Ekaia, 2025, 47, 389-406
https://doi.org/10.1387/ekaia.26839

ekaia
ZIENTZIA eta TEKNOLOGIA ALDIZKARIA

ISSN 0214-9001 – eISSN 2444-3255

Euskarrien hautaketa eta erabilera biomekanizazio eraginkorragoa lortzeko

(Support selection and application to improve biomachining efficiency)

Arrate Santaolalla[1], Junkal Gutierrez[2], Astrid Barona[3], Naiara Rojo[1]*

Ingeniaritza Kimikoa eta Ingurumenaren Ingeniaritza Saila
[1] Vitoria-Gasteizko Ingeniaritza Eskola
[2] Gipuzkoako Ingeniaritza Eskola
[3] Bilboko Ingeniaritza Eskola
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 garrantzi handia du mikroorganismoak aktibo mantentzeak, bakterioek oxidatzailea (burdina ferrikoa) birsortzen baitute, prozesuak era ziklikoan aurrera egin dezan. Zelula aktiboen 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, eta 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 a support material, 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.

**** 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 (2025). «Euskarrien hautaketa eta erabilera biomekanizazio eraginkorragoa lortzeko», *Ekaia*, 47, 2025, 389-406. (https://doi.org/10.1387/ekaia.26839).

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

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

Lan hau *Creative Commons Aitortu-EzKomertziala-PartekatuBerdin 4.0 Nazioartekoa* lizentzia baten mende dago

1. **SARRERA**

Mikrofabrikazioaren industriak berebiziko garrantzia du gaur egun, giza bizitzari eusten dioten gailu ugari garatzen baititu, hala nola sentsoreak, 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 ase eta bizi-kalitatea hobetu ahal izateko [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 askotariko geometria eta funtzionaltasuneko piezak lortzeko moldakortasuna da [6-8].

Biomekanizazioan erabiltzen diren mikroorganismo motei dagokienez, *Acidithiobacillus ferrooxidans* (*A. ferrooxidans*) izan da aztertuena [1,2,9,10]. Mikroorganismo extremofilo honen erresistentzia-mailak eta gaitasun metabolikoek abantaila nabarmenak eskaintzen dituzte; adibidez, metal-kontzentrazio handietan biziraun dezake. Gaitasun horiek direla eta potentzial handia du industria-mailan baldintza gogorretan jarduteko eta prozesuaren kontrol zorrotzen beharra eta kostuak murrizteko [11].

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

$$4\ Fe^{2+} + 4\ H^{+} + O_2 \rightarrow 4\ Fe^{3+} + 2\ H_2O + \text{energia} \quad \text{[Eq. 1]}$$

Mikroorganismoek lagundutako biomekanizazioan zeharkakoa da erauzketa-mekanismo nagusia; 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 eragile den

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

$$2\ Fe^{3+} + Cu^{0} \rightarrow 2\ Fe^{2+} + Cu^{2+}\ \text{[Eq. 2]}$$

A. ferrooxidans-en hazkuntzan energia eta hidrogeno-ioiak sortzen ditu burdina ferrosoaren oxidazioak [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 ($MFe_3(SO_4)_2(OH)_6$) [20]. Jarosita prezipitatuen pilaketak burdina ferriko disolbatuaren eskuragarritasunaren murrizketa ekar lezake [21].

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

Parametro horien guztien artean, garrantzi handia du bakterio-dentsitateak, hark zehazten baitu bakterioek burdina ferrosoa burdina ferrikora oxidatzeko behar duten denbora [24]. Sistema biologikoetan zelula-dentsitatea handitzeko, euskarrietan immobilizatu ohi dira mikroorganismoak. 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 abantaila potentzialak ditu zelula libreen (esekiduran) aukerarekin alderatuta; besteak beste, egonkortasun eta aktibitate handiagoak eta ordezkapen errazagoa. Biomasa immobilizatua hainbat helburutarako aplikatu ohi da, bai laborategian, bai industria-eskalan; adibidez 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.

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

1. taula. Biomasaren immobilizazioan erabilitako zenbait material.

Mikroorganismoa	Euskarria	Erabilera	Egilea
Isochrysis galbana	Alginato gela	Cr(III)-aren biosortzioa	[27]
Aspergilus niger lipase	Poliestirenoa	Biodieselaren sintesia	[28]
enzyme cocktail	Kitosano perlak	Zukuen klarifikazioa	[29]
Trametes versicolor laccase	Arrautzaren mintza	Azido siringikoaren eliminazioa	[30]
Lactobacillus rhamnosus	Polibinil alkohola	Azido laktikoaren ekoizpena	[31]
A. ferrooxidans	Kotoizko gasa	Zirkuitu inprimatuko plaken biolixibiazioa	[32]
Yarrowia lipolytica	Biozelulosa	Azido zitrikoaren ekoizpena	[33]
Lactobacillus spp.	Biozelulosa	Urdail-zukuen eta behazun-gatzen soluzioaren aurkako babesa	[34]

2. MATERIALAK ETA METODOAK

2.1. Mikroorganismoak eta hazkuntza-ingurunea

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

Mikroorganismoa Silverman-ek eta Lundgren-ek erabilitako hazkuntza-ingurunean hazi zen [35]. Ingurune hori honako bi disoluzioak nahastuz prestatu zen: alde batetik, mantenugaiak dituen gatz ez-organikoen disoluzioa (3,0 g L^{-1} $(NH_4)_2SO_4$; 0,5 g L^{-1} $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,5 g L^{-1} K_2HPO_4; 0,1 g L^{-1} KCl; 0,01 g L^{-1} $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$) eta, bestetik, energia-iturria (Fe^{2+} ioia) duen sulfato ferroso heptahidratatuaren ($FeSO_4.7H_2O$) disoluzioa. Aipatzekoa da hasierako bi burdina-kontzentrazio erabili zirela: 6 eta 9 g Fe^{2+} L^{-1} (6K eta 9K hazkuntza-inguruneak, hurrenez hurren). Hazkuntza-inguruneko pH-a 1,7-1,8-ko gehieneko baliora doitu zen azido sulfurikoa (H_2SO_4) gehituz (%25 v:v).

2.2. Euskarriak eta haien aukeraketarako protokoloa

Bakterioen euskarri gisa jardun zezaketen eta, horrela, haiek 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 moztu edo prestatu egin ziren 4,6-4,8 cm^2-ko kanpogainazala izan zezaten.

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-tenperaturan 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 ºC, 3 orduz irabiatuz). Ondoren, PVA soluzio homogeneoak Petri plaka banara isuri ziren giro-tenperaturan hoztu arte. Bi teknika erabili ziren PVA hidrogelak sintetizatzeko: Freeze-Thawing (FT, izoztu-desizoztu zikloak) eta Freeze-Drying (FD, liofilizazioa). FT metodoan [38] guztira 3 ziklo egin ziren, 24 orduko izozketak (-21 ºC) eta 3 orduko epelketak (25 ºC) 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 ºC) ondoren sartu ziren liofilizazio-ekipoan (Alpha 1_4LD Martin Christ modeloa), -85 ºC-an eta 0,1 mbar-ean.

Zelulosa-triazetatoa. Kaiser-ek eta lankideek [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, 10 minutuz murgildu zen, kontu handiz, 0,25 M HCl (%99) bainuan. Prozedura honen bidez, kaltzio karbonatoa disolbatu zen eta, ondorioz, CO_2 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 lortu ziren poroak, 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 cm^2-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}) egin ziren. Bigarren eta hirugarren etapetan prozesuaren ondorioz pH-aren igoera gertatu zenean, balioa 1,7-1,8-ra doitu zen. Etapa hauetan mikroorganismoen hazkuntza Fe^{2+}-aren oxidazioa neurtuz egiaztatu 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 hazkundea	Materialak mikrobioen hazkundean eragin kaltegarririk du?	Euskarriak 9K hazkuntza-ingurunean murgildu. ✓ *A. ferrooxidans* 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 betetzeko. 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 (HIBaren) eta materialen kanpo-gainazalaren (KGaren) arteko 1:0.2 ml:cm^2 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 3. taulan jasotako baldintzetan gauzatu ziren, EAKTIBak prozesua osatzeko behar zuen denbora murrizten zuten baldintzak hautatu ahal izateko. HIB:KG erlazioari eta agitazio-abiadurari dagokionez, ez zen erlazio eta balio altuagorik aukeratu baldintza bortitzegiek materiala kaltetu zezaketelako.

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

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

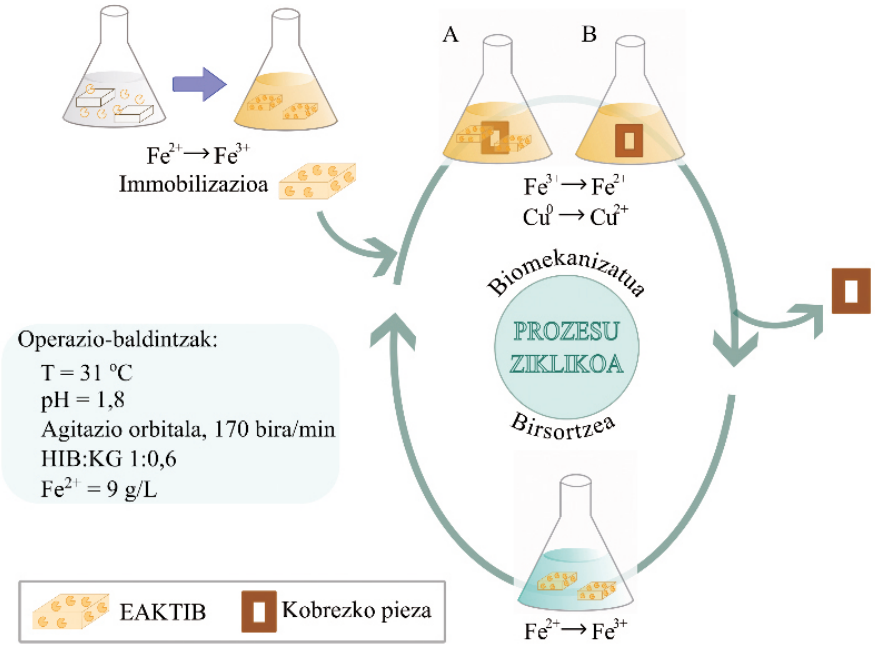
2.4. **Immobilizatutako mikroorganismoen erabilera: kobrezko piezen biomekanizazioa**

Biozelulosazko EAKTIBak erabili ziren kobrezko piezak biomekanizatzeko. Horretarako, lehenik eta behin, kobrezko piezak honela prestatu ziren: egitura angeluzuzeneko maskara itsasgarri bat piezaren gainazaletako bati (20 mm luze × 7 mm zabal) itsatsi zitzaion eta beste gainazala bernizbabeslearekin estali zen.

1. Ondoren, piezak honako ondoz ondoko etapaz osatutako biomekanizazio-prozesuari jarraituz tratatu ziren (1. irudia):
2. Immobilizazioa. EAKTIBak prestatu ziren, 2.3. puntuan azaldutako protokoloa jarraituz.

3. 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 bigarrenean (B aukera), aldiz, EAKTIBa hazkuntza-ingurunetik atera zen biomekanizazio-etaparen aurretik.

Oxidatzailearen (Fe^{3+}-aren) birsortzea. Metalezko pieza disoluziotik atera zen eta aurreko etapan sortutako Fe^{2+}-a (bio)oxidatu zen EAKTIBa erabiliz; hau da, EAKTIBean immobilizatutako mikoorganismoen 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 zikloren ostean burdina oxidatzeko duen gaitasuna zehazteko. Prozesuan zehar, pH-aren balioa 1,7-1,8-ra doitu zen.

2.5. **Metodo analitikoak**

Burdinaren kontzentrazioa (Fe^{2+} eta Fe_{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). Neurtu ziren pH-a (Crison Basic 20, pH SENSION + 5010 T elektrodoa) eta oxidazio-erredukzio potentziala (Thermo-Orion 920+) ere.

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 erauzketatasa espezifikoa (ETE) kalkulatu zen [Eq. 3], grabatze-prozesuaren eraginkortasuna kuantifikatzeko.

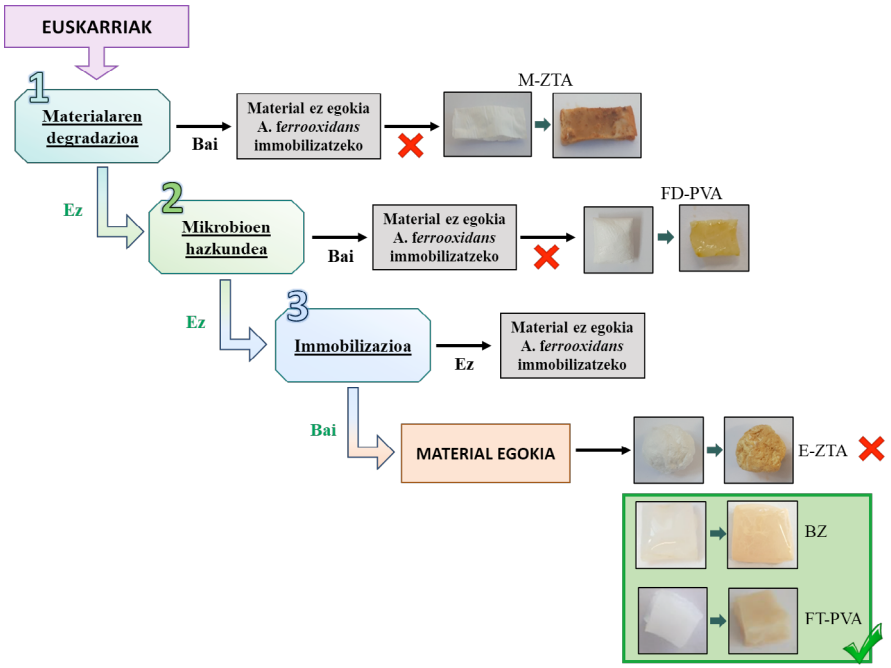
$$\text{ETE (mg h}^{-1}\text{ cm}^{-2}) = \frac{\text{Erauzitako metal-masa (mg)}}{\text{denbora (h) azalera (cm}^2\text{)}} \quad \text{[Eq. 3]}$$

3. **EMAITZAK**

3.1. **Euskarriaren aukeraketa**

Euskarrien hautaketari dagokionez, 2. irudian bildu dira bideragarritasun-protokoloan lortutako emaitzak eta euskarrien argazkiak (protokoloa aplikatu aurretik —ezkerrezko argazkiak— eta ondoren —eskuineko argazkiak). Irudi horretan erakusten denez, 9K hazkuntza-inguruneak M-ZTAren integritate fisikoa kaltetu zuen (begibistaz), eta FD-PVAk bakterioen hazkuntza galarazi zuen (ez zen oxidazio-aktibitaterik detektatu mikroorganismoak esekiduran zeudenean). Bestalde, bakterioak arrakastaz immobilizatu ziren E-ZTA esferetan; 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 eta, ondorioz, metalaren disoluzioa eragotzi eta bakterio-jarduera kaltetu.

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 bioteknologikotan [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.

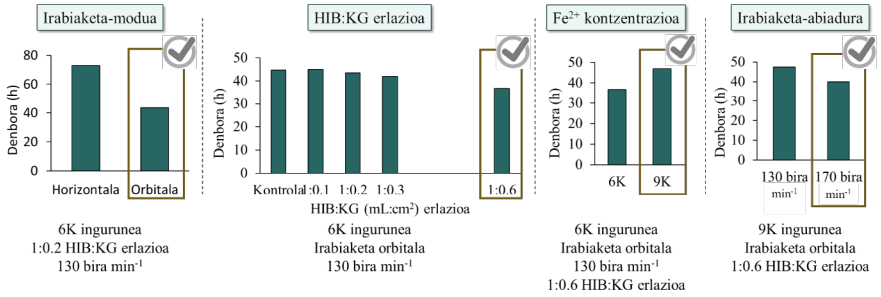
3.2. **Mikroorganismoen immobilizazioa eta operazio-baldintzen optimizazioa**

Bakterioak BZn immobilizatzeari dagokionez, 79 eta 97 ordu behar izan ziren, hurrenez hurren, 6 eta 9 g L^{-1} Fe^{2+} biooxidatzeko eta EAKTIBa lortzeko.

Operazio-baldintzen optimizazio-entseguetan lortutako emaitzak 3. irudian erakutsi dira. Burdinaren oxidazioa osatzeko denbora %40 murriztu zen modu orbitala erabili zenean modu 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 Fe^{2+} 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} Fe^{2+} erabiltzeak metalaren erauzketa-tasa handiagoa ekar lezake biolixibiazio- eta biomekanizazio-prozesuetan, eta hori oso ezaugarri interesgarria izan liteke industria-arloan. 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 dakioke emaitza hori. Beraz, azken balio hori hautatu zen hurrengo entseguetarako.

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

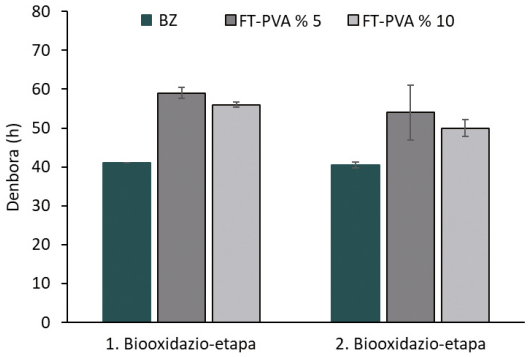


3. irudia. Operazio-baldintzen eragina Fe^{2+}-aren biooxidazioan.

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 egokien gisa. Izan ere, dagoeneko frogatu da onddoak, legamiak, entzimak edo bakterioak immobilizatzeko euskarri gisa erabil daitekeela. Adibidez, Ton eta Le ikertzaileek [50] determinatu zuten BZn immobilizatutako *Saccharomyces Cerevisiae* legamiak jarduera metaboliko hobeak erakusten zituela legamia askeak baino 10 ziklo hartzidura eten errepikatuaren ondoren. Chen-ek eta lankideek [51] aurkitu zuten BZn immobilizatutako *Tramete Versicolor*en lakasa fungikoak jatorrizko jardueraren %69 mantentzeko gaitasuna zuela zazpi aldiz berrerabili ondoren, eta Tam-ek eta Huong-ek [52] zortzi aldiz erabili ahal izan zituzten BZn immobilizatutako zelulak hartzidura errepikatuak egiteko. Gainera, Żywicka-k eta lankideek [33] 2020an egindako ikerketa batek frogatu zuen azido zitrikoaren kontzentrazio globala handiagoa izan zela *Yarrowia lipolytica* immobilizatuetan suspentsioan baino (121-129 g/L eta 99-110 g/L, hurrenez hurren).

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

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



4. irudia. Fe^{2+} oxidazio-denbora bi biooxidazio-etapatan BZ eta FT-PVA aktiboak erabiltzen direnean.

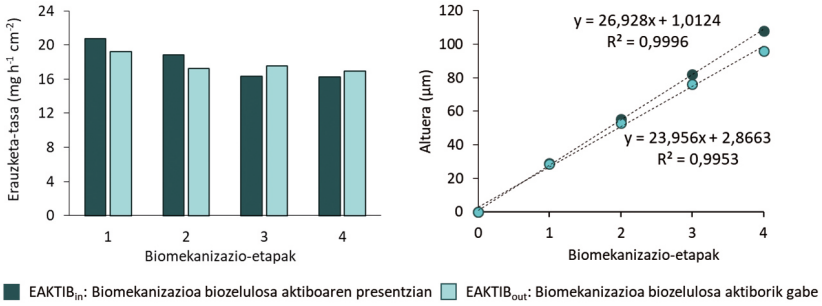
3.3. **Immobilizatutako mikroorganismoen erabilera: kobrezko piezen biomekanizazioa**

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

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

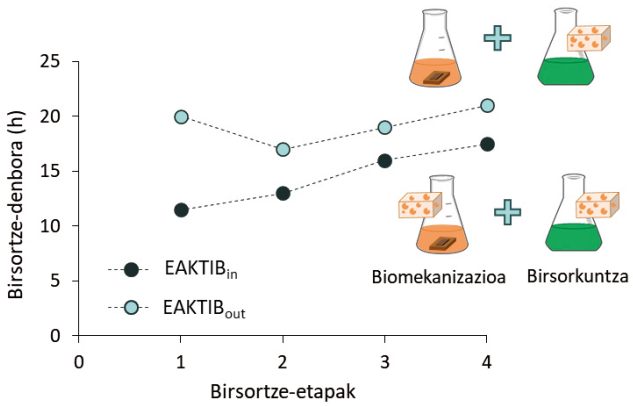
Bi konfigurazioak ($EAKTIB_{in}$ eta $EAKTIB_{out}$) konparatuz, oso antzekoak izan ziren entsegu bien ETE balioak. Izan ere, gehieneko balioa lehenengo etapan lortu zen, eragiketa modua edozein izanda ere. Ondoren, ia konstante mantendu zen biomekanizazioaren ondoz ondoko hiru etapetan, $EAKTIB_{out}$ erabili zenean. Aitzitik, balio horrek pixka bat behera egin zuen $EAKTIB_{in}$ erabili zenean. Portaera hori kobrezko piezaren gainazalaren eta oxidatzailearen arteko kontaktu okerragoari egotz dakioke, 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 EAKTIB$_{in}$ 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 kobrearen biomekanizazioa burutzeko EAKTIBaren presentzian (6. irudia). Hori mikroorganismo immobilizatuak metalaren presentziara ondo egokitu izanari egotz dakioke. Aitzitik, EAKTIB$_{out}$ 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 askotariko metalekin duten tolerantzia handitu egin daitekeela baitiote, hazkundean 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. Fe^{2+} 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 eta, horrela, prozesuan sortutako hondakinak murrizten ditu.

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}-ko agitazio orbitala; 9 g L^{-1} Fe^{2+} eta 1:0,6 erlazioa hazkuntza-ingurunearen bolumenaren (HIB-aren) eta materialen kanpo-gainazalaren (KG-ren) artean. Baldintza horietan, ondorioztatu zen EAKTIBa erabilita 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 pausoan, EAKTIBa disoluzioan murgildu zen burdina ferrosoa burdina ferriko bihurtzeko eta, bigarrenean, kobrezko pieza aurreko pausoan sortutako disoluzioan murgildu zen biomekanizazioa gerta zedin. Bigarren etapa (biomekanizazioa) bi konfiguraziotan aztertu zen: 1) EAKTIBaren presentzian (EAKTIBin) eta 2) EAKTIBa erreaktoretik aterata (EAKTIBout). Kasu bietan, antzekoak izan ziren metalaren erauzketa-tasa espezifikoaren eta geometria grabatuaren altueraren balioak. Hala ere, oxidatzailea birsortzeko behar den denbora laburragoa izan zen EAKTIBin konfigurazioan eta, oro har, denbora gutxiago behar izan zen EAKTIBin alternatiban aukeratutako geometria biomekanizatzeko.

ESKER ONAK

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

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 Bio-machining 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 Eexchanger». *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] FIJAŁKOWSKI, K., PEITLER, D., RAKOCZY, R., ŻYWICKA, A. 2016. «Survival of Probiotic Lactic Acid Bacteria Immobilized in Different Forms of Bacterial Cellulose in Simulated Gastric Juices and Bile Salt Solution». *Food Science and Technology*, **68**, 322-328.

[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., TSAFRAKIDOU, 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,** 945-949.

[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.