

Biomecanizado con Microorganismos Extremófilos: Aplicación al Cobre Libre de Oxígeno

A. Rodríguez-Ezquerro⁽¹⁾, E. Díaz-Tena⁽¹⁾, L. N. López de Lacalle Marcaide⁽¹⁾, A. Elías Sáenz⁽²⁾, Luis Gurtubay Bustinduy⁽²⁾, N. Rodríguez González⁽³⁾

*(1) Dpto. de Ingeniería Mecánica. Universidad del País Vasco UPV-EHU
adrian.rodriguez@ehu.es*

(2) Dpto. de Ingeniería Química y del Medio Ambiente. Universidad del País Vasco UPV-EHU

(3) Centro de Astrobiología, INTA-CSIC, Madrid

En los últimos años, el uso del cobre y sus aleaciones está experimentando un crecimiento exponencial. Tanto las propiedades mecánicas como las de conductividad eléctrica, hacen del cobre un material de especial interés en la fabricación de equipos para instalaciones científicas y para el sector médico-quirúrgico. La fabricación de este tipo de componentes requiere de operaciones de gran precisión que minimicen el daño térmico y estructural en el material. Una alternativa a los procesos convencionales de fabricación se basa en técnicas de biomecanizado. Se trata de técnicas novedosas enfocadas al pulido y micromecanizado de piezas de precisión y que no repercuten en la integridad superficial de la pieza.

*Con el objetivo de desarrollar una técnica de pulido respetuosa con el medio ambiente y dado que las aguas de Río Tinto (Huelva) permiten simular las condiciones de biomecanizado, se han llevado a cabo una serie de ensayos previos en este entorno. La presencia de especies bacterianas, como *Acidithiobacillus ferrooxidans* ha permitido valorar el efecto que este biosistema puede generar en el acabado de la superficie a estudio. Los resultados obtenidos han mostrado la necesidad de plantear un trabajo futuro en el que se lleve a cabo una serie de ensayos físico-químicos, previos al tratamiento biológico, que permitan definir las condiciones adecuadas a implantar en el ensayo final de biorefino que garanticen la calidad superficial requerida.*

1. INTRODUCCIÓN

El cobre fue uno de los primeros metales en ser utilizados por el ser humano en la prehistoria. Aunque su uso disminuyó con la evolución de la siderurgia, tras el descubrimiento en el año 1831 del generador eléctrico por Faraday su uso se incrementó llegándose a convertir de nuevo en un material estratégico. Hoy en día es un elemento clave para el futuro que queda por llegar. Se trata de un material económicamente accesible y sus propiedades físicas hacen que su uso se extienda a varias aplicaciones, siendo el tercer metal más empleado.

Propiedades como la resistencia mecánica, conductividad, resistencia a la corrosión, maquinabilidad y ductilidad hacen del cobre uno de los materiales más versátiles para una amplia gama de aplicaciones. Las variaciones en composición al igual que en la manufactura y los métodos de mecanizado contribuyen a que el cobre sea un material ampliamente recurrido para una gran cantidad de productos y sistemas finales. La producción mundial de este material ha alcanzado cifras superiores a las 18 millones de toneladas por año observándose un crecimiento considerable en los últimos 5 años [1]. La perspectiva a futuro del uso de cobre y sus aleaciones para componentes relacionados con temas de I+D, instalaciones científicas y diseño técnico muestra una tendencia de crecimiento exponencial. Proyectos actuales como el acelerador de iones, cuyos componentes funcionales son mayormente fabricados en cobre, son un ejemplo claro de la necesidad de controlar el mecanizado de este material. La fabricación de componentes para

instalaciones científicas y para equipamiento médico-quirúrgico requiere de operaciones de gran precisión que minimicen el daño térmico y estructural en el material.

En los últimos años los procesos de micromecanizado alternativos buscan constantemente la innovación, apostando por mejores resultados y ventajas específicas. Hasta ahora, los métodos de mecanizado más utilizados se basaban en técnicas físicas, químicas o incluso fisico-químicas. Pero en las ciencias naturales coexisten tres subsistemas: la física, la química y la biología. Entonces, ¿por qué no emplear la biología como técnica de mecanizado?

La evolución de los sistemas de fabricación es función de múltiples factores externos e internos. Debido a los problemas ambientales las empresas deben adecuarse a nuevas ecotasas y para poder hacer frente a posibles competidores deben buscar la competencia a través de la eficiencia, orientando sus procesos hacia el 'Green Manufacturing' o Mecanizado Ecológico [2].

Las empresas han visto el mecanizado biológico como una alternativa a procesos convencionales como el mecanizado químico o micro EDM. Si bien el uso de procesos biológicos en el ámbito del mecanizado sigue siendo limitado, si se llega a controlar, entender y en su caso a acelerar, será una técnica comercialmente competitiva.

Este proceso, también conocido como *biomecanizado*, no sólo es más ecológico que mecanizados estrictamente químicos, sino que también destaca por su bajo consumo de energía, alta eficiencia energética y bajo coste [3]. Además, siendo un proceso en el que la fuente de herramientas (bacterias) es renovable y es totalmente natural, no existe daño superficial o térmico alguno en la superficie mecanizada [4].

Pioneros en este ámbito han sido Uno, Kaneeda y Yokomizo [4]. En su estudio mediante ensayos básicos han sido capaces de obtener datos preliminares acerca de los efectos que produce la variación de los parámetros involucrados en el proceso. Paralelamente han propuesto una manera de acelerar el proceso mediante un potencial eléctrico aplicado adecuadamente.

China es un país también precursor en este tema. En el año 1998 y 1999 Zhang y Li [5, 6] no sólo trabajaron en la investigación del mecanizado mediante bacterias, sino que llegaron a definir las ecuaciones que rigen la cinemática de la reacción global respecto de las condiciones experimentales y la termodinámica del proceso.

Desde entonces, se han realizado investigaciones en torno al biomecanizado desde diferentes puntos de vista. Daniel Johnson en su tesis [7] ha determinado la rugosidad que el biomecanizado deja en el cobre libre de oxígeno. Hong Hocheng *et al* [8] han llevado a cabo el estudio del biomecanizado para diferentes materiales: cobre, níquel, zinc, aluminio y estaño, comparando tiempo de mecanizado y la tasa específica de eliminación de material, analizándose también el patrón de la superficie tras el mecanizado.

A través de la información publicada, y de cara al desarrollo e implantación de un sistema de biopulido, mediante este estudio se ha llevado a cabo un simulacro de biotratamiento en el entorno del Río Tinto en Huelva. Este río ha sido ampliamente estudiado y caracterizado por lo que ha llevado a pensar que su cauce podría constituir un biorreactor inagotable, sobre el que se podría llevar a cabo una serie de ensayos previos a partir de los cuales se establecerían unas bases serias en la experimentación. El objetivo de este estudio ha sido por tanto valorar el efecto de las especies existentes en el Río Tinto en placas de cobre libre de oxígeno.

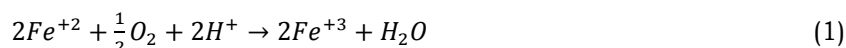
2. FUNDAMENTOS DEL BIOMECANIZADO

Las bacterias *Acidithiobacillus ferrooxidans*, formalmente conocidas como *Thiobacillus ferrooxidans*, son las especies más empleadas por varios investigadores en estudios anteriores realizados a cerca del biomecanizado [3-9]. Estos son los microorganismos que también se han empleado en el presente trabajo. Se trata de un microorganismo en forma de varilla, que llega a tener 1 μm de largo y 0.5 μm de diámetro [4], lo cual lo hace útil como herramienta de micromecanizado.

La teoría básica del mecanismo del biomecanizado viene ilustrada en la figura 1, para el caso de emplear como material base cobre libre de oxígeno [10,11]. Los *A. ferrooxidans* tienen un citoplasma y una biomembrana que consiste en una membrana exterior, peptidoglicano, un espacio periplásmico y una membrana interior.

El proceso de adhesión de la bacteria a la superficie del material a mecanizar se realiza mediante sustancias poliméricas extracelulares (EPS), circundantes a la bacteria. La oxidación del hierro divalente ocurre en el espacio periplásmico y en la membrana interior.

El Fe^{+2} , que ha sido transportado al espacio periplásmico desde el fluido cultivado pasando por la biomembrana exterior, pierde un electrón a través de la catálisis de la oxidación del hierro. Este electrón es captado por el O_2 , que en presencia de H^+ en el medio, genera el agua necesaria en las distintas reacciones bioquímicas. La reacción global es la siguiente:



La reacción de la ecuación 1 genera energía. El Fe^{+3} , expulsado a través de la membrana interior es un fuerte oxidante y es capaz de oxidar el material base. De esta manera, el Fe^{+3} mecaniza el cobre libre de oxígeno.



El Fe^{+3} producido por las bacterias *A. ferrooxidans* se reduce a Fe^{+2} durante el biomecanizado. Este Fe^{+2} puede volver a ser oxidado a Fe^{+3} con el oxígeno del medio, lo cual hace que se constituya el ciclo.

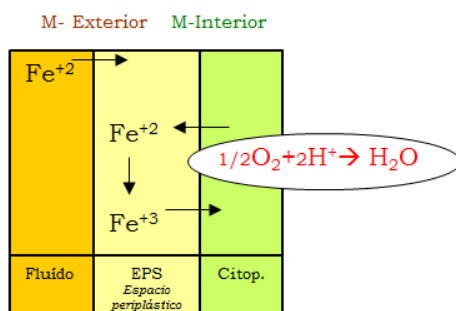


Figura 1. Representación simplificada del mecanismo del biomecanizado

3. MEDIO: RÍO TINTO

Río Tinto, situado en el suroeste de España, ha sido estudiado desde diferentes puntos de vista durante más de quince años. La razón de su interés reside en el ecosistema inusual que presenta a lo largo de sus 92 km de longitud.



Figura 2. Localización de Río Tinto, Huelva

Sus aguas rojizas (habiéndose históricamente atribuido ese color a la contaminación de los minerales de las minas adyacentes) presentan un pH medio de 2.3, siendo por consiguiente un medio considerablemente ácido. Ostenta un alto contenido en metales pesados

(mayoritariamente hierro) junto con oxígeno, al ser los organismos existentes en el río en su mayoría fotosintéticos. Las extremas condiciones del río son, en gran medida, producidas y mantenidas por una alta diversidad microbiológica [12,13]: organismos tanto eucariotas como procariotas, siendo los eucariotas los más comunes [14], alimentados sólo de minerales y capaces de adaptarse a hábitats extremos.



Figura 3. Aguas rojizas de Río Tinto

Estudios realizados sobre las poblaciones de bacterias quimiolitótrofas (bacterias procarióticas) [12] determinaron la elevada cantidad de bacterias oxidadoras del hierro y del azufre. Principalmente, se encontró que las bacterias aisladas conocidas como *Acidithiobacillus ferrooxidans* eran capaces de oxidar Fe^{+2} a Fe^{+3} , mientras que oxidadores de compuestos reducidos pertenecían a la familia *Acidithiobacillus thiooxidans*. De ahí que estudios anteriores relacionados con el biomecanizado hayan empleado este tipo de bacterias en el proceso.

Actualmente, Río Tinto forma parte de un experimento de la NASA debido a similitudes que presenta con el ambiente del planeta Marte. Si bien se creía que la vida en Marte era poco probable por las condiciones en las que se encontraba: radiación UV, falta de agua y bajas temperaturas entre otros, los avances en la microbiología han dado paso a otro punto de vista. Una reciente investigación en la que ha participado el CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), resalta la posibilidad de que determinados tipos de organismos puedan sobrevivir bajo restrictivas condiciones, tomando como ejemplo el hábitat de Río Tinto. De ahí que Río Tinto sea objeto de estudio de la vida en el planeta Marte y se busquen continuas semejanzas [15, 16].

4. PREPARACIÓN DE LOS ENSAYOS

4.1. Objetivo de los ensayos

En este estudio se han llevado a cabo una serie de ensayos en los que se busca valorar el efecto que el medio bacteriano (Río Tinto) tiene en una placa de cobre libre de oxígeno, en función del tiempo que la placa ha permanecido en el mismo. La coexistencia de diferentes especies químicas junto con microorganismos supone un efecto mixto, cuyo resultado final buscado es el afine de la superficie. De esta manera, mediante este acercamiento inicial al entendimiento del proceso, se avanzará en la posibilidad de poder reproducir el mecanizado biológico en un laboratorio, sin necesidad de trasportar las piezas a mecanizar.

4.2. Preparación de las probetas

En el Taller del Departamento de Ingeniería Mecánica se prepararon probetas como la que aparece en la figura 4.



Figura 4. Probeta de cobre libre de oxígeno

Partiendo de un bloque de cobre libre de oxígeno (mín. 99.99% de pureza según fabricante) primero se fresó en un centro de mecanizado de la marca KONDIA HS1000 con una velocidad de corte de 600 m/min y un avance por diente de 0.08 mm. Para el proceso de mecanizado se emplearon herramientas de metal duro HM-MG de la marca KENDU y la estrategia de mecanizado fue fresado en zig-zag, de manera que la superficie mecanizada presentara zonas de fresado tanto en oposición como en concordancia.

Realizado el mecanizado, el bloque se cortó a un grosor de 2 mm en una metalográfica y finalmente se definieron las porciones para diferentes puntos de control (ver figura 5). Las dimensiones finales fueron: 32 mm x 25 mm x 2mm.

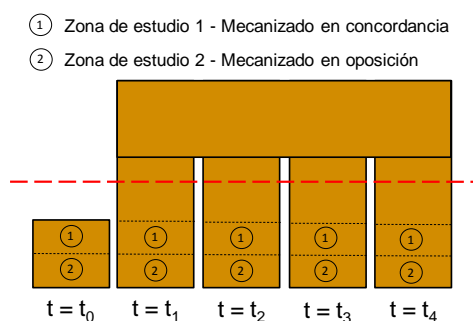


Figura 5. Multiprobeta y puntos de control

Para la caracterización superficial inicial se diseñó una probeta mecanizada bajo las mismas condiciones de corte que la probeta de la figura 4 con las dimensiones 10 mm x 10 mm x 2 mm.

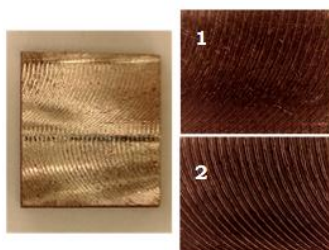


Figura 6. Fotografías de la superficie mecanizada. Zona 1 mecanizado en concordancia. Zona 2 mecanizado en oposición

4.3. Definición de los ensayos

La probeta de la figura 4 se trasladó a la zona de ensayo y se sumergió en aguas de Río Tinto en medio de una zona de flujo regular para conseguir que el contacto estuviera asegurado durante todo el tiempo de exposición.

Cada 2 semanas aproximadamente, se realizó una extracción de muestra, siendo así la duración total del ensayo 2 meses. La frecuencia de extracción derivó de la dificultad

geográfica en la que se encuentra el Centro donde se ha llevado a cabo el estudio del medio bacteriano complementario al presente trabajo.

Pasado el tiempo de exposición, cada probeta se extrajo del río y se cortó por la línea de puntos roja de la figura 5. A continuación, las probetas fueron sometidas a un análisis de SEM (*Scanning Electron Microscope*) y un análisis topográfico. Para realizar la observación del SEM, las probetas fueron adheridas a un soporte con cinta de carbono de doble cara, para luego visualizarlas en un microscopio electrónico de barrido, en este caso de la marca Hitachi S3400N. La imagen que proporciona el equipo aporta los datos del voltaje utilizado, el detector (en este caso electrones secundarios), los aumentos y una barra de escala. Para el análisis topográfico se empleó un microscopio de la marca Leica DCM 3D.

Finalmente, decir que no fue empleado ningún acondicionamiento ni antes, ni después de la introducción en el cauce sobre la probeta.

5. RESULTADOS

5.1. Análisis de la topografía

El análisis topográfico se realizó tanto en la probeta que no fue introducida en el río, considerada como probeta de referencia, como en la última probeta extraída del medio. La figura 7 muestra la diferencia topográfica que presentan ambas probetas.

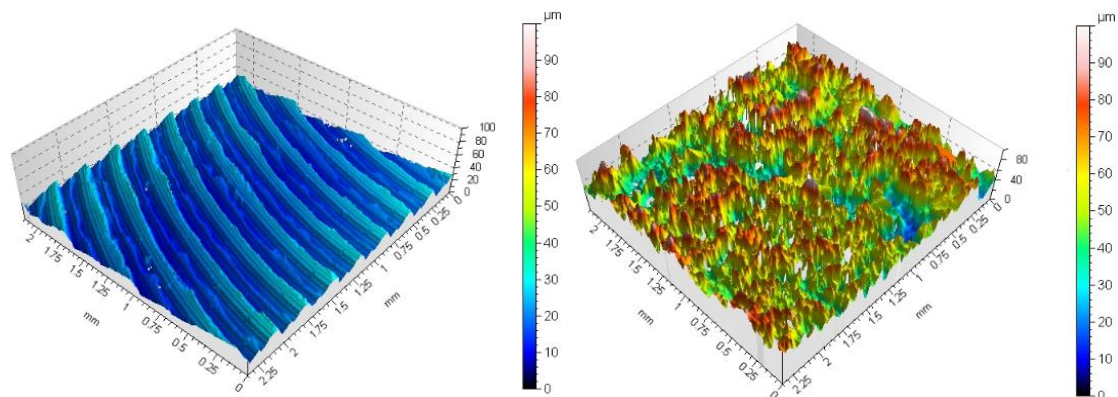


Figura 7. Izq.) Análisis de rugosidad de la probeta de muestra. Drcha.) Análisis de rugosidad de la probeta tras permanecer 2 meses en Río Tinto.

Las diferencias entre las dos superficies son evidentes. Mientras que la probeta de referencia muestra el patrón del fresado original obtenido tras el mecanizado, no se puede decir lo mismo de la probeta extraída tras 2 meses de permanencia en el río. La rugosidad ha aumentado y a simple vista se puede observar la mala calidad superficial que la probeta presenta, tal y como aparece en la figura 8.



Figura 8. Diferencia de la calidad superficial

También hay una diferencia en los resultados que el análisis topográfico da en cuanto a la rugosidad. Los valores de rugosidad obtenidos según la norma ISO 25178 son $4.88\mu\text{m}$ y $14.30\mu\text{m}$ respectivamente para la probeta de muestra y para la probeta cuya estancia en el medio ha sido de 2 meses. Así pues, la capacidad de ataque del medio sobre las probetas ha quedado mostrada con los efectos sobre la rugosidad de las probetas analizadas.

5.2. Análisis del SEM

En la figura 9 se pueden observar los resultados del análisis de las probetas mediante el SEM. En ella puede observarse la evolución que el estado superficial del cobre libre de oxígeno ha sufrido desde su introducción al medio hasta la extracción de la última probeta tras un período de 2 meses.

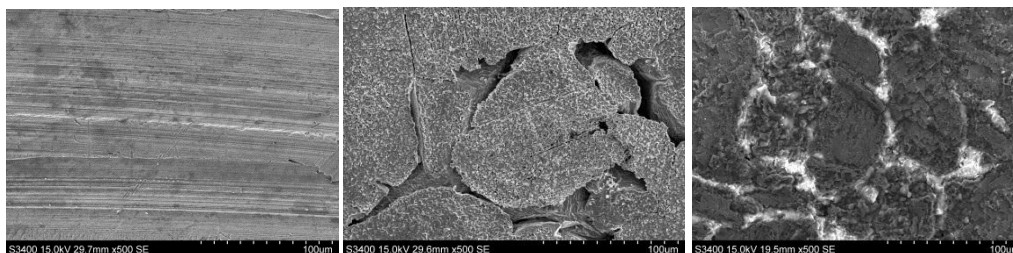


Figura 9. Resultados del SEM. Izq.) Probeta inicial. Centro.) Tras 1mes de permanencia. Drcha.) Tras 2 meses de permanencia (x500)

A la izquierda de la figura 9 se observa el patrón que habitualmente deja el fresado en la superficie definido por el paso de los filos de la herramienta. Tras 1 mes dentro del río, imagen central de la figura 9, el patrón de fresado ha desaparecido completamente y en su caso aparecen orificios en la superficie del material. Finalmente, la última probeta extraída del medio (véase imagen derecha de la figura 9) presenta inclusiones intergranulares, algo a lo que de momento no se le ha dado explicación.

6. CONCLUSIONES

Tras este primer acercamiento al ámbito del biomecanizado y analizados los resultados tanto topográficos como microscópicos, se llega a una indudable conclusión: la estancia en el río de 2 meses para las probetas es excesivo. Tal y como puede apreciarse en la figura 9 la probeta sufre una elevada erosión y la calidad superficial empeora considerablemente, llegando a presentar una rugosidad tres veces mayor en comparación con la rugosidad que la placa de muestra presentaba (véase figura 8).

Por ello, se puede afirmar que el tiempo de exposición aconsejable es mucho menor que el llevado a cabo, si bien estos resultados definen un límite claro en el tiempo de análisis para futuros estudios.

El agua del Río Tinto utilizada en el biomecanizado tiene una composición compleja tanto de especies inorgánicas como biológicas, no siempre bien conocidas y en contenidos variables según la zona del río, la época del año, etc., así como de difícil disponibilidad. Por ello, para poder controlar de una manera reproducible los parámetros que pueden influir en el biomecanizado, se van a ensayar las probetas de cobre en disoluciones sintéticas preparadas en el laboratorio, análogas en su composición a las del Río Tinto en cuanto a las especies químicas y biológicas más significativas.

Previamente a estas pruebas, con las disoluciones anteriormente citadas, basadas en el sistema $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$ en medio sulfúrico, pero sin bacterias, se realizarán ensayos con las probetas en distintas condiciones de concentraciones, pH, agitación, temperatura y duración del ensayo, seguidas de los análisis superficiales de las mismas, rugosidad, topografía y SEM, además del control de la pérdida de masa de las probetas.

Se espera que los resultados de este estudio previo proporcionen información relevante para abordar con mayor garantía el más complejo estudio del mecanizado con bacterias.

7. AGRADECIMIENTOS

Los autores de este artículo quieren mostrar su agradecimiento a Sgiker, por el apoyo técnico suministrado en la realización de SEM y al proyecto Etortek PROFUTURE.

8. REFERENCIAS

- [1] International copper study group, <http://www.icsg.org>. [Último acceso: Abril (2012)]
- [2] A. Deif, *A system model for green manufacturing*. Journal of Cleaner Production 19 (2011) 1553-1559
- [3] K. Kurasaki, M. Matsui, Y. Nakamura, K. Murai, T. Kimura, *Material processing using microorganisms (an investigation of microbial action on metals)*. JSME International Journal of Microelectromechanical Systems 12-6 (2003) 761-778
- [4] Y. Uno, T. Kaneeda, S. Yokomizo, *Fundamental study on biomachining (machining of metals by Thiobacillus ferrooxidans)*. JSME International Journal, Series C 39-4 (1993) 837-842
- [5] D. Zhang, Y. Li, *Possibility of biological micromachining used for metal removal*. Science in China, Series C Life Sciences 42 (1998) 151-156
- [6] D. Zhang, Y. Li., *Studies on kinetics and thermodynamics of biomachining pure copper*. Science in China, Series C Life Sciences 42 (1999) 57-62
- [7] D. Johnson, R. Warner, A. J. Shih, *Surface roughness and material removal rate in machining using microorganisms*. Journal of Manufacturing Science and Engineering 129-1 (2007) 223-227
- [8] Hong Hocheng, Jei-heui Chang, Umesh U. Jadhav, *Micromachining of various metals by using Acidithiobacillus ferrooxidans 13820 culture supernatant experiments*. Journal of Cleaner Production 20 (2012) 180-185
- [9] Y. P. Ting, A. S. Kumar, M. Rahman, B. K. Chia, *Innovative use of Thiobacillus ferrooxidans for the biological machining of metals*. Acta Biotechnologia 20-2 (2000) 87-96
- [10] Jos Istiyanto, Tae Jo Ko, Il-Chae Yoon, *A Study on Copper Micromachining Using Microorganisms*. International Journal of Precision and Manufacturing 11-5 (2010) 659-664
- [11] Jos Istiyanto, Min Yeop Kim, Tae Jo Ko, *Profile characteristics of biomachined copper*. Microelectronic Engineering 88 (2011) 2614-2617
- [12] A.I. López-Archilla, I. Marín, R. Amils, *Bioleaching and interrelated acidophilic microorganisms from Rio Tinto, Spain*. Geomicrobiology Journal 17 (1993) 603-307
- [13] R. Amils, E. González-Toril, D. Fernández-Remolar, F. Gómez, N. Rodríguez, C. Durán, *Interaction of the sulfur and iron cycles in the Tinto River ecosystem*. Reviews in Environmental Science Bio/Technology 1 (2002) 299-309
- [14] A.I López-Archilla, I. Marín, R. Amils, *Microbial community composition and ecology of an acidic aquatic environment: the Tinto River, Spain*. Microb. Ecol. 41 (2001) 20-35
- [15] Ricardo Amils, Elena González-Toril, David Fernández-Remolar, et al., *Extreme environments as Mars terrestrial analogs: The Rio Tinto case*. Planetary and Space Science 55 (2007) 370-381
- [16] Howel G.M. Edwards, Peter Vandenabeele, Susana E. Jorge-Villar, et al., *The Rio Tinto Mars Analogue site: An extremophilic Raman spectroscopic study*. Spectrochimica Acta Part A 68 (2007) 1133-1137