako zelulak hartidura errepikatuak egiteko. Gainera, Żywicka eta langileek [33] 2020an egindako ikerketa batek frogatu zuen azido zitrikoaren kontzentrazio globala handiagoa izan zela

Yarrowia lipolytica immobilizatueta suspentsioan baino (121-129 g/L eta 99-110 g/L, hurrenez hurren).

Aipatu bezala, FT-PVA ere *A. ferrooxidans* bakterioa immobilizatzeko material gisa erabiltzeko hautaketa-protokoloan ezarritako baldintza guztiak bete zituen. Horrenbestez, BZ aktiboak eta FT-PVA aktiboak burdin ferrosoa biooxidatzeko duten gaitasuna alderatzeko saiakuntza bat egin zen. FT-PVA hidrogela, bi kontzentrazio desberdinekin, % 5 eta % 10 (m:v), BZ aktiborako ezarritako baldintza operatibo egokienetan erabili zen.

Bakterioen immobilizazioaren ondoren, FT-PVA aktiboa erabiltzean burdina ferrosoa biooxidatzeko behar den denbora neurtu zen. Biooxidazioaren ondoz ondoko bi etapatan behar izan zen biooxidazio-denbora irudikatu da 4. irudian. Ondoriozta daiteke prozesua azkarragoa izan zela BZ aktiborekin PVA aktiborekin baino, FT-PVAREN kontzentrazioa edozein izanda ere. Lortutako emaitza biozukulosak duen hiru dimentsioko sarearen egiturari egotz dakioke, horrek zelulen immobilizazioa eragin baitezake.



4. irudia. Fe²⁺ oxidazio-denbora bi biooxidazio etapatan BZ eta FT-PVA aktiboak erabiltzen direnean.

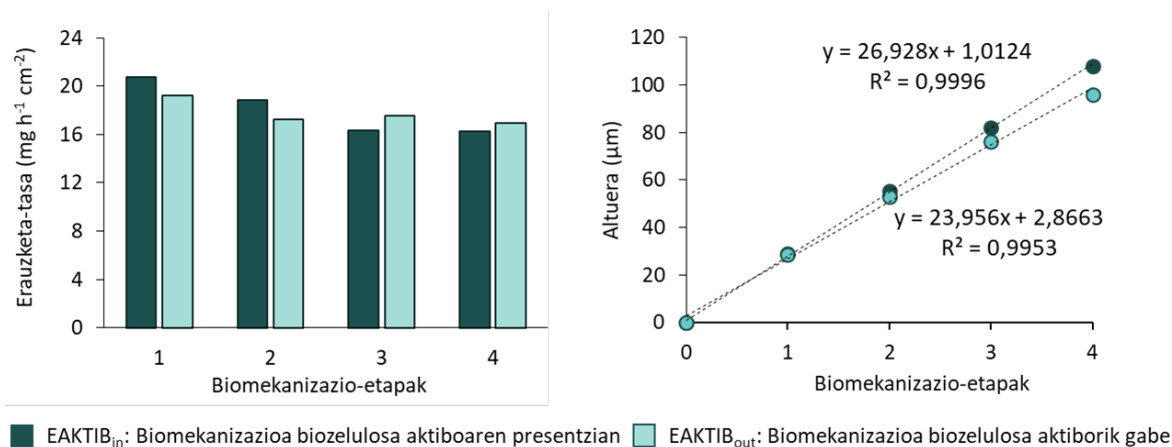
3.3. Immobilizatutako mikroorganismoen erabilera: kobrezko piezen biomekanizazioa

Konfigurazio operatiboak biomekanizazio-prozesuan duen eragina aztertu nahian, bi funtzionamendu-modu desberdin aztertu ziren EAKTIBa erabiliz: alde batetik, biomasa immobilizatu eta kobrezko pieza batera sartu ziren disoluzioan biomekanizazioa egiteko (EAKTIB_{in}) eta, bestetik, biomasa immobilizatu disoluziotik atera ostean egin zen piezaren biomekanizazioa (EAKTIB_{out}).

Metalaren ETEaren balioak behera egin zuen biomekanizazio-etapek aurrera egin ahala (5. irudia). Murrizketa hori, Fe^{3+} -aren galeraren eta ingurunean disolbatutako kobreakon kontzentrazioaren igoeraren ondorio izan daiteke. Haatik, grabatutako egituraren altuera linealki handitu zen biomekanizazio prozesuan zehar (5. irudia).

Bi konfigurazioak ($\text{EAKTIB}_{\text{in}}$ eta $\text{EAKTIB}_{\text{out}}$) konparatuz, entsegu bien ETE balioak oso antzekoak izan ziren. Izan ere, gehieneko balioa lehenengo etapan lortu zen, eragiketa modua edozein izanda ere. Ondoren, ia konstante mantendu zen biomekanizazioaren ondoz ondoko hiru etapatan, $\text{EAKTIB}_{\text{out}}$ erabili zenean. Aitzitik, balio horrek pixka bat behera egin zuen $\text{EAKTIB}_{\text{in}}$ erabili zenean. Portaera hori kobrezko piezaren gainazalaren eta oxidatzailearen arteko kontaktu okerragoari egotz dakioko, erreaktorearen barruan BZ aktibo zatiak baitzeuden. Hala ere, haien arteko aldea % 1.7 baino ez zen izan.

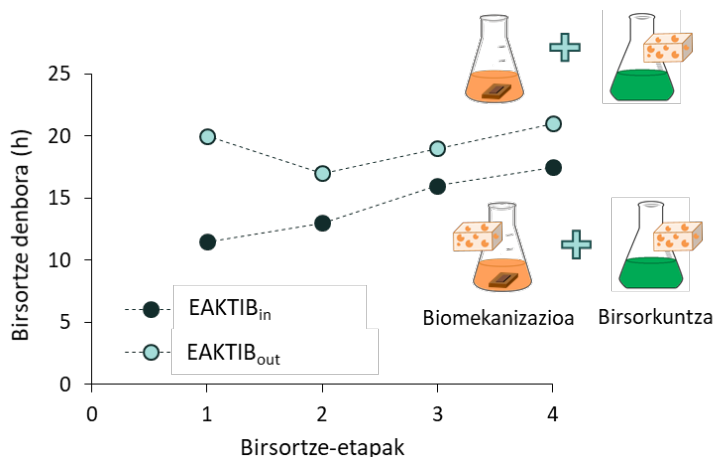
Bestalde, moldean lortutako altuerak konparatuz, prozesuaren bukaeran balio handiagoak lortu ziren $\text{EAKTIB}_{\text{in}}$ esperimentuetan (% 12 handiagoak) beste aukerarekin konparatuta.



5. irudia. ETEaren eta grabatutako egituraren altueraren eboluzioa immobilizatutako biomasa erabiliz.

Haatik, oxidatzailearen birsortze denbora laburragoak behar izan ziren kobreakon biomekanizazioa EAKTIB -ren presentzian (6. irudia). Hori mikroorganismo immobilizatuak metalaren presentziara ondo egokitu izanari egotz dakioko. Aitzitik, $\text{EAKTIB}_{\text{out}}$ piezak kobrea zuen erreaktorean berriro sartu zirenean, bakterioek denbora gehiago behar izan zuten ingurunera egokitzeko, eta horrek oxidatzailearen birsortze-prozesua moteldu zuen. Emaitza horiek bat datoz beste autore batzuek ondorioztatutakoarekin, mikroorganismoek metal ezberdinekiko duten tolerantzia handitu egin daitekeela baitiote, hazkundera

metalak duen presentziara egokitzen badira [53,54]. Oro har, denbora gutxiago behar izan zen EAKTIB_{in} sistemarekin hautatutako geometriaren biomekanizazioa burutzeko (% 32 laburragoa).



6. irudia. Fe²⁺ oxidatzeko behar den denbora, birsortze-etapa bakoitzaren ondoren.

Lortutako emaitzek erakusten dute biomekanizazio-etapen artean birsorkuntza-etapak sartzea estrategia arrakastatsua dela disoluzioaren oxidazio-ahalmena berreskuratzeko. Estrategia horrek disoluzioaren erabilera-bizitza luzatzea ahalbidetzen du, prozesuan sortutako hondakinak murriztuz.

4. ONDORIOAK

Ikerketa honetan *A. ferrooxidans* bakterioa immobilizatzeko hiru material aztertu ziren: biozelulosa (BZ), polibinil alkohola (PVA) eta zelulosa-triazetatoa (ZTA). Materialak laborategian sintetizatu ziren eta, bideragarritasun-protokoloa aplikatu ostean, BZ hautatu zen hurrengo saiakuntzak egiteko. Beraz, mikroorganismoak BZan immobilizatu ziren, eta euskarri aktibo (EAKTIB) horren operazio-baldintza egokienak zehaztu ziren: 170 bira min⁻¹ agitazio orbitala, 9 g L⁻¹ Fe²⁺ eta hazkuntza-ingurunearen bolumenaren (HIB-aren) eta materialen kanpo-gainazalaren (KG-ren) arteko erlazioa 1:0,6. Baldintza horietan, ondorioztatu zen EAKTIBa erabilia burdina ferrikoaren oxidazioa azkarragoa zela biomasa esekiduran edota PVA aktiboa erabiltzen denean baino.

Azkenik, EAKTIBa erabili zen kobrezko pieza batean geometria bat biomekanizatzeko, hurrenez hurreneko bi etapako prozesu ziklikoa erabiliz. Lehenengo pausuan, EAKTIBa disoluzioan murgildu zen burdina ferrosoa burdina ferriko bihurtzeko eta, bigarrenean, kobrezko pieza aurreko pausuan sortutako disoluzioan murgildu zen biomekanizazioa gerta zedin. Bigarren etapan konfigurazio operatibo bi aztertu ziren: 1) biomekanizazioa EAKTIBaren presentzian (EAKTIB_{in}) egitea eta 2)

bigarren pausoan EAKTIBa erreaktoretik aterata (EAKTIBout) egin zen biomekanizazioa. Kasu bietan, metalaren erauzketa tasa espezifikokoaren eta geometria grabatuaren altueraren balioak antzekoak izan ziren. Hala ere, oxidatzailea birsortzeko behar den denbora laburragoa izan zen EAKTIBin konfigurazioan eta, orokorrean, denbora gutxiago behar izan zen EAKTIBin alternatibian aukeratutako geometria biomekanizatzeko.

ESKER ONAK

Eusko Jaurlaritzaren Hezkuntza Sailak (Unibertsitate eta Ikerketa Sailordetzak) emaniko diru laguntza (IT1633-22) eskertu nahi dute egileek.

5. BIBLIOGRAFIA

- [1] Indianto, M.A., Santoso, I., Istiyanto, J., Jo Ko, T. 2023. «Optimizing Biomachining Material Removal Rate Through Oxygen Addition to the Bacteria's Culture by an Air Supply System». *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing*, **24**, 2239–2247.
- [2] Pradeep, M.; Rajesh, S.; Uthayakumar, M.; Sivaranjana, P.; Syath Abuthakeer, S.; Ravichandran, M.; Kumar Thiagamani, S.M.; Mavinkere Rangappa, S.; Siengchin, S. 2022. «Investigations on the combined effects of Thiobacillus novellus microorganism and process parameters on the biomachining of NiTi». *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1–10.
- [3] Lin, W.; Huang, H.; Shi, W.; Ma, F.; Li, T.; Macleod, I. 2024. «Effect of Jet Velocity on Metal Removal Ability of a Biomachining Solution and Its Mechanism». *Journal of cleaner production*, **434**, 140429.
- [4] Weimin, L., Hui, H., Fei, M. 2022. «Analysis of The Removal Mechanism of Ferroalloy by *Acidithiobacillus ferrooxidans*». *Procedia CIRP*, **110**, 14–19.
- [5] Ma F., Huang H., Cui C., Mater J., 2020. «Biomachining properties of various metals by microorganisms». *Process Technology*, **278**, 116512.
- [6] Kurosaki, Y., Matsui, M., Nakamura, Y., Murai, K., Kimura, T., 2003. «Material processing using microorganisms (an investigation of microbial action on metals)». *Corrosion Engineering*, **46** (1), 322-330.
- [7] Imran, M., Saragih, A. S., Sahar, M. S. U., Ko, T. J. 2017. «Digital Maskless Lithography Capabilities for Surface Texturing with Biomachining». *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, **89**, 3709–3719.
- [8] Taufiqurrakhman, M., Istiyanto, J., Putra, N. 2021. «Application of biomachining on copper for a minichannel heat exchanger». *Thermal Science and Engineering Progress*, **26**, 101128.

- [9] Xenofontos, E., Feidiou, A., Constantinou, M., Constantinides, G., Vyrides, I., 2015. «Copper biomachining mechanisms using the newly isolated *Acidithiobacillus ferrooxidans* B1». *Corrosion Science*, **100**, 642-650.
- [10] Verma P., Sodhi A.K., Bhanot N., 2019. «Application of *Aspergillus Niger* for Biomachining of Aluminium Alloy 4004». In: Agnihotri A., Reddy K., Bansal A. (eds) Sustainable Engineering. Lecture Notes in Civil Engineering, vol 30. Springer, Singapore.
- [11] Wang, Q., Long, H., Wang, H., Lau Vetter, M.C.Y. 2024. «Characterize the Growth and Metabolism of *Acidithiobacillus ferrooxidans* under Electroautotrophic and Chemoautotrophic Conditions». *Microorganisms*, **12**, 590.
- [12] Temple, K.L., Colmer, A.R., 1951. «The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium: *Thiobacillus ferrooxidans*». *Journal of Bacteriology*, **62**, 605-611.
- [13] Quatrini, R., Appia-Ayme, C., Denis, Y., Ratouchniak, J., Veloso, F., Valdes, J., Lefimil, C., Silver, S., Roberto, F., Orellana, O., Denizot, F., Jedlicki, E., Holmes, D.S., Bonnefoy, V. 2006. «Insights into the iron and sulfur energetic metabolism of *Acidithiobacillus ferrooxidans* by microarray transcriptome profiling». *Hydrometallurgy*. **83**, 263-272.
- [14] Zhan, Y., Yang, M., Zhang, S., Zhao, D., Duan, J., Wang, W., Yan, L. 2019. «Iron and sulfur oxidation pathways of *Acidithiobacillus ferrooxidans*». *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **35**, 60.
- [15] Sand, W., Gehrke, T., Jozsa, P-G., Schippers, A. 2001. «(Bio)chemistry of bacterial leaching—direct vs indirect bioleaching». *Hydrometallurgy*, **59**, 159-175.
- [16] Díaz-Tena E, Gallastegui G, Barona A, Rodríguez A, López de Lacalle, L. N., Elías A. 2017. «Biomachining: metal etching via microorganisms». *Critical Reviews in Biotechnology*, **37**, 323-332.
- [17] Monachon, M., Albelda-Berenguer, M., Joseph, E. 2019. «Biological oxidation of iron sulfides. Advances in Applied Microbiology», **107**, 1–27.
- [18] Fashola, M., Ngole-Jeme, V., Babalola, O. 2015. «Diversity of Acidophilic Bacteria and Archaea and Their Roles in Bioremediation of Acid Mine Drainage». *British Microbiology Research Journal*, **8**, 443–456.
- [19] Chen, M., Grégoire, D. S., Bain, J. G., Blowes, D. W., Hug, L. A. 2024. «Legacy copper/nickel mine tailings potentially harbor novel iron/sulfur cycling microorganisms within highly variable communities». *Applied and Environmental Microbiology*, **90**:e00143-24.

- [20] Liu R., Wang W., Zhou W., Cheng H., Zhou H., 2020. «Acid catalysis coupling bioleaching for enhancement of metals removal from waste resin powder». *Journal of Cleaner Production*, **247**, 119-130.
- [21] van Hille, R.P., van Zyl, A.W., Spurr, N.R.L., Harrison, S.T.L., 2010. «Investigating heap bioleaching: effect of feed iron concentration on bioleaching performance». *Minerals Engineering*, **23**, 518-525.
- [22] Muhammad, I., Sana Ullah, S. M., Sup Han, D., Jo Ko, T. 2015. «Selection of optimum process parameters of biomachining for maximum metal removal rate». *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing-Green Technology*, **2**, 307-313.
- [23] Gao, X., Jiang, L., Mao, Y., Yao, B., Jiang, P. 2021. «Progress, Challenges, and Perspectives of Bioleaching for Recovering Heavy Metals from Mine Tailings». *Adsorption Science and Technology*, 9941979.
- [24] Zhu, N., Shi, C., Shang, C. R., Yang, Z., Xu, Z., Wu, P. 2017. «Immobilization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on cotton gauze for biological oxidation of ferrous ions in a batch bioreactor». *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **64**, 727-734.
- [25] Karel, S.F., Libicki, S.B., Robertson, C.R. 1985. «The immobilization of whole cells: Engineering principles». *Chemical Engineering Science*, **40**, 1321–1354.
- [26] Trelles, J.A., Rivero, C.W. 2013. «Whole cell entrapment techniques». *Immobilization of Enzymes and Cells*, 365–374.
- [27] Kadimpati, K., Mondithoka, K., Bheemaraju, S., Challa, V. 2012. «Entrapment of marine microalga, *Isochrysis galbana*, for biosorption of Cr(III) from aqueous solution: isotherms and spectroscopic characterization». *Applied Water Science*, **3**, 85–92.
- [28] Guldhe, A., Singh, P., Kumari, S., Rawat, I., Permaul, K., Bux F. 2016. Biodiesel synthesis from microalgae using immobilized *Aspergillus niger* whole cell lipase biocatalyst». *Renewable Energy*, **85**, 1002-1010.
- [29] Dal Magro, L., Pessoa, J.P.S., Klein, M.P., Fernandez-Lafuente, R., Rodrigues, R.C. 2021. «Enzymatic Clarification of Orange Juice in Continuous Bed Reactors: Fluidized-Bed versus Packed-Bed Reactor». *Catalysis Today*, **362**, 184–191.
- [30] Girelli, A.M., Scuto, F.R. 2021. «Eggshell membrane as feedstock in enzyme immobilization». *Journal of Biotechnology*, **325**, 241–249.
- [31] Radosavljević, M.; Lević, S.; Belović, M.; Pejin, J.; Djukić-Vuković, A.; Mojović, L.; Nedović, V. 2021. «Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in polyvinyl alcohol for the production of L-(+) lactic acid». *Process Biochemistry*, **100**, 149–160.

- [32] Nie, H., Zhu, N., Cao, Y., Xu, Z., Wu, P., 2015. «Immobilization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on cotton gauze for the bioleaching of waste printed circuit boards». *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **177**, 675-688.
- [33] Żywicka, A., Junka, A., Ciecholewska-Juśko, D., Migdał, P., Czajkowska, J., Fijałkowski, K. 2020. «Significant enhancement of citric acid production by *Yarrowia lipolytica* immobilized in bacterial cellulose-based carrier». *Journal of Biotechnology*, **321**, 13-22.
- [34] Moghanjoughi, Z. M., Bari, M. R., Khaledabad, M. A., Almasi, H., Amiri, S. 2020. Bio-preservation of white brined cheese (Feta) by using probiotic bacteria immobilized in bacterial cellulose: Optimization by response surface method and characterization». *Lwt*, **117**, 108603.
- [35] Silverman, M.P., Lundgren, D.G., 1959. «Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields». *Journal of Bacteriology*, **77**, 642-647.
- [36] Retegi, A., Gabilondo, N., Peña, C., Zuluaga, R., Castro, C., Ganan, P., de La Caba, K., Mondragon I. 2010. «Bacterial cellulose films with controlled microstructure-mechanical property relationships». *Cellulose*, **17**, 661-669.
- [37] Gutierrez, J., Fernandes, S.C.M., Mondragon, I., Tercjak, A. 2013. «Multifunctional hybrid nanopapers based on bacterial cellulose and sol-gel synthesized titanium/vanadium oxide nanoparticles. *Cellulose*, **20**, 1301-1311.
- [38] Hassan, C. M.; Peppas, N. A. 2000. «Structure and applications of poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods. *In Biopolymers PVA Hydrogels, Anionic Polymerisation Nanocomposites*, **153**, 37–65.
- [39] Peppas, N.A., Scott, J.E. 1992. «Controlled release from poly(vinyl alcohol) gels prepared by freezing–thawing processes». *Journal of Controlled Release*, **18**, 95-100.
- [40] Vrana, N.E., O’Grady, A., Kay, E., Cahill, P.A., McGuinness, G.B. 2009. «Cell encapsulation within pva-based hydrogels via freeze-thawing: A one-step scaffold formation and cell storage technique». *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **3**, 567–572.
- [41] Kaiser, A., Stark, W.J., Grass, R.N. 2017. «Rapid production of a porous cellulose acetate membrane for water filtration using readily available chemicals». *Journal of Chemical Education*, **94**, 483-487.
- [42] Díaz-Tena, E., Gallastegui, G., Hipperdinger, M., Donati, E. R., Ramírez, M., Rodríguez, A., López de Lacalle, L. N., Elías, A. 2016. «New advances in copper biomachining by iron-oxidizing bacteria». *Corrosion Science*, **112**, 385-392.

- [43] Santaolalla, A.; Lens, P.N.L.; Barona, A.; Rojo, N.; Ocio, A.; Gallastegui, G. 2021. Metal «Extraction and Recovery from Mobile Phone PCBs by a Combination of Bioleaching and Precipitation Processes». *Minerals*, **11**, 1004.
- [44] Cacicedo M.L., Castro M.C., Servetas I., Bosnea L., Boura K., Tsafraquidou P. 2016. «Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications». *Bioresource Technology*, **213**, 172-180.
- [45] Choi, S.M., Rao, K.M., Zo, S.M., Shin, E.J., Han, S.S. 2022. «Bacterial Cellulose and Its Applications». *Polymers*, **14**, 1080.
- [46] Wang, J., Tavakoli, J., Tang, Y. 2019. «Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods—a review. *Carbohydrate Polymers*. **219**, 63–76.
- [47] Blanco Parte, F.G., Santoso, S.P., Chou, C.C., Verma, V., Wang, H.T., Ismadji, S., Cheng, K.C. 2020. «Current progress on the production, modification, and applications of bacterial cellulose». *Critical Reviews in Biotechnology*, **40**, 397–414.
- [48] Girard, V., Chaussé, J., Vermette, P. 2024. «Bacterial Cellulose: A Comprehensive Review». *Journal of Applied Polymer Science*, **141**, e55163.
- [49] Jaisankar, S., Modak, J.M., 2009. Ferrous iron oxidation by foam immobilized *Acidithiobacillus ferrooxidans*: experiments and modeling». *Biotechnology Progress*. **25**, 1328-1342.
- [50] Ton, N. M. N., Le, V. V. M. 2011. «Application of immobilized yeast in bacterial cellulose to the repeated batch fermentation in wine-making». *International Food Research Journal*, **18**(3).
- [51] Chen, L., Zou, M., Hong, F.F. 2015. «Evaluation of fungal laccase immobilized on natural nanostructured bacterial cellulose». *Frontiers in Microbiology*, **6**, 1245.
- [52] Tam, T.T.M., Huong, N.T., 2014. «Optimization of *Corynebacterium glutamicum* immobilization process on bacterial cellulose carrier and its application for lysine fermentation». *IOSR Journal of Engineering*, **4**, 33–38.
- [53] Ravindra P., Kodli B., Veera Rao V.P.R. 2015. «Effect of Adaptation of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on Ferrous Oxidation and Nickel Leaching Efficiency». *Advances in Bioprocess Technology*, 17-26.
- [54] Pourhossein, F., Mousavi, S.M. 2018. «Enhancement of copper, nickel, and gallium recovery from led waste by adaptation of *Acidithiobacillus ferrooxidans*». *Waste Management*, **79**, 98-108.