

Universidad de Granada  
Departamento de Microbiología  
Facultad de Ciencias



**ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE MAGNETITA POR BACTERIAS Y  
DE SU APLICACIÓN COMO MARCADOR DE ACTIVIDAD  
BIOGÉNICA**

**Teresa Pérez González**

**TESIS DOCTORAL**

**Granada, 2010**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Teresa Pérez González  
D.L.: GR 3005-2010  
ISBN: 978-84-693-2582-7



Universidad de Granada

Departamento de Microbiología

Facultad de Ciencias

**Estudio de la producción de magnetita por bacterias y de su aplicación  
como marcador de actividad biogénica**

Teresa Pérez González

Memoria presentada por la licenciada en biología Dña. Teresa Pérez  
González para aspirar al grado de doctor

VºBº de las directoras

**Concepción Jiménez López**

Profesor-Contratado Doctor

Universidad de Granada

**Maria Teresa González Muñoz**

Catedrática Microbiología

Universidad de Granada

La doctoranda

**Teresa Pérez González**

**Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología (Facultad de Ciencias) de la Universidad de Granada durante los años 2006-2010, dentro del grupo de investigación Mixobacterias.**

**Para realizar este trabajo la doctoranda disfrutó de una beca F.P.I. a cargo del proyecto CGL2004-03910/BTE del Ministerio de Educación y Ciencia.**

**A mis padres, mi hermana  
y David, gracias por vuestro  
apoyo incondicional**

## **Relación de acrónimos**

DIRB (Dissimilatory iron reducing bacteria): Bacteria reductora desasimiladora de hierro.

BIM (Biologically induced mineralization): Mineralización inducida biológicamente.

BCM (Biologically controlled mineralization): Mineralización controlada biológicamente.

SDM (Single domain magnetite): Magnetita de dominio único.

OAI (Oxic-anoxic interphase): Interfase óxica-anóxica.

MAB (Magnetite assay for biogenicity): Prueba de biogenicidad para magnetite.

CSD (Crystal size distribution): Distribución del tamaño del cristal.

SFD (Shape factor distribution): Distribución del factor forma.

HRTEM (High resolution transmission microscopy): Microscopía de transmisión de alta resolución.

DSC (Differential Scanning Calorimetry): Calorimetría diferencial de barrido.

SAED (Selected area electron diffraction): Difracción de electrones de áreas seleccionadas.

FESEM (Field emission scanning electron microscopy): microscopía electrónica de barrido de campo de emisión.

ICP-MS (Inductively coupled plasma mass spectrometry): Espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo.

EDAX y EDX (Energy dispersive X-ray spectroscopy): Microanálisis de rayos X de energía dispersiva.

HAADF (High-angle annular dark field): Alto ángulo anular campo oscuro.

TGA (Thermogravimetric analyses): Análisis termogravimétrico.

## **Indice**

# Capítulo I: Introducción

I.1. Generalidades de biomineralización	3
I.1.A. Mineralización inducida biológicamente	5
I.1.B. Mineralización controlada biológicamente	11
I.2. Definición, composición, características y ocurrencia de magnetita en depósitos naturales	
I.2.A. Ocurrencia en la corteza terrestre	15
I.2.B. Composición química	21
I.2.C. Morfología cristalina	22
I.2.D. Magnetismo	23
I.3. Bacterias productoras de magnetita	
I.3.A. Bacterias reductoras de hierro	24
I.3.B. Bacterias magnetotácticas	30
I.4. Formación de magnetita abiótica y biótica	
I.4.A. Aspectos cinéticos y termodinámicos de la formación de un mineral	44
Nucleación	44
Crecimiento cristalino	54
I.4.B. Formación de magnetita abiótica	56
I.4.C. Formación de magnetita biótica	65
Formación de magnetita inducida biológicamente	66
Formación de magnetita controlada biológicamente	72
<u>El magnetosoma</u>	72
<u>La membrana del magnetosoma</u>	72
<u>Características de la magnetita BCM</u>	75



I.5. Aplicaciones	
I.5.A. Magnetita como biomarcador	83
La importancia de la magnetita como biomarcador	83
Criterios utilizados para reconocer a la magnetita de origen orgánico, el Paquete MAB	84
<u>Tamaño de dominio único y proporción ancho/largo anisotrópica restringida</u>	84
<u>Pureza química</u>	85
<u>Perfección cristalográfica</u>	86
<u>Morfología cristalina inusual</u>	86
<u>Dirección de elongación de los cristales de magnetita</u>	89
<u>Cadenas de magnetita</u>	89
Problemática, nuevas técnicas y metodologías	90
<u>Problemas al usar la morfología como indicador de biogenicidad</u>	90
<u>Cuestiones y problemas de la pureza química</u>	92
Otras opciones, posibilidades y consideraciones	
<u>Compuestos orgánicos y cambios en la estructura del cristal</u>	94
<u>Isótopos</u>	95
I.5.B Aplicaciones nanotecnológicas	95
Aplicaciones de los magnetosomas y cristales de magnetita	96
	101
Capítulo II: Objetivos	
Capítulo III: Materiales y Métodos	105
III.1. Microorganismos	105
III.2. Medios de cultivo	105
III.2.A. Medios generales de cultivo	105
III.2.B. Medio de crecimiento y producción de magnetita por bacterias reductoras de hierro	106
III.2.C. Medios para el crecimiento de <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i>	109

III.3. Procedimientos experimentales	112
III.3.A. Creación de condiciones anóxicas y preparación de medios de cultivo anóxicos	112
Cámara Coy	112
Medios de cultivo anóxicos	114
III.3.B. Precipitación de magnetita	115
Precipitación inorgánica de magnetita	115
<u>Formación primaria a partir de soluciones acuosas</u>	116
<u>Formación primaria a partir de medio estéril BpH7</u>	117
<u>Formación secundaria por descomposición termal de ankeritas</u>	118
Precipitación de magnetitas por <i>Shewanella oneidensis</i>	119
<u>Experimentos de formación de magnetita estequiométrica</u>	119
Estudio del proceso de precipitación de magnetita	119
Estudio de los papeles activo y pasivo del microorganismo en la precipitación	120
<u>Experimentos conteniendo compuestos de Ca, Mg y Mn</u>	122
Formación de magnetita por <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i>	122
III.4. Análisis	125
III.4.A. Análisis de las soluciones	125
III.4.B. Análisis de sólidos	126
Capítulo IV: Magnetitas producidas de manera inorgánica	
IV.1. Inorganic magnetite precipitation at 25°C: an easy inorganic coprecipitation method	133
IV.2. Chemical compositions of magnetites formed by thermal decomposition of ankerites	163
Capítulo V: Magnetitas inducidas biológicamente	
V.1. Magnetite biomineralization induced by <i>Shewanella oneidensis</i>	205
V.2. Chemical purity of <i>Shewanella oneidensis</i> induced magnetites	245

Capítulo VI: Magnetitas controladas biológicamente	
VI. Doped up: The incorporation of Manganese in the Crystal Lattice of Magnetosome Magnetite	295
Capítulo VII: Conclusiones	319
Bibliografía	325

# **Capítulo I: Introducción**



## **I.1. Generalidades de biomineralización**

La biomineralización es el proceso por el que los organismos, tanto procariotas como eucariotas, producen minerales. Este proceso ocurre, por un lado, como resultado de su actividad celular, la cual provoca los cambios fisicoquímicos necesarios para que se produzca la formación del mineral y el crecimiento cristalino y, por otro, por el aporte de superficies (pared celular, membranas, polímeros extracelulares, restos de lisis, entre otros) que actúan como núcleos de cristalización, disminuyendo la barrera energética que es necesario superar para que se produzca la nucleación de una fase mineral. La biomineralización ocurre en microorganismos, animales y plantas y los minerales producidos suelen tener una función muy específica como, por ejemplo, la magnetita de los dientes de los quitones que sirve para endurecer la superficie del diente y que no se desgaste (Lowenstam, 1967). A lo largo del tiempo, el número de biominerales descubiertos ha ido incrementándose, contabilizándose en la actualidad más de 60 en 55 *phyla* (Mann, 2001).

Los organismos con capacidad de precipitar minerales están presentes en todos los taxones, desde las bacterias a los cordados. Sin embargo, existe una marcada diferencia en cuanto a la formación de estos biominerales entre los distintos grupos taxonómicos (Simkiss y Wilbur, 1989).

Por lo que respecta a la distribución de los biominerales entre los principales grupos de organismos, se encuentra que los animales son el grupo mayoritario capaces de formar treinta y siete minerales diferentes. El segundo grupo lo forman las bacterias, capaces de sintetizar veinticuatro minerales distintos, las plantas vasculares que forman once y, finalmente los hongos y los protozoos, que forman diez tipos de minerales. Los

minerales de carbonatos, fosfatos, silicatos y óxido de hierro, se forman por especies pertenecientes respectivamente a 26, 23, 21 y 17 *phyla* (Lowentsan y Weiner, 1989).

La mayor parte de los biominerales cuentan con el calcio como catión mayoritario, siendo el hierro el segundo más común. Si agrupamos según los aniones, los más numerosos serían los fosfatos, seguidos de óxidos y carbonatos. A nivel general, los polimorfos del  $\text{CaCO}_3$ , aragonito y calcita son los que están más ampliamente distribuidos en todos los *phyla* mientras que los haluros aparecen en muy pocos grupos y los sulfuros y ciertos óxidos, hasta ahora, sólo se han encontrado en los procariontas.

Dentro de las funciones que pueden tener los biominerales, la más importante es la formación de esqueletos/exoesqueletos. Esta función es muy evidente en organismos eucariotas unicelulares y en muchos *phyla* de invertebrados. Los minerales más abundantes en los esqueletos son los carbonatos de calcio, el fosfato cálcico y la sílice. Los esqueletos de carbonatos y fosfatos son los más fuertes y ligeros, y están formados por compuestos de polímeros bien ordenados intercalados con la fase mineral. Otra función muy importante de los depósitos de biominerales es la de actuar como almacén de iones que se pueden utilizar posteriormente en momentos de gran demanda fisiológica. Una demanda de cationes extraordinaria es algo que ocurre, por ejemplo, durante el tamponado de soluciones bajo condiciones aerobias y anaerobias, cuando se reparan los esqueletos, cuando se biomineraliza un nuevo exoesqueleto después de la muda, en los momentos de estrés reproductivo y en la formación de cáscaras de huevo. El Ca es el ión que más se almacena. Otras funciones de los biominerales son la formación de dientes, espículas, dispositivos para detectar la gravedad (otolitos, estatolitos...), dispositivos de flotación, lentes y dispositivos de orientación en el campo magnético (Lowenstam y Weiner, 1989).

En los organismos pluricelulares, la mineralización depende de un tejido en particular. Esta especificidad celular está muy bien representada en aquellos organismos en los que las células depositan un mineral en una región mientras que otro mineral se forma de manera simultánea en otra parte del organismo. Un buen ejemplo es el depósito de carbonato cálcico en la concha de los moluscos por el epitelio del manto mientras que se deposita magnetita y  $\text{SiO}_2$  por el epitelio que forma la rádula (Simkiss y Wilbur, 1989).

Existen dos modelos mecanísticos que separan en dos tipos los procesos de biomineralización: 1) mineralización inducida biológicamente (BIM) (Lowenstam, 1981); y 2) mineralización controlada biológicamente (BCM) (Frankel y Bazylinski, 2003). A la mineralización controlada biológicamente se le ha llamado en el pasado mineralización mediada por matriz (Lowestam, 1981) y biomineralización organizada por barrera (Mann, 1986) destacando que las membranas son importantes en el proceso de biomineralización. Hay varias diferencias importantes entre BIM Y BCM en las que nos fijaremos a continuación.

### **I.1.A. Mineralización inducida biológicamente**

El mineral precipita debido a cambios químicos producidos en el ambiente donde vive el organismo ocasionados por el metabolismo del mismo y por el aporte de núcleos de cristalización, es decir, de superficies que “favorecen” la precipitación, tal y como se explicará más adelante. Debido a esto, los biominerales se depositan, prácticamente siempre, externos al organismo que los induce. La mineralización ocurre en un ambiente abierto y no en un espacio delimitado para este propósito. No existe una maquinaria celular o macromolecular especializada para inducir la biomineralización.

En la BIM se dan dos tipos de procesos, activos y pasivos (Fortin y Beveridge, 2000; Southam 2000). Los mecanismos activos se refieren a la formación del mineral



causada por la actividad metabólica del organismo. Los mecanismos pasivos se refieren a la formación de minerales gracias a las paredes o membranas celulares y/o restos celulares, que actúan como núcleos de cristalización (Fortin y Beveridge, 2000; Southam, 2000).

Respecto a los mecanismos pasivos, la mayoría de exopolímeros y superficies celulares están cargadas negativamente, lo que provoca la unión de cationes por interacciones electrostáticas inespecíficas contribuyendo a la sobresaturación local (Beveridge, 1989; Konhauser, 1998; Banfield y Zhang, 2001; Bäuerlein, 2003; Bazylinski *et al.*, 2007). Esta unión también ayuda a estabilizar las superficies de las partículas minerales que se están formando, ya que disminuye la energía libre crítica necesaria para la formación de núcleos cristalinos. Gracias a la presencia de estos mecanismos pasivos, la tasa de mineralización puede incrementarse en varios órdenes de magnitud respecto a una situación en la que no estuvieran presentes estas superficies. Los minerales formados tienen una gran variedad de tamaños y de morfologías y suelen agregarse al azar (Lowenstam y Weiner, 1989).

La mineralización inducida biológicamente parece el proceso dominante entre los procariotas y los hongos, y ocurre con frecuencia entre algunos eucariotas unicelulares (Lowenstam y Weiner, 1989). Un hecho característico de la mineralización inducida biológicamente es que la mineralogía de la fase sólida resultante depende en gran medida de las condiciones ambientales en que un organismo vive. De esta manera, un mismo organismo en distintas condiciones puede dar lugar a distintos minerales (Lowenstam y Weiner, 1989). Por ejemplo, los líquenes producen minerales a partir de los cationes liberados por la disolución del substrato en el que se encuentran, disolución causada por ácidos que ellos mismos producen. Así, dependiendo de la mineralogía del substrato, los líquenes pueden inducir la formación de distintos minerales. Por ejemplo,

la especie *Pertusaria corallina* forma habitualmente weddellita, o un oxalato de manganeso sin nombre específico, pero cuando el sustrato es una roca volcánica rica en hierro, el líquen forma ferrihidrita (Jones *et al.*, 1986).

Entre los animales, la mineralización inducida biológicamente, es un proceso bastante frecuente. Como ejemplos de ésta nos encontramos con los cristales de calcita formados en el esqueleto axial de los Pennatulidos (Ledger y Franc, 1978) y los cristales de weddellita y brucita que se forman entre las capas de depósitos de calcita biológicamente controlados en la mandíbula o el pico de *Nautilus* (Lowenstam *et al.*, 1984),

Entre las algas también encontramos muchos ejemplos de biomineralización inducida, siendo el carbonato el biomineral formado en la mayoría de los casos (Borowitzka, 1982). Además, combinan los procesos de mineralización inducida con el de mineralización controlada biológicamente. Por ejemplo, mientras que las algas pardas como *Padina* forman cristales de aragonito sin ningún control sobre el proceso, las algas rojas *Galaxura* y *Liagora* y, particularmente las algas verdes *Halimeda*, forman cristales por un proceso mucho más controlado, de manera que los cristales se depositan entre las células, en un espacio que puede estar parcialmente comunicado con el ambiente marino (Hillis, 1959). Estos cristales formados están en asociación con la membrana celular. Hay otros ejemplos de biomineralización en algas. En muchos de ellos, el alga tiene cierto grado de control sobre el biomineral formado, al estar implicadas en dicha formación estructuras celulares, como la pared celular en el caso de *Chara* (Spear *et al.*, 1969) y la membrana citoplasmática en el caso de algas verdes como *Penicillus*, *Rhipocephalus* y *Acetabularia* (Böhm *et al.* 1978).

Entre las bacterias, los procesos de mineralización inducida biológicamente están ampliamente extendidos, siendo también muy amplio el número de biominerales

producidos mediante este proceso en todo tipo de ambientes: aerobios, anaerobios e interfase óxica-anóxica (OAI). Los biominerales que están más distribuidos a nivel geológico son los hidróxidos férricos (ferrihidrita) (Konhauser, 2007), aunque otros minerales de hierro como la, magnetita, goethita, hematita, también están muy ampliamente distribuidos. Los óxidos de manganeso también son muy comunes, así como las arcillas, la sílice amorfa, los carbonatos, fosfatos, sulfatos y sulfitos (Konhauser, 2007). A continuación se amplía información sobre diferentes minerales producidos por bacterias.

En primer lugar nos referiremos a los carbonatos, que pueden ser inducidos por una gran cantidad de microorganismos. Esta precipitación de carbonatos ocurre como consecuencia de cambios en las condiciones químicas del medio debido a diferentes procesos metabólicos entre los que se incluyen fotosíntesis, amonificación, metanogénesis, reducción desasimiladora de nitrato, la degradación de urea o ácido úrico y la reducción desasimiladora de sulfato (Castanier *et al.*, 2000; Riding, 2000). En estos procesos la precipitación ocurre por aumentos de la alcalinidad del sistema causados por la fijación de CO<sub>2</sub> y/o aumentos de pH debidos a la liberación de ión amonio, CO<sub>2</sub> o consumo de protones en el metabolismo bacteriano. En estas condiciones, si hay calcio presente en el medio, se inducirá la formación de carbonatos de calcio, refiriéndonos a este mineral por ser uno de los más estudiados en la literatura, aunque la precipitación de carbonatos de magnesio y manganeso también es un proceso habitual. Se han estudiado numerosos microorganismos capaces de inducir la formación de CaCO<sub>3</sub>. Entre ellos destacamos bacterias del género *Pseudomonas* (Baskar *et al.*, 2006), *Bacillus* (Castanier *et al.*, 2000), *Vibrio* (Rivadeneya *et al.*, 1993) y *Streptomyces* (Cañaveras *et al.*, 1999), bacterias reductoras de sulfato y cianobacterias (Wright, 1999), *Myxobacteria* (Ben Chekroun *et al.*, 2004; González-Muñoz *et al.*, 1996) y *Halobacillus*

(Rivadeneira *et al.*, 2004). Las bacterias quimioheterótrofas han contribuido en gran medida a la formación de carbonatos en sedimentos, superando a la de cianobacterias y otros microorganismos fotosintéticos. Además, se ha demostrado que los minerales de carbonato cálcico no sólo son inducidos por el metabolismo bacteriano, sino que también se pueden formar en presencia de células muertas, como resultado de un aumento local de saturación del sistema con respecto a la fase mineral relevante, provocado por membranas y restos celulares. En este sentido cabe destacar los trabajos de Gonzalez-Muñoz *et al.*, 1996 y Benzerara *et al.*, 2004.

La producción de carbonatos por microorganismos, según una mineralización inducida, tiene importancia ambiental en procesos como, entre otros, la retirada de CO<sub>2</sub> atmosférico (Braissant *et al.*, 2002; Ehrlich, 2002), la formación de rocas y sedimentos (Riding, 2000; Ben Chekroun *et al.*, 2004) y los ciclos biogeoquímicos de los elementos (Banfield y Nealson, 1997; Ehrlich, 2004). Además, también en clínica podría ser relevante, por aparecer concreciones de carbonatos en algunas patologías (Keefe, 1976). En biotecnología se aprovecha este proceso en la biorremediación de aguas contaminadas (Warren *et al.*, 2001; Fujita *et al.*, 2004; Mitchell y Ferris, 2005, 2006; Köhler *et al.*, 2007) y la conservación de piedra ornamental (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2003, Jimenez-Lopez *et al.*, 2007 y 2008).

En la literatura se pueden encontrar trabajos sobre otros biominerales inducidos por microorganismos, aunque las referencias no son tan abundantes como en el caso de carbonatos. Un primer ejemplo es el caso de la formación biológica de fosfatos. La precipitación bacteriana de fosfatos es un proceso muy común y lo realizan bacterias de varios géneros. La precipitación de apatito (Ca<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>(OH,F,Cl)) se ha observado, entre otros microorganismos, en *Streptococcus salivarius*, *Actinomyces naeslundii* y *Bacterionema matruchotti* (Rizzo *et al.*, 1962). Los fosfatos también pueden aparecer en

la naturaleza como sales de calcio, aluminio, hierro o magnesio. Otro ejemplo de mineral de fosfato es la estruvita ( $\text{MgNH}_4\text{PO}_4$ ), que es sintetizada por *Staphylococcus aureus* (Beavon y Heatley, 1962), *Bacillus pumilus* (Nelson *et al.*, 1991), *Pseudomonas calciprecipitans* (Shinano y Sakai, 1975) y *Myxococcus xanthus* (González-Muñoz *et al.*, 1996, 2008; Omar *et al.*, 1998) entre otros.

También los sulfuros y sulfatos pueden ser formados por microorganismos. Por ejemplo, las bacterias reductoras de sulfato liberan sulfuro de hidrógeno, sobresaturando el medio con respecto a diferentes fases de sulfuros, que podrán precipitar si está presente el ión metálico correspondiente. Algunos ejemplos son sulfuro de hierro ( $\text{FeS}$ ), pirita ( $\text{FeS}_2$ ), greigita ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ) e incluso magnetita intracelular de dominio magnético único ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) (Sakaguchi *et al.*, 2002). Otras cepas de sulfato reductoras pueden producir mackiwanita  $(\text{Fe,Ni})_{1+x}\text{S}$  (donde  $x = 0$  a  $0.11$ ), millerita ( $\text{NiS}$ ), galena ( $\text{PbS}$ ) y esfarelita ( $\text{ZnS}$ ) (Machel, 2001). Otros microorganismos de chimeneas hidrotermales marinas se encontraron asociados con calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ), pearcita ( $\text{Ag}_{14,7-x}\text{Cu}_{1,3+x}\text{As}_2\text{S}_{11}$ ) y proustita ( $\text{Ag}_3\text{AsS}_3$ ). Otras especies como *Synechococcus* son capaces de precipitar sulfatos como el yeso ( $\text{CaSO}_4$ ) (Schultze-Lam *et al.*, 1992), la celestita ( $\text{SrSO}_4$ ) o la estroncita ( $\text{SrCO}_3$ ). *Myxococcus xanthus* es capaz de formar barita ( $\text{BaSO}_4$ ) (González-Muñoz *et al.*, 2003).

Otro mineral muy común en la corteza terrestre es el silicio. Algunas bacterias y hongos son capaces de captar silicio intracelular, dentro de ciertos límites (Heinen, 1960). Sin embargo, lo que ocurre más frecuentemente es que los microorganismos silicifican al estar en un ambiente sobresaturado de silicio, es decir, se ven envueltos en una solución de oligómeros de silicio que polimerizan y finalmente precipitan. Colonias enteras se encuentran cementadas en una matriz silíceica que puede llegar a tener varios micrómetros de espesor (Konhauser, 2007). Esto puede ocurrir de tres formas

diferentes: por unión a hidrógeno, como *Calothrix* (Phoenix *et al.*, 2002); por puentes de cationes, se da en *Bacillus subtilis* (Phoenix *et al.*, 2003); o por interacciones electroestáticas directas, como en *Sulfurihydrogenibium azorense* (Lalonde *et al.*, 2005).

### **I.1.B. Mineralización controlada biológicamente**

En la BCM los minerales normalmente se forman sobre o dentro de matrices o vesículas orgánicas dentro de la célula. El organismo ejerce un grado de control significativo sobre el proceso de nucleación y crecimiento del mineral y, por lo tanto, sobre la composición, tamaño, hábito, y localización intracelular de las partículas (Bazylinski y Frankel, 2003).

Para entender mejor la biomineralización controlada hay que tener en cuenta que todos los sistemas celulares tienen tres características comunes: (1) su composición consiste principalmente en proteínas disueltas en una solución salina y englobadas dentro de membranas lipídicas, (2) para mantener el equilibrio osmótico y que se puedan dar otras reacciones metabólicas la composición salina debe ser diferente en el exterior e interior de las membranas lipídicas y (3) el transporte activo a través de las membranas ayuda a mantener la estabilidad osmótica. En este sentido, mientras el Mg es acumulado intracelularmente, el Ca es expulsado y los aniones fosfato y bicarbonato se mueven libremente a través de las membranas, actuando como los tampones inorgánicos más importantes en las células.

Como se ha mencionado anteriormente, en la mineralización controlada biológicamente los organismos ejercen un gran control sobre la nucleación y crecimiento de las partículas minerales. En la mayoría de casos, los minerales son directamente sintetizados, sólo en circunstancias determinadas, en un lugar específico dentro, o en la superficie de la célula. El mineral que se forma se aísla primero del

ambiente exterior por una barrera a través de la cual los iones no pueden difundir libremente (Wilbur y Bernhart, 1984; Simkiss, 1986). Las bicapas lipídicas, tanto en las membranas celulares como en vesículas localizadas dentro o fuera de las células, son las más utilizadas para delimitar estos espacios. Otros materiales utilizados para este propósito son las macromoléculas insolubles, como proteínas y/o polisacáridos que forman láminas impermeables, como, por ejemplo, la periostracina (Herbert *et al.*, 1979).

En los microorganismos, el ejemplo mejor caracterizado de BCM es la formación de magnetosomas por bacterias magnetotácticas, un grupo de microorganismos en que los cristales de magnetita producidos por BCM parecen tener una función específica y cuyo proceso de formación se verá detalladamente más adelante.

Sin embargo, este tipo de biomineralización es mucho más común en los organismos superiores, en los que se producen varios minerales diferentes con unas funciones muy específicas.

Las cáscaras de huevo de aves son estructuras calcificadas que funcionan como barrera protectora para el contenido del huevo y permiten el desarrollo extrauterino del embrión (Nys *et al.*, 2004). Consiste en una parte mineral mayoritaria (>95%) compuesta de cristales de calcita y una matriz orgánica impregnada (1–3.5%) hecha de un material compuesto con excelentes propiedades mecánicas (Nys *et al.*, 2004; Arias *et al.*, 1993; Simkiss y Wilbur, 1989). La parte mineral consiste en cristales columnares de calcita (capa en empalizada, 200  $\mu\text{m}$  de grosor) formados a partir de núcleos separados (cuerpos mamilares) y cubiertos por una cutícula. La disposición y el tamaño de los cristales de calcita cambia a lo largo del corte, siendo pequeños y orientados al azar en

la superficie interna y más grandes y orientados según direcciones preferentes cerca de la superficie externa (Hamilton et al., 1982; Silyn-Roberts y Sharp , 1985).

La formación de la cáscara de huevo es un proceso muy bien regulado espacio-temporalmente, dando como resultado un material con composición y unas características ultra/microestructurales muy bien definidas que son muy comunes en todas las especies de aves (Hernández-Hernández *et al.*, 2009).

Por otro lado, las valvas de moluscos se componen de materiales compuestos muy sofisticados formados por cristales de  $\text{CaCO}_3$  embebidos en una matriz orgánica. Las valvas están compuestas de de capas superpuestas con una composición monomineral (calcita o aragonito) y formadas por cristales de tamaño y morfología uniforme colocados de manera ordenada según diferentes microestructuras o arquitecturas de la concha (Taylor y Kennedy, 1969; Carter, 1990). Las microestructuras específicas de la concha son características de las capas calcíticas (ej. prismáticas en hoja) o aragoníticas (ej. nácar, lámina cruzada). En estos biomateriales, el mineral y la matriz orgánica están íntimamente asociados y ordenados jerárquicamente en todas las escalas (de nano a milimétrica) (Lowenstam y Traub, 1984; Cartwright y Checa, 2007). Para una especie determinada de molusco, las características microestructurales de la valva son definidas y constantes, indicando que el animal controla el proceso de mineralización de manera exhaustiva (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2006; Checa *et al.*, 2009) (Addadi y Weiner, 1992).

La mineralización de las valvas ocurre en un ambiente cerrado delimitado por el manto, en el que una solución de composición compleja se secreta por el tejido. Esta solución es el fluido extrapaleal y contiene iones de calcio y carbonato para la precipitación de cristales de carbonato cálcico, así como los precursores orgánicos necesarios para la formación de la matriz orgánica. Hay pruebas gracias a experimento



de cristalización de  $\text{CaCO}_3$  *in vitro* de que las proteínas de la matriz orgánica juegan un papel muy importante en el control de la mineralización de la valva y de que regulan específicamente el crecimiento del cristal definiendo la fase polimórfica y la morfología de los cristales de carbonato cálcico que constituyen las capas de las valvas de los moluscos (Belcher *et al.*, 1996; Falini *et al.*, 1996; Nudelman *et al.*, 2006)

Estos dos minerales, calcita y aragonito, también forman los sensores de gravedad de animales terrestres como marinos. Estos sensores (estatólitos, estatóconios, otolitos y otoconios) se encuentran sumergidos en un fluido denso rodeados por unas células con extensiones en forma de *pili*. Cuando hay un cambio en la aceleración lineal del organismo, el movimiento del cristal es detectado por estas células que transmiten la correspondiente señal eléctrica.

La calcita formaba también las lentes de los ojos compuestos de los trilobites. Los cristales de calcita son birrefringentes, sin embargo, en este animal, los cristales de calcita se encontraban alineados de tal manera que el animal podía ver correctamente.

Por otro lado, el fosfato de calcio es el mineral que aparece más frecuentemente en organismos superiores. Esto es debido a que los dientes y los huesos están formados por una variedad de fosfato cálcico, el hidroxiapatito ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). El hueso, aparte de un biomineral, es un mineral “vivo” ya que sufre de constantes crecimientos, disoluciones y remodelaciones en respuesta a señales internas y externas. El esmalte y la dentina son otros derivados del hidroxiapatito con características muy particulares para resistir el estrés mecánico al que están sometidos.

El silicio aparece en las formas superiores de vida como en las espículas de las esponjas, en espinas y fitolitos de plantas y en los dientes de las lapas (Hua y Li *et al.*, 2007). En microorganismos como las diatomeas y los radiolarios es estructural donde forma delicados microesqueletos porosos (Hua y Li., 2007). La síntesis de frústulas de

diatomeas se produce por la secreción de vesículas areolares que se unen a la pared celular y proporcionan un molde para la deposición de sílice (Perry *et al.*, 2003).

Además de todas las funciones específicas de los biominerales, el hecho de que permanezcan en sedimentos durante periodos de tiempo más extensos que los componentes orgánicos y su presencia en gran cantidad y diversidad de *phyla*, hacen que estos biominerales puedan ser usados como biomarcadores, es decir, marcadores de actividad biogénica, y nos sirvan para estudiar la evolución de la vida en nuestro planeta.

## **I.2. Definición, composición, características y ocurrencia de magnetita en depósitos naturales**

### **I.2.A. Ocurrencia en la corteza terrestre**

La magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) es un óxido ferroso diférrico, diferente del resto de óxidos de hierro porque contiene hierro di y trivalente ( $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4$ ). Es un mineral común en las rocas terrestres que puede tener un origen biótico o inorgánico. La magnetita está presente en rocas sedimentarias, ígneas y metamórficas.

Las magnetitas presentes en rocas ígneas, metamórficas y de origen hidrotermal son de origen inorgánico. En la tabla 1A se muestran las principales características de las rocas de origen ígneo y metamórfico, mientras que en la tabla 1B se muestran las características de las rocas de origen hidrotermal. Estos tres tipos de roca contienen magnetitas con una gran variabilidad en el tamaño del cristal que no son puras en la mayoría de los casos, ya que aparecen otros cationes en su composición, de los que el más abundante es el Ti.

Por otra parte, también aparece magnetita de manera muy frecuente en ambientes de baja temperatura, ambientes ricos en carbonatos, calizas, depósitos de petróleo degradados, sedimentos (marinos y terrestres) y en suelos. Estas magnetitas pueden tener un origen biótico o inorgánico. Es normal ver en una misma muestra tanto partículas de magnetita inorgánica como partículas biogénicas. En la tabla 1C se muestran las características de las magnetitas producidas en ambientes de baja temperatura. Las magnetitas de origen biogénico son puras y tienen tamaños de cristal parecidos (Thomas-Keprta *et al.* 2000).

La magnetita está también presente en rocas de origen extraterrestre. Se ha hallado este mineral en varias condritas como se muestra en la tabla 1D. Actualmente hay un debate abierto sobre este tema desde que Thomas-Keprta *et al.* (2000), propusieron las magnetitas presentes en uno de estos meteoritos, concretamente en el ALH84001 proveniente de Marte, como un posible biomarcador de una antigua vida bacteriana en este planeta.

**Tabla 1 A. Magnetitas en rocas ígneas y metamórficas**

Tipo de roca	Morfología	Tamaño	Composición química	Referencias
I/M	Amplia variedad	< 1 $\mu\text{m}$ hasta mm	Generalmente + Ti ( $\text{Fe}_{3-x}\text{Ti}_x\text{O}_4$ ; $0 \leq x \leq 0.8$ ) El Fe se sustituye frecuentemente por Ti, Mg, Mn, Ni, Zn, Al, Cr y V	(Cornell y Schwertman, 1996; Frost, 1991; Frost y Lindsley, 1991)
I (carbonatitas)	Irregulares	1 mm en la dirección más larga		(Moecher <i>et al.</i> , 1997)
I	Barras y láminas	< 17 $\mu\text{m}$		(Evans y McElhinny, 1968; Evans y McElhinny, 1966)
I	Irregulares/equant	30 nm-2 $\mu\text{m}$ ; la mayoría multidominio		(Evans y Wayman, 1970)
I	Equant/alongados	10–500 nm	+Ti	(Morgan y Smith, 1981)
I		100–200 $\mu\text{m}$ (0.5 mm max)	< 1 wt% $\text{TiO}_2$ , trazas de V (intercrecimiento de magnetita/ilmenita)	(Morgan y Smith, 1981)
I	Algunas agujas	200–400 nm de ancho, 2.4 $\mu\text{m}$ de longitud		(Morgan y Smith, 1981)
I (en vidrio)	Irregulares, hexagonales	De dominio único a pseudoúnico ; de <1 $\mu\text{m}$ a varias $\mu\text{m}$	+Ti	(Heider <i>et al.</i> , 1993)
I (en vidrio)	Esferas	10–20 nm	+Ti	(Pick y Tauxe, 1994)
I (en vidrio)	Redondeadas	1.5–10 nm		(Schlinger <i>et al.</i> , 1988)
I (en vidrio)		~10 nm		(Schlinger y Smith, 1986)
I (en vidrio)	Redondeadas, irregulares	Dominio único	+Ti	(Itoh <i>et al.</i> , 1989)
I	Agregados cristalinos y cristales pequeños aislados	15–20 $\mu\text{m}$ ; 5–10 $\mu\text{m}$	+Ti, Mn	(LeGuern y Bernard, 1982)
I (en vidrio)	Irregulares/hexagonales	40 nm	+Ti	(Smith, 1979)
I (en vidrio)		Dominio único y pseudoúnico	+Ti	(Geissman <i>et al.</i> , 1983)
I	Octaedros/ alongados	Hasta 50 $\mu\text{m}$	+Al, Ti	(Symonds <i>et al.</i> , 1987; Symonds, 1993)

**Tabla 1 B. Magnetitas terrestres producidas hidrotermalmente**

Tipo de roca	Morfología	Tamaño	Composición química / interpretación	Referencias
Rocas volcánicas yesíticas	Capas/ octaedros	Grano grueso	Reemplazamiento metasomático de yesita y alteración hidrotermal (250–350°C)	(Rhodes <i>et al.</i> , 1997)
Depósito de óxido de hierro masivo	a. Ilmenita periférica b. Agrupaciones radiales de cristales euhédricos c. En fluorita, gotitas esféricas alongadas	a. Decenas de $\mu\text{m}$  c. <100 nm	<1 wt% Ti fluidos hidrotermales de origen magmático	(Borrok <i>et al.</i> , 1998)
Basaltos	a. Cruciformes / ramificados b. Anhédricos/ subhédricos	a. Hasta decenas de $\mu\text{m}$ b. >1 $\mu\text{m}$	a. De pura a +Ti b. Productos de alteración puros anhédricos/ subhédricos de ígneas primarias (dendríticas)	(Van der Voo <i>et al.</i> , 1993)
Yacimiento de Fe	Irregulares	Mm de tamaño	+Ti	(Vidal C. <i>et al.</i> , 1990)
Yacimiento			+ Al, Ca, Mg	(Grigoryev <i>et al.</i> , 1990)

**Tabla 1 C. Magnetita en ambientes de baja temperatura**

Tipo de roca	Morfología	Tamaño	Interpretación	Referencias
Sedimentos marinos profundos	a. Prismáticas alongadas, forma de bala, octaédricas b. Euédricas, con ilmenitas de exsolución lamelas	a. Dominio único (30–100 nm) b. Grueso	a. Biogénica b. +Ti, Mg, Al, Mn, Cr/escasas composiciones puras	(Petersen <i>et al.</i> , 1986)
Depósitos secundarios de calcitas en cuevas	a. Irregulares/equidimensionales b. Hexagonales/cúbicas	a. 0.01 a >10 µm b. 10–100 µm	a. Algunas + Ti b. Algunas biogénicas	(Perkins, 1996)
Suelos	Octagonales/hexagonales	<10–100 nm	+Zn, Mn ocasionalmente	(Maher y Taylor, 1988)
Carbonato	c. Esferas	a. Dominio único b. Multi-dominio c. >10 µm	a. Biogénica b. +Ti	(Belkaaloul <i>et al.</i> , 1997)
Carbonato	a. Botryoidales/ esferas agregadas b. Esferas	a. 3–20 µm b. Hasta 150 µm	b. Inclusiones: +Mg, Al, Si, Ca	(McCabe <i>et al.</i> , 1983)
Carbonato	a. Esferas/ superficies horadadas b. No esféricas c. Relleno de huecos	a. 1–35 µm b. Submicrones a 50 µm		(Suk <i>et al.</i> , 1990b)
Sedimentos lacustres	Prismáticas	Dominio único	Biogénica	(Snowball, 1994)
Carbonato	Esferoides huecas, botryoidales			(Jackson <i>et al.</i> , 1988)

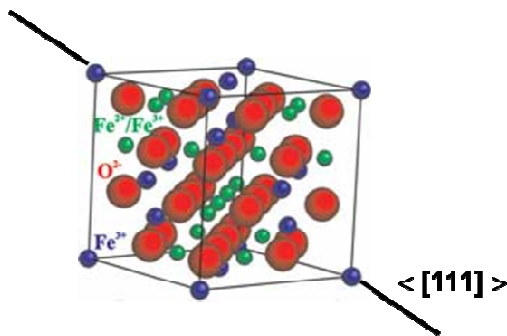
**Tabla 1 D. Magnetitas en muestras extraterrestres**

Muestra	Morfología	Tamaño	Composición química	Modo de formación	Referencias
Condritas carbonatadas CI	a. Agregados redondeados; los cristales son equant b. Esferulitos; pilas de discos	a. 10–30 $\mu\text{m}$ ; los cristales individuales son $< 1 \mu\text{m}$ b. 5–40 $\mu\text{m}$	a. Trazas de Ni b. ~800 ppm Ni	Alteración acuosa	(Kerridge <i>et al.</i> , 1979; Kerridge, 1970)
Orgueil (Condritas carbonatadas CI)	Discos, pilas de discos, framboides	~0.5 a varios $\mu\text{m}$		Condensado de vapor nebular	(Jedwab, 1971)
Condritas ordinarias desequilibradas		15–20 nm			(Tople-Schadt y Muller, 1985)
Condritas carbonatadas CI	Euhédricas				(Endress y Bischoff, 1966)
Condritas normales tipo 3	Granos masivos distribuidos heterogéneamente	Decenas de $\mu\text{m}$		Alteración hidrotermal de Fe metálico	(Krot <i>et al.</i> , 1997)
Condritas carbonatadas CK		De decenas a cientos de $\mu\text{m}$	+Cr, Al, Ti, Ni, Mg, Mn, Si; el Ni esta distribuido por zonas		(Rubin, 1993)

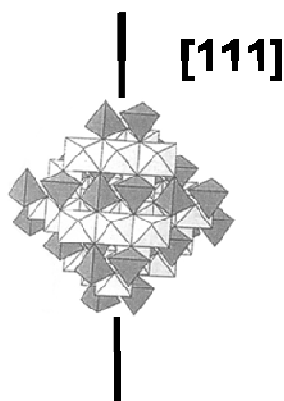
La magnetita se ha encontrado de forma directa en las bacterias magnetotácticas (Frankel *et al.* 1979), en algunas especies de algas (Torres de Araujo, 1986), en los dientes de los quitones (Lowenstam, 1967), en peces (Mann *et al.*, 1988), en la tortuga verde (Perry *et al.* 1985) y en las palomas (Walcott *et al.*, 1979). De forma indirecta, gracias al magnetómetro SQUID (superconducting quantum device) (Fuller *et al.*, 1985), se ha detectado en multitud de organismos pluricelulares como las abejas (Gould *et al.* 1978), varias especies de crustáceos (Burskirk y O'brian, 1985), la mariposa monarca (Mc Fadden y Jones, 1985), anfibios y reptiles (Perry *et al.* 1985), aves (Presti, 1985), murciélagos (Buchler y Wasileski, 1985), cetáceos (Bauer *et al.*, 1985) e incluso en simios (Kirschvink, 1981) y humanos (Baker *et al.*, 1983).

## I.2.B. Composición química

La magnetita tiene una celda unidad, la porción más simple de la estructura cristalina, que al repetirse mediante traslación reproduce todo el cristal, formada por una estructura con 32 aniones de  $O^{2-}$ . Estos aniones están empaquetados regularmente de forma cúbica a lo largo del eje  $\langle [111] \rangle$  (Fig. 1), lo que provoca que haya 32 huecos octaédricos y 64 tetraédricos en la estructura. El  $Fe^{3+}$  puede ocupar sitios tetraédricos (T) y octaédricos (M) mientras que el  $Fe^{2+}$  sólo puede ocupar sitios octaédricos (M) (Fig. 2). En la estructura hay 32 huecos octaédricos, de los que hay 16 libres y 16 ocupados por  $Fe^{2+}$  y 64 huecos tetraédricos, de los que hay 56 libres y 8 ocupados por  $Fe^{3+}$ . La estructura consiste en capas octaédricas mezcladas con capas octaédricas-tetraédricas apiladas a lo largo del eje  $[111]$  (Fig. 2).



**Figura 1.-** La imagen se corresponde con una celda unidad (32 átomos de  $O_2$ ). Los sitios octaédricos (M) están representados en verde. Los sitios tetraédricos (T) están representados en azul.



**Figura 2.-** Modelo poliédrico que alterna capas octaédricas con capas octaédricas-tetraédricas. Los octaedros están representados en blanco y los tetraedros en gris.

Como ya hemos señalado antes, no todos los huecos están rellenos por cationes de  $Fe^{2+}$  o  $Fe^{3+}$ . Se puede producir el relleno de estos huecos o incluso la sustitución de  $Fe^{2+}$



o  $\text{Fe}^{3+}$  por un largo número de cationes. En la naturaleza se encuentra frecuentemente asociada al titanio (Ti). Las titanomagnetitas ( $\text{Fe}_{3+x}\text{Ti}_x\text{O}_4$ ) y las ilmenitas ( $\text{Fe}_{2+x}\text{Ti}_x\text{O}_3$ ) son los óxidos de hierro más importantes en rocas ígneas. El hierro también puede ser desplazado por un gran número de cationes además del Ti, como por ejemplo el Mg, Mn, Ni, Zn, Al, Cr y Vn (Thomas-Keprta *et al.* 2000).

### I.2.C. Morfología cristalina

La magnetita natural y sintética suele aparecer como cristales octaédricos, unidos por los planos  $\{111\}$  (Fig. 3) y como rombo-dodecaedros (Fig. 4), aunque puede adoptar varias morfologías, dependiendo de varios parámetros relacionados con el modo de síntesis. El emparejamiento ocurre en el plano  $\{111\}$ . Las diferentes morfologías que puede adquirir relacionadas con su ocurrencia en la naturaleza se exponen en los apartados I.4.B. y I.4.C.



**Figura 3.-** Magnetita octaédrica.



**Figura 4.-** Magnetita rombo-dodecaédrica.

## I.2.D. Magnetismo

La magnetita es ferrimagnética a temperatura ambiente, es decir, el alineamiento de los espines electrónicos es antiparalelo, lo que hace que el momento magnético de los espines sea diferente y crea un momento magnético neto. Por lo tanto, se ve fuertemente atraída por los campos magnéticos. Cualquier sustitución catiónica disminuye la coercitividad, es decir, la fuerza magnética de la magnetita. En este magnetismo también influye el tamaño de la partícula. Las partículas entre ~35-120 nm son de dominio único magnético (SMD, single magnetic domain), es decir, cada partícula se comporta como un imán en si misma y tiene sus dos dipolos (N y S). Las partículas inferiores a 35 nm son superparamagnéticas a temperatura ambiente, es decir, no tienen un magnetismo permanente a temperatura ambiente. Las que superan los 120 nm presentan un magnetismo más débil ya que al presentarse varios dominios magnéticos en una misma partícula se anulan unos a otros.

Cuando el tamaño de partícula y la distribución de tamaño de las partículas son similares, la morfología del cristal afecta a la coercitividad en el siguiente orden: esferas < cubos < octahedros. Esto es debido al aumento en el número de ejes magnéticos en esta serie de formas. Controlando las condiciones de precipitación, y por tanto el tamaño y morfología de la partícula, se pueden producir magnetitas con una coercitividad entre 2.4 y 20 kAm<sup>-1</sup> (Meisen y Kathrein, 2000). Esta propiedad se usa mucho en las aplicaciones tecnológicas de la magnetita, donde el control de las propiedades magnética es crucial, tal y como se explica en el apartado I.5.B.

### **I.3. Bacterias productoras de magnetita**

Existen en la naturaleza diferentes tipos de microorganismos capaces de producir magnetita. Los más importantes son las bacterias desasimiladoras reductoras de hierro y las bacterias magnetotácticas.

#### **I.3.A. Bacterias reductoras de hierro**

Aunque en los ciclos biogeoquímicos del hierro intervienen diferentes microorganismos, la magnetita precipita en la naturaleza fundamentalmente gracias a las bacterias desasimiladoras reductoras de hierro. La reducción desasimiladora del hierro y manganeso es el proceso por el que el microorganismo reduce  $\text{Fe}^{3+}$  o  $\text{Mn}^{4+}$  con un propósito diferente a la asimilación de estos cationes, se obtenga o no energía a partir de este proceso. Las bacterias reductoras de hierro están muy extendidas en el dominio *Bacteria* y se han encontrado en diferentes ambientes, como hábitats acuáticos marinos y de agua dulce (Lovley *et al.*, 1990; Caccavo *et al.*, 1992; Roh *et al.*, 2006) incluyendo lagos básicos (Zavarzina *et al.*, 2006), manantiales termales (Solokova *et al.*, 2007), sedimentos de lagos con residuos de minería (Cummings *et al.*, 1999) y aguas residuales (Ye *et al.*, 2004; Kusel, 2003; Johnson y Hallberg, 2003). Debido a su amplia distribución, las bacterias reductoras de hierro intervienen, en cierta medida, en los ciclos geoquímicos globales de elementos como el carbono, el oxígeno, el azufre y el hierro.

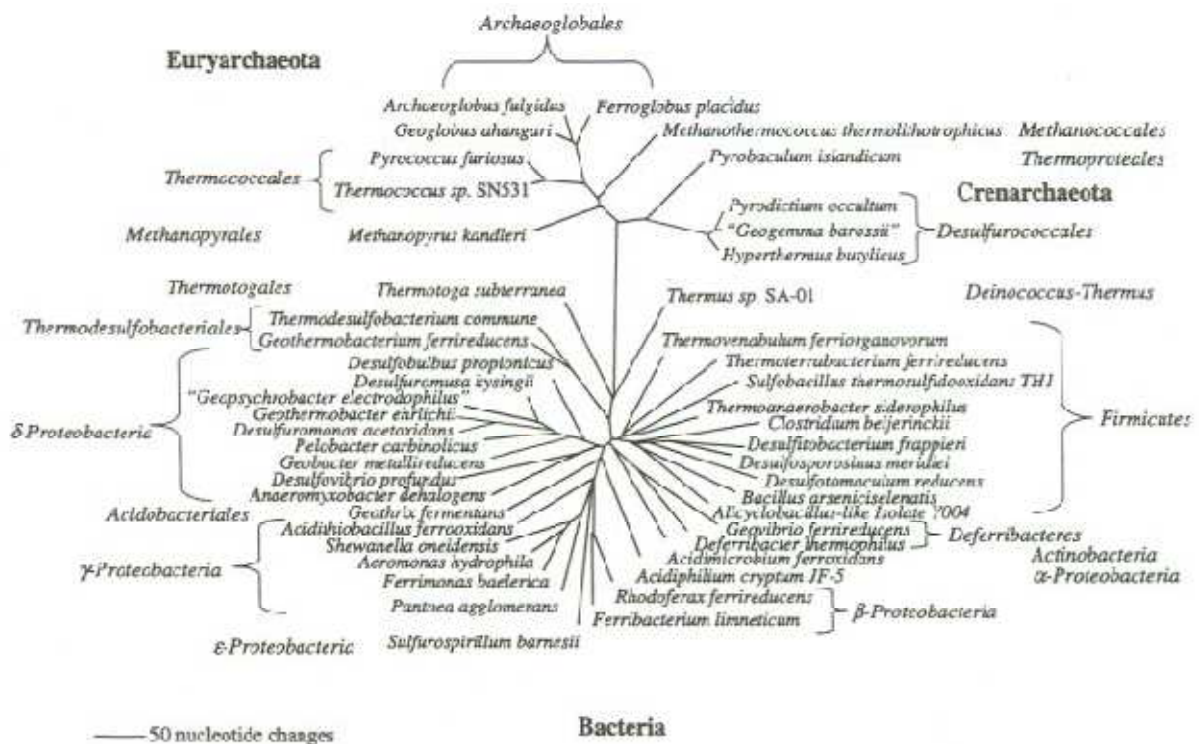
Muchos de estos microorganismos reducen  $\text{Fe}^{3+}$  como efecto secundario de su metabolismo pero no obtienen energía para su crecimiento a partir de esta transferencia de electrones (Lovley, 1987, 1991). Los primeros microorganismos reductores desasimiladores de hierro que se estudiaron fueron los fermentadores reductores de  $\text{Fe}^{3+}$  (*Bacillus polymyxa*, *Clostridium butyricum* y *Cl. pasteurianum*) (Ottow, 1970; Ottow y

Glathe, 1971, Munch y Ottow, 1977, 1983). A partir de estos estudios se determinaron muchos de los conceptos de la fisiología de la reducción desasimiladora de  $\text{Fe}^{3+}$  que se mantienen en la actualidad, como, por ejemplo, la necesidad de contacto entre los reductores de  $\text{Fe}^{3+}$  y el óxido de  $\text{Fe}^{3+}$  para que se produzca la reducción o la inhibición de la reducción de  $\text{Fe}^{3+}$  en presencia de nitrato y oxígeno. En algunos estudios se pudo demostrar claramente que la reducción de  $\text{Fe}^{3+}$  era un proceso enzimático, pero los mecanismos para llevar a cabo esta reducción nunca fueron claramente demostrados. Sin embargo, una vez que se descubrió que los microorganismos que utilizan el  $\text{Fe}^{3+}$  como aceptor final de electrones de la respiración son los principales responsables de la mayoría de la reducción de  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Mn}^{4+}$  en suelos y sedimentos, se abandonó el estudio de los microorganismos fermentadores reductores de  $\text{Fe}^{3+}$ .

Otros microorganismos desasimiladores reductores de hierro que no obtienen energía de esta desasimilación son, por una parte, algunos microorganismos desasimiladores reductores de sulfato (*Desulfovibrio desulfuricans*, *D. vulgaris*, *D. baculatus*, *Desulfobacterium autotrophicum*, *Desulfobulbus propionicus*...) (Coleman *et al.*, 1993; Lovley *et al.*, 1993b) y, por otra, las arqueas metanógenas (*Methanosarcina barkeri* MS, *Methanosphaera cuniculi* 1R7, *Methanobacterium palustre* F, *Methanococcus voltaei* A3 y *Methanlobus vulcani* PL-12/M) (Bond y Lovley, 2002). En los dos grupos, el hidrógeno se metaboliza hasta un nivel mínimo en presencia de  $\text{Fe}^{3+}$ , hasta concentraciones en las que la reducción de sulfato o la producción de metano no son termodinámicamente favorables. Los mecanismos para la reducción de  $\text{Fe}^{3+}$  no se han estudiado con detalle, pero estudios con *D. vulgaris* demostraron el papel esencial del citocromo *c3* en la reducción de metales (Lovley, 1993; Lovley *et al.*, 1993c; Lovley y Phillips, 1994). El desvío del flujo de electrones hacia el  $\text{Fe}^{3+}$  en las bacterias sulfato reductoras y en las arqueas metanógenas puede ser un factor

importante que contribuya a la inhibición de la reducción de sulfato y la producción de metano en sedimentos con presencia de  $Fe^{3+}$  (Coleman *et al.*, 1993; Lovley *et al.*, 1993b; Bond y Lovley, 2002).

Por otro lado existen muchos microorganismos en los dominios *Bacteria* y *Archea* (Fig. 5) que sí son capaces de obtener energía a partir de la desasimilación del hierro y pertenecen a diferentes *phyla* dentro de cada dominio. Dentro del dominio *Bacteria* encontramos microorganismos desasimiladores reductores de hierro en los diferentes *phyla* de *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Thermodesulfobacteriales*, *Thermotogales* y *Deinococcus-Thermus*. En el dominio *Archea* aparecen tanto en *Euryarchaeota*, *Thermococcales* y *Methanopyrales*, como en *Crenarchaeota*, *Desulfurococcales*, *Methanococcales* y *Thermoproteales*.



**Figura 5.-** Árbol filogenético basado en secuencias de genes de RNA 16S de organismos capaces de conservar la energía creciendo a partir de  $Fe^{3+}$  (Lovley *et al.*, 2004).

De estos microorganismos hay tres géneros que se han estudiado con más detalle: el género *Shewanella* ( $\gamma$ Proteobacteria), el género *Geobacter* ( $\delta$ Proteobacteria) y el género *Geothrix* (phylum geothrix). No obstante, este proceso de reducción desasimilatoria del hierro con producción de energía también es llevado a cabo por otras bacterias termófilas y algunas arqueas (Vargas *et al.*, 1998). Se han encontrado microorganismos capaces de reducir hierro en casi todos los ambientes termófilos del planeta, por ejemplo, *Thermococcus* sp. y *Geoglobus ahangari* en chimeneas hidrotermales profundas en los océanos (Kashefi *et al.*, 2002), *Thermoanaerobacter acetoethylicus*, *Thermoanaerobacter brockii*, *Thermotoga subterranea* y *Thermococcus sibiricus* en aguas residuales de campos petrolíferos (Slobodkin, 2005), *Pyrobaculum aerophilum* y *Ferroglobus placidus* en respiraderos de manantiales hidrotermales de aguas poco profundas (Slobodkin, 2005) y *Geothermobacterium Ferrireducens*, *Thermodesulfobacterium commune* (Slobodkin, 2005), *Thermolithobacter ferrireducens* y *Thermolithobacter carboxydivorans* (Solokova *et al.*, 2007) en manantiales hidrotermales. También se han encontrado bacterias como *Geoalkalibacter ferrihydriticus* (Zavarzina *et al.*, 2006) y *Alkaliphilus metalliredigens* (Ye *et al.*, 2004) capaces de reducir hierro en ambientes alcalinos.

Pasaremos a continuación a describir con algún detalle los géneros más estudiados: *Shewanella*, *Geobacter* y *Geothrix*. El género *Shewanella* está incluido en la familia *Vibrionaceae*. Esta familia contiene cuatro géneros mayores (*Aeromonas*, *Photobacterium*, *Plesiomonas* y *Vibrio*) y una docena de géneros menores en los que se incluye *Shewanella*. Todos los miembros del género *Shewanella* son anaerobios facultativos, gram-negativos, móviles por flagelos polares, bacilos no formadores de esporas y generalmente están asociados a hábitats marinos o acuáticos. Las células tienen de 2 a 3  $\mu\text{m}$  de largo y de 0,4 a 0,7  $\mu\text{m}$  de diámetro. Miembros de este género se

han asociado durante mucho tiempo a la degradación de alimentos proteínicos (Shewan, 1977; Jorgensen y Huû, 1989). También actúan como patógenos oportunistas en humanos y animales acuáticos (Brink *et al.*, 1995; Aguirre *et al.*, 1994). Estos microorganismos se están utilizando para la biorremediación de compuestos orgánicos halogenados (Petrovskis *et al.*, 1994) y petróleo crudo (Semple y Westlake, 1987).

Las cepas de *Shewanella* realizan muchos procesos en anaerobiosis, como la reducción de hierro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) y manganeso ( $\text{Mn}^{4+}$ ) (Myers y Nealson, 1988; Kostka *et al.*, 1996), uranio ( $\text{U}^{6+}$ ) (Lovely y Phillips, 1988), thiosulfato (Perry *et al.*, 1993) y azufre elemental (Perry *et al.*, 1993; Moser y Nealson, 1996). Las células que crecen en un medio sólido apropiado forman colonias circulares de 1 a 4 mm de diámetro, lisas, convexas y con bordes regulares. *S. algae*, *S. amazonensis*, *S. frigidimarina*, *S. gelidimarina*, *S. oneidensis* y *S. putrefaciens* muestran una coloración rosada en agar LB mientras que *S. benthica*, *S. hanedai*, *S. pealeana* y *S. woodyi* forman colonias menos coloreadas en agar marino (Venkateswaran, 1999).

La mayoría de las especies de este género son mesófilas, pero también hay especies psicrotolerantes y psicrófilas. Por ejemplo, *S. benthica* crece óptimamente a 4°C, *S. hanedai* entre 15 y 25°C, *S. gelidimarina* a 15°C y otras especies entre 25 y 35°C. *S. algae*, *S. amazonensis* y algunas cepas de *S. oneidensis* crecen a 40°C. Dentro del género *Shewanella* hay especies halotolerantes y halófilas (Gilmour, 1990). Aunque las especies halotolerantes, como *S. oneidensis* y *S. putrefaciens*, crecen en la ausencia de NaCl, el crecimiento se acelera en presencia de 0,2 M de NaCl.

Todas las cepas son citocromo oxidasa y catalasa positivas y no producen amilasa, alginasa, arginina dihidrolasa, lisina y ornitina decarboxilasa. *S. algae*, *S. amazonensis*, *S. hanedai*, *S. frigidimarina*, *S. gelidimarina* y *S. oneidensis* producen gelatinasa. Ninguna cepa es capaz de producir indol o acetoína. Pueden crecer con

muchas fuentes de carbono diferentes, dependiendo de la cepa, entre ellos lactato, fumarato, succinato y citrato aunque ninguna puede utilizar acetato.

El otro género más estudiado entre las bacterias desasimiladoras reductoras de hierro es *Geobacter* (Gorby y Lovley, 1991), aunque también hay estudios sobre *Geothrix* (Anderson *et al.*, 1998; Coates *et al.*, 1999). Estos dos géneros comprenden microorganismos anaerobios estrictos que mineralizan la materia orgánica a dióxido de carbono (Coates *et al.*, 1999, 2001; Lovley *et al.*, 1997). *Geothrix* representa un nuevo *phylum* dentro del dominio *Bacteria* (Coates *et al.*, 1999), mientras que *Geobacter* pertenece a la familia *Geobacteraceae* de las  $\alpha$ -*Proteobacteria* (Coates *et al.*, 2001). De estos dos géneros, se han aislado un mayor número de especies de *Geobacter*, especialmente de ambientes contaminados con hidrocarburos y ambientes de agua dulce (Anderson *et al.*, 1998; Coates y Anderson, 2000; Coates *et al.*, 1996, 1998; Lovley y Coates, 2000; Lovley y Phillips, 1988). La característica que hace que estos microorganismos sean más abundantes en el ambiente que las especies de *Shewanella*, es que son capaces de utilizar acetato como fuente de carbono y energía.

*Geobacter metallireducens* ha sido la más estudiada, se trata de un bacilo no móvil, gram-negativo, que no forma esporas, de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de largo y 0,5  $\mu\text{m}$  de ancho y que no tiene inclusiones, ni flagelos. Las colonias crecidas en medios sólidos con nitrato o citrato férrico como aceptor de electrones tienen 1 mm o menos de diámetro y son rojas, convexas, enteras y de aspecto húmedo. Es un anaerobio estricto, catalasa negativo. Tiene un metabolismo quimiorganotrofo que oxida completamente acetato, etanol, propionato, butirato, isobutirato, valerato, isovalerato, piruvato, propanol, butanol, tolueno y benzoato, entre otros. Utiliza el  $\text{Fe}^{3+}$  como aceptor de electrones aunque también puede utilizar otros como  $\text{Mn}^{4+}$ ,  $\text{U}^{6+}$  y nitrato. Puede fijar nitrógeno molecular. Su temperatura óptima de crecimiento son 30-35°C.



*Geothrix fermentans* es un Gram-negativo estrictamente anaerobio que crece con acetato, propionato, lactato y fumarato como donadores de electrones utilizando  $\text{Fe}^{3+}$  como aceptor de electrones. También puede fermentar citrato o fumarato si no hay aceptores de electrones disponibles.

### **I.3.B. Bacterias magnetotáticas**

Estas bacterias forman un grupo heterogéneo de procariotas, que presentan la peculiaridad de que se alinean de forma pasiva y nadan activamente a lo largo de las líneas del campo magnético terrestre (Blakemore, 1975, 1982). Es un grupo morfológico, metabólico y filogenéticamente diverso y entre las formas celulares encontradas se hallan cocos (poco esféricos u ovoides), bacilos, vibrios, espirilos e incluso formas multicelulares (Blakemore *et al.*, 1982; Esquivel *et al.*, 1983; Bazylinski, 1995; Keim *et al.*, 2004a y b). El término “bacterias magnetotáticas” no tiene significado taxonómico y debe ser interpretado como una colección de diferentes bacterias que poseen la aparentemente ampliamente distribuida característica de la aeromagnetotaxis, por lo que todas ellas forman magnetosomas (Bazylinski, 1995). El magnetosoma bacteriano se define como una vesícula formada por una bicapa de fosfolípidos que envuelve un cristal intracelular de mineral de hierro magnético, de dominio único (Balkwill *et al.*, 1980; Gorby *et al.*, 1988; Komeili *et al.*, 2004). Estas vesículas se encuentran alineadas dentro de las células formando una o varias cadenas.

A pesar de la diversidad, estas bacterias magnetotáticas tienen importantes características en común (Bazylinski y Frankel, 2004): 1) son todas gram-negativas del dominio *Bacteria* (no se descarta la posibilidad de la existencia de arqueas productoras de magnetosomas pero hasta el momento no se han encontrado); 2) todas son móviles, generalmente por flagelos (podrían existir bacterias no móviles que sintetizaran magnetosomas con lo que serían magnéticas pero no magnetotáticas); 3) son

microaerófilas, anaerobias facultativas y/o anaerobias; 4) todas las cepas en cultivo puro tienen un metabolismo respiratorio, salvo una excepción que puede fermentar; 5) tienen actividad nitrogenasa y por tanto son capaces de fijar nitrógeno atmosférico, y 6) son mesófilas. La fisiología y el metabolismo de las cepas son muy diferentes. Además, la formación del magnetosoma puede verse afectada por diversas causas, siendo la más común el estado fisiológico en el que se encuentren las células (debido, por ejemplo, al medio de cultivo). Dicha alteración del magnetosoma provoca cambios en el comportamiento magnético celular (Bazylinski y Williams, 2007).

Las bacterias magnetotácticas pueden producir dos tipos de minerales: óxidos de hierro y sulfuros de hierro. Aquellas que producen óxidos de hierro, sólo forman magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) (Frankel *et al.*, 1979), las que producen sulfuros de hierro sintetizan greigita ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ) (Mann *et al.*, 1990; Bazylinski y Frankel, 2000b) además de algunos minerales precursores de la greigita (Pósfai *et al.*, 1998a, b). Las productoras de óxidos de hierro pueden ser microaerófilas estrictas, anaerobias facultativas (que son microaerófilas cuando crecen con  $\text{O}_2$ ), o anaerobias estrictas. Sin embargo, las productoras de sulfuros de hierro son anaerobias estrictas.

Las bacterias magnetotácticas están distribuidas por todo el mundo y se han encontrado en todos los continentes. Sin embargo, localmente, estas bacterias se ven confinadas a un hábitat específico, una zona microaeróbica relativamente estrecha, llamada “interfase óxica-anóxica” (OAI). Esta zona se encuentra en la columna de agua o en sedimentos que tengan un gradiente vertical de estratificación química (Fig. 6). Estos microorganismos pueden llegar a alcanzar densidades celulares relativamente altas ( $10^4$  células/ mL) en la OAI y en las regiones anóxicas del hábitat (Bazylinski y Moskowicz, 1997; Bazylinski *et al.*, 1995; Simmons *et al.*, 2004). La zona OAI se sitúa a diferente nivel en columnas de agua dulce o de ambientes marinos costeros,

dependiendo de la concentración de sulfuros en el medio, que a su vez depende de la velocidad de difusión del  $H_2S$  desde el sedimento (donde es producido por las bacterias sulfato reductoras) hacia la superficie. En casi todos los sistemas de agua dulce las concentraciones de sulfato son muy bajas o incluso cero, siendo también baja la concentración de  $H_2S$  producido por las bacterias sulfato reductoras. Debido a esto, el  $H_2S$  difunde lentamente desde el sedimento a la superficie, por lo que la OAI se sitúa generalmente en la interfase agua-sedimento o varios milímetros por debajo de esta. Aunque la situación en las zonas marinas profundas es similar a la anterior, esta situación puede ser totalmente diferente en hábitats costeros marinos no alterados. En estos ambientes, hay un doble gradiente que va a delimitar la zona donde se encuentra la OAI. Por un lado, la concentración de oxígeno disminuye de la superficie hacia el sedimento. Por otro lado, el  $H_2S$  difunde rápidamente desde el sedimento hacia la superficie, creando concentraciones considerables de este gas a lo largo de la columna de agua. Por tanto, la zona OAI se situará en la zona de confluencia de estos gradientes que delimiten concentraciones óptimas de oxígeno y  $H_2S$ . En esta situación la zona OAI no estará en el sedimento sino desplazada hacia la superficie dentro de la columna de agua (Fig. 6). En hábitats de agua dulce sólo se han encontrado magnetobacterias productoras de magnetita, mientras que en ambientes marinos se han encontrado productoras de magnetita y greigita. En los ambientes marinos las productoras de magnetita se encuentran generalmente en la OAI y las productoras de greigita se encuentran ligeramente debajo de esta, donde no hay  $O_2$  pero sí  $S^{2-}$  (Bazylinski y Schubbe, 2007).

### **Ventajas biológicas de la magnetotaxis**

Gracias a los magnetosomas la célula tiene un momento dipolo magnético, lo que provoca que las células se comporten como pequeñas brújulas móviles que se alinean a

lo largo de las líneas del campo magnético terrestre (Frankel, 1984). Esto es debido a que cada magnetosoma está compuesto de un cristal de magnetita con un tamaño tal que hace que se comporte como un dominio singular magnético, es decir, como un imán. El momento magnético dipolar de la célula es la suma de los momentos magnéticos de cada uno de los magnetosomas, y, como todos están alineados, se maximiza el momento magnético de la célula (Bazyliniski y Schubbe, 2007).

En un principio se pensó que las bacterias magnetotácticas se dirigían al norte o al sur, dependiendo de la orientación magnética del dipolo magnético de la célula con respecto a la dirección del movimiento (Blakemore *et al.*, 1980). Según esta idea, se creía que la componente vertical del campo geomagnético (que está inclinado) seleccionaba la polaridad dominante en cada hemisferio. De esta manera, favorece a aquellas células cuya polaridad hace que naden hacia sedimentos anaeróbicos y microaeróbicos, evitando así las concentraciones de oxígeno altas y potencialmente tóxicas de las aguas superficiales. Esta hipótesis parecía cierta, por lo menos en parte, ya que se pensaba que las bacterias que buscaban el norte predominaban en el hemisferio norte mientras que las que buscaban el sur lo hacían en el hemisferio sur (Blakemore *et al.*, 1980)<sup>1</sup>. Sin embargo, aunque cierta en la mayoría de los casos, se observó que no se cumplía en otros, concretamente, en el caso del coco MC-1. Las células de MC-1 no crecen en el fondo de un tubo de cultivo sino que forman bandas microaerofílicas de células en la interfase óxica-anóxica (OAI) (Frankel *et al.*, 1997). Este descubrimiento hizo pensar que la magnetotaxis no es independiente, sino que está ligada a la aerotaxis. En la actualidad la hipótesis más aceptada es la magneto-aerotaxis.

---

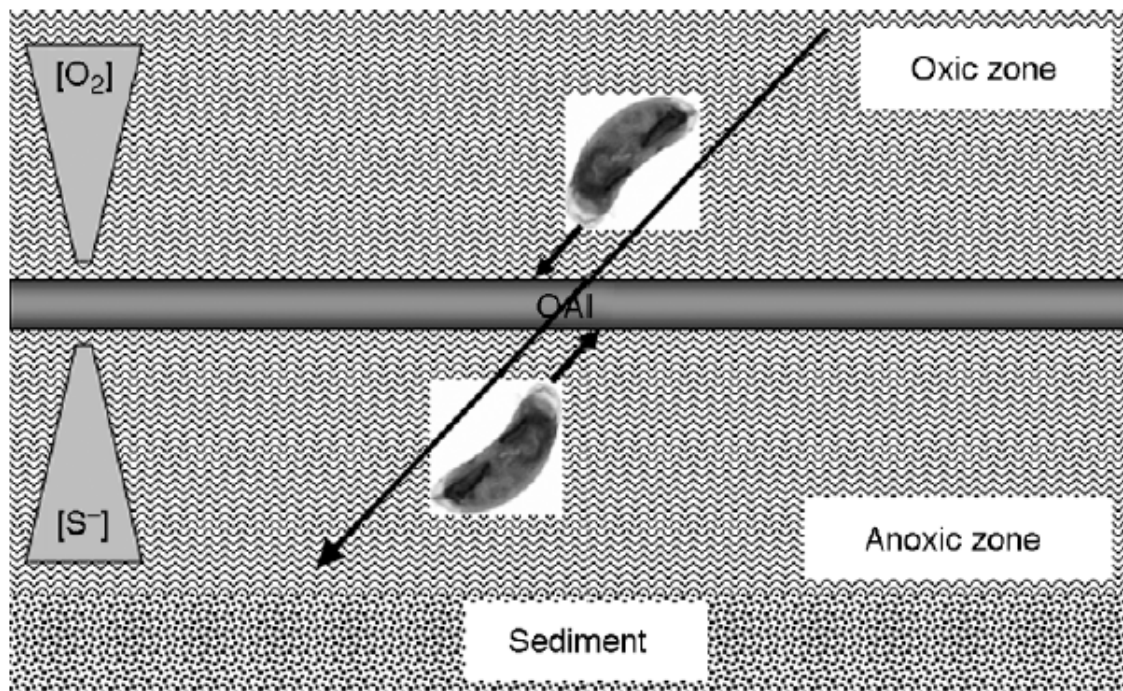
<sup>1</sup> Esta última aseveración no se cumple en todos los casos y varias especies de bacterias magnetotácticas del hemisferio norte buscan el sur (Simmons *et al.*, 2006)

Esta teoría se ha estudiado en el coco marino y microaerofílico MC-1 y en *Magnetospirillum magnetotacticum* (Frankel *et al.*, 1997, 2007).<sup>2</sup>

La finalidad de la magneto-aerotaxis es mantener a la célula en una concentración determinada de oxígeno. Las líneas del campo magnético de la Tierra están inclinadas con respecto al eje de rotación de la tierra, tal y como se indica en la figura 6. Si depositamos una célula no magnetotáctica en la columna de agua, y esta célula ha de situarse en la región OAI, debería buscar esa zona en las tres direcciones del espacio. Si esa célula es magnetotáctica, al nadar a lo largo de las líneas de campo magnético, limita esta búsqueda a una sola dirección (Fig. 6). La magneto-aerotaxis puede ser polar o axial. Las bacterias con una magneto-aerotaxis polar nadan de manera persistente en un sentido y, cuando han de cambiar de sentido, la célula ha de girar 180°. Sin embargo, las que presentan una magneto-aerotaxis axial nadan en los dos sentidos, sin necesidad de darse la vuelta. El sentido en el que nadan está determinado por la rotación del flagelo, que puede girar a favor o en contra de las agujas del reloj, provocando que el microorganismo nade en un sentido o en otro.

---

<sup>2</sup> Aunque estas bacterias parecen diferir en sus mecanismos de respuesta aerotáctica y en el modo en que usan el campo magnético, ya que la cepa MC-1 utiliza el campo magnético en el sentido de la dirección (magneto-aerotaxis polar) y *M. magnetotacticum* usa el campo como un eje (magneto-aerotaxis axial), ambos prefieren situarse en la interfase óxica-anóxica (OAI) y de esta forma la magneto-aerotaxis funciona igual para los dos organismos (Frankel *et al.*, 1997, 2007).



**Figura 6.-** Esquema de la interfase óxica- anóxica en la columna de agua. La flecha indica la línea del campo magnético de la Tierra (Bazyliniski y Schubbe, 2007).

### Filogenia y taxonomía

Como se ha mencionado antes, todas las bacterias magnetotácticas conocidas y cultivadas están asociadas filogenéticamente al dominio *Bacteria*. También los estudios realizados de las secuencias de ADN ribosómico 16S de especies no cultivadas de muestras recogidas en distintos ambientes muestran que todas estas especies pertenecen al dominio bacteria. De todas formas, no se puede descartar la existencia de arqueas magnetotácticas ya que los genes para la síntesis del magnetosoma han sido distribuidos entre muchos tipos de bacterias por transferencia lateral.

Las bacterias magnetotácticas productoras de óxido de hierro, cultivadas y no cultivadas, se asocian con  $\alpha$  y  $\delta$ -*Proteobacteria*, con un gran grupo de bacterias Gram negativas y con el *phylum Nitrospira*. Dentro del subgrupo  $\alpha$ -*Proteobacteria* se incluyen especies de agua dulce del género *Magnetospirillum*. A este género pertenecen

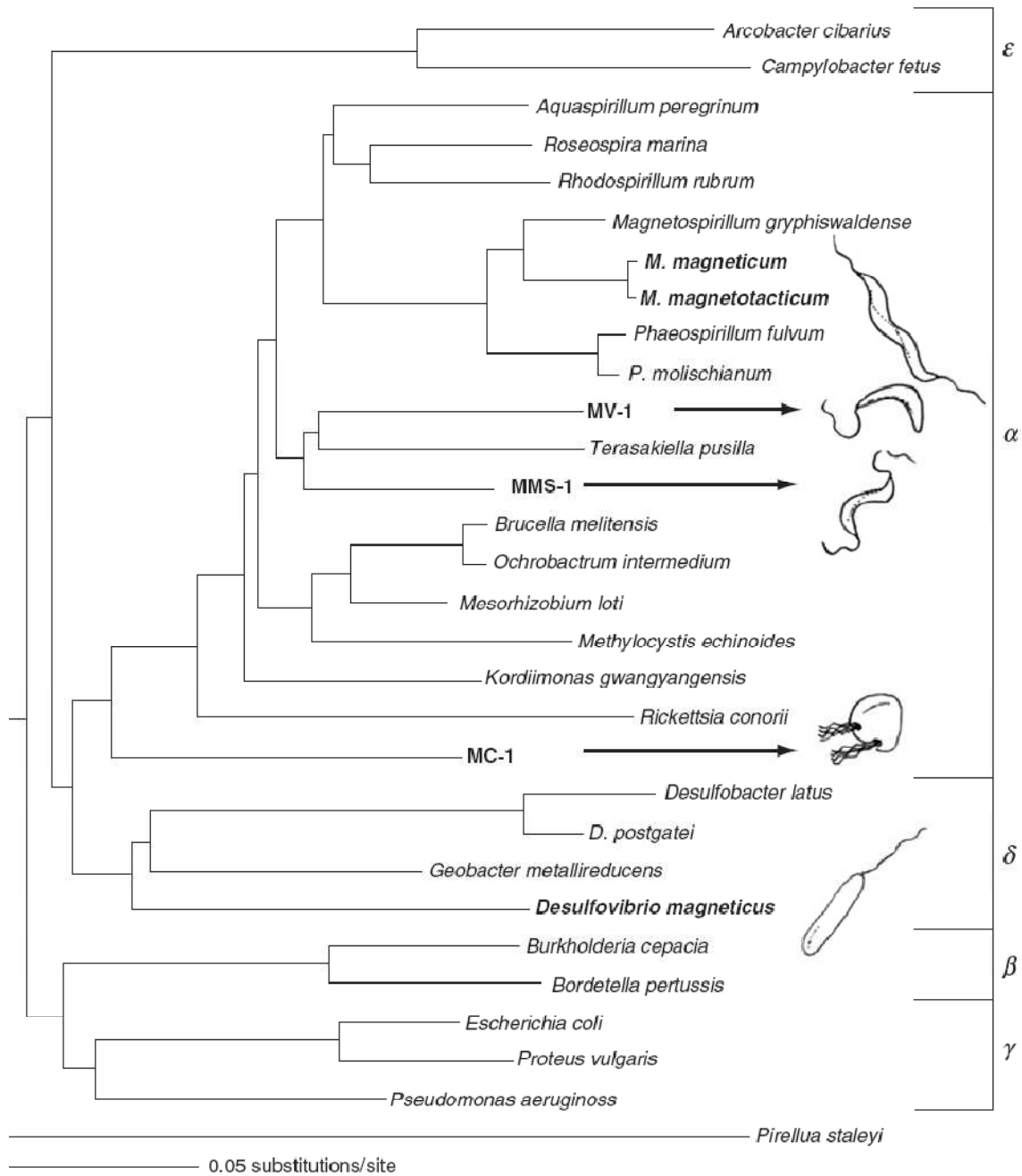
todos los cocos magnetotácticos marinos y de agua dulce hasta ahora estudiados, un espirilo marino conocido como MMS-1 (Bazylinski y Williams, 2007), un grupo de vibrios marinos (como por ejemplo la cepa MV-1) (Bazylinski *et al.*, 1988) y algunas bacterias magnetotácticas no cultivadas recogidas de muestras de diferentes ambientes acuáticos (Spring *et al.*, 1992, 1993, 1995). La especie sulfato-reductora *Desulfovibrio magneticus* cepa RS-1 es la única bacteria magnetotáctica productora de óxido de hierro que está filogenéticamente asociada con el subgrupo  $\delta$  (Fig. 7).

La figura 7 muestra el árbol filogenético basado en secuencias de genes de RNA 16S de bacterias magnetotácticas. El género *Magnetospirillum* se halla filogenéticamente dentro de la familia *Rhodospirillaceae* y está dentro de un cluster de  $\alpha$ -*Proteobacteria* que incluye el género fototrófico *Phaeospirillum* y *Rhodospirillum* y el género no fototrófico *Azospirillum* (Burgess *et al.*, 1993). La cepa MC-1, el único coco magnetotáctico aislado en cultivo puro hasta ahora, y otros cocos magnetotácticos no cultivados, procedentes de agua dulce y marina, no muestran afinidad cercana con otro  $\alpha$ -*Proteobacteria*. Estos cocos parecen constituir un único linaje que diverge cerca de la rama principal de las  $\alpha$ -*Proteobacteria* (DeLong *et al.*, 1993; Fernandez de Henestrosa *et al.*, 2003) y están sólo distancialmente relacionados a otras  $\alpha$ -*Proteobacteria* magnetotácticas. Las cepas de vibrios marinos como MV-1 y el espirilo marino cepa MMS-1 representan un nuevo género dentro de las  $\alpha$ -*Proteobacteria* y no se les conoce pariente filogenético cercano (Bazylinski y Williams, 2007; DeLong *et al.*, 1993). *D. magneticus* cepa RS-1 encaja claramente dentro del género *Desulfovibrio* en la familia *Desulfovibrionaceae* y el orden Desulfovibrionales dentro de  $\delta$ -*Proteobacteria* (Kawaguchi *et al.*, 1995), siendo su relación más cercana *D. burkinensis* (con un 87% de similitud) (Sakaguchi *et al.*, 2002). *Candidatus Magnetobacterium bavaricum* es un bacilo que contiene múltiples cadenas de magnetosomas y está

filogenéticamente unido con el filum *Nitrospira* y no con las *Proteobacteria* (Spring y Bazylinski, 2006; Spring *et al.*, 1993).

Se conoce poco de la filogenia de las bacterias magnetotácticas productoras de sulfuro. Se han caracterizado morfológica y filogenéticamente dos microorganismos procariotas magnetotácticos multicelulares (MMP; figura 7) y un bacilo grande. Son unas bacterias multicelulares que poseen aproximadamente de 10 a 30 células rodeadas por una membrana esférica, se mueven como una unidad no como células separadas (Rodgers *et al.*, 1990). Cada célula es multiflagelar en una cara. Filogenéticamente, las bacterias magnetotácticas multicelulares (MMP), están relacionadas con bacterias sulfato-reductoras dentro de las  $\delta$ -*Proteobacteria*, lo que sugiere que ellas también sean sulfato-reductoras. Estas han sido encontradas en hábitats salobres y marinos por todo el mundo y, basándonos en su morfología especial se considera que representan una especie única. Sin embargo, Simmons y Edwards (2007), estudiando secuencias de genes de 16S de poblaciones naturales de estas bacterias, encontraron que las secuencias representan cinco linajes separados por al menos un 5% de divergencia. Por esta inesperada diversidad filogenética, estas bacterias debían considerarse como un género separado que contiene varias especies dentro de las  $\delta$ -*Proteobacteria* y no como una única especie como se pensó anteriormente (Simmons y Edwards, 2007). Con respecto al bacilo, Simmons *et al.* (2004) encontraron este bacilo marino productor de sulfuro de hierro que parece estar relacionado con las  $\gamma$ -*Proteobacteria* sugiriendo un metabolismo basado en hierro más que en sulfuro.





**Figura 7.** Árbol filogenético basado en secuencias de genes de RNA 16S de bacterias magnetotácticas (Bazylinski y Schubbe, 2007).

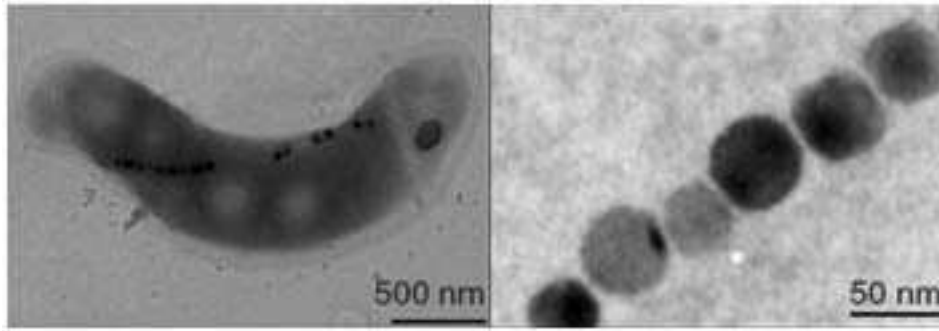
## Fisiología

### Magnetospirillum

Las especies de este género son las más estudiadas de las bacterias magnetotácticas. Las especies conocidas incluyen *M. magnetotacticum* MS-1 (Maratea

y Blakemore, 1981), *M. gryphiswaldense* cepa MSR-1 (Schleifer *et al.*, 1991), y *M. magneticum* cepa AMB-1 (Matsunaga *et al.*, 1991). Todas son microaerófilas obligadas cuando crecen con el oxígeno como el único aceptor de electrones, pero también son capaces de desnitrificar, aunque siempre requieren mínimas cantidades de oxígeno, a diferencia de la mayoría de los microorganismos desnitrificantes, que realizan este proceso en anaerobiosis (Bazylinski y Blakemore, 1983). Las tres especies de *Magnetospirillum* antes mencionadas son quimiorganoheterótrofas. No obstante, se ha encontrado que estas tres especies tienen en su genoma un gen completo de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RubisCO), lo que indica que, potencialmente, podrían sintetizar por lo menos una enzima del ciclo de Calvin-Benson-Bassham (Bazylinski *et al.*, 2004; Matsunaga *et al.*, 2005). Sin embargo, todavía no se ha encontrado un donador de electrones que soporte el crecimiento de estos microorganismos de forma autótrofa. Cuando *M. magnetotacticum* MS-1, *M. gryphiswaldense* MSR-1 y *M. magneticum* AMB-1 crecen en condiciones quimiorganoheterótrofas sólo usan algunos ácidos orgánicos como fuente de carbono y electrones. Las tres especies tienen actividad nitrogenasa y por lo tanto son capaces de fijar el oxígeno atmosférico (Bazylinski *et al.*, 2000).

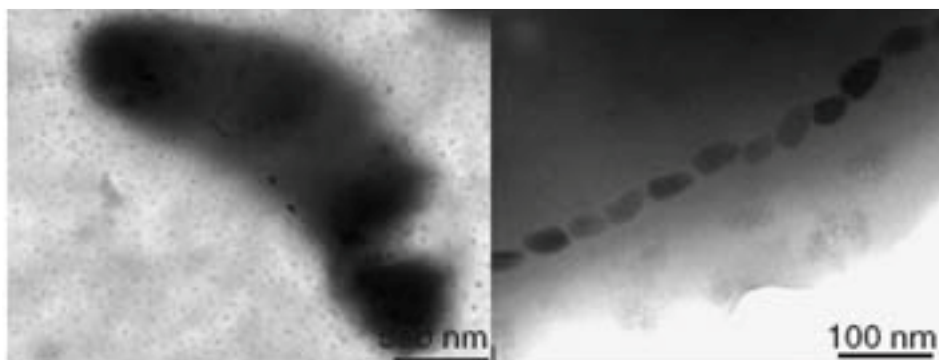
*M. magnetotacticum* MS-1, *M. gryphiswaldense* MSR-1 y *M. magneticum* AMB-1 producen cristales cubooctédricos de magnetita en sus magnetosomas, en condiciones microaeróbicas y/o anaeróbicas, dependiendo de la especie (Fig. 8).



**Figura 8.** Imágenes de una cepa de *Magnetospirillum* de agua dulce (izquierda) y detalle de su cadena de magnetosomas (derecha) (Bazylinski y Schubbe, 2007).

*Desulfovibrio magneticus* cepa RS-1

*D. magneticus* RS-1 es un vibrio quimiorganoheterótrofo anaerobio estricto que utiliza lactato, piruvato, malato, oxalacetato y glicerol como donador de electrones y fuente de carbono (Sakaguchi *et al.*, 2002). Las células respiran con fumarato, sulfato, y tiosulfato, convirtiendo los dos últimos compuestos en sulfhídrico, pero no con sulfito, nitrato, azufre elemental,  $Fe^{3+}$  u  $O_2$  como aceptor final de electrones. Esta es la única bacteria magnetotáctica fermentadora que se conoce. Fermenta piruvato a acetato,  $CO_2$  y  $H_2$  (Sakaguchi *et al.*, 2002). Es la única magnetobacteria que, en cultivo puro, sintetiza cristales en forma de diente en sus magnetosomas (Fig. 9).

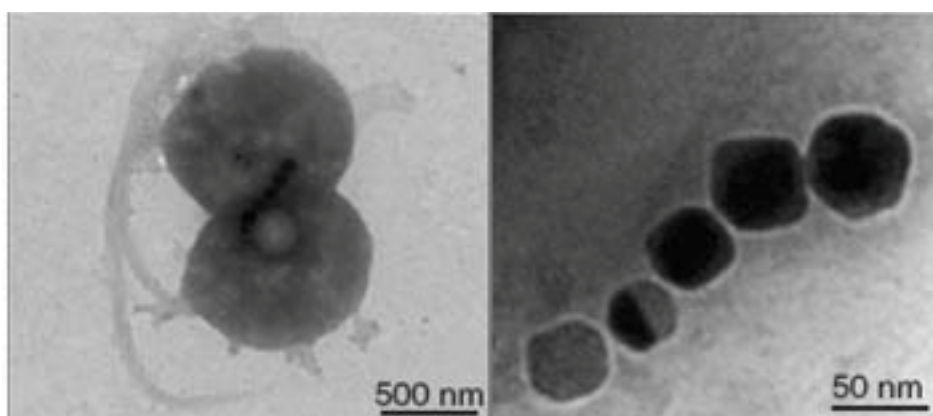


**Figura 9.** Imágenes de *D. magneticus* RS-1 (izquierda) y detalle de su cadena de magnetosomas (derecha) (Bazylinski y Schubbe, 2007).

### Coco magnetotáctico cepa MC-1

Es el único coco magnetotáctico que se ha conseguido aislar en cultivo puro. Las células son vagamente esféricas, de 1 a 2  $\mu\text{m}$  de diámetro y anfitricas (tienen dos penachos de flagelos, uno a cada lado de la célula) (Frankel *et al.*, 1997). El comportamiento magnético de esta especie, como el de todos los cocos magnetotácticos conocidos, se ha definido como magneto-aerotaxis polar (Frankel *et al.*, 1997).

Esta especie no tiene un metabolismo muy versátil. Es microaerófila obligada que se comporta como quimiolitioautótrofa (oxidando sulfhídrico y tiosulfato) y como quimiorganoheterótrofa (oxidando acetato), según los estudios realizados por Bazylinski y Williams (2007) y Williams *et al.* (2006). A diferencia de otras bacterias magnetotácticas autótrofas, esta cepa utiliza el ciclo reverso del ácido tricarbóxico para la fijación de dióxido de carbono y el crecimiento autótrofo (Williams *et al.*, 2006). Las células de MC-1 producen una única cadena de magnetosomas que contiene prismas alargados de magnetita (Meldrum *et al.*, 1993a). La cepa MC-1, al igual que las especies de *Magnetospirillum*, podría ser capaz de fijar nitrógeno (Bazylinski y Williams, 2007) (Fig. 10).

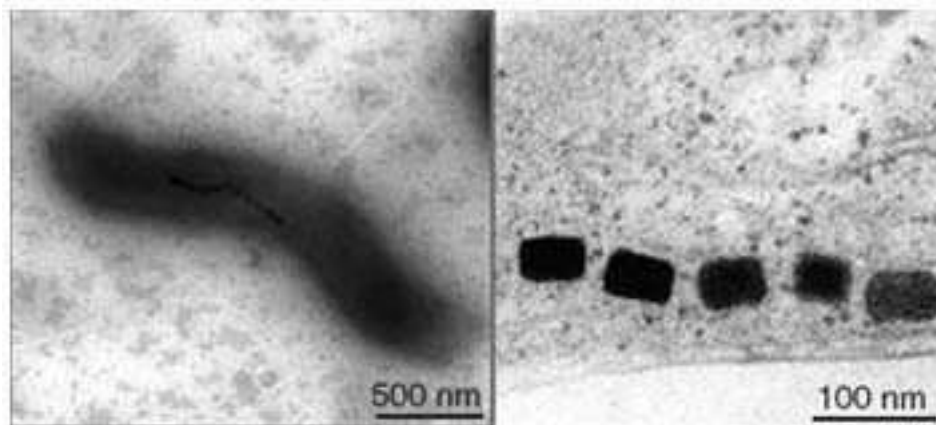


**Figura 10.** Imágenes del coco MC-1 (izquierda) y detalle de su cadena de magnetosomas (derecha) (Bazylinski y Schubbe, 2007).

### Cepa MV-1 y otros vibrios relacionados

La cepa MV-1 es un pequeño vibrio marino microaerófilo y anaerobio facultativo. Tiene una morfología helicoidal (o en forma de coma) y un único flagelo polar (Bazylinski y Williams, 2007). Las células de esta cepa pueden ser quimiolitautótrofas, quimiorganoheterótrofas y quimiorganoautótrofas (Bazylinski *et al.*, 2004). Las quimiorganoheterótrofas utilizan ácidos orgánicos y aminoácidos como donadores de electrones (Bazylinski *et al.*, 1988), mientras que, como aceptores finales de electrones usan O<sub>2</sub>, en microaerobiosis, y N<sub>2</sub>O, en anaerobiosis. Para el crecimiento quimiolitautótrofo, la cepa MV-1, en microaerobiosis, utiliza sulfhídrico, tiosulfato, y, posiblemente, Fe<sup>2+</sup> soluble como donadores de electrones. Sin embargo, no usa tetrionato o Fe<sup>2+</sup> como FeS o FeCO<sub>3</sub> (siderita) (Bazylinski *et al.*, 2004). El crecimiento quimiorganoautótrofo se realiza oxidando formato (Bazylinski *et al.*, 2004), mientras que, como fuente de carbono se fija CO<sub>2</sub> por el ciclo de Calvin-Benson-Bassham (Bazylinski *et al.*, 2004). Son fijadoras de nitrógeno y, además, se comportan como desnitrificantes, reduciendo el nitrato a nitrógeno diatómico (Bazylinski and Williams, 2007).

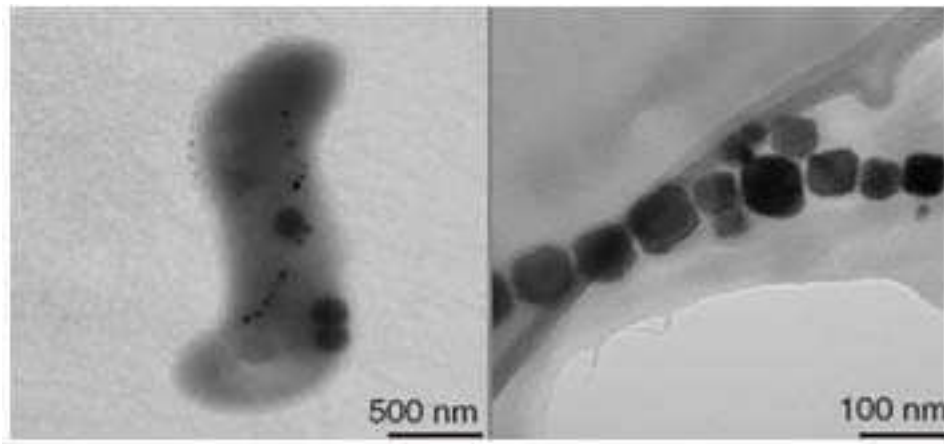
Las células de MV-1 y otras cepas relacionadas producen una sola cadena de magnetosomas orientada a lo largo del eje de la célula. Los magnetosomas contienen magnetita pseudoprismática alongada, siendo la morfología hexaocédrica truncada (Bazylinski *et al.*, 1988; Thomas-Keprta *et al.*, 2001) (Fig. 11).



**Figura 11.** Imágenes del vibrio MV-1 (izquierda) y detalle de su cadena de magnetosomas (derecha) (Bazylinski y Schubbe, 2007).

#### Cepa MMS-1

Es una cepa aislada de ambientes marinos. Son células de 1-3  $\mu\text{m}$  de largo. Pueden ser bacilos rectos, algunos parcialmente helicoidales, llegando a encontrarse hélices completas. Tienen flagelos bipolares (Bazylinski y Williams, 2007). Se sabe poco de la fisiología de esta cepa. Puede presentar comportamiento quimiorganoheterótrofo, oxidando ácidos orgánicos, y quimilitoautótrofo, oxidando tiosulfato (Bazylinski y Williams, 2007). Fijan nitrógeno. Las células son microaerófilas obligadas y no se han encontrado hasta el momento aceptores finales de electrones diferentes del oxígeno. Las células sintetizan una única cadena de magnetosomas con magnetitas alongadas octaédricas (Meldrum *et al.*, 1993b) (Fig. 12).



**Figura 12.** Imágenes de la cepa MMS-1 (izquierda) y detalle de su cadena de magnetosomas (derecha) (Bazylinski y Schubbe, 2007).

## **I.4. Formación de magnetita abiótica y biótica**

### **I.4.A. Aspectos cinéticos y termodinámicos de la formación de un mineral**

Todos los cristales se formen de una manera abiótica o biótica siguen las mismas fases de formación y deben cumplir una serie de requisitos termodinámicos que se relatan en el siguiente apartado.

#### **Nucleación**

Se entiende por nucleación el proceso por el que una fase sólida ordenada es segregada de un fundido o vapor o, alternativamente, de una solución multicomponente. La aparición de una fase sólida a partir de una solución sobresaturada, tiene lugar mediante la formación y posterior crecimiento de agrupaciones de átomos de la nueva fase.

La nucleación puede ser *nucleación primaria* (según dos mecanismos, *homogéneo y heterogéneo*) y *nucleación secundaria*. *Nucleación primaria* según un

**mecanismo homogéneo** es aquella en la que la nucleación tiene lugar a partir de la creación de agregados o embriones, en soluciones perfectamente limpias. Este mecanismo es el que requiere los mayores valores de sobresaturación de la solución (Fig. 13). Se entiende por **nucleación primaria** según un **mecanismo heterogéneo** aquella en la que la nucleación se desarrolla sobre núcleos previamente formados o sobre partículas procedentes de contaminación, paredes del recipiente u otras superficies incorporadas al sistema. Requiere menores valores de sobresaturación que en el caso anterior. **Nucleación secundaria** se refiere al recrecimiento epitaxial de semillas inoculadas a una solución, y cobra especial importancia en campos como la cristalización industrial (Garside, 1982). En este caso, la nucleación puede desarrollarse en condiciones de menor sobresaturación que en los casos de nucleación primaria (Fig. 14).

En la figura 14 se muestra un esquema de los mecanismos de precipitación y disolución (modificada por Nancollas y Reddy, 1974). El diagrama se ha construido para un mineral termodinámicamente estable, que tiene tres fases inestables cuya solubilidad se incrementa de la siguiente manera: 1) fase anhidra, 2) fase hidratada y 3) fase amorfa.



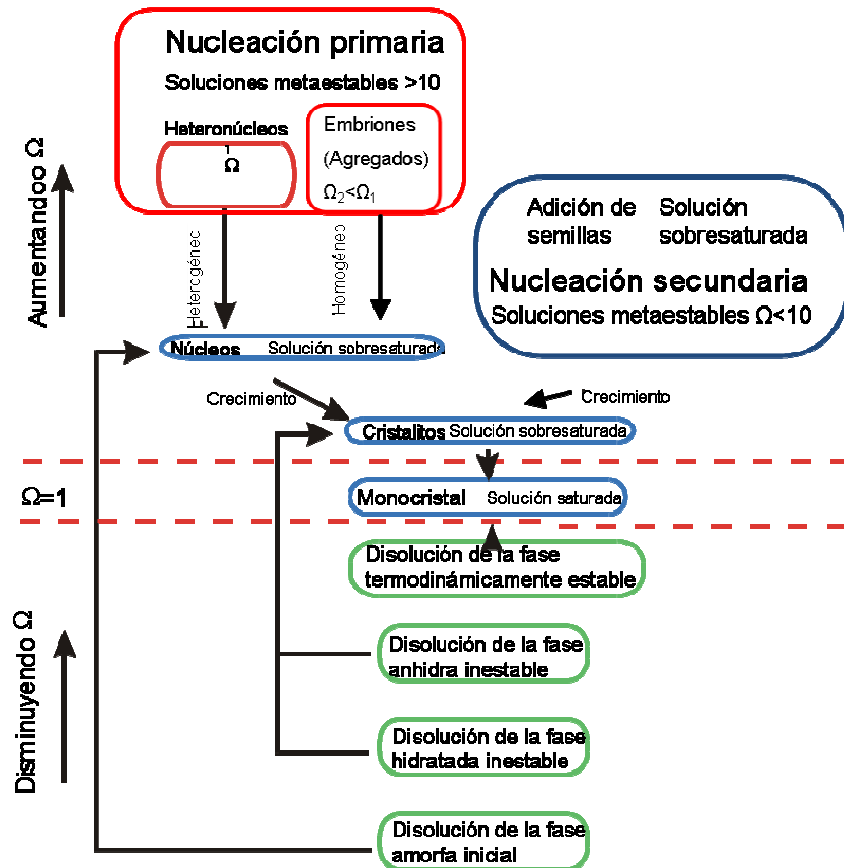
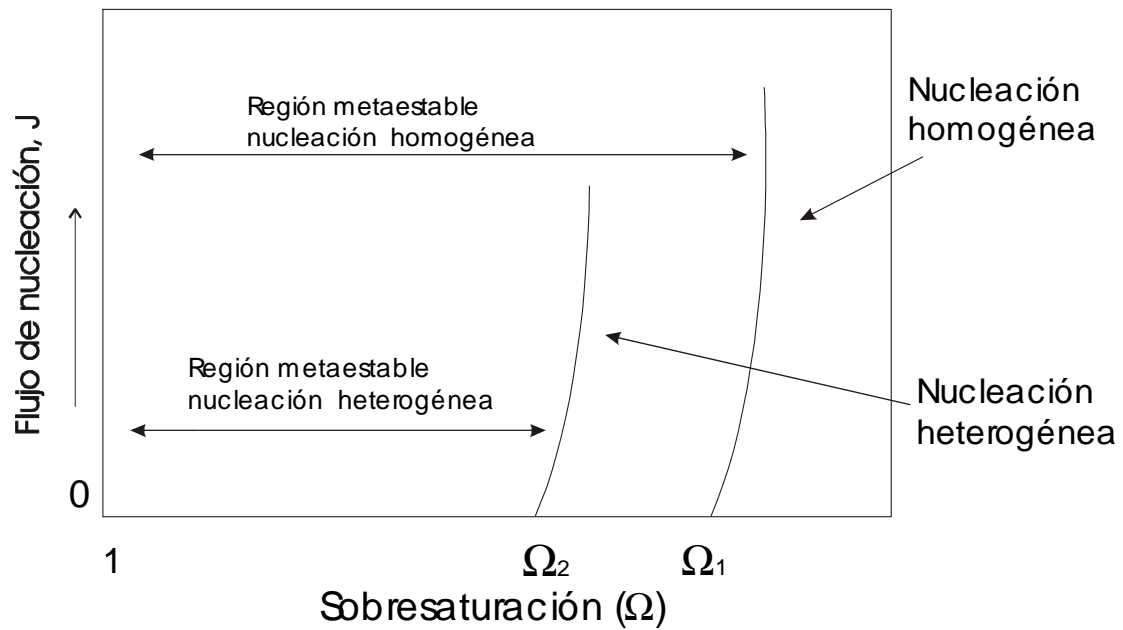


Figura 13.- Mecanismos de nucleación (Jimenez-Lopez *et al.*, 1999)

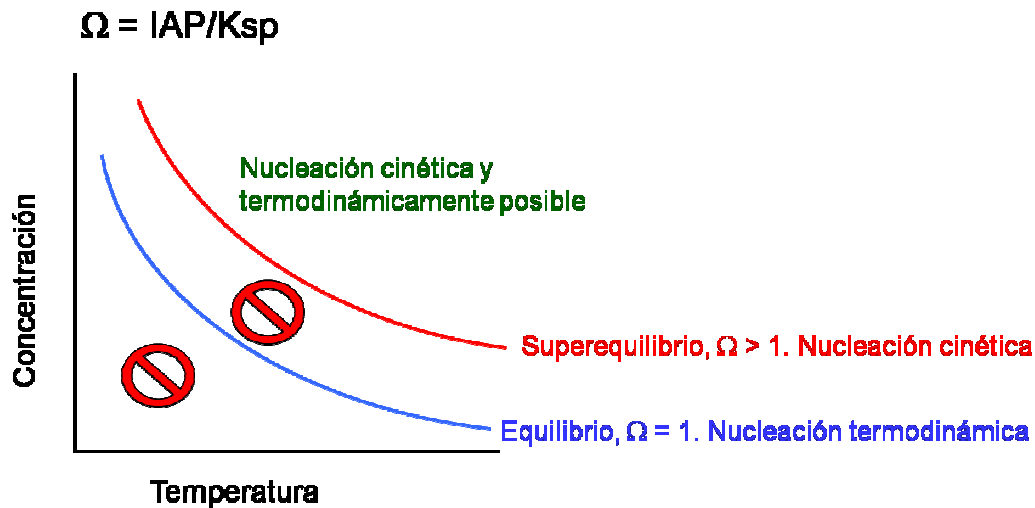
En numerosas ocasiones, la precipitación ocurre según un proceso de *maduración de "Ostwald"*, que consiste en una nucleación en cadena en la que las fases más inestables se disuelven dando paso a fases cada vez más estables (Ogino *et al.*, 1987). Suele producirse, en primer lugar, la nucleación de una fase amorfa, que se disuelve para formar núcleos del material cristalino en cuestión. El crecimiento de estos núcleos y la disolución de fases inestables (hidratada y anhidra), dan lugar a la formación de cristalitos, precursores de los cristales que resultan en condiciones de equilibrio.



**Figura 14.-** Regiones de metaestabilidad para los mecanismos homogéneos y heterogéneos en un proceso de nucleación primaria (Garside, 1982).

La simplicidad conceptual de la nucleación homogénea ha hecho que se la considere normalmente como modelo general de nucleación.

En la figura 15 se representan las curvas de solubilidad, que indican las condiciones termodinámicas y cinéticas necesarias para que se de la nucleación de un cristal en función de la T.



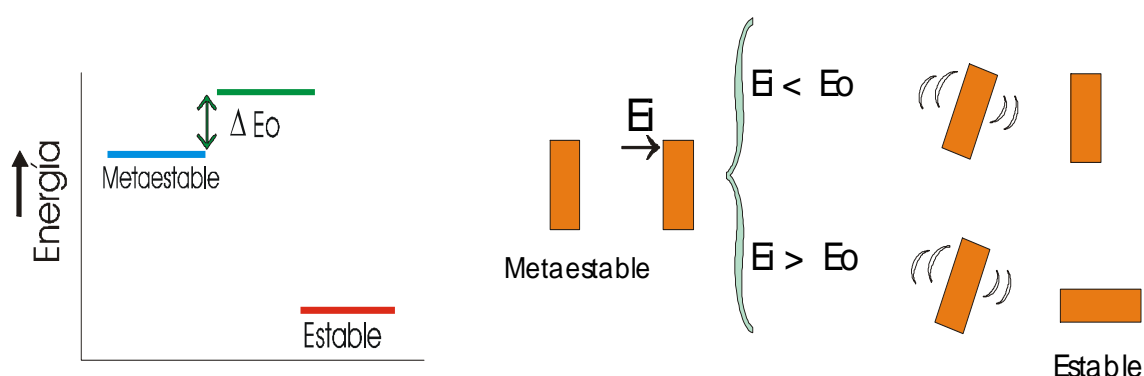
**Figura 15.-** Curvas de sobresaturación y nucleación cristalina.

Para cada material se puede determinar una curva concentración-temperatura que representa el lugar geométrico de puntos donde el sistema estará en estado de equilibrio termodinámico. Esta es la llamada “curva de solubilidad”, la cual es unívoca e independiente de las condiciones experimentales. Estados de saturación inferiores a esta curva constituyen la “región subsaturada” y los superiores, la “región sobresaturada”. Las condiciones de cada una de esas zonas se resumen en la tabla 2, donde  $C(T)$  es la concentración en función de la temperatura,  $C_e$  la concentración de la solución en condiciones de equilibrio termodinámico,  $\Omega = C(T)/C_e$  la sobresaturación de la solución y  $\Delta\mu$  la variación del potencial químico del sistema. **Tabla 2:** Descripción de zonas en el diagrama  $C = C(T)$

Zona	$C(T)$	$\Omega$	$\Delta\mu$
Sobresaturación	$> C_e$	$> 1$	$> 0$
Equilibrio termod.	$= C_e$	$= 1$	$= 0$
Subsaturación	$< C_e$	$< 1$	$< 0$

Para que la nucleación de una fase sea *termodinámicamente posible*, la solución ha de estar sobresaturada con respecto a ella. Sin embargo, una vez que el sistema se

encuentra en esas condiciones, los embriones formados han de tener un tamaño crítico, necesario para que la nucleación sea *cinéticamente posible*. Esto ocurre tras un cierto periodo de tiempo llamado tiempo de inducción. Durante este periodo, la solución se encuentra en un estado de metaestabilidad. Soluciones con relativamente baja sobresaturación pueden permanecer estables indefinidamente, sin nuclear (Mullin y Raven, 1961; Nancollas, 1979). Para ilustrar esto, Mullin y Raven (1961) usó la analogía de un ladrillo apoyado sobre una de las caras de menor superficie (Fig. 16).



**Figura 16.-** Analogía entre el estado de metaestabilidad de un ladrillo apoyado sobre una de sus caras más pequeñas, y una solución metaestable (Mullin y Raven, 1961).

Una solución *metaestable* no está en su estado de mínima energía, pero, de manera similar a lo que ocurre con el ladrillo, se le puede empujar hacia la nucleación. Si la energía suministrada no es suficiente para superar la barrera de potencial, la solución volverá de nuevo a su estado de metaestabilidad; si lo es, se producirá la nucleación. El lugar geométrico de puntos situados en la región sobresaturada, a partir de los cuales tiene lugar la nucleación, forma la curva de superequilibrio de naturaleza cinética.

Los microorganismos pueden inducir la formación de minerales gracias a que pueden sobresaturar el medio donde viven como consecuencia de cambios químicos resultantes de sus actividades metabólicas. Además aportan superficies que pueden

actuar como núcleos de cristalización como puede ser la pared celular, membranas, restos celulares y productos orgánicos resultantes de la actividad metabólica.

El tiempo requerido para la formación de un cristal a partir de los núcleos en una solución sobresaturada puede ser medido bien porque cambian las propiedades ópticas de la solución o mediante la extracción de muestras y recolección de cristales. Al tiempo en el que aparecen los cristales por primera vez en una solución se le llama *tiempo de inducción*.

El mecanismo de nucleación homogénea se explica mediante el modelo tridimensional de bolas de billar (solute) inmersas en aire (solvente), que chocan entre sí en todas las direcciones mediante choques inelásticos. La probabilidad de estos choques aumenta con la concentración, pudiendo llegar un momento en que se formen agregados.

Las fuerzas que actúan sobre estos agregados son de dos tipos:

a) *Atractivas*, resultantes de la interacción entre las partículas que forman el agregado. Tienden a mantenerlo unido y son proporcionales al número de enlaces compartidos y, por tanto, a su volumen.

b) *Repulsivas*, resultantes de la interacción del agregado con el solvente. Tienden a disolverlo y son proporcionales al número de enlaces libres y, consecuentemente, a la superficie de las caras.

Para que el agregado sea estable, las fuerzas atractivas deben predominar sobre las repulsivas. El tamaño crítico de estabilidad del agregado ocurrirá cuando ambas fuerzas sean iguales.

La diferencia de *energía libre de Gibbs* ( $\Delta G$ ) entre una agrupación de  $n$  átomos de la nueva fase y el mismo número de átomos de la fase metaestable depende de  $n$ , de tal forma que el valor de esta diferencia viene dado por la expresión:

$$\Delta G = -n(\mu_1 - \mu_2) + an^{2/3}\sigma \quad (\text{I.1})$$

donde

$$\mu_1 - \mu_2 = kT \ln \Omega \quad (\text{I.2})$$

siendo  $\mu_1$  y  $\mu_2$  el potencial químico de la fase metaestable y fase estable,  $\Omega$ , la sobresaturación del sistema respecto a la fase estable,  $\sigma$  la energía libre superficial,  $T$  la temperatura absoluta y  $a$  un término ligado a la superficie de las caras.

La variación de la energía libre de Gibbs asociada a la nucleación consta, por tanto, de dos términos. Uno, negativo, es favorable a la nucleación y corresponde a la relajación del potencial químico como resultado de la aparición de un nuevo volumen. El otro, positivo, es desfavorable a la nucleación y se debe a la necesidad de crear nuevas superficies. Suponiendo que los agregados son esféricos, la energía libre de Gibbs adopta la siguiente forma:

$$\Delta G = -\frac{4\pi r^3}{3V}kT \ln \Omega + 4\pi r^2\sigma \quad (\text{I.3})$$

donde  $r$  es el radio del agregado,  $V$  es el volumen molar,  $k$  la constante de Boltzman y  $\sigma$  es la energía libre superficial. Tomando  $r$  como variable continua, la expresión (I.3) presenta un máximo para el valor de

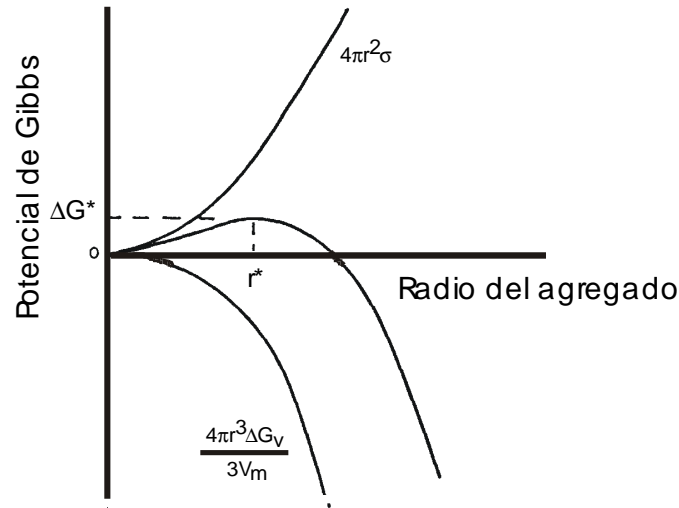
$$r^* = \frac{2V\sigma}{kT \ln \Omega} \quad (\text{Ecuación de Gibbs-Thomson}) \quad (\text{I.4})$$

Así, el radio necesario para que un agregado sea estable ( $r^*$ ) viene determinado por la sobresaturación del sistema. A medida que aumenta la sobresaturación de una solución respecto a una fase, disminuye el **radio crítico** necesario para que los agregados sean estables, y se facilita, por tanto, la nucleación. Sustituyendo la expresión (I.4) en la (I.3), se obtiene la **energía libre de Gibbs crítica** para que se produzca la nucleación,  $\Delta G^*$ ,

$$\Delta G^* = -\frac{4}{3}\pi \left( \frac{V}{kT \ln \Omega} \right)^2 \left[ \left( \frac{8\sigma}{3} \right)^3 + \frac{64}{3} \sigma^3 \right] \quad (\text{I.5})$$

Estas ecuaciones proporcionan una explicación al proceso de maduración de “*Ostwald*” (Nancollas, 1979; Nielsen, 1972, 1982). Los agregados tenderán a cambiar su tamaño como un modo de disminuir su energía libre. Aquellos con radio menor que  $r^*$  tenderán a disolverse, mientras que los agregados mayores ganarán estabilidad continuando su crecimiento (Fig. 17) (Garside, 1982; Randolph y Larson, 1988). El proceso de “*Ostwald*” viene favorecido por la temperatura y limitado por reacciones

superficiales y fenómenos de transporte del material disuelto (Nielsen, 1972, 1982; Johnson, 1990).



**Figura 17.-** Energía libre de un agregado, en función de su radio (Garside, 1982).

El número de núcleos que se forman por unidad de volumen y tiempo,  $J(r^*)$ , se puede escribir en función del potencial de Gibbs crítico para la nucleación, usando una ecuación tipo Arrhenius, (Randolph y Larson, 1988; Stumm y Morgan, 1981):

$$J(r^*) = Ce^{-\frac{\Delta G^*}{RT}} \quad (I.6)$$

donde  $C$  es un factor de frecuencia, con un valor comprendido entre  $10^{25}$  y  $10^{30} \text{ seg}^{-1}\text{cm}^{-3}$  dependiendo del material (Randolph y Larson, 1988). Introduciendo en esta ecuación la expresión del potencial de Gibbs crítico (I.5), se obtiene:

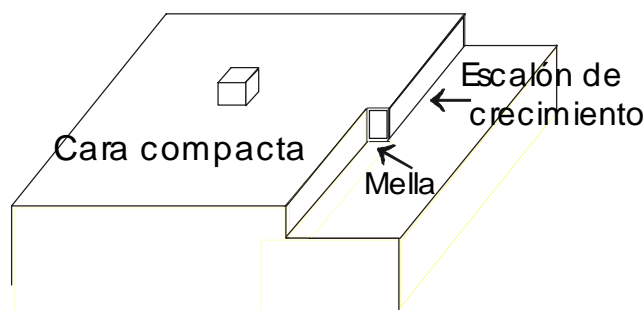


$$J(r^*) = C \exp\left(\frac{-16\pi v^2 \sigma^3}{3k^3 T^3 \ln^2 \Omega}\right) \quad (1.7)$$

El flujo de nucleación,  $J(r^*)$ , es muy sensible a la sobresaturación del sistema, siendo prácticamente cero en los casos de muy baja sobresaturación. En estas condiciones, los cristales formados tenderán a crecer, pero no se producirán nuevas nucleaciones (Garside, 1982).

### Crecimiento cristalino

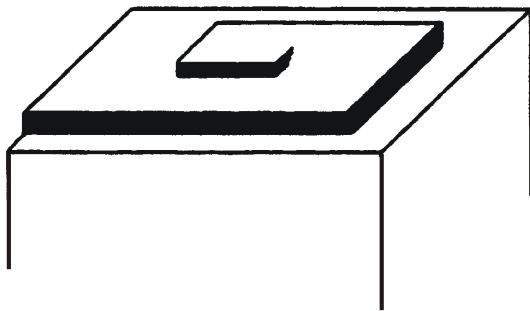
Una vez formados núcleos estables en la solución, éstos continuarán creciendo si la solución se encuentra sobresaturada y se disolverán si se encuentra subsaturada. Tradicionalmente se considera que el cristal crece mediante la adición de unidades de crecimiento en posiciones adecuadas de su superficie. Las **unidades de crecimiento** pueden ser moléculas o iones (o segmentos de polímeros lineales). Además, no todos los sitios presentes en la superficie de un cristal son energéticamente equivalentes. Se pueden distinguir tres **posiciones** más favorables para el crecimiento cristalino: *mellas*, *escalones* y *cara compacta* (Fig. 18).



**Figura 18.-** Posibles sitios de crecimiento en la superficie de un cristal: a) cara compacta, b) escalón, c) mella.

La probabilidad de encontrar una mella en un escalón de crecimiento varía entre 0.7% y 8% (Nielsen y Christoffersen, 1982), por lo que siempre se pueden encontrar estas mellas. Las unidades de crecimiento se incorporan preferentemente en ellas y hacen crecer al escalón hasta que desaparece, creando el problema de la generación de nuevos escalones.

En condiciones de alta sobresaturación, podría darse una nueva nucleación bidimensional que generara escalones en una cara compacta (Fig. 18). Sin embargo, este proceso no es posible si la sobresaturación del sistema es baja, ya que, como en todos los procesos de nucleación, la formación de núcleos bidimensionales es muy sensible a la sobresaturación del sistema (Nielsen y Christoffersen, 1982). Para resolver este problema de generación de escalones en condiciones de baja sobresaturación, Burton *et al.* (1951) propusieron un modelo de crecimiento a partir de una espiral permanente causada por los defectos del cristal (Fig. 19).



**Figura 19.-** Dislocaciones que se usan como huecos para continuar el crecimiento del cristal, según la teoría BCF (Burton *et al.*, 1951).

El *crecimiento del cristal* es el resultado de una serie de mecanismos, entre los que se pueden destacar los siguientes:

- a) Transporte de unidades de crecimiento hacia la superficie del cristal.
- b) Adsorción de iones en la superficie.
- c) Difusión de éstos sobre la superficie cristalina para encontrar un sitio favorable energéticamente.
- d) Incorporación de la unidad de crecimiento en la estructura del cristal.
- e) Transferencia de calor.

Las *etapas cinéticamente limitantes* en el proceso de crecimiento cristalino pueden ser el transporte de unidades de crecimiento hacia la superficie del cristal, los mecanismos de adsorción-difusión-incorporación en esta superficie o una combinación de ambos (Nielsen y Christoffersen, 1982). Con el fin de obtener minerales de alta calidad cristalina, en muchas ocasiones se modifica la constante cinética del proceso de transporte hasta convertir este último mecanismo en la etapa cinéticamente limitante del proceso de crecimiento cristalino. Para ello, se han desarrollado numerosos sistemas experimentales de precipitación en los que el transporte de unidades de crecimiento se realiza mediante un proceso difusivo.

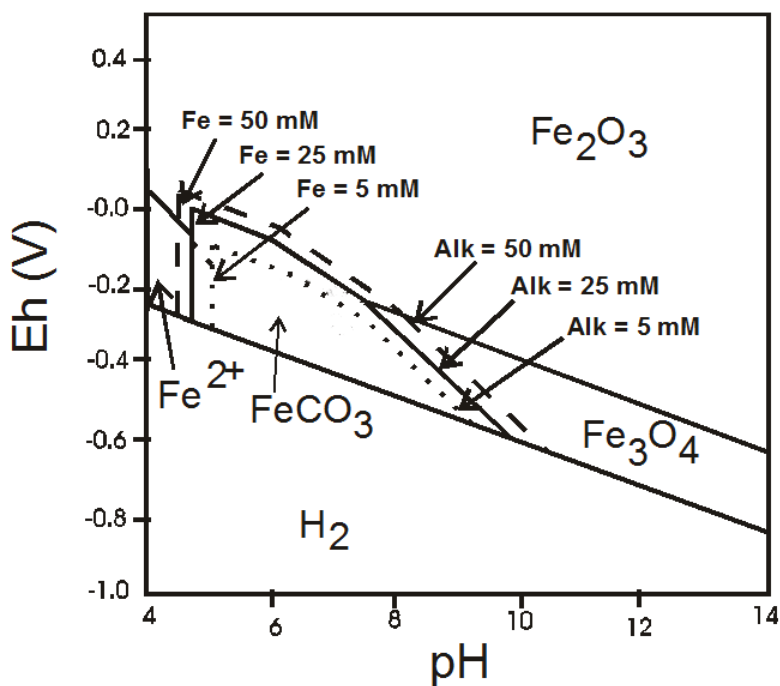
Para el caso en el que la precipitación esté controlada cinéticamente por fenómenos que ocurren en la superficie del cristal: adsorción-difusión-incorporación, se recogen en las referencias bibliográficas tres modelos de crecimiento, dependiendo de cual sea la etapa limitante del proceso: *lineal*, en el que la etapa limitante es la adsorción de iones (Nielsen, 1982); *parabólico*, en el que la etapa limitante es la difusión e incorporación de iones en la superficie del cristal (Burton *et al.*, 1951); y

*exponencial*, en el que la etapa limitante es la nucleación bidimensional en la superficie del cristal (Nielsen, 1972).

#### **I.4.B. Formación de magnetita abiótica**

La magnetita abiótica puede precipitarse de diversas formas. Se puede conseguir como una fase primaria por precipitación homogénea o heterogénea a partir de una solución usando diferentes métodos. También se puede conseguir como una fase secundaria gracias a la descomposición termal de carbonatos que contienen Fe y por la transformación de ferrihidrita o de una fase mineral conocida como “herrumbre verde”.

Los métodos más desarrollados para la síntesis de magnetita abiótica son aquellos en los que se precipita este mineral como FASE PRIMARIA a partir de una solución, ya que se pueden obtener grandes cantidades del mineral. Esta síntesis se puede producir de diferentes formas, la diferencia fundamental se encuentra en como se añade el Fe a la solución. Sin embargo, todos los métodos de síntesis tienen que alcanzar el campo de estabilidad termodinámico para la magnetita, que depende en gran medida del Eh, pH y la alcalinidad/PCO<sub>2</sub> del sistema (Garrels y Christ, 1990). A continuación, en la figura 20 hemos construido el diagrama de estabilidad termodinámica de sideritas y magnetitas, calculado para sistemas cerrados en los que la precipitación de estos minerales se realiza a partir de una solución.



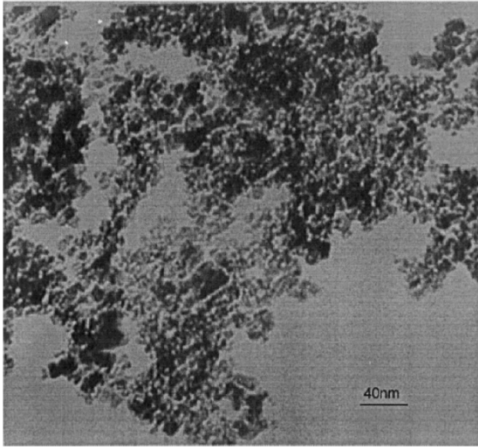
**Figura 20.-** Diagrama de estabilidad para magnetitas.

A partir del diagrama se puede observar como la magnetita es estable en condiciones reductoras ( $E_h$  negativo) y a valores de pH altos. Los métodos de precipitación inorgánica tratan de conseguir estas condiciones mediante diferentes procedimientos experimentales.

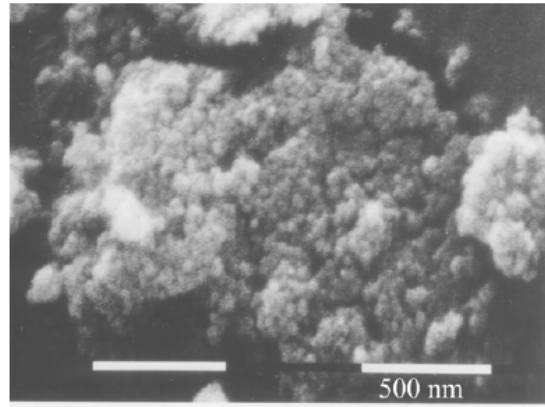
La mayoría de los métodos siguen un proceso de “**co-precipitación**”, en el que, bajo condiciones anóxicas, se introducen mezclas de  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  como solución de partida (las sales más usadas son los cloruros). Para alcanzar el campo de estabilidad termodinámica de la magnetita se utilizan diferentes soluciones para subir el pH:  $\text{NH}_3$  a  $85^\circ\text{C}$  (Vayssières *et al.*, 1998; Tseng *et al.*, 2007),  $\text{NaOH}$  a  $25^\circ\text{C}$  en un gel de agarosa (Prozorov *et al.*, 2007),  $\text{NaOH}$  a  $25^\circ\text{C}$  en solución (Perez-Gonzalez *et al.*, 2010),  $\text{NH}_4\text{OH}$  a  $25^\circ\text{C}$  (Arató *et al.*, 2005) y  $\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{OH}$  (Vayssières *et al.*, 1998). Es habitual que se observen diferentes morfologías (dentro de la misma mezcla de reacción) en los cristales de magnetita producidos de este modo como, por ejemplo, cúbicas, redondeadas, octahédricas y/o irregulares. Sin embargo, variando las condiciones de la

mezcla de reacción se pueden obtener diferentes tamaños, distribuciones de tamaño y morfologías. Por ejemplo, el tamaño medio de los cristales de magnetita puede variar dentro de un rango a escala nanométrica (1,5-12,5 nm) simplemente controlando el pH y la fuerza iónica de las soluciones de hierro. Las partículas de magnetita son más pequeñas a valores de pH altos y mayores fuerzas iónicas en la solución de hierro (Vayssières *et al.*, 1998).

Para aquellas aplicaciones en las que se necesitan partículas con tamaños y distribuciones de tamaño específicas se han desarrollado diferentes técnicas de “**co-precipitación**” modificando el procedimiento base. Estas modificaciones se basan fundamentalmente en limitar el espacio que tiene el cristal para crecer, precipitando la magnetita en microemulsiones, vesículas, soluciones de polímeros o geles (Mann y Hannington, 1988; Ward y Friberg, 1989; Liu *et al.*, 2004) (Fig. 21). Por ejemplo, en la técnica de microemulsión se utilizan tres fases: oleosa, surfactante y acuosa. Los iones de hierro se añaden como cloruros en la fase acuosa. El sistema se mantiene en condiciones anóxicas para mantener el Eh bajo. La precipitación de magnetita se consigue añadiendo amonio hasta llegar a pHs por encima de 10. Las fases oleosa y surfactante evitan la agregación de las partículas (Koutzarova *et al.*, 2006) (Fig. 22).

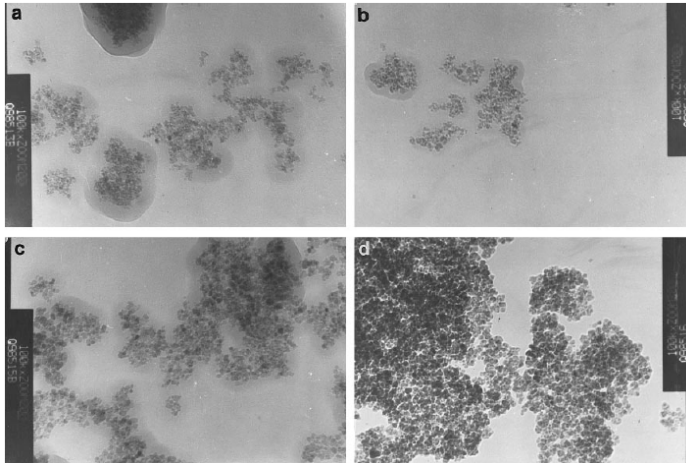


**Figura 21.-** Imagen TEM (microscopía electrónica de transmisión) de partículas de magnetita dispersadas en agua obtenidas por microemulsión (Liu *et al.*, 2004).



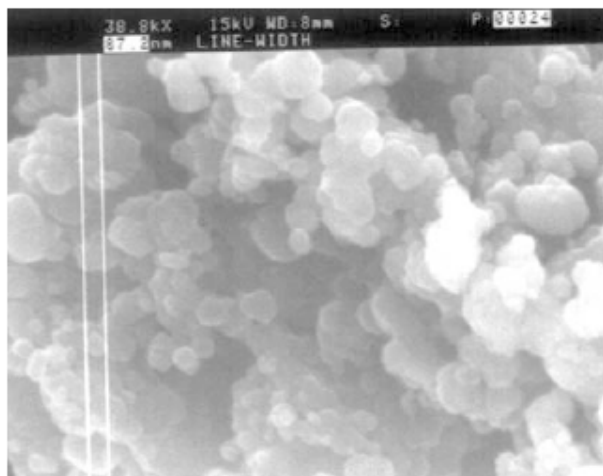
**Figura 22.-** Imagen SEM (microscopía electrónica de barrido) de partículas de magnetita obtenidas por la técnica de microemulsión (Koutzarova *et al.*, 2006).

Otro método para la obtención de magnetitas inorgánicas es el de “**reducción-precipitación**”. En este método la precipitación de magnetita ocurre por la adición de hierro sólo como  $\text{Fe}^{3+}$  en solución (normalmente como  $\text{FeCl}_3$ ). Esta precipitación ocurre por la reducción del cloruro férrico a sales ferrosas con  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  y por un posterior incremento del pH en el sistema debido a la adición de amonio, siempre bajo condiciones anóxicas (Schwertmann y Murad, 1990; Qu *et al.*, 1999; Shengchun *et al.*, 1999). Como resultado de este proceso se forma magnetita esférica con diámetros de 10nm como máximo (Fig. 23). La mineralogía del producto depende en gran medida de la relación inicial  $[\text{Fe}^{3+}]/[\text{SO}_3^{2-}]$ .



**Figura 23.-** Imágenes TEM de muestras obtenidas de soluciones de  $\text{FeCl}_3$  a una concentración inicial de (a) 0.075, (b) 0.15, (c) 0.3, y (d) 0.45  $\text{mol dm}^{-3}$  con una relación inicial  $[\text{Fe}^{3+}]_0/[\text{SO}_3^{-2}]_0$  de 3 en todas las muestras (Shengchun *et al.*, 1999).

Otro método para formar magnetita inorgánica consiste en aplicar un voltaje a una solución de tal manera que se reduzcan las sales férricas y se alcancen los valores de Eh necesarios para conseguir el campo de estabilidad de la magnetita. Es el método “**electroquímico**”. Las condiciones de alcalinidad necesarias para la precipitación de magnetita se consiguen subiendo el pH con amonio (Franger *et al.*, 2004) (Fig. 24).

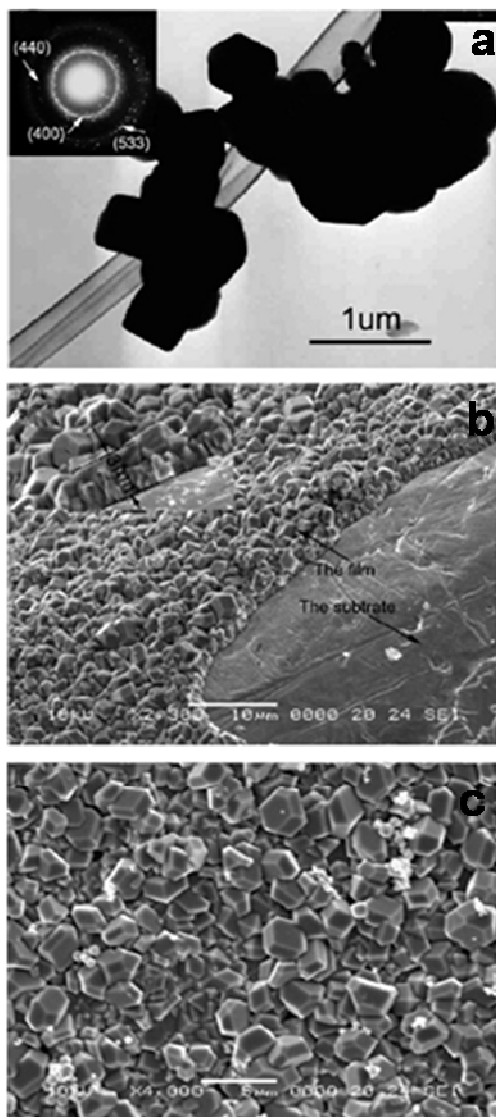


**Figura 24.-** Imagen SEM de magnetita obtenida por el método electroquímico (en electrolito NaCl);  $74 \text{ nm} < \text{Ø observado} < 88 \text{ nm}$  (Franger *et al.*, 2004).

La magnetita también puede precipitarse a **altas temperaturas**, obteniendo en este caso cristales más grandes y mejor cristalizados. Un ejemplo de este método es la formación de magnetita por la oxidación de una solución de  $\text{Fe}^{2+}$ , en concreto ( $\text{FeSO}_4$ ),

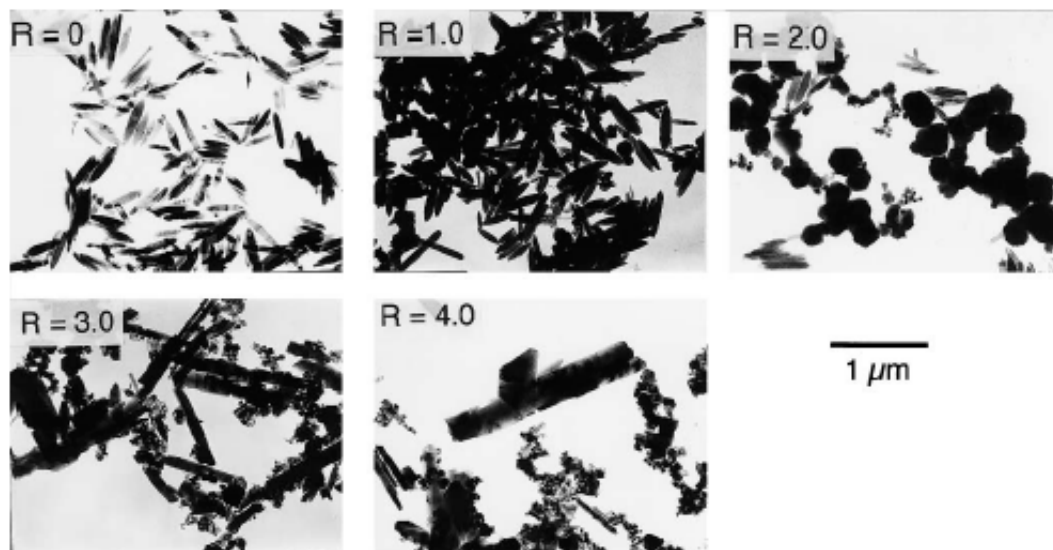


con  $\text{KNO}_3$  a  $90^\circ\text{C}$  manteniendo el pH alto con una solución de  $\text{KOH}$ . La magnetita resultante es casi estequiométrica y forma cubos con tamaños entre los  $0.05$  y  $0.20 \mu\text{m}$  (Schwertmann y Cornell, 2000). Otro ejemplo es el de la formación de magnetita a alta temperatura a partir de soluciones de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Estas soluciones se calientan en un autoclave a  $150^\circ\text{C}$  8 horas (Zhu *et al.*, 2007). Con este método se obtienen magnetitas cúbicas, bien cristalizadas, de aproximadamente  $1 \mu\text{m}$  de diámetro (Fig. 25).



**Figura 25.-** Imágenes TEM y SEM de partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  en solución y en film: (a) Imagen TEM de partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ; (b) Imagen SEM del film tomada a un ángulo inclinado; (c) Imagen SEM del film (Zhu *et al.*, 2007).

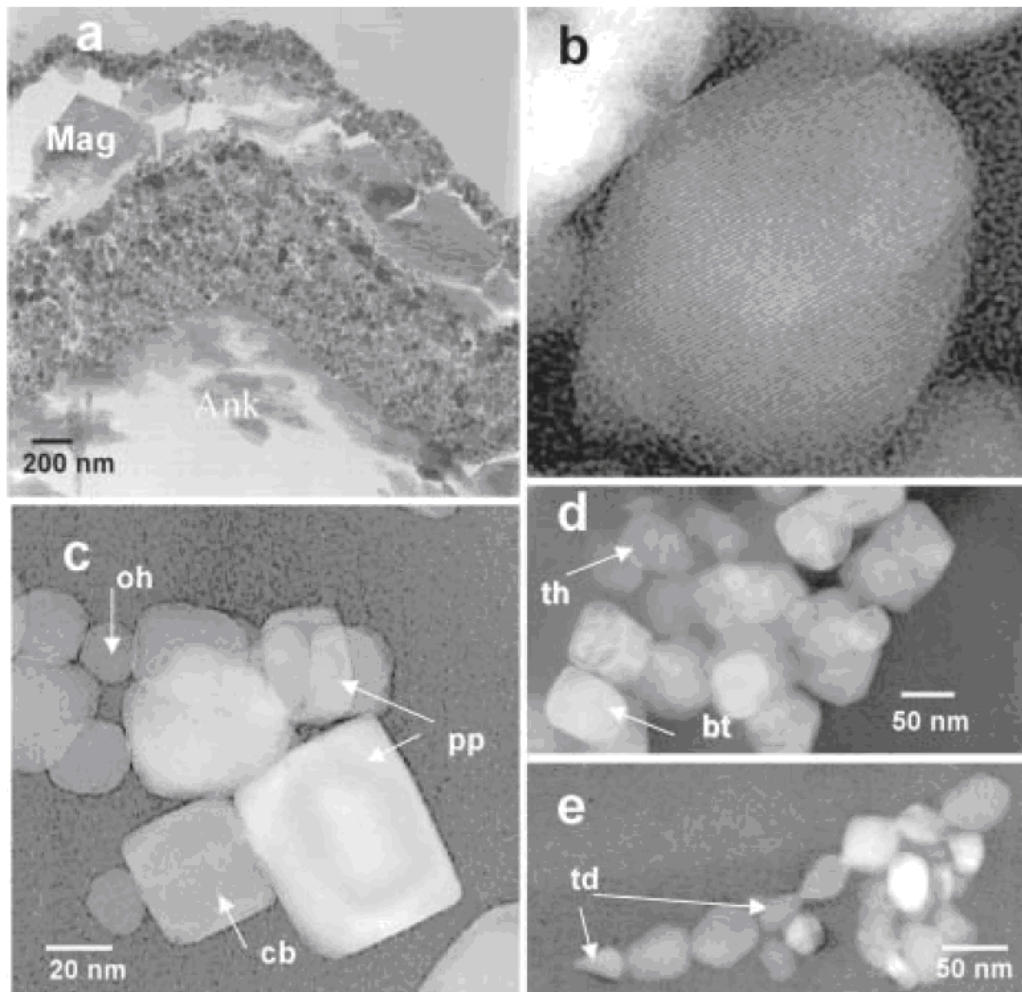
Como FASE SECUNDARIA, la magnetita puede obtenerse por diferentes métodos que implican la transformación de fases minerales a altas o bajas temperaturas. A temperatura ambiente (25°C), la magnetita se forma, por ejemplo, por la **transformación de ferrihidrita** o de una fase mineral conocida como “herrumbre verde”. Ambas fases son inestables respecto a la magnetita en condiciones anóxicas, es decir, se transforman en magnetita cuando el pH, Eh,  $p\text{CO}_2$ , y  $\text{Fe}^{2+}$  del sistema alcanzan unos determinados valores (Zachara *et al.*, 2002). También se puede formar magnetita gracias a las reacciones entre  $\text{Fe}(\text{OH})_2$  y  $\text{FeOOH}$  en solución, a temperaturas que van de los 25 a los 100° y valores de pH de 3 a 13 (Ishikawa *et al.*, 1998). Con este método se obtienen magnetitas cúbicas bien cristalizadas mezcladas con cristales irregulares de  $\text{FeOOH}$  con forma de huso, bacilo y aguja (Fig. 26).



**Figura 26.-** Imágenes TEM de diferentes magnetitas (Ishikawa *et al.*, 1998).

Otro método para obtener químicamente magnetita como fase secundaria es la **descomposición termal de siderita** u otras fases de carbonatos ricos en Fe. A altas temperaturas (superiores a los 400°C), los dominios ricos en Fe de los carbonatos se

descomponen formando óxidos de Fe y CO<sub>2</sub>. En condiciones anóxicas, el óxido de Fe que se forma es magnetita. Este procedimiento ha sido examinado en detalle por Golden *et al.* (2001, 2004) (Fig. 27) y Thomas-Keprta *et al.*, (2009), debido a la controversia sobre el origen de las magnetitas nanométricas del meteorito marciano ALH84001 (McKay *et al.*, 1996).



**Figura 27.-** Imágenes TEM de las diferentes morfologías de magnetita sintetizadas por descomposición de ankeritas (Golden *et al.*, 2004).

### **I.4.C. Formación de magnetita biótica**

Los organismos precipitan magnetita por tres razones fundamentales:

1. Como producto final del metabolismo, es el caso de algunas bacterias reductoras de hierro, en el que no se ha observado una función del mineral.
2. Para endurecer la superficie externa de los dientes de los quitones que utilizan para rascar las rocas y obtener alimento.
3. Para detectar y orientarse a lo largo del campo magnético terrestre.

Los microorganismos forman magnetita mediante la mineralización inducida biológicamente (Biologically induced mineralization, BIM) o mediante la mineralización controlada biológicamente (Biologically controlled mineralization, BCM).

En general, la BIM es el resultado de la actividad metabólica de los organismos y las subsiguientes reacciones químicas ocasionadas por los productos metabólicos, por esta razón, los minerales originados por BIM se depositan casi siempre extracelularmente. En algunos casos, el organismo secreta uno o varios productos metabólicos que reaccionan con iones o compuestos presentes en el medio dando lugar a la precipitación de partículas minerales (Frankel y Bazylinski, 2003), mientras que en otros, las superficies bacterianas como la pared celular o materiales poliméricos (exopolímeros) exudados por la bacteria actúan como sitios para la adsorción de iones y la correspondiente nucleación y crecimiento del mineral (Fortin y Beveridge, 1989; Konhauser, 1998). La BIM es, en esencia, equivalente a la mineralización inorgánica bajo las mismas condiciones ambientales y las partículas formadas tienen, por lo tanto, unas características cristal químicas que son generalmente indistinguibles de las sintetizadas inorgánicamente.

En la BCM los minerales normalmente se forman sobre o dentro de matrices o vesículas orgánicas dentro de la célula. Esto indica que el organismo ejerce un grado de control significativo sobre el proceso de nucleación y crecimiento del mineral y, por lo tanto, sobre la composición, tamaño, hábito, y localización intracelular de las partículas (Bazylinski y Frankel, 2003). Los cristales formados por BCM están generalmente bien ordenados estructuralmente, tienen una distribución de tamaños estrecha y hábitos cristalinos específicos de cada especie. Estas características indican que la BCM está controlada metabólica y genéticamente.

### **Formación de magnetita inducida biológicamente**

En la década pasada se ha producido un creciente interés en las transformaciones de los precursores portadores de  $\text{Fe}^{3+}$  y procesos biogeoquímicos que llevan a la formación de minerales de Fe (Dong *et al.*, 2000). Esto es debido, en parte, a que el hierro es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre y también porque se piensa que el  $\text{Fe}^{3+}$  fue el primer aceptor de electrones externo relevante de la respiración microbiana (Walker, 1987; Cairns-Smith *et al.*, 1992; de Duve, 1995a, 1995b). Se ha sugerido que la reducción bacteriana de hierro apareció en la Tierra antes que la reducción de sulfatos, nitratos o la respiración aeróbica (Lovley, 1991; Nealson y Saffarini, 1994). Además Nealson y Myers (1990) sugirieron que la reducción bacteriana de hierro pudo haber jugado un papel importante en la génesis de las formaciones bandeadas de hierro del Precámbrico, si en aquel momento existió un ambiente cálido (50-70°C) (Knauth y Epstein, 1976; Knauth y Lowe, 1978).

Las bacterias reductoras de Fe utilizan en su mayoría oxohidróxidos de  $\text{Fe}^{3+}$  muy amorfos como aceptor de electrones, siendo los más usados por las células goethita, hematita, ferrihidrita y nanogoethita. Estos minerales son frecuentes como productos secundarios de desgaste de suelos, materiales de subsuperficie saturados e insaturados y

sedimentos acuáticos (Zachara *et al.*, 2002; Van der Zee *et al.*, 2003; Kukkadapu *et al.*, 2005). Algunas bacterias desasimiladoras reductoras de hierro también son capaces de utilizar y reducir el  $\text{Fe}^{3+}$  presente en filosilicatos [ej., montmorillonita, illita (Kukkadapu *et al.*, 2006)] e incluso en magnetitas (Dong *et al.*, 2000).

En condiciones anaerobias las bacterias DIRBs usan el  $\text{Fe}^{3+}$  como aceptor de electrones en el proceso de respiración, transformándolo en  $\text{Fe}^{2+}$ . Se han propuesto tres mecanismos diferentes para esta transferencia de electrones. El primer mecanismo, que es el que cuenta con más apoyo, propone el contacto directo de la membrana externa de la célula con la forma oxidada del metal ( $\text{Fe}^{3+}$ ). La transferencia directa de electrones se produce gracias a los citocromos presentes en la membrana de las mismas. En el caso de *S. oneidensis* existen los citocromos *a* y *b*, de los que al menos el citocromo *a* está expuesto en la superficie celular. Este citocromo contacta con las formas oxidadas de los metales sirviendo como reductasa (Myers y Myers, 2004). Muchas de estas hemoproteínas han sido identificadas gracias a estudios mutagénicos (Beliaev y Saffarini, 1998; Beliaev *et al.*, 2001; DiChristina *et al.*, 2002; Leang *et al.*, 2003; Myers y Myers, 2001, 2002, 2003).

El segundo mecanismo propone la existencia de transportadores de electrones de bajo peso molecular, como por ejemplo compuestos redox activos y solubles. Esta teoría también ha obtenido apoyo experimental. Por ejemplo, Lovley y Woodward (1996) demostraron que en cultivos de *G. metallireducens* se estimulaba en gran medida la reducción de metales con la adición de sustancias húmicas o quinonas solubles en agua como anthraquinona-2,6-disulfonato (AQDS). También Nevin y Lovley (2002) demostraron esta presencia de transportadores al estimular la reducción de óxido de hierro mediante la adición de filtrados de un cultivo de *Geothrix fermentans*. Por otra parte, Rosso *et al.* (2003) sugirieron que la falta de corrosión por picadura, observada

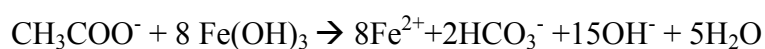
cuando *Shewanella putrefaciens* CN32 crece sobre cristales de hematita en condiciones anaerobias, era debida a la secreción de un agente de transporte de electrones. El trabajo de Newman y Kolter (2000) apoya además la presencia de mediadores redox. En su caso, un mutante de *S. oneidensis* MR-1 incapaz de producir menaquinona no fue capaz de reducir AQDS. No obstante, al añadir el sobrenadante de un medio en el que había crecido una cepa salvaje de *S. oneidensis* MR-1, se complementó el fenotipo del mutante y se restauró la capacidad para reducir AQDS, demostrándose que la capacidad de reducir AQDS reside en algún metabolito excretado por la bacteria. Sin embargo, hay autores que cuestionan esta hipótesis de que la molécula capaz de restaurar esta reducción sea un transportador redox (Myers y Myers, 2004).

El tercer mecanismo para la reducción de hierro por DIRBs se basa en la presencia de sustancias quelantes. Esta teoría no tiene tanto apoyo como las otras dos, aunque sí se ha visto que la presencia de sustancias quelantes estimula la reducción de óxidos de metal (Arnold *et al.*, 1986, 1990; Royer *et al.*, 2002; Urrutia *et al.*, 1999). Por ejemplo, Nevin y Lovley (2002) demostraron que *G. fermentans* produce un quelante endógeno que estimula la solubilización de óxidos de  $\text{Fe}^{3+}$  poco cristalinos en cultivos puros. En este estudio se determinó que la presencia de *G. fermentans* en cultivos con  $\text{Fe}^{3+}$  sólido hace que se produzca 10 veces más  $\text{Fe}^{3+}$  soluble que en el mismo experimento en presencia de *G. metallireducens*, ya que esta última no produce ningún quelante (Nevin y Lovley, 2000).

Aunque el mecanismo específico de precipitación de magnetita por las bacterias reductoras de hierro desasimiladoras no se ha caracterizado químicamente en su totalidad, Zachara *et al.* (2002) examinaron la producción de magnetita por *S. putrefaciens* cuando se utilizaba ferrihidrita como fuente de  $\text{Fe}^{3+}$  y aceptor de electrones. Estos autores propusieron que la precipitación de magnetita por *S.*

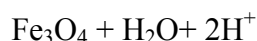
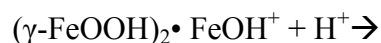
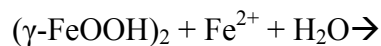
*putrefaciens* ocurría por la conversión topotáctica (es decir, continuidad tridimensional de la estructura cristalina) de la ferrihidrita 2-line. Esta ferrihidrita se transformaría en magnetita bajo las siguientes condiciones: 1) liberación de un flujo intermedio de  $\text{Fe}^{2+}$  por las células; y 2) la existencia de un gradiente de pH y otros iones ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) que sería máximo en la superficie de la célula y disminuye hacia el medio de cultivo circundante. El producto metabólico de estas reacciones hace que el sistema se sobresature con respecto a la magnetita, permitiendo la precipitación de esta fase mineral.

Actualmente, el papel que juegan las bacterias reductoras de hierro en la precipitación de magnetita sigue sin conocerse. Por un lado, la reacción abiótica del  $\text{Fe}^{2+}$  con el hidróxido férrico debería ser suficiente para formar magnetita. Sin embargo, estudios experimentales muestran que la magnetita no se forma en cultivos incubados a temperaturas demasiado altas para el crecimiento bacteriano, si el medio inoculado se esteriliza antes de la incubación o si se agregan células metabólicamente inactivas a la solución experimental (Lovley *et al.*, 1987). Estas observaciones sugieren que el metabolismo de las bacterias reductoras de  $\text{Fe}^{3+}$  contribuye en algo más que en la producción de  $\text{Fe}^{2+}$  a la magnetogénesis. Una posibilidad es que la formación de magnetita esté favorecida por los pHs altos, una condición encontrada en la reacción de reducción de  $\text{Fe}^{3+}$  (reacción 1.1). El  $\text{Fe}^{2+}$  que se forma se adhiere a los granos de hidróxido férrico transformándolos en magnetita (reacción 1.2). Por lo tanto, la combinación apropiada de una concentración alta de  $\text{Fe}^{2+}$  y un pH alto cuando se da el contacto con el  $\text{Fe}^{3+}$  sólido puede suministrar el ambiente adecuado para la formación secundaria de magnetita (Lovley, 1990).





También se ha observado que se forma magnetita por la reducción microbiana de lepidocrocita ( $\gamma$ -FeOOH), un polimorfo de la goetita (Cooper *et al.*, 2000). En este caso, la formación de magnetita ocurre por una reacción intermedia del hidróxido ferroso:



En estudios recientes se ha observado que la formación de magnetita no requiere estrictamente la actividad de las bacterias reductoras de  $\text{Fe}^{3+}$ . En experimentos donde se añadió  $\text{Fe}^{2+}$  a cultivos de *Dechlorosoma suillum* con nitrato como aceptor final de electrones, la bacteria indujo la precipitación de un hidróxido de  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  verde grisáceo, conocido como “herrumbre verde”. Este mineral es generalmente inestable en el medio ambiente y cuando se oxida se transforma en magnetita en sólo dos semanas (Chaudhuri *et al.* 2001). Además, otros estudios experimentales han documentado la formación de magnetita en asociación con cultivos suspendidos de bacterias fototrópicas oxidadoras de  $\text{Fe}^{2+}$ , a través de la reacción del  $\text{Fe}^{2+}$  con precipitados de hidróxido férrico biogénicos (Jiao *et al.*, 2005).

En los sedimentos actuales de agua dulce y marinos una gran cantidad de magnetita se forma en las capas subóxicas donde se da la reducción de  $\text{Fe}^{3+}$  (ej. Karlin *et al.* 1987). La magnetita también aparece asociada a filtraciones de gas y bitumen sólido, donde su formación parece estar ligada a la reducción microbiana de oxohidróxidos de hierro con los hidrocarburos actuando como donadores de electrones (ej. McCabe *et al.*, 1987). Este proceso quedó demostrado por el hallazgo de la acumulación de magnetita durante la oxidación del tolueno acoplada a la reducción de  $\text{Fe}^{3+}$  por *G. metallireducens* (Lovley y Lonergan, 1990).

Aunque el mecanismo de precipitación no se conozca en su totalidad, sí se sabe que la mineralogía, morfología, composición y tamaño de las magnetitas inducidas por bacterias (magnetitas BIM) depende en gran medida de varios factores como las condiciones ambientales en las que ocurre la precipitación [pH,  $pO_2$ ,  $pCO_2$ , Eh y temperatura (Bell *et al.*, 1987; Kukkadapu *et al.*, 2006; Roh *et al.*, 2006)], la composición del medio de cultivo, la concentración y formas químicas de los aceptores y donadores de electrones y los iones adsorbidos (Zachara *et al.*, 2002).

La morfología y el tamaño de los cristales de magnetita producido por las DIRBs han sido caracterizados hasta cierto punto. Se han descrito desde cristales globulares hasta cristales euhédricos o irregulares (Sparks *et al.*, 1990; Zachara *et al.*, 2002; Kukkadapu *et al.*, 2005) (Perez-Gonzalez *et al.*, 2010). El tamaño de las magnetitas en estos estudios puede variar desde menos de 35 nm, en el rango de partículas superparamagnéticas (lo que significaría que no tendrían un magnetismo permanente a temperatura ambiente), hasta rangos entre 35-120 nm (SDM) en el que cada cristal individual tiene un momento de dipolo magnético permanente a temperatura ambiente (Vali *et al.*, 2004; Roh *et al.*, 2006); (Perez-Gonzalez *et al.*, 2010).

En casi todos los casos anteriores el organismo ejerce escaso o ningún control sobre los procesos de biomineralización. Por lo tanto, los minerales producidos de forma inducida, incluida la magnetita, son generalmente indistinguibles en morfología y tamaño de los minerales formados inorgánicamente bajo las mismas condiciones químicas. Estos biominerales están caracterizados, en general, por una baja cristalinidad, amplias distribuciones de tamaño de partícula, ausencia de morfologías cristalinas específicas, poca especificidad mineral (minerales mezclados) y/o la presencia de impurezas en la red mineral (Frankel y Bazylinski, 2003; Bazylinski *et al.*, 2007). Todo lo mencionado anteriormente explica por qué los minerales BIM no se

utilizan como biomarcadores en la actualidad. Sin embargo, existen algunas excepciones. Por ejemplo, células de la cepa GS-15 de *Geobacter metallireducens* son capaces de inducir la formación de una forma única de magnetita tabular de dominio único bajo unas condiciones de cultivo poco usuales (baja  $p\text{CO}_2$ ). Esta magnetita tiene un hábito cristalino y unas propiedades magnéticas bien definidas. Vali *et al.* (2004) propusieron, debido a sus características únicas, la utilización de estas magnetitas inusuales como indicador de una actividad biológica en ambientes terrestres y extraterrestres en el pasado.

### **Formación de magnetita controlada biológicamente**

Sea cual sea el mineral producido por la bacteria siempre estará englobado en el magnetosoma, vesículas que son las que proporcionan a las bacterias magnetotácticas sus características especiales.

#### El magnetosoma

El magnetosoma bacteriano se define como un cristal intracelular de mineral de hierro magnético, de dominio único, envuelto en una membrana bicapa de fosfolípidos (Balkwill *et al.*, 1980; Gorby *et al.*, 1988; Komeili *et al.*, 2004). Esta membrana es intracelular, constituida por una invaginación de la membrana citoplasmática (Komeili *et al.*, 2006), que crea una vesícula en la que se produce la nucleación del cristal de magnetita y su posterior crecimiento (Gorby *et al.* 1988).

#### La membrana del magnetosoma

Desde el comienzo de la investigación con bacterias magnetotácticas fue evidente que los cristales de magnetita estaban envueltos en algún tipo de cubierta (Balkwill *et al.*, 1980). Esta cubierta es la membrana del magnetosoma (MM) que engloba a los cristales de magnetita (Gorby *et al.*, 1988; Schüller y Baeuerlein, 1997) y

parece ser el sitio de control y regulación de los procesos de biomineralización de magnetita en las bacterias magnetotácticas.

El análisis lipídico de magnetosomas purificados de *M. magnetotacticum* y *M. gryphiswaldense* mostró que la MM contiene proteínas, ácidos grasos, glicolípidos, sulfolípidos y fosfolípidos (Gorby *et al.*, 1988; Grünberg *et al.*, 2004). Los fosfolípidos predominantes son fosfatidilserina, fosfatidilglicerol y fosfatidiletanolamina. Los fosfolípidos constituyen entre el 58 y el 65% de los lípidos de la MM de *M. magnetotacticum* siendo el 50% de estos fosfatidiletanolamina (Nakamura y Matsunaga, 1993). Una comparación de los ácidos grasos de la MM, de la célula o de la membrana citoplasmática (CM) y de la membrana externa (OM) mostró que la composición de los de la MM es similar a la de los de la CM pero diferente a los de la membrana externa (OM) (Tanaka *et al.*, 2006). Estos resultados indican que la MM es una bicapa lipídica, lo que contrasta con otras inclusiones encontradas en procariotas que están generalmente envueltas en una monocapa de proteínas. Los resultados también sugieren que la MM se origina a partir de la membrana citoplasmática (CM).

Los magnetosomas están casi siempre localizados junto a la CM en las especies de *Magnetospirillum* y durante mucho tiempo no se ha sabido si la MM se formaba por invaginación de la CM o por síntesis de novo a pesar de la evidencia circunstancial descrita en el párrafo anterior. Tampoco se sabía si las vesículas del magnetosoma eran sintetizadas antes de que se produjera la biomineralización de magnetita y existen como vesículas vacías en la célula o si la MM envuelve a la partícula después de la biomineralización. Sin embargo, un estudio de microscopía electrónica mostró que las células de *M. magnetotacticum* crecidas con déficit de hierro contenían vesículas de magnetosomas vacías y también vesículas con cristales pequeños e inmaduros de magnetita (Gorby *et al.*, 1988). Por otra parte, la criotomografía de electrones (ECT,

electron cryotomography) ha demostrado que la MM es una invaginación de la CM en vez de una vesícula libre (Komeili *et al.*, 2006). Estos estudios también demostraron que la precipitación de magnetita ocurre tras la formación de la vesícula.

La biomineralización del magnetosoma es un proceso complejo que se da en varios pasos. Estos incluyen la formación de la vesícula del magnetosoma, la acumulación de hierro por la célula, el transporte de hierro a la vesícula del magnetosoma y la biomineralización controlada de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  o  $\text{Fe}_3\text{S}_4$  dentro de la vesícula. En *Magnetospirillum magneticum* no está claro si la membrana del magnetosoma (MM) forma una vesícula verdadera e independiente separada del periplasma o una invaginación permanente (Komeili, 2007; Komeili *et al.*, 2006). Si la estructura del MM forma una invaginación permanente que está en comunicación con el periplasma no sería necesario un sistema de transporte de hierro al interior de la vesícula muy complejo, ya que el hierro solo necesitaría atravesar la membrana externa.

Aunque una gran parte del proceso es todavía desconocida, sobre todo los detalles químicos y bioquímicos, la acumulación de hierro sí ha sido estudiada en detalle. Hay varios aspectos conocidos, entre los que destacan los siguientes: (1)  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  pueden ser utilizados en la formación de magnetita aunque no necesariamente de manera simultánea o por la misma bacteria (Matsunaga y Arakaki, 2007; Schüler y Baeuerlein, 1996; Suzuki *et al.*, 2006); (2) la acumulación de hierro para la síntesis de magnetita, así como la biomineralización, suceden con relativa rapidez (Schüler y Baeuerlein, 1998); y (3) hay pruebas de la existencia de sideróforos, ligandos de bajo peso molecular producidos por la célula que quelan y solubilizan el  $\text{Fe}^{3+}$  (Neilands, 1995; Calugay *et al.*, 2003; Dubbels *et al.*, 2004; Paoletti y Blakemore, 1986).

## Características de la magnetita BCM

### **Composición mineral**

Las bacterias magnetotáticas generalmente producen magnetosomas con óxidos de hierro o bien con sulfuros de hierro. Mientras que las productoras de óxidos de hierro producen en su mayor parte magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) (ej., Frankel *et al.*, 1979), otros minerales aparte de la greigita ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ) (Mann *et al.*, 1990; Heywood *et al.*, 1990) se han encontrado en las productoras de sulfuros de hierro, como la mackiwanita ( $\text{FeS}$  tetragonal) y  $\text{FeS}$  cúbico que se cree son precursores de la greigita (Pósfai *et al.*, 1998 a, b). Curiosamente se han encontrado dos tipos de bacterias no cultivadas capaces de producir tanto magnetita como greigita: un grupo de grandes bacterias marinas con forma de bacilo (Bazylinski *et al.*, 1993b, 1995; Pósfai *et al.*, 2007) y el procariota magnetotático multicelular (MMP) (Keim *et al.*, 2007).

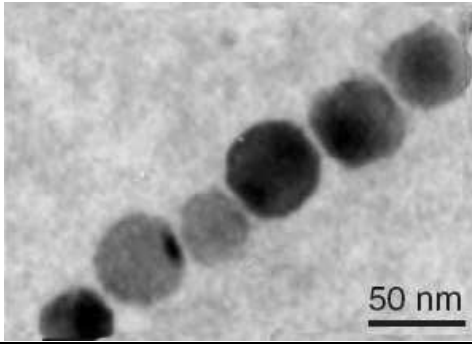
La fase mineral del magnetosoma parece encontrarse bajo un estricto control químico, ya que, varias de las bacterias magnetotáticas cultivadas sintetizan magnetita y no pueden sintetizar greigita, ni siquiera si se cultivan en la presencia de sulfuro de hidrógeno (Meldrum *et al.*, 1993 a, b). Generalmente, los cristales de magnetita de los magnetosomas de las bacterias magnetotáticas son químicamente muy puros (Bazylinski y Frankel, 2004). De todas formas hay algunas excepciones. Por ejemplo, se han encontrado trazas de titanio en los cristales de magnetita de un coco no cultivado recogido de una balsa de tratamiento de aguas residuales (Towe y Moench, 1981) y una cantidad significativa de cobre se ha encontrado en cristales de greigita del MMP recogido de marismas salinas (Bazylinski *et al.*, 1993a). También se ha encontrado manganeso en una bacteria no cultivada (Keim *et al.*, 2009) y cobalto en tres cepas de *Magnetospirillum* adicionando este elemento al medio (Staniland *et al.*, 2008).

## Morfología

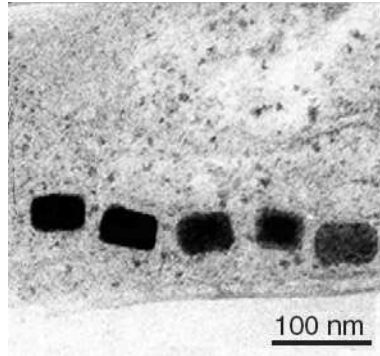
Se han encontrado diferentes formas en los cristales de magnetita de los magnetosomas de bacterias magnetotácticas. Normalmente una cepa tiene una sola morfología cristalina que es específica (Bazylinski *et al.*, 1994). Pequeñas variaciones con respecto a esta morfología específica se han encontrado en los cristales de algunas especies al crecer en condiciones diferentes (Meldrum *et al.*, 1993a). Los cristales superparamagnéticos de reciente creación tienen los bordes redondeados y caras más planas que se van definiendo según madura el cristal y se incrementa el tamaño hasta convertirse en una partícula SDM (Bazylinski y Frankel, 2000b). Se han observado tres formas generales para las partículas maduras de greigita y magnetita usando microscopía de transmisión de electrones (TEM, transmission electron microscopy) (Bazylinski y Frankel, 2000a, b). Estas formas son: (1) cuboidales (cuboctaédricas) (Balkwill *et al.*, 1980; Mann *et al.*, 1984a) (Fig. 28), (2) pseudoprismáticas alongadas (casi rectangulares en el plano horizontal de la proyección) (Mann *et al.*, 1984b; Meldrum *et al.*, 1993a, b; Towe y Moench, 1981) (Fig. 29), y (3) con forma de diente, bala o punta de flecha (Mann *et al.*, 1987a, b; Thornhill *et al.*, 1994) (Fig. 30)<sup>3</sup>.

---

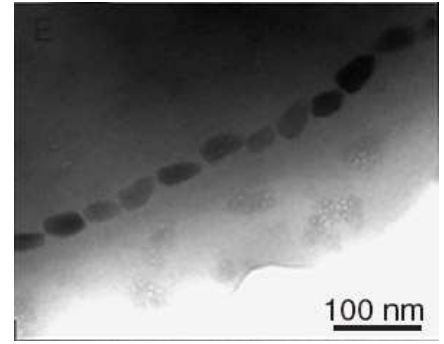
<sup>3</sup> Los cristales de greigita de las bacterias magnetotácticas tienen las mismas tres morfologías generales que la magnetita (cubo-octaédrica, alongada pseudorectangular prismática y en forma de diente (Pósfai *et al.*, 1998b) que están compuestas primariamente de formas {111} y {100} (Heywood *et al.*, 1991). En la mayoría de cepas no cultivadas los cristales de greigita también parecen ser específicos de la cepa y/o especie aunque esto debe ser confirmado mediante cultivo puro o con técnicas de biología molecular. Sin embargo, los MMP contienen una combinación de cristales de greigita de diferentes formas como pleomórficos, prismáticos pseudorectangulares, con forma de diente y cubo-octaédricos (Pósfai *et al.*, 1998b).



**Figura 28.-** Cristales de magnetita cuboidales. (Bazylinski y Schubbe, 2007).



**Figura 29.-** Cristales de magnetita pseudocrismáticos alargados. (Bazylinski y Schubbe, 2007).



**Figura 30.-** Cristales de magnetita en forma de flecha (Bazylinski y Schubbe, 2007).

### Tamaño

La mayoría de los cristales maduros de magnetita y greigita de los magnetosomas se encuentran dentro de un pequeño rango de tamaños entre 35 y 120 nm (ejes mayores), aunque existe variabilidad entre especies (Bazylinski y Moskowitz, 1997; Bazylinski *et al.*, 1994; Devouard *et al.*, 1998; Frankel *et al.*, 1998). La magnetita y greigita son por tanto SMD y son magnéticas de forma permanente a temperatura ambiente (Butler y Banerjee, 1975; Diaz-Ricci y Kirschvink, 1992). Además las partículas están uniformemente magnetizadas, lo que significa que su momento bipolar magnético es máximo y que es igual al momento de saturación  $M_s$ . Por el contrario, las partículas más pequeñas, aquellas por debajo de 30 nm no tienen una magnetización remanente estable a temperatura ambiente y son las llamadas partículas superparamagnéticas. Las células producen inicialmente estas partículas más pequeñas que finalmente crecen hasta cristales SMD (Bazylinski y Frankel, 2000a). Si los cristales fueran más grandes se formarían dominios múltiples, provocando que la magnetización no sea uniforme y disminuyendo, por tanto, la magnetización remanente. Sintetizando partículas SMD, las bacterias magnetotácticas producen el tamaño óptimo



de cristal para obtener un momento magnético permanente que sea el máximo posible por magnetosoma (Bazylinski y Frankel, 2000b).

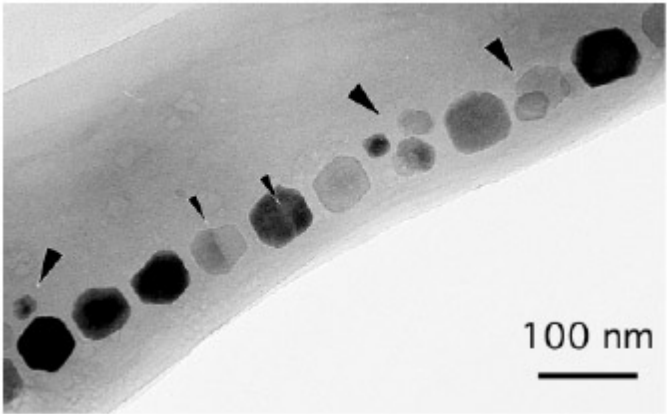
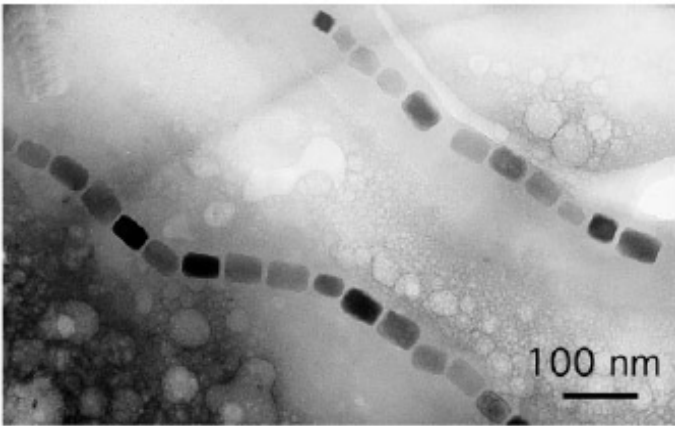
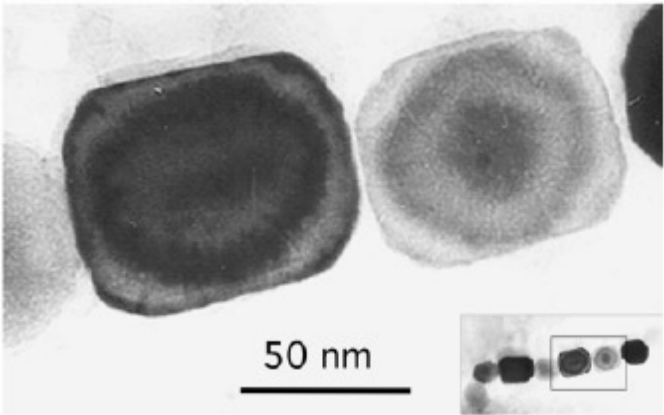
### **Estructura cristalina**

Respecto a la estructura cristalina, los cristales de magnetita de las bacterias magnetotácticas tienen una gran perfección estructural, según se ha observado por diferentes técnicas, como TEM de alta resolución, difracción de electrones de área seleccionada (SAED, selected area electron diffraction) y tomografía de electrones (Clemett *et al.*, 2002; Mann *et al.*, 1984a, b, 1987a, b; Meldrum *et al.*, 1993a, b; Thomas- Keprta *et al.*, 2000, 2001).

La magnetita y la greigita se encuentran en el grupo espacial Fd3m y tienen estructuras cristalinas con las caras centradas en el espín (Palache *et al.*, 1944). Los cristales macroscópicos de magnetita tienen el hábito cristalino de la forma octaédrica {111} y ocasionalmente dodecaédrica {110} o cúbica {100}. Para los cristales de las especies de agua dulce de *Magnetospirillum* el hábito cristalino es cubo-octaédrico compuesto por formas {100} o {111} (Mann *et al.*, 1984a), con un desarrollo equidimensional de las seis caras de simetría de la forma {111}. Los hábitos de los cristales no alargados de manera equidimensional, como los de los vibrios marinos MV-1 y MV-2 y el coco marino MC-1, se han descrito como combinaciones de formas {100}, {111} y {110} (Meldrum *et al.*, 1993a, b). En estos cristales las caras de simetría 6, 8 y 12 de las respectivas formas que constituyen los hábitos no se desarrollan igualmente. Por ejemplo, los cristales de las cepas MV-1 y MV-2 (Meldrum *et al.*, 1993a) y MC-1 (Meldrum *et al.*, 1993b) tienen hábitos pseudoprismáticos alargados en el eje <111>, con seis caras (110) bien desarrolladas paralelas al eje de elongación. En los cristales de las cepas MV-1 y MV-2, las restantes seis caras (111) forman discontinuidades en los bordes, las caras (110) son muy pequeñas o están ausentes

(Thomas-Keprta *et al.*, 2001). En los cristales de la cepa MC-1, las secciones de cada borde consisten en tres caras (100) alternando con tres caras (110). Por lo tanto, seis caras (110) son más grandes y seis más pequeñas, y las seis caras (111) están virtualmente ausentes en este hábito. Sólo las seis caras (100) son equidimensionales (Meldrum *et al.*, 1993a). El patrón pseudoprismático de seis caras alongadas (110) tapadas por caras (111) con diferentes planos de sección es muy común en las bacterias magnetotácticas que producen cristales de magnetita no equidimensionales. La tabla 3 (Frankel y Bazylinski, 2003) resume la información anterior:

**Tabla 3.** Resumen de las diferentes morfologías cristalinas en función de la cepa productora.

Cepa	Morfología	Imagen
Especies de agua dulce de <i>Magnetospirillum</i>	cubo-octaédrica	
MV-1 y MV-2	cristales no alargados de manera equidimensional	
MC-1	hábitos pseudoprismáticos alargados en el eje $\langle 111 \rangle$ , con seis caras (110) bien desarrolladas paralelas al eje de elongación	

Los cristales en forma de diente, bala y flecha son los más anisotrópicos (diferentes según la dirección de crecimiento) dentro de las partículas magnéticas producidas por bacterias magnetotácticas. En un coco magnetotáctico no cultivado los

cristales grandes y pequeños tienen diferentes hábitos, lo que nos sugiere que el crecimiento cristalino ocurre en dos fases en las que las partículas iniciales son cubo-octaédricas que se alongan en el eje [111] para formar un prisma pseudo-octaédrico que alterna caras (110) y (100) tapadas por caras (111) (Mann *et al.*, 1987a, b).<sup>4</sup>

Aunque los defectos como las dislocaciones de tornillo son raros en los cristales de los magnetosomas, la macla de cristales es relativamente común (aprox. 10% de los cristales en algunos organismos) con los cristales individuales asociados en rotaciones de 180° sobre la dirección [111] paralela a la dirección de la cadena y con un plano de contacto común (111) (Devouard *et al.*, 1998). Las maclas múltiples también han sido observadas pero son menos comunes.

### **Alineación de la cadena**

Los magnetosomas se encuentran alineados dentro de las células en una o más cadenas (Bazylinski y Moskowitz, 1997; Bazylinski *et al.*, 1995), gracias a la presencia de las proteínas MamK y MamJ (Komeili *et al.*, 2007). Como los cristales de los magnetosomas se orientan espontáneamente a lo largo del eje de la cadena (Frankel, 1984), y el momento del dipolo magnético de la cadena (y de la célula) es la suma algebraica de los momentos individuales de los cristales de la cadena, la célula maximiza su momento magnético dipolar alineando los magnetosomas, y se comporta

---

<sup>4</sup> A diferencia de los cristales de magnetita de las bacterias magnetotácticas, los cristales individuales de greigita en estos microorganismos a menudo exhiben un contraste irregular al observarse con el microscopio electrónico (Pósfai *et al.*, 1988b), y en lugar de facetas diferentes y bien definidas las superficies de los cristales son con frecuencia redondeadas e irregulares. Estos defectos se han interpretado como resultado del proceso de conversión de la mackiwanita a greigita (Pósfai *et al.*, 1998b). Las variaciones en el grosor y otros factores pueden también contribuir al desigual contraste de las partículas.

toda ella como un único imán.<sup>5</sup> Gracias a esta propiedad, las células se alinean pasivamente a lo largo de las líneas del campo magnético al nadar (Frankel, 1984). Las células vivas ni son atraídas ni empujadas hacia ningún polo magnético, y las células muertas también se alinean en el campo magnético, pero no nadan. Sin embargo, para que la cadena del magnetosoma funcione como se ha descrito anteriormente, los magnetosomas deben anclarse en un sitio dentro de las células, ya que si flotaran libremente probablemente se agregarían, condición por la que el momento del dipolo magnético se reduciría considerablemente.

Algunas cepas no cultivadas como cocos productores de magnetita, bacilos productores de greigita y los MMP no alinean los magnetosomas en cadenas, sino que producen agrupaciones de magnetosomas en un extremo de las células o bien agrupaciones con cadenas parciales (Cox *et al.*, 2002; Heywood *et al.*, 1990; Mann *et al.*, 1990; Moench, 1988; Pósfai *et al.*, 1998a, b). Sin embargo, incluso estas células tienen un momento de dipolo magnético neto.

---

<sup>5</sup> Esto ha sido confirmado con resultados de medidas magnéticas (Peninga *et al.*, 1995), microscopia de fuerza magnética (Proksch *et al.*, 1995; Suzuki *et al.*, 1998) y holografía electrónica (Dunin-Borkowski *et al.*, 1998, 2001).

## **I.5. Aplicaciones**

### **I.5.A. Magnetita como biomarcador**

#### **La importancia de la magnetita como biomarcador**

La búsqueda de biomarcadores es muy importante tanto para entender la evolución primigenia de nuestro planeta, como para ayudar a revelar indicios de una antigua actividad biológica en otros planetas como Marte. Aunque existen compuestos orgánicos como terpenoides (Simoneit *et al.*, 2002), preservados en el registro fósil, que son utilizados como biomarcadores moleculares, los biomarcadores minerales se utilizan ampliamente ya que permanecen mejor en los sedimentos. Estos biomarcadores constituyen un registro sobre la evolución de la vida en nuestro planeta, ya que los organismos capaces de precipitar minerales están presentes en todos los grupos desde Bacteria a organismos superiores.

En la pasada década, se ha incrementado el interés por las transformaciones biogeoquímicas de las fases del  $\text{Fe}^{3+}$  y por el conocimiento sobre los procesos que llevan a la biomineralización de este (Dong *et al.*, 2000). Este interés en el  $\text{Fe}^{3+}$  es debido a que este catión pudo haber sido el primer aceptor de electrones externo en la respiración microbiana de importancia global (Walker, 1987; Cairns-Smith *et al.*, 1992; de Durve, 1995). Como consecuencia de esto, la presencia de magnetita originada por la biorreducción de  $\text{Fe}^{3+}$  se ha utilizado como una posible prueba de la existencia de procesos respiratorios en la atmósfera primigenia (Walker, 1987; Vargas *et al.*, 1998), la presencia de una biosfera profunda de la subsuperficie terrestre (Gold, 1992) e incluso para intentar demostrar la presencia de una antigua vida microscópica en Marte (McKay *et al.*, 1996).

## **Criterios utilizados para reconocer a la magnetita de origen orgánico, el Paquete MAB**

Desde que McKay *et al.* (1996) propusieran como prueba de una antigua vida en Marte la semejanza morfológica entre las magnetitas nanométricas en los bordes de las inclusiones de carbonatos del meteorito marciano ALH84001, y las magnetitas producidas por BCM de las bacterias magnetotácticas terrestres, se ha discutido mucho sobre los criterios que pueden usarse para reconocer el origen biológico de una muestra natural de magnetita. Hoy en día se usa un conjunto de seis criterios para reconocer magnetita de origen biogénico y, aunque estos criterios los propuso por primera vez Thomas-Keprta *et al.* (2000), se han estado utilizando informalmente durante los últimos 30 años para identificar remanentes fósiles de magnetosomas bacterianos (magnetofósiles) en el registro sedimentario de la tierra (Chang y Kirschvink, 1989; Petersen *et al.*, 1986; Akai *et al.*, 1991; Hesse, 1994; Schwartz *et al.*, 1997). Estos criterios incluyen características físicas y químicas específicas de los cristales de magnetita formados por BCM que, cuando se consideran en conjunto, no se observan en ninguna población de magnetita inorgánica.<sup>6</sup> Los seis criterios propuestos por Thomas-Keprta *et al.* (2000) son conocidos como el paquete MAB (magnetite assay for biogenicity) y son los siguientes:

### Tamaño de dominio único y proporción ancho/largo anisotrópica restringida

Debido a que los magnetosomas son los responsables de la aeromagnetotaxia de las bacterias magnetotácticas, el tamaño y la proporción ancho/largo de los cristales han evolucionado de tal manera que la taxia sea lo más eficiente posible, ya que los

---

<sup>6</sup> Sin embargo, siempre hay que tener en cuenta que las comparaciones se establecen con los cristales producidos por las bacterias actuales.

superparamagnéticos o los cristales multidominio no son útiles para la magnetotaxis (Kirschvink y Lowenstam, 1979).

Todas las pruebas realizadas hasta el momento en los cristales de los magnetosomas de las bacterias magnetotácticas vivas han confirmado que estos cristales se comportan como dominio único (Bazylinski, 1995; Bazylinski y Moskowitz, 1997; Sparks *et al.*, 1990; Thomas-Keprta *et al.*, 2000). Siendo de dominio único, la partícula está magnetizada de manera uniforme. Las partículas de este tamaño y forma son imanes perfectos.

Buseck *et al.* (2001) y Faivre y Zuddas (2006) sugirieron que, además del tamaño, la forma de la distribución del tamaño del cristal (CSD) también podía utilizarse como criterio de biogenicidad. Arató *et al.* (2005) continuaron con estos análisis combinando el uso de CSD con la distribución del factor forma (SFD, representa la distribución de los cristales según su forma, ancho/largo) de las poblaciones de magnetita. Estos autores usaron estos parámetros para determinar si muestras de magnetitas naturales eran biogénicas, y más específicamente, si estaban producidas por bacterias magnetotácticas. Estos autores encontraron que el parámetro de distribución del tamaño del cristal de los magnetosomas puede ser utilizado para demostrar que una población específica de cristales de magnetita tiene su origen en las bacterias magnetotácticas, siempre y cuando sea diferente la distribución del factor forma de esos mismos magnetosomas. También descubrieron que una cepa de bacterias magnetotácticas produce cristales de magnetita con una distribución de tamaño log-normal.

#### Pureza química

La magnetita producida por las bacterias magnetotácticas es generalmente  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  puro y estequiométrico sin otros contaminantes (Mann y Frankel, 1989; Sparks *et al.*, 1990; Meldrum *et al.*, 1993; Bazylinski, 1995; Bazylinski y Moskowitz, 1997; Thomas-



Keprta *et al.*, 2000). Sin embargo, se han descubierto algunas excepciones; cantidades traza de titanio se han encontrado en magnetitas de sedimentos de bacterias no cultivadas (Towe y Moench, 1981). Otras parecen incorporar manganeso cuando se añade  $MnCl_2$  al medio (Keim *et al.*, 2009) y otras cobalto, probablemente, en las capas superficiales del cristal (Staniland *et al.*, 2008).

#### Perfección cristalográfica

Los cristales de magnetita formados por las bacterias magnetotácticas (estudiados con microscopía de transmisión de alta resolución, HRTEM) son estructuralmente perfectos (sin defectos internos), con la excepción de agrupaciones en el plano {111} (Vali *et al.*, 1987; Vali y Kirschvink, 1991; Mann *et al.*, 1988; Devouard *et al.*, 1998; Thomas-Keprta *et al.*, 2000). La falta de defectos en la red aumenta el momento magnético de la partícula, que es necesaria para una magneto-aerotaxia eficiente.

#### Morfología cristalina inusual

Se ha observado que los cristales inorgánicos de magnetita ( $< 1 \mu m$ ) adoptan formas isotrópicas, es decir, equivalentes en las direcciones del espacio, por ejemplo, cúbicas, cubooctaédricas, octaédricas, dodecaédricas, minimizando la energía libre superficial (Ichinose *et al.*, 1992). Sin embargo, los cristales de magnetita producidas por algunas bacterias magnetotácticas son anisotrópicos, es decir, diferentes en las tres direcciones del espacio. Frecuentemente estos cristales aparecen alargados en una dirección cristalográfica (normalmente en la [111], aunque no exclusivamente). Estas formas alargadas no son formas de equilibrio, por ejemplo, en forma de bala, con forma de diente, prismáticas hexagonales alargadas (Mann *et al.*, 1987a, b; Thornhill *et al.*, 1994).

Estas estructuras alargadas se producen por el crecimiento desigual de algunas caras de simetría relacionadas, debido probablemente a condiciones anisotrópicas en el ambiente que rodea al cristal (ej. concentración química de iones, temperatura y gradientes de pH y Eh) (Mann y Frankel, 1989). La anisotropía se puede originar por que exista un flujo de iones, diferente en algunas direcciones, a través de la membrana del magnetosoma que rodea el cristal, o por interacciones anisotrópicas de la membrana del magnetosoma o de proteínas del magnetosoma con el cristal en crecimiento (Mann y Frankel, 1989).

Thomas-Keprta *et al.* (2002) son más estrictos definiendo las morfologías inusuales de los cristales de magnetita. Definen la morfología inusual basándose en los cristales del magnetosoma de la bacteria magnetotáctica marina MV-1 y su similitud con la población de cristales, presuntamente de origen biológico, del meteorito ALH84001. Esta geometría alargada del cristal es definida como hexa-octaédrica y consiste en ocho caras octaédricas  $\{111\}$  divididas en, dos caras borde y seis caras pequeñas seccionadas, seis caras dodecaédricas  $\{110\}$ , y seis caras seccionadas cúbicas  $\{100\}$  (Thomas-Keprta *et al.*, 2002) (Fig. 31). Las seis caras  $\{110\}$  que quedan, necesarias para la estructura cúbica centrada en una cara del cristal, son presuntamente caras seccionadas muy pequeñas. Esto se observa frecuentemente en los cristales del magnetosoma de la cepa MV-1 y también se observa esta morfología en aproximadamente el 25% de todos los cristales de magnetita de los carbonatos del meteorito marciano ALH84001 (Thomas-Keprta *et al.* 2002).

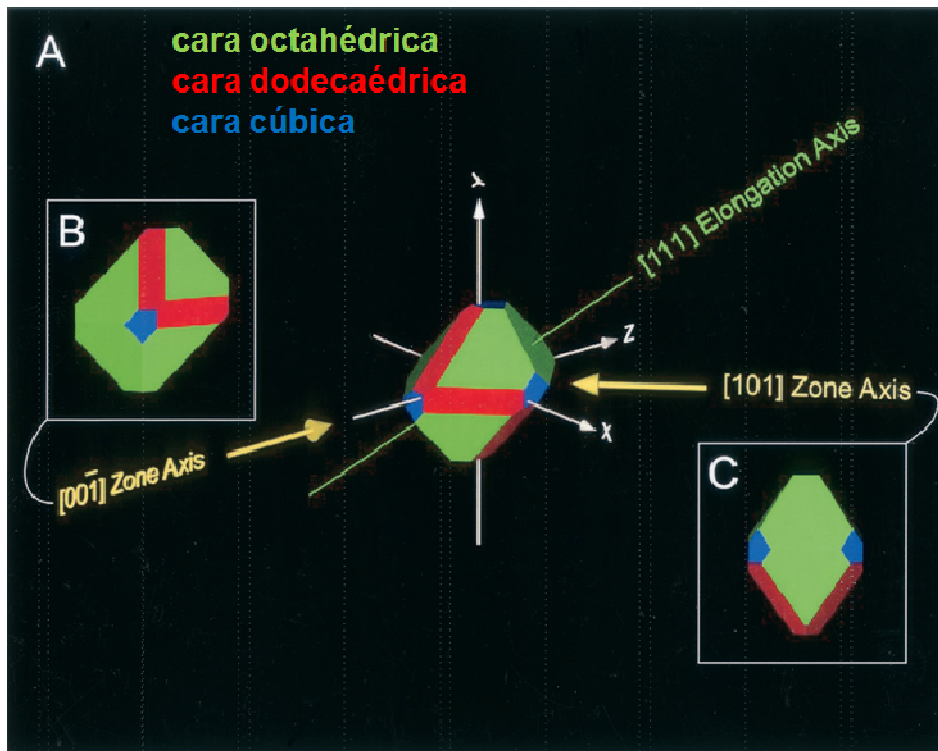


Figura 31.- Representación idealizada de un cristal de magnetita de geometría hexa-octaédrica truncada, con 8 caras octaédricas  $\{111\}$  (verdes), 6 caras dodecaédricas  $\{110\}$  (rojas), y seis caras cúbicas  $\{100\}$  (azules) (Thomas-Keprta *et al.* 2002).

El último punto a considerar respecto a la morfología cristalina es el hecho de que otros microorganismos y organismos superiores, aparte de los procariontes, producen cristales de magnetita, de dominio único, que tienen morfologías similares a los cristales BCM de bacterias magnetotácticas. Algunos ejemplos son la magnetita tabular de dominio único que se produce por BIM gracias a las células de la cepa GS-15 de *Geobacter metallireducens* (Vali *et al.*, 2004) o los cristales formados por eucariotas unicelulares (Bazylinski *et al.*, 2000), algas (Torres de Araujo *et al.*, 1985) y organismos superiores como algunos peces (ej. salmón rojo [Mann *et al.*, 1988]) y algunas plantas (Gajdardziska-Josifovska *et al.*, 2001). Aunque algunos de estos organismos producen cristales de magnetita con morfologías cubooctaédricas como en el caso del salmón rojo, otros sintetizan partículas anisotrópicas alargadas, con forma de diente en las algas (Torres de Araujo *et al.*, 1985) y un porcentaje de prismas hexaédricos y octaedros en

células de hierba (Gajdardziska-Josifovska *et al.*, 2001). La contribución de estos organismos a la magnetización de sedimentos, suelos y otros hábitats naturales es aún desconocida.

#### Dirección de elongación de los cristales de magnetita

Los cristales de magnetita alargados lo están normalmente en una de las direcciones [111], es decir, en una de los cuatro posibles ejes de rotación triples de un octaedro regular (Mann *et al.*, 1988; Vali *et al.*, 1987; Vali y Kirschvink, 1991; Thomas-Keprta *et al.*, 2000, 2002). Sin embargo, se ha puesto en duda si la dirección cristalográfica de elongación [111] de los cristales de magnetita BCM se pueda usar como criterio de biogenicidad ya que se ha encontrado que no todas las magnetitas BCM se alargan en esta dirección (Isambert *et al.*, 2007).

#### Cadenas de magnetita

Las bacterias magnetotácticas alinean los magnetosomas en cadenas lineares gracias a la proteína ácida Mam J (Scheffel *et al.*, 2006). Estos autores sugirieron que Mam J interactúa con la superficie del magnetosoma así como con una estructura similar al citoesqueleto, configurando uno de los niveles más altos de organización estructural conseguidos por las células procariotas. Este alineamiento maximiza el momento magnético total de la célula (siendo este el vector suma de los momentos de cada cristal individual), así la célula se comporta como un solo imán. La presencia de cadenas de magnetita ha sido muy discutida como un criterio fiable, ya que el alineamiento de la cadena puede desaparecer por dos razones: cuando la bacteria muera, ya que la cadena se colapsa, y también por la propia recogida de la muestra, que normalmente se realiza acercando un imán lo que provoca una reorientación de los cristales individuales (Thomas-Keprta *et al.*, 2000).

## **Problemática, nuevas técnicas y metodologías**

A pesar del considerable esfuerzo hecho para definir criterios con el propósito de distinguir si un cristal de magnetita encontrado en un ambiente natural tiene un origen biológico, el uso de alguno de estos criterios ha sido cuestionado y discutido por varias razones, algunas de las cuales detallamos a continuación:

### Problemas al usar el criterio de morfología como indicador de biogenicidad

El problema de usar la morfología cristalina como un criterio para reconocer el origen biológico de los minerales es antiguo y no está ligado únicamente a la magnetita. La autenticidad de muchos fósiles antiguos de procariotas, que en su día fueron aceptados por la comunidad científica, está hoy en entredicho.

Mucha atención se ha centrado en el uso de la morfología del cristal como indicador de la biogenicidad de la magnetita, porque históricamente fue el primer criterio propuesto para este fin. Esto se fundamentó en el hecho de que las bacterias magnetotácticas producen cristales con morfologías que no se observan en las partículas de magnetita sintetizadas inorgánicamente. Una de las mayores críticas que recibe el uso de la morfología es debido al tipo de metodología utilizado para la determinación de las estructuras tridimensionales de los cristales nanométricos. Normalmente estas partículas se analizan con microscopía electrónica, lo que conlleva la dificultad de inferir figuras tridimensionales a partir de imágenes bidimensionales. El método utilizado por Thomas-Keprta *et al.* (2001) y Golden *et al.* (2004) para minimizar este problema fue reconstruir las imágenes tridimensionales de los cristales a partir de múltiples imágenes bidimensionales de TEM tomadas a diferentes ángulos. Sin embargo, el mejor método para determinar la estructura tridimensional de cristales pequeños, es usar la tomografía de electrones, que se ha utilizado con éxito en cristales

de magnetita de bacterias magnetotácticas y del meteorito ALH84001 (Clemett *et al.*, 2002). Estas técnicas conllevan el examen de un número de cristales estadísticamente significativo y, por lo tanto, mucho trabajo.

Actualmente, se desconoce un proceso abiótico que pueda reproducir exactamente las morfologías y las características físicas y magnéticas de la magnetita anisotrópica BCM producida por las bacterias magnetotácticas, con la posible excepción de los cristales de magnetita sintetizados por Golden *et al.* (2004).

La clave para discernir si la morfología puede usarse como biomarcador reside en conocer cómo las bacterias magnetotácticas, y otros organismos, producen estas magnetitas. Arakaki *et al.* (2003) exploraron la influencia que ejerce la interacción entre el cristal de magnetita y las proteínas del magnetosoma sobre la morfología final del cristal. Para ello estudiaron la morfología de cristales de magnetita formados en presencia de Mms6, una proteína del magnetosoma de *M. magneticum* (cepa AMB-1). Observaron, en resultados no muy concluyentes, que la morfología de los cristales se veía afectada y se acercaba ligeramente a la morfología de los cristales de los magnetosomas maduros de células intactas. Otros autores (Amemiya *et al.*, 2007; Prozorov *et al.*, 2007) realizaron modificaciones de este experimento y confirmaron los resultados de Arakaki *et al.*, (2003).

Los experimentos realizados hasta la fecha en este sentido son escasos y con procedimientos algo dudosos, como, por ejemplo, realizar la precipitación de magnetita a 90°C, temperatura a la que la vida de las bacterias sería inviable. Además, los experimentos están restringidos a las cepas AMB-1 y *M. griffithswaldense*. Indudablemente, mucha más investigación es necesaria para confirmar esta hipótesis de la influencia de la interacción mineral-proteína en la morfología final del cristal. Estos experimentos deberían de realizarse *in vitro*, pero también *in vivo* a través de la creación

de mutantes con genes específicos que codifican para las proteínas de membrana del magnetosoma inactivados (mutantes knockout). No obstante, estos experimentos no serán el objetivo de esta memoria.

### Cuestiones y problemas de la pureza química

Aunque los primeros estudios de la magnetita del magnetosoma concluyeron que la magnetita es suficientemente pura para ser considerada estequiométrica (ej. Sparks *et al.*, 1990; Meldrum *et al.*, 1993a; Thomas-Keprta *et al.*, 2000), algunos estudios recientes, como se ha mencionado antes, muestran que otros metales aparte del hierro pueden incorporarse al magnetosoma (Towe y Moench, 1981; Staniland *et al.*, 2008; Keim *et al.*, 2009).

La pregunta clave respecto a estos estudios es si el catión metálico se incorpora dentro de la estructura del mineral reemplazando átomos de hierro o, si por el contrario, se forma un cristal de varias fases minerales mezcladas.

El resultado de ambas situaciones es muy diferente, ya que la primera situación produciría una solución sólida, es decir, una magnetita no estequiométrica, mientras que en la segunda situación, la magnetita seguiría siendo químicamente pura.

En experimentos realizados hasta el momento sobre la incorporación de cobalto a especies de *Magnetospirillum*, parece que el Co no se incorpora al cristal, sino que parece confinarse a las capas superficiales de este cristal de magnetita (Staniland *et al.*, 2008).

La incorporación de cationes extraños también ha sido estudiada en magnetitas producidas por DIRBs. Coker *et al.* (2007) introdujeron con éxito Co, Ni y Mn en bioferritas producidas por *G. sulfurreducens* y *S. oneidensis*.

El estudio de la introducción de cationes en magnetitas de distinto origen es un objetivo de esta tesis. Esto es debido a que aún no está claro si la magnetita formada inorgánicamente como fase secundaria a partir de un precursor "no puro" incorpora o no los cationes del precursor. Este será también un objetivo de nuestra investigación debido a que antes de que el criterio de la pureza química de la magnetita pueda utilizarse de forma fidedigna es importante determinar si los cationes pueden incorporarse o no a la estructura de las magnetitas producidas mediante BCM.

El criterio de la alta pureza química ha ganado últimamente más importancia en el debate sobre si hay una parte de magnetita biogénica en el meteorito ALH84001. Golden *et al.* (2004) defendieron que se pueden obtener magnetitas químicamente puras de la descomposición termal de sideritas de magnesio a 470°C en condiciones anóxicas y propusieron un mecanismo inorgánico para la formación de magnetitas químicamente puras en el meteorito ALH84001. Thomas-Keprta *et al.* (2009) realizando experimentos similares obtuvieron unos resultados totalmente diferentes, encontrando que las magnetitas formadas de esta manera a partir de un precursor no "puro", (Mg,Mn)CO<sub>3</sub> contenían diferentes porcentajes de Mg y Mn. Por otro lado, Jimenez-Lopez *et al.* (Cation incorporation in magnetites formed upon thermal decomposition of ankerites, artículo presentado en General Assembly of the European Geosciences Union, Vienna, Austria, 2008) comunicaron que la descomposición termal de (Ca, Mg, Fe)CO<sub>3</sub> a 700°C y bajo una presión de CO<sub>2</sub> de 1 atm producía magnetitas con diferentes cantidades de Mg y Ca incorporadas en la estructura del cristal de magnetita.



## Otras opciones, posibilidades y consideraciones

### Compuestos orgánicos y cambios en la estructura del cristal

Los compuestos orgánicos juegan un papel esencial en la formación del mineral. Pueden: (1) actuar de moldes para la nucleación de cristales (Pentecost, 1985; Mann y Hannington, 1988; Dupraz y Visscher, 2005); (2) concentrar cationes en las zonas negativamente cargadas de la pared celular, membranas, residuos o productos secundarios del metabolismo bacteriano (Fowle y Fein, 2001; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2007; Neal *et al.*, 2007); (3) favorecer la agregación orientada de cristales de nucleación homogénea por afinidad electrostática entre los iones cargados negativamente y planos atómicos específicos del cristal [efecto ionotópico, (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2007)]; y (4) atrapar semillas de cristal que actúan como núcleo para la precipitación heterogénea (Knorre y Krumbein, 2000; Turner y Jones, 2005).

Se ha observado que, en ocasiones, los compuestos orgánicos se incorporan entre la estructura de un cristal mineral, modificando e incluso estabilizando el mismo. Esto se ha ratificado para la vaterita ( $\text{CaCO}_3$ ) producida gracias a *Myxococcus xanthus* por BIM (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2007). Sin embargo, no se ha observado incorporación de materia orgánica en magnetitas producidas por BCM y no se ha estudiado si se produce esta incorporación en magnetitas producidas por BIM.

Si la incorporación de materia orgánica modifica la estructura del cristal y esta modificación se puede detectar entonces este factor se podría proponer como biomarcador. Dada la importancia del tema y que no hay estudios al respecto, este punto constituirá un objetivo de nuestra investigación.

## Isótopos

Los organismos vivos son conocidos por alterar el fraccionamiento isotópico de los elementos presentes en aquellos minerales que producen, en comparación con aquellos producidos inorgánicamente, ya que los procesos metabólicos enriquecen el mineral en isótopos más pesados o más ligeros. El fraccionamiento isotópico está basado en la preferencia de una enzima por un isótopo en particular y, por lo tanto, depende de la ruta química-bioquímica utilizada por el organismo para sintetizar el mineral (O'neil, 1986). Un fraccionamiento isotópico significativo del oxígeno y/o el hierro de la magnetita biogénica comparada con la inorgánica podría servir como un buen criterio de biogenicidad.

### **I.5.B Aplicaciones nanotecnológicas**

La magnetita es un mineral que gracias a sus propiedades magnéticas tiene multitud de utilidades. La producción de magnetita, tanto de forma inorgánica como biológica, es uno de los campos más prometedores de la nanotecnología y un negocio en el que, sólo en EEUU, se invierten millones de dólares cada año. Para su aplicación tecnológica, las nanopartículas de magnetita de un lote han de ser muy homogéneas, debiendo presentar todas ellas unas características de tamaño y formas similares. Las partículas producidas por métodos inorgánicos suelen ser pequeñas (<10 nm) amorfas y con un momento magnético pequeño lo que no las hace deseables para su aplicación práctica. Para que adquieran las condiciones deseadas las nanopartículas de magnetita han de formarse por métodos inorgánicos en condiciones de alta temperatura y en ambiente reductor, lo que hace que su producción sea muy cara. Por otro lado, las magnetitas formadas por magnetobacterias reúnen todas las propiedades que la convierten en un material excelente para ser usado en nanotecnología. Más aún, sus propiedades magnéticas se pueden cambiar, adaptándolas a las necesidades particulares de cada aplicación. Además de lo dicho hasta el momento, hay que añadir una ventaja

más, que es el hecho de que la magnetita formada por magnetobacterias es un material biocompatible y, por tanto, se eliminan muchos de los problemas a este respecto en comparación con las magnetitas de origen inorgánico.

#### Aplicaciones de los magnetosomas y cristales de magnetita

Los magnetosomas y los cristales de magnetita se usan en aplicaciones tecnológicas y biomédicas.

Las diferentes aplicaciones tecnológicas para las que se usa son por ejemplo, el almacenamiento magnético (Chakraborty, 1999), la refrigeración magnética (McMichael *et al.*, 1992), los dispositivos fotoeléctricos (McMichael *et al.*, 1992) y los ferrofluidos (McMichael *et al.*, 1992).

En el campo de biomedicina tiene una gran aplicación debido a que la membrana de fosfolípidos de los magnetosomas permite la inmovilización de moléculas biológicas como proteínas o ácidos nucleicos en su superficie. Algunos ejemplos de las aplicaciones que puede tener en el campo de la inmunología son: la creación de anticuerpos magnéticos usando partículas de magnetita bacteriana que se han utilizado en varios ensayos de inmunofluorescencia (Matsunaga *et al.*, 1990); la detección de alérgenos (Nakamura y Matsunaga, 1993) y células escamosas de carcinoma (Matsunaga, 1991); la cuantificación de inmunoglobulina G (Nakamura *et al.*, 1991); la detección y eliminación de células de *Escherichia coli* con un anticuerpo monoclonal conjugado con isotiocianato inmovilizado en magnetita bacteriana (Nakamura *et al.*, 1993).

Otras de las aplicaciones que tiene en el campo de la biomedicina son: la inmovilización de enzimas (Matsunaga y Kamiya, 1987; Kanno *et al.*, 2005); como agente de contraste para diagnóstico clínico con imágenes de resonancia magnética

(Wunderbaldinger *et al.*, 2002); y su utilización en estrategias hipertérmicas contra el cáncer (Kim *et al.*, 2001).

En el campo de la biología molecular la magnetita de los magnetosomas se utiliza para detectar polimorfismo de un único nucleótido, basándose en la técnica de transferencia de energía de la resonancia de fluorescencia (FRET) (Maruyama *et al.*, 2004; Nakayama *et al.*, 2003; Ota *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2003; Yoshino *et al.*, 2003). Los magnetosomas también se pueden utilizar para el aislamiento de ácidos nucleicos. Para esto los magnetosomas se modifican utilizando compuestos como dendrímeros de poliamidoamina muy ramificados o aminosilanos para la extracción de ADN (Yoza *et al.*, 2002, 2003a, b). También se ha descrito un modo eficiente de aislar ARNm gracias a magnetosomas modificados con oligo (dT) (Sode *et al.*, 1993).

En el campo de la geología y el paleomagnetismo encontramos otra aplicación muy importante de la magnetita. La magnetita de origen bacteriano, tanto la producida por las bacterias magnetotácticas como aquella precipitada gracias a bacterias reductoras del hierro es una portadora importante, en ocasiones la más importante, de la remanencia magnética en algunos sedimentos lacustres y oceánicos (Kim *et al.*, 2005; Oldfield y Wu, 2000; Snowball, 1994; Snowball *et al.*, 2002). Este material magnético de grano fino guarda memoria del campo magnético de la Tierra existente en el momento en el que fue depositado. Usando datación isotópica, y otras técnicas, se puede determinar cuando fueron depositados los sedimentos y rastrear los cambios producidos en el campo magnético. Esto proporciona información importante sobre el origen del campo geomagnético y el interior de la Tierra, la historia de los movimientos de placas y la inversión magnética, e incluso datos magnéticos representativos del paleoclima y paleoambiente (Evans y Heller, 2003).



## **Capitulo II: Objetivos**



## Capítulo II: Objetivos

Buscar criterios nuevos que sirvan para distinguir magnetitas inorgánicas de las producidas por BIM. Para ello se realizarán varios experimentos:

1. Síntesis inorgánica de magnetita en condiciones compatibles con la vida de bacterias magnetotácticas y bacterias reductoras de hierro, con el objetivo de que este experimento inorgánico sirva como control. Caracterización de las magnetitas inorgánicas obtenidas mediante este método.
2. Producción de magnetita por *S. oneidensis*, caracterización de las muestras.
3. Comparación de ambos tipos de magnetita (inorgánica y BIM) con el fin de encontrar características diferenciadoras.

Comprobar la validez del criterio de “pureza química” actualmente utilizado como biosignatura de magnetitas. Para ello se sintetizarán magnetitas inorgánicas, BIM y BCM en presencia de cationes extraños y se comprobará la incorporación de estos cationes a la estructura del cristal.

Comprobar si existe posibilidad de modular las propiedades magnéticas de las magnetitas BCM con el fin de mejorar su aplicación biotecnológica. Para ello se determinarán las propiedades magnéticas de las magnetitas BCM obtenidas, en su caso, en presencia de cationes.





## **Capítulo III: Materiales y Métodos**



## Capítulo III. Materiales y Métodos

### III.1. Microorganismos

Para la realización de esta tesis se han empleado las bacterias desasimiladoras reductoras de hierro *Shewanella oneidensis* (ATCC 700550) procedente de la Colección Americana de Cultivos Tipo. También se utilizó la bacteria magnetotáctica *Magnetospirillum gryphiswaldense* cedida por los doctores Bazylinski y Schüler.

### III.2. Medios de cultivo

#### III.2.A. Medios generales de cultivo

##### TSA y TSB

Estos medios se han utilizado para la conservación de las cepas reductoras de hierro. TSB (estéril)

Triptona de soja (Scharlau Chemie)	3%
------------------------------------	----

Agua destilada

##### TSA (estéril)

Triptona de soja (Scharlau Chemie)	3%
------------------------------------	----

Agar (Scharlau Chemie)	2%
------------------------	----

Agua destilada

## **III.2.B. Medio de crecimiento y producción de magnetita por bacterias reductoras de hierro**

### **Medio BpH 7**

Este medio se corresponde con el M-1 descrito por Kostka y Nealson (1998) al que se le ha eliminado el tampón fosfato. Se utiliza para inducir la precipitación de magnetita por las bacterias reductoras de hierro. Para actuar como aceptor de electrones y fuente de hierro, se añaden 0,2 g/L de ferrihidrita 2-line (descrita más adelante), una sal de hierro muy amorfa. En condiciones de anaerobiosis *S. oneidensis* utiliza el  $Fe^{3+}$  presente en esta sal de hierro como aceptor final de electrones reduciéndolo a  $Fe^{2+}$ . En la composición de este medio aparece un suplemento de metales, una solución de sales bases y una solución de aminoácidos que se detallaran más adelante. El medio se prepara para que sea anóxico.

#### Procedimiento

1. Para la preparación de 1 L de medio, se añaden 1,19\_g de  $(NH_4)_2SO_4$  a un recipiente, 9 g de buffer PIPES [piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid), concentración final de 30 mM], 100 mL de sales basales y 875 ml de agua destilada. Se mezcla hasta que todo esté disuelto.
2. Se añaden 0,1 mL de una solución de 0,115 M  $NaSeO_4$ , 0,1 mL de suplemento de metales y 6 mL de una solución de lactato de sodio al 60% en agua (concentración final, 32 mM).
3. Se ajusta el pH a 7 con NaOH (10N).
4. Se hierve durante dos o 3 minutos y se burbujea con  $N_2$  durante todo el tiempo necesario hasta que se enfríe.

5. Se dispensa en botellas cerradas herméticamente a las que se ha sustituido el aire por una atmósfera de N<sub>2</sub>.
6. Se autoclava a 121°C durante 20 min.
7. A cada botella se le añaden 10mL/L de la solución de aminoácidos (se utiliza un filtro acoplado a la jeringuilla), y 10 mL de la solución de ferrihidrita.

Suplemento de metales

CoSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1,41 g
NiCl <sub>2</sub> 6 H <sub>2</sub> O	1,98 g
NaCl	0,58 g
Agua destilada	100 mL

Se autoclava a 121°C y se guarda a 4°C

Solución de sales basales

Solución de elementos traza	10 mL
Agua destilada	800 mL
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	2 g
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,57 g
EDTA, sal de disodio	0,20 g
FeSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0,012 g

Se guarda a 4°C

### Solución de elementos traza

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,8	g
ZnSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0,24	g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2 H <sub>2</sub> O	0,75	g
CuSO <sub>4</sub> 5 H <sub>2</sub> O	0,042	g
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0,17	g
Agua destilada	1	L

Se esteriliza por filtración y se guarda a 4°C

### Amino ácidos

L-arginina	0,2	g
L-serina	0,2	g
L-ácido glutámico	0,2	g
Agua destilada	100	mL

Se esteriliza por filtración y se guarda a 4°C

### Preparación de ferrihidrita 2-line por precipitación de bases

1. Se disuelven 40g de Fe (NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>9H<sub>2</sub>O en 550 ml de agua Milli-Q.
2. Se añaden aproximadamente 330 ml de KOH 1 M para subir el pH entre 7 y 8. Los últimos 20 ml deben ser añadidos gota a gota comprobando constantemente el pH.
3. Se agita vigorosamente y se centrifuga 10 minutos a 2000 r.p.m, se descarta el sobrenadante, el precipitado se vuelve a resuspender en agua Milli-Q hasta el volumen original de la muestra (880 mL aprox.). Se repite este proceso 3 veces.

4. Se dializa la solución para quitar los electrolitos, la conductividad debe estar por debajo de 20  $\mu$ s.

6. Se vuelve a ajustar el pH a 7.

El medio BpH7 se utilizará en otros experimentos modificando su pH.

### **Medio NBpH 7 y NbpH 8**

Son idénticos al medio BpH 7 pero eliminando el buffer PIPEs. Son medios no tamponados a los que se les ha ajustado el pH a 7 y 8 respectivamente utilizando  $\text{NH}_4\text{OH}$  (25% en  $\text{NH}_3$ ).

### **III.2.C. Medios para el crecimiento de *Magnetospirillum gryphiswaldense***

#### **Medio MSR-1 modificado**

Se utiliza para el crecimiento de la bacteria magnetotáctica *M. gryphiswaldense*. Este medio fue descrito por Schüler y Bauerlein (1997). Se ha modificado eliminando la fuente de hierro, citrato férrico, y el extracto de levadura. En la composición de este medio aparece una solución de vitaminas que se detalla más adelante. Concretamente este medio se ha usado para preparar inóculos de esta bacteria. Es un medio microaerobio.

Hepes	2,383 g
Piruvato sódico	2,97 g
$\text{NaNO}_3$	0,39 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,10 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,142 g



Bacto peptona 3 g

pH 7

Se burbujea 1 h con una mezcla N<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> en proporción 99/1

Se autoclava a 121°C

Solución de vitaminas 1 mL

Solución de vitaminas (Wolin *et al.*, 1963)

Biotina 2 mg

Ácido fólico 2 mg

Piridoxina 10 mg

Tiamina 5 mg

Riboflavina 5 mg

Niacina 5 mg

D,L Ca<sup>2+</sup> pantotenato 5 mg

Vitamina B<sub>12</sub> 0,1 mg

Ácido paraminobenzoico (PABA) 5 mg

Ácido lipoico 5 mg

Agua Milli-Q 1 L

Se esterilizan por filtración

Se guardan a 4°C en oscuridad

## Medio FSM modificado

Es un medio muy similar al MSR-1. Fue descrito por Heyen y Schüler (2003). Se ha modificado eliminado la fuente de hierro y el extracto de levadura. En la composición de este medio aparece una solución de elementos traza que se detalla más adelante. Se utiliza para cultivar magnetospirilos en grandes volúmenes. Es un medio microaerobio.

Hepes	2,38 g
NaNO <sub>3</sub>	0,34 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,10 g
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0,142 g
Peptona de soja	3 g
Lactato	2 mM
Elementos traza	1 mL
pH 7	

Se burbujea 1 h con una mezcla de N<sub>2</sub> al 99% con un 1% de O<sub>2</sub>

Se autoclava a 121°C

### Solución de elementos traza

Ácido nitriloacético (NTA)	1,5 g
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	3,0 g
NaCl	1,0 g
FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0,1 g
CoCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O o CoSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0,1 g

CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	0,1 g
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0,1 g
CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	0,025 g
AlK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> •12H <sub>2</sub> O	0,01 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,01 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	0,4 g
NiCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	0,01 g
Agua Milli Q	1 L

Para preparar esta solución de elementos traza se procede del modo siguiente: se añade el NTA a 500 mL de agua Milli-Q. Se ajusta el pH a 6,5 con KOH saturado bajo agitación constante. El NTA se disuelve según aumenta el pH. Una vez disuelto completamente se añaden las sales en orden dejando que cada una se disuelva antes de añadir la siguiente. Se autoclava y se guarda a 4°C.

### **III.3. Procedimientos experimentales**

#### **III.3.A. Establecimiento de condiciones anóxicas y preparación de medios de cultivo anóxicos**

##### **Cámara Coy**

Ha sido necesario trabajar en condiciones anóxicas durante el desarrollo de los experimentos, recogida de los sólidos y preparación de los análisis por varias razones: (1) la magnetita sólo se produce en condiciones reductoras; (2) el sólido sólo es estable en ausencia de oxígeno; y (3) además ciertos reactivos usados (aquellos que contienen Fe<sup>2+</sup>), sólo son estables si no hay presencia de oxígeno. Por ello hemos trabajado

siempre en el interior de una cámara de anaerobiosis Coy (Coy Lab Inc.) (Fig. 32). La cámara está a temperatura ambiente y 1 atm de presión. Tiene una atmósfera interna mezcla de  $N_2$  con  $H_2$  al 4%. Las trazas de  $O_2$  residual se eliminan con dos catalizadores de paladio que aceleran la reacción entre el oxígeno residual y el hidrógeno para formar agua. Dentro de la cámara también se introduce gel de sílice para eliminar el exceso de  $H_2O$  y mantener el grado de humedad por debajo de un 30%. La cámara viene equipada con analizadores de gases que monitorizan continuamente los niveles de  $O_{2(g)}$  y  $H_{2(g)}$  durante los experimentos. La cámara cuenta con una precámara para introducir material. Antes de abrir la precámara al interior, se hacen automáticamente 3 ciclos de vacío y posterior llenado con  $N_2$ , en dos de ellos, y  $H_2/N_2$  en el último ciclo. Estos ciclos tienen como objetivo diluir el oxígeno presente en el aire que entró en la precámara al ser abierta. De esta forma, tras el último de los ciclos, el gas de la precámara no tiene apenas oxígeno, y sí una composición similar al contenido en la cámara. Es en este momento cuando la precámara puede ser abierta al interior.



**Figura 32.-** Cámara Coy.

### **Medios de cultivo anóxicos**

En nuestros experimentos se han utilizado diferentes medios de cultivo en función del microorganismo. Los medios para la producción de magnetita por bacterias reductoras de hierro son anóxicos y los utilizados con *M. gryphiswaldense* microaerobios. Para conseguir estas condiciones particulares han de seguirse varios pasos: 1) Hervir el medio para eliminar  $O_2$  (en el caso del medio anóxico). 2) Burbujeo con gases que saturan el agua y desplazan al  $O_2$ . Estos gases son:  $N_2$  para los medios anóxicos y una mezcla de  $N_2/O_2$  al 99/1 para los microaerobios.

En el caso de los medios anóxicos el nitrógeno se somete a una purificación extra para eliminar agua, oxígeno y otros contaminantes. Se le hace circular a través de un purificador Supelco de gran capacidad.

El tiempo de burbujeo depende del volumen del medio, 1 h para volúmenes de 1 L y 20 min para volúmenes de 70 mL.

En ambos casos las conducciones del sistema de burbujeo deben de estar hechas de un material no poroso (Fig. 33).

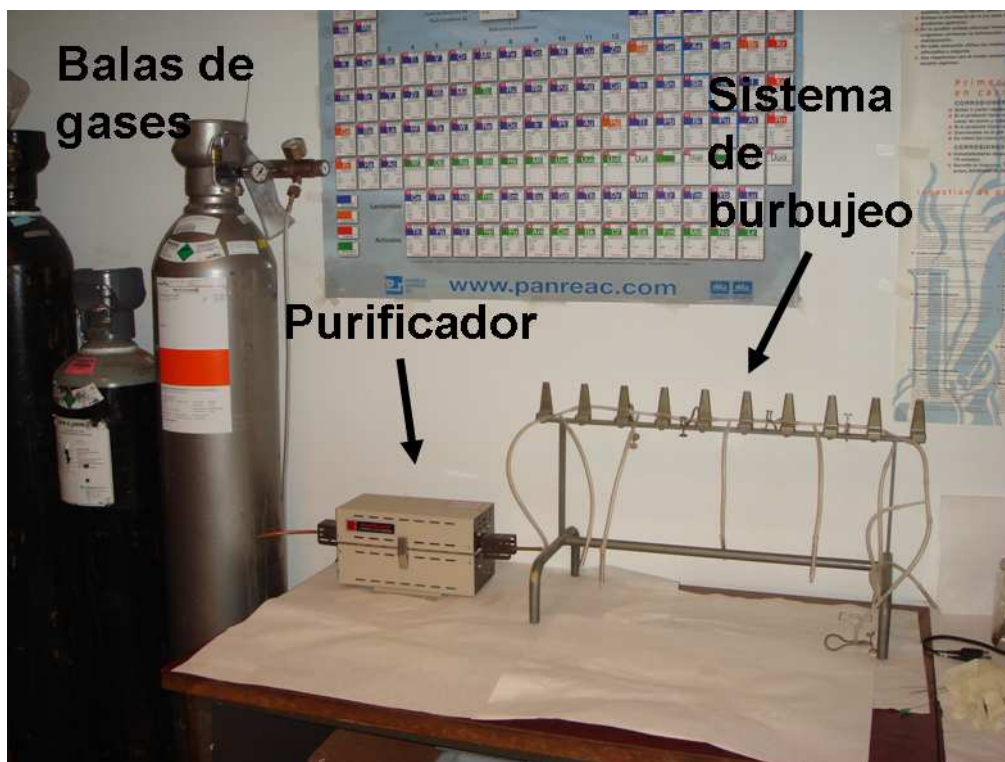


Figura 33.- Sistema de burbujeo.

### III.3.B. Precipitación de magnetita

#### Precipitación inorgánica de magnetita

Como se ha explicado en la introducción, la magnetita puede precipitar de manera inorgánica como una fase primaria o como una fase secundaria (I.3.A. y I.3.B.). Se han realizado dos experimentos de precipitación inorgánica de magnetita como fase primaria y uno como fase secundaria. Estos experimentos se encuentran resumidos en la tabla 3.1. Esta tabla debida a su tamaño se encuentra la final de la sección III.3.

### Formación primaria a partir de soluciones acuosas

La magnetita precipita como fase primaria, en una precipitación homogénea, a partir de una solución mantenida en condiciones anóxicas en el interior de la cámara Coy, a 25°C y 1 atm de presión. Se prepara una solución de  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0.75 L, 25 mM/25 mM) utilizando agua Milli-Q libre de  $\text{O}_2$ . Para eliminar el  $\text{O}_2$  la solución se hierve y burbujea con  $\text{CO}_2$  durante una hora, se introducen en la cámara Coy. Una vez dentro, se añade  $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$  hasta una concentración de 25 mM. Esta solución compuesta de  $\text{NaHCO}_3$  (25 mM),  $\text{NaCO}_3$  (25 mM) y  $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$  (25 mM), pH 7.79 y Eh -392 mV es la solución inicial y como tal será referida siempre en esta memoria. A partir de esta solución se realizó el experimento que se detalla a continuación.

Diferentes volúmenes de una solución de NaOH (1 M) y otra de  $\text{FeCl}_3$  (0,5 M) se añaden a la solución inicial con el objetivo de conducir esta dentro del campo de estabilidad de la magnetita (es decir, valores altos de pH y bajos de Eh) según el diagrama mostrado en la figura 26 y calculado expresamente para estos experimentos. Las soluciones de NaOH y  $\text{FeCl}_3$  se prepararán mezclando los reactivos con agua libre de oxígeno. Durante el proceso, se monitorizan continuamente los valores de pH y Eh. Se añaden 100 ml de NaOH y 26 ml de  $\text{FeCl}_3$ , alcanzando un valor de pH 11,68 y un Eh de -301,7 mV. Esta solución, con una concentración final de  $\text{NaHCO}_3$  (25 mM),  $\text{NaCO}_3$  (25 mM),  $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$  (25 mM),  $\text{FeCl}_3$  (15 mM) y NaOH 114 (mM) es la solución MIS. De esta solución se preparan tres réplicas en botellas Pyrex de 1 L que se cierran fuertemente y permanecen a 25°C dentro de la cámara Coy durante 1 mes.

### **Experimentos de adición de cationes**

A la misma solución inicial, se añaden soluciones de cationes diferentes al Fe,  $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$  y  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  y  $\text{Mn}(\text{ClO}_4)_2$  hasta obtener distintas mezclas de concentración de cada catión detalladas en la tabla 3.2, estas soluciones se llamarán MIS-X, siendo X

el catión añadido.

**Tabla 3.2.**

<b>Muestra</b>	<b>NaHCO<sub>3</sub> (mM)</b>	<b>NaCO<sub>3</sub> (mM)</b>	<b>Fe(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (mM)</b>	<b>Ca(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (mM)</b>	<b>Mg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (mM)</b>	<b>Mn(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (mM)</b>
MIS-Mg	25	25	25	0	25	0
MIS-Ca	25	25	25	25	0	0
MIS-Mn	25	25	25	0	0	25
MIS-Mx1	25	25	25	12.5	12.5	0
MIS-Mx2	25	25	25	20	10	0

Al igual que en los experimentos anteriores se adicionaron diferentes concentraciones de NaOH (10 M) y FeCl<sub>3</sub> (2,5 M) para alcanzar el campo de estabilidad de la magnetita, hasta alcanzar los valores detallados en la tabla 3.3:

**Tabla 3.3.**

<b>Muestra</b>	<b>pH</b>	<b>Eh (mV)</b>
MIS-Mg	11.82	-181.3
MIS-Ca	12.28	-304.4
MIS-Mn	12.28	-202.6
MIS-Mx1	12.2	-293.9
MIS-Mx2	12.71	-254

#### Precipitación primaria a partir de medio estéril BpH7

En este experimento la precipitación de magnetita se consigue de manera inorgánica, utilizando como solución inicial el medio BpH7. Para ello se le adiciona a este medio FeCl<sub>2</sub> como fuente de Fe<sup>2+</sup>, para suplir el que se libera al medio gracias al metabolismo bacteriano, ausente en este caso. El campo de estabilidad de la magnetita se alcanza añadiéndole al medio NaOH (10 M) y FeCl<sub>3</sub> (2,5 M). Se prepararon distintos



experimentos en las siguientes condiciones (tabla 3.4):

**Tabla 3.4.**

<b>Nombre</b>	<b>Medio</b>	<b>pH final</b>	<b>Eh final (mV)</b>
BpH 7 (pH=7)	BpH 7	7	-20
NBpH 7 (pH=7)	NbpH 7	7	-20
NBpH 8 (pH=8)	NbpH 8	8	-21
BpH 7 (pH=10.18)	BpH 7	10.18	-294

#### Formación secundaria por descomposición termal de ankeritas

En estos experimentos la magnetita se forma como fase secundaria por la transformación de un mineral precursor, en este caso ankeritas. Las ankeritas, carbonatos de hierro, calcio y magnesio, se sintetizaron en el laboratorio a 25°C y 70°C, en experimentos de libre intercambio de iones a partir de soluciones de NaHCO<sub>3</sub>, Fe(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, Mg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> y Ca(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. Estas ankeritas fueron preparadas y caracterizadas por Romanek *et al.* (2009). De todas las ankeritas preparadas por estos autores se seleccionaron FD15, FD16, FD20 y FD21. Cada muestra de ankerita se separa en dos alícuotas y se descompone a magnetita usando dos procedimientos diferentes, cada uno aplicado a una alícuota:

(1) calentando la muestra a 700°C en condiciones reductoras, es decir, en atmósfera de CO<sub>2</sub> (1 atm) mediante calorimetría diferencial de barrido (Differential Scanning Calorimetry, DSC) utilizando una rampa de 20°C/min. Las muestras resultantes son las llamadas “magnetitas-DSC”.

(2) calentando cristales seleccionados de ankerita con el haz de electrones de un microscopio electrónico de transmisión de alta resolución (HRTEM, Philips CM200, 200 kV). En estos experimentos, se realizaron análisis SAED (difracción de electrones

de áreas seleccionadas) de determinados cristales de ankerita con el objetivo de orientar los cristales en diferentes direcciones. El cristal de ankerita seleccionado, una vez orientado mediante el SAED, se mantiene bajo el haz de electrones entre 5 y 20 min para descomponer los cristales en magnetitas. Este procedimiento se realizó en cada cristal de ankerita seleccionado. Esta colección de muestras se ha nombrado como “magnetitas in-situ”. La composición química de cada cristal individual de ankerita, así como de las magnetitas resultantes se analizó con HRTEM y análisis de energía dispersiva (EDAX).

### **Precipitación de magnetitas por *Shewanella oneidensis***

#### Experimentos de formación de magnetita estequiométrica

Estos experimentos tienen dos objetivos diferentes, por un lado observar cómo *S. oneidensis* induce la formación de magnetita, estudiando la evolución de la química del medio de cultivo, y, por otro lado, observar la importancia de los mecanismos activos y pasivos de precipitación. Para ello se realizaron dos experimentos diferentes.

#### **Estudio del proceso de precipitación de magnetita**

En este experimento se estudia la evolución química del sistema durante la precipitación de magnetita. Para ello, se reparten en condiciones anóxicas 750 mL de medio BpH7 en 24 botellas Pyrex de 1 L (2 réplicas de 12 botellas cada una). Estas botellas se cierran con tapones de rosca modificados, que poseen un septo de goma que permite la inoculación y una adición posterior de sustancias químicas. Se autoclavan las botellas a 121°C durante 20 minutos.

Once de cada 12 botellas Pyrex conteniendo 750 mL de medio se inoculan con 3,75 mL de la suspensión de *S. oneidensis*, quedando una botella sin inocular como control. Se añade 0,2g/L de ferrihidrita como aceptor de electrones. Las botellas se

introducen en la cámara Coy a 25°C y 1 atm de presión.

De las once botellas inoculadas, se abre una botella a cada uno de los intervalos de tiempo determinados (0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56 horas, 5, 10 y 30 días) durante el experimento. De cada botella se mide el pH, Eh, la densidad óptica a 625 nm ( $OD_{625}$ ), la presión de  $O_2$ , la concentración de hierro ferroso ( $Fe^{2+}$ ) y la concentración de hierro total ( $Fe_T$ ).

### **Estudio de los papeles activo y pasivo del microorganismo en la precipitación**

Para observar la influencia de estos mecanismos se realizaron distintos experimentos, en los que varió el tipo de inóculo:

- 1) Experimentos L: Se utilizó directamente una suspensión celular de *S. oneidensis* como inóculo. Es el experimento control.
- 2) Experimentos UV: Se usó como inóculo una suspensión celular de *S. oneidensis* sometida a UV hasta su muerte.

Este experimento se realizó para observar el papel de la membrana externa celular en la precipitación de magnetita, excluyendo el papel del metabolismo bacteriano. Para garantizar una radiación uniforme, las suspensiones celulares fueron diluidas 5 veces en una solución de KCl 2 mM y expuestas a la radiación UV durante 2 horas. La exposición se realizó en placas Petri siendo la profundidad de la solución de 2 mm. Después de la exposición, se concentraron las células hasta su densidad original. Esta suspensión se utiliza como inóculo, pero primero se sembraron 100  $\mu$ L en placas de TSA y se incubaron a 28°C durante 3 días para confirmar la ausencia de células vivas. Se prepararon 5 réplicas por inóculo. El inóculo muerto por UV también se observó por microscopía electrónica de barrido de campo de emisión (FESEM, Gemini-1350, LEO, Carl Zeiss) para asegurarnos de que las células muertas estaban intactas.

3) Experimentos FP: Se usa como inóculo una suspensión de células de *S. oneidensis* muertas por prensa French. Se concentró la suspensión celular y se hizo estallar las células utilizando la prensa French (Thermo, 9000 p.s.i., 3 veces). Este experimento se lleva a cabo para comprobar el papel de los restos celulares en la precipitación de magnetita, excluyendo el papel del metabolismo celular. Después de romper las células, se diluyó la suspensión hasta su densidad original y se utilizó como inóculo. De nuevo, 100  $\mu$ L del inóculo se sembraron en placas de TSA para comprobar que no quedaban células vivas. Se prepararon 5 réplicas por inóculo.

Estos experimentos se realizan en volúmenes más pequeños y con diferentes medios, para estudiar asimismo el efecto de la presencia o no de buffer y del pH en la formación de magnetita. Los medios utilizados son BpH7, NBpH7 y NBpH8. En este caso, se reparten 70 mL de medio en botellas de 100 mL. Estas botellas se cierran en anaerobiosis y se autoclavan como se ha descrito anteriormente.

A cada botella de medio BpH7, NBpH7 y NBpH8 se le añaden 700  $\mu$ L de una solución de  $\text{FeCl}_2$  142 mM como fuente de  $\text{Fe}^{2+}$ . Se añade este catión para suplir el que se liberaría al medio debido al metabolismo bacteriano, que está ausente en estos experimentos. Para realizar los experimentos, las quince botellas que constituyen el experimento UV (tabla 3.5) se inoculan con 0,7 mL de la suspensión de *S. oneidensis* muerta por UV, las quince botellas del experimento FP se inoculan con 0,7 mL de la suspensión muerta con la prensa French. Los controles no inoculados se preparan con las siguientes variantes: a) seis botellas (dos para cada medio: BpH7, NBpH7 and NBpH8) sin la adición de  $\text{FeCl}_2$ , b) doce botellas (cuatro para cada medio: BpH7, NBpH7 and NBpH8) adicionando 0,7 mL de la solución de  $\text{FeCl}_2$ . Todas las botellas se incuban durante un mes a 25°C. El número de botellas preparado para cada condición experimental queda resumido la tabla 3.5:

**Tabla 3.5.**

Medio de cultivo	Experimentos UV	Experimentos FP	Controles	
			Estériles, sin FeCl <sub>2</sub>	Estériles, con FeCl <sub>2</sub>
BpH 7	5	5	2	4
NBpH 7	5	5	2	4
NBpH 8	5	5	2	4

En este caso se utilizó también *S. oneidensis* y medio BpH7 para observar el proceso de precipitación de magnetita en presencia de cationes distintos al Fe.

El protocolo experimental es idéntico al detallado en el apartado 3.2.2.1.A. pero añadiendo al medio de cultivo soluciones 25 mM de MgSO<sub>4</sub>, CaSO<sub>4</sub> y MnSO<sub>4</sub> hasta una concentración final de 0,25 mM de cada catión. Para la preparación de las soluciones, cada compuesto químico se disuelve en 50 mL de agua Milli-Q. Las soluciones se colocan en botellas de 100 mL con tapones de butilo, se burbujan con N<sub>2</sub> durante 20 minutos y luego se cierran. El espacio vacío se llena con N<sub>2</sub> burbujando la botella durante 5 minutos. Se autoclavan a 121°C durante 20 minutos.

### **Formación de magnetita por *Manetospirillum gryphiswaldense***

Para los experimentos de producción de magnetita BCM por *M. gryphiswaldense* se utilizó el medio de cultivo estándar FSM (Flask Standard Medium), suprimiendo el hierro y el extracto de levadura. Los inóculos se tomaron de un cultivo en medio MSR-1 modificado. Se uso inóculo con una densidad óptica de 0,6 a 575 nm.

Dos botellas de 2 L conteniendo 1,2 L de FSM modificado fueron inoculadas cada una con 10 ml de cultivo en medio MSR-1 modificado, y se les añadió citrato férrico. Estas botellas servirán como experimentos control.

Para observar el efecto de la adición de cationes sobre los cultivos de *M. gryphiswaldense*, y los magnetosomas producidos por esta bacteria, se prepararon

diferentes soluciones de metales a una concentración de 10 mM:  $\text{RuCl}_3$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{VOSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Estas soluciones se prepararon en anaerobiosis y fueron autoclavadas salvo la solución de  $\text{RuCl}_3$  que fue esterilizada por filtración.

Cada botella de 2 L conteniendo 1,2 L de FSM modificado fue inoculada con 10 ml de cultivo en medio MSR-1 modificado, y se le añadió citrato férrico y la solución del metal hasta una concentración de 50  $\mu\text{M}$ .

Después de una semana de crecimiento, se recogieron las células por centrifugación a 9000 r.p.m. durante 20 minutos. Las células fueron lavadas 3 veces mediante centrifugación a 9000 r.p.m. y resuspensión en tampón fosfato salino (PBS 1X). Posteriormente, fueron fijadas con glutaraldehído durante 8 horas y lavadas otras 3 veces mediante centrifugación y resuspensión en PBS.

Los magnetosomas se extrajeron rompiendo las células con una prensa French. Los restos celulares fueron centrifugados y resuspendidos en 2 mL de agua Milli-Q a la cual se añadió 1 mL de SDS al 1% para eliminar la materia orgánica. Después de 1 h con la solución de SDS se lavaron los cristales obtenidos mediante centrifugación a 9000 r.p.m. y resuspensión en agua Milli Q. Los cristales obtenidos se resuspendieron en 2 mL agua Milli-Q y congelaron para su posterior manipulación.

Tabla 3.1. Resumen de experimentos					
Modo de mineralización	Tipo experimento	Subtipo	Medio utilizado	Cationes	pH
Inorgánica	Formación primaria a partir de soluciones acuosas		MIS	Fe <sup>2+</sup> y Fe <sup>3+</sup>	11,68
		Presencia de cationes ≠Fe	MIS	Fe <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> y Mn <sup>2+</sup>	11,82
					12,28
					12,28
	12,2				
	A partir de medio estéril BpH7	BpH7	Fe <sup>2+</sup> y Fe <sup>3+</sup> (ferrihidrita)	10,18	
Formación secundaria por descomposición termal de ankeritas		BpH7	Fe <sup>3+</sup> (ferrihidrita)	7	
Biomineralización inducida por <i>S. oneidensis</i>	Proceso de precipitación de magnetita		BpH 7	Control Fe <sup>3+</sup> (ferrihidrita)	7
	Experimentos sobre los papeles activo y pasivo del microorganismo en la precipitación	NBpH 7	NBpH 7	Fe <sup>2+</sup> y Fe <sup>3+</sup> (ferrihidrita)	7
				Control Fe <sup>3+</sup> (ferrihidrita)	7
		NBpH 7 NBpH 8	NBpH 7 NBpH 8	Fe <sup>2+</sup> y Fe <sup>3+</sup> (ferrihidrita)	7
				Control Fe <sup>3+</sup> (ferrihidrita)	8
		NBpH 8 BpH7	NBpH 8 BpH7	Fe <sup>2+</sup> y Fe <sup>3+</sup> (ferrihidrita)	8
				Fe <sup>3+</sup> (ferrihidrita)	7
	Experimentos de adición de cationes		FSM	Fe <sup>3+</sup>	7
Biomineralización controlada	Control		FSM		7

por <i>M. gryphiswaldense</i>	Experimentos de adición de cationes	Presencia de cationes ≠Fe	FSM	Fe <sup>3+</sup> , Ru <sup>3+</sup> , Mn <sup>2+</sup> y V <sup>2+</sup>	7
-------------------------------	-------------------------------------	---------------------------	-----	--------------------------------------------------------------------------	---

### III.4. Análisis

#### III.4.A. Análisis de las soluciones

El pH y el Eh de las soluciones se midieron utilizando un pH-metro Thermo Orion 250+, calibrado utilizando soluciones buffer con estándar NIST para la corrección de la pendiente (pH 4 y 7) y la compensación de temperatura. La calibración para las medidas de Eh se realizó añadiendo quinhidrona a las soluciones buffer estándar 4 y 7, siguiendo las instrucciones del fabricante. Basándonos en medidas repetidas, el error para el pH y el Eh se calculó como  $\pm 0.05$  y  $\pm 13$  mV, respectivamente. El O<sub>2</sub> disuelto se midió utilizando el kit K-7759 de CHEMets. La exactitud fue  $\pm 20$  ppm. El hierro total (Fe<sub>T(aq)</sub>) y ferroso (Fe<sup>2+</sup><sub>(aq)</sub>) se midieron utilizando el método FerroVer y el de la Fenantrolina 1,10 respectivamente (Hach, instrucciones del fabricante) con un colorímetro Hach DR 850. La exactitud fue  $\pm 1$   $\mu$ M para ambos análisis. La concentración de hierro férrico Fe<sup>3+</sup><sub>(aq)</sub> se calculó como la diferencia de los valores medidos de Fe<sub>T(aq)</sub> y Fe<sup>2+</sup><sub>(aq)</sub>. La densidad óptica a una longitud de onda de 625 nm (OD<sub>625</sub>) se midió utilizando un espectrofotómetro Thermo Genesys.

La concentración de cationes de los experimentos de precipitación de biomineralización inducida de magnetita fue medida con un espectrómetro de absorción atómica (PERKIN ELMER mod.5100, equipado con cámara de grafito PERKIN ELMER).



### **III.4.B. Análisis de sólidos**

#### **Composición química del sólido**

Las muestras de magnetita inorgánica producida con cationes fueron disueltas con HCl y la proporción de cationes analizada con un espectrómetro de masas ICP-OES, marca Fisons, Mod. ARL 3410, a las siguientes longitudes de onda: Ca, 393.372 nm; Fe, 259.952 nm y Mg, 279.546 nm. Las rectas de calibrado fueron establecidas con disoluciones patrón, suministrada por la casa Merck mantenidas en las mismas condiciones operatorias que la muestra.

#### **Difracción de rayos X**

La mineralogía de los sólidos se determinó usando un difractómetro de rayos X de cristal único equipado con un detector de área (Bruker D8 SMART APEX, Alemania). Se recogió un patrón de difracción bidimensional utilizando las siguientes condiciones experimentales: Mo  $K\alpha$ , 50 kV, 30 mA, 0.5 mm de diámetro del colimador y un tiempo de exposición de 30 segundos. Las muestras de polvo, aglutinadas con pegamento, se analizaron en el modo de transmisión. Se utilizó el software XRD2DScan (Rodríguez-Navarro, 2006) para convertir los patrones de difracción bidimensionales en análisis  $2\theta$  lineares. Es importante reseñar los beneficios de un difractómetro de cristal único en estos análisis: el equipo utiliza radiación Mo  $K\alpha$  en vez de Cu  $K\alpha$ , reduciendo la fluorescencia producida por los minerales ricos en hierro y mejorando sustancialmente la relación señal/ruido en los difractogramas resultantes. Además, el uso de un rayo pequeño colimado y un sensor de área con dispositivo de carga acoplado

(CCD) muy sensible, permiten tomar medidas de muestras muy pequeñas ( $< 1$  mg), factor importante en estos experimentos en los que la cantidad de la muestra es limitada.

### **Microscopía de transmisión de alta resolución (HR-TEM)**

Con el fin de observar la morfología de los cristales y la composición de los mismos, se usó microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM). El microscopio utilizado fue un Philips CM20, equipado con microanálisis de rayos X de energía dispersiva (EDAX). Estos análisis permiten el estudio de la morfología de los sólidos, el espaciamiento  $d$  [calculado gracias a la difracción de electrones de área seleccionada (SAED)] y la composición química bruta de cada cristal individual.

Para los análisis mediante HR-TEM se fijaron las muestras con glutaraldehído y se post-fijaron con tetraóxido de osmio. En los experimentos bióticos también se tiñeron las células con acetato de uranilo. Posteriormente, la muestra fue deshidratada con etanol e incluida en resina de epoxi Embed 812. Se prepararon secciones ultrafinas (50-70 nm) con un microtomo Reicher Ultracut S con una cuchilla de diamante DIATOME. Las muestras se montaron en rejillas de cobre y se las recubrió con carbono.

En el caso de los magnetosomas de bacterias magnetotácticas las imágenes fueron tomadas sin tinción negativa con un microscopio electrónico de barrido de transmisión Tecnai G2 F20 equipado con detectores HAADF y EDX y operando a un voltaje de 200KV. 20 microlitros de cultivo bacteriano concentrado fijados con glutaraldehído al 2% se suspendieron en 2 mL de agua Milli-Q. 20 microlitros de la suspensión de células preparada de esta manera se colocaron en una rejilla de cobre Quantifoil. Para determinar la media de magnetosomas por célula, más de 60 células fueron examinadas en cada muestra. Para asegurarnos de la eliminación de restos

celulares y remanentes de membrana antes de la preparación de la muestra para microscopia electrónica, las células magnéticamente separadas fueron lavadas con lejía anaeróbicamente durante 72 h, luego se lavó con una gran cantidad de agua Milli-Q burbujeada con argón antes de ser expuesta al análisis localizado de EDX en el modo microsonda. El conteo de los magnetosomas y el análisis de tamaño se realizaron en varios micrográficos (en total se midieron más de 1000 partículas) con el detector HAADF.

### **Propiedades magnéticas**

Las características magnéticas de las muestras, concretamente la susceptibilidad magnética, el ciclo de histéresis y la curva de primera magnetización fueron analizados en 2,490 mg del sólido usando un magnetómetro MANICS DSM-8 a 300 y 10000 Mg.

En el caso de las magnetitas BCM las medidas magnéticas de las suspensiones celulares de *M. griphyswaldense* y las células lisadas se tomaron usando un *Quantum Design* SQUID (Superconducting Quantum Interference Device) 5T MPMS (Magnetic Properties Measurement System). Para identificar la temperatura de transición de Verwey, las muestras fueron enfriadas en un campo magnético de cero a 5 K. Después se aplicó un campo magnético de 500 Oe y se tomaron medidas mientras se calentaba la muestra a 296 K (proceso ZFC-W) y después enfriando otra vez a 5 K (proceso FC-C). Un segundo tipo de medida magnética fue la curva del campo magnético mientras se registraba la magnetización a una temperatura fija (ciclos de magnetización).

### **Calorimetría diferencial y análisis termogravimétrico**

Para determinar la estabilidad térmica del sólido, así como para detectar pérdidas de peso y energía y analizar los gases que pudieran aparecer durante el calentamiento de la muestra, como fruto de posibles descomposiciones, se realizaron análisis de

calorimetría diferencial (DSC) y termogravimetría (TGA). Estos análisis se realizaron bajo condiciones anaerobias para evitar oxidaciones. En el caso del DSC, se utilizaron 10 mg de muestra que se calentaron en un termogravímetro DSC-50 SHIMADZU y la rampa de calentamiento fue de 10°C/min.

En el caso del TGA las muestras sólidas utilizadas para el análisis fueron lavadas con SDS al 10% 3 veces para eliminar células y otros restos orgánicos. La separación se llevó a cabo por centrifugación a 6000 r.p.m. durante 10 minutos, resuspendiendo posteriormente el pellet en agua libre de O<sub>2</sub>. Se usaron 10 mg de muestra que se calentaron en un termogravímetro SHIMADZU (modelo TGA-50H). El calentamiento se realizó en una célula de aluminio, en atmósfera de N<sub>2</sub>, a un ritmo de 20°C/min hasta una temperatura final de 950°C. También se analizaron los gases liberados durante la descomposición del sólido.

### **Espectroscopía Raman**

El análisis Raman se realizó para determinar los modos de vibración del enlace Fe-O en la magnetita, para comprobar si eran los característicos de este mineral. También se usó para ver si había corrimientos en sus modos de vibración, y así detectar cambios a nivel estructural. Para este análisis se usaron aproximadamente 1 mg de las muestras que se estudiaron con el espectrómetro Kaiser Holospec, con un láser de He-Ne de 632.8 nm y un microscopio Nikon Eclipse E600. Se recogieron los espectros en un rango de 100-3800 cm<sup>-1</sup> con una resolución espectral de 4 cm<sup>-1</sup>. En las muestras de magnetita adicionada con cationes se utilizó un espectrómetro Renishaw Raman “In Via” reflex, con un láser de Ar: 785 nm y un microscopio Lieka DM. Se recogieron los espectros en un rango 200-2000 cm<sup>-1</sup>. Como las muestras eran muy termolábiles se utilizó poca intensidad de láser (0.4 mW) y un tiempo de adquisición largo (3 min). Sin embargo, los espectros mostraron poca intensidad y una relación ruido/señal pequeña.

Los espectros se recogieron en diferentes puntos en cada muestra para comprobar la consistencia de los resultados.

### **Espectroscopía de infrarrojos**

Conjuntamente a los análisis de espectrometría Raman se realizó un análisis de espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FT-IR). El objetivo de este análisis es obtener información complementaria a la de los análisis Raman, pues nos sirven para determinar exactitud la estructura cristalina y cambios estructurales.

Se utilizó un espectrómetro Thermo-Nicolet con una resolución espectral de 4  $\text{cm}^{-1}$  y 128 barridos. Antes de realizar el análisis, los precipitados se incluyeron en pastillas De KBr (3 mg de magnetita + 95 mg de KBr). Para determinar si había materia orgánica ocluida dentro de los cristales de magnetita o, por el contrario, toda la materia orgánica estaba adsorbida en la superficie del cristal, una submuestra de magnetita BIM se trató con una solución al 5% de NaOH durante una noche. Posteriormente se lavó con agua Milli-Q y se centrifugó a 2000 r.p.m. varias veces para eliminar toda la materia orgánica adsorbida.

## **Capitulo IV: Magnetitas producidas de manera inorgánica**



# **Inorganic magnetite precipitation at 25°C: an easy inorganic coprecipitation method**

T. Perez-Gonzalez<sup>1</sup>, A. Rodriguez-Navarro<sup>2</sup>, C. Jimenez-Lopez<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Universidad de Granada, Campus de Fuentenueva s/n, 18071, Granada, SPAIN.

<sup>2</sup>Departamento de Mineralogía, Universidad de Granada, Campus de Fuentenueva s/n, 18071, Granada, SPAIN.

## **ABSTRACT**

In this study we have developed an easy, low cost method for inorganically producing magnetite nanoparticles from solutions, in free-drift experiments, under anoxic conditions, at 25°C and 1 atm pressure. The resulting solid has been extensively characterized. By using this method, 100% magnetite forms that shows the typical magnetic properties and thermal stability for magnetite produced by other methods. The magnetite crystals produced by our method can exhibit relatively high sizes (200-300 nm), or sizes within the single magnetic domain range, just depending on the incubation time. The solution from which magnetite precipitates may be representative of certain natural environments and, thus, our magnetite may be used as an inorganic reference material to compare to biologically produced magnetites.

## **1. INTRODUCTION**

Magnetite is a ferrous-diferric iron oxide (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>). It is a magnetic mineral that is usually found in magmatic, metamorphic and sedimentary rocks (Thomas-Keprta *et al.*,



2000 and references therein). It is also an important part of terrestrial and marine sediments (Mozley and Carothers, 1992; Rajan *et al.*, 1996), degraded oil deposits (Ptacek, 1992), stuarian and lake sediments (Kelts 1988; Michard *et al.*, 1988) and it is even found in extraterrestrial materials like Martian meteorite ALH84001 (Thomas-Keprta *et al.*, 2000).

Moreover, because of its strong magnetic properties, magnetite has important applications in nanotechnology, ranging from magnetic storage (Chakraborty, 1999), magnetic ink printing (Peikov *et al.*, 1999), magnetic refrigeration (McMichel *et al.*, 1992), photoelectric devices (McMichel *et al.*, 1992), ferrofluids (McMichel *et al.*, 1992), magnetic bioseparation (Sen *et al.*, 2006), and microwave absorption (Pinho *et al.*, 2001), among others, to clinical applications such as cancer therapy (Kim *et al.*, 2001), tumor detection (Kumagai *et al.*, 2009), magnetic resonance imaging for clinical diagnosis contrast agent (Wunderbaldinger *et al.*, 2002) and magnetic drug targeting (Kim *et al.*, 2001). Other applications of the magnetic nanoparticles are: in-vitro cell separation (Begg *et al.*, 2002), in-vivo drug delivery (Roulin *et al.*, 2002), immunoassay (Mura *et al.*, 2002), immunomagnetic array (Call *et al.*, 2001), enzyme immobilization (Kanno *et al.*, 2005) and biosensors and bioprocessing (Perez *et al.*, 2003; Nixon *et al.*, 1992). Because of these applications, the production of magnetite represents a rapidly growing and one of the most promising fields of applied nanotechnology and is a rapidly growing business that generates millions of dollars.

Regarding the inorganic precipitation of magnetite, this mineral can be synthesized as a primary or a secondary phase. The best developed techniques for the synthesis of inorganic magnetite as a primary mineral phase are based on the precipitation of this mineral from bulk solution, since large quantities of magnetite can be produced. There are a number of different specific methods to do this, some of which

are detailed below, that mainly differ in how  $\text{Fe}^{2+}$  is introduced in the solution. All these methods, however, are dependent on controlling the conditions consistent with the thermodynamic stability field for magnetite, which include Eh, pH and alkalinity/ $p\text{CO}_2$  (Jimenez-Lopez *et al.*, 2004) as shown in Figure 1.

Most of the procedures involving the precipitation of magnetite from bulk solution follow the so-called “co-precipitation” method, in which a variety of salts of  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$  mixtures (mainly as chlorides or nitrates) are introduced as starting solutions under anaerobic conditions. In order to maintain the conditions necessary for the thermodynamic stability field for magnetite, different compounds are used to increase and maintain alkaline conditions during magnetite precipitation including the following:  $\text{NH}_3$  at 85°C (Vayssières *et al.*, 1998; Tseng *et al.*, 2007), NaOH at 25°C in agarose gel (Prozorov *et al.*, 2007), NaOH at 25-45°C in solution (Vayssières *et al.*, 1998),  $\text{NH}_3$  and/or NaOH at 9-90°C (Nyirő-Kósa *et al.*, 2009).  $\text{NH}_4\text{OH}$  at 25°C (Arató *et al.*, 2005), and  $\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{OH}$  (Vayssières *et al.*, 1998). It is common for the magnetite crystals formed in this manner to be of several different morphologies (within the same reaction mixture) including cubic, rounded, octahedral and/or irregular. For those applications in which specific sizes and relatively narrow size distributions of the magnetite particles are desired, several modifications of the bulk “co-precipitation” technique have been developed. These modifications are mainly based on limiting the space available for crystal growth by precipitating magnetite in microemulsions, vesicles, polymer solutions, or gels (Mann and Hannington, 1988; Ward and Friberg, 1989; Liu *et al.*, 2004).

Another method for inorganic precipitation of magnetite is the “reduction-precipitation” technique, in which the precipitation of magnetite occurs by the addition of iron only as a  $\text{Fe}^{3+}$  solution (mainly  $\text{FeCl}_3$ ). The precipitation of spherical magnetite

particles with mean diameter of about 10 nm or less has been shown to occur through the reduction of ferric ions (as  $\text{FeCl}_3$ ) to ferrous ions by  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  followed by an increase in the pH of the system by the addition of ammonia, always under anaerobic conditions (Schwertmann and Murad, 1990; Qu *et al.*, 1999). The mineralogy of the product strongly depends on the initial  $[\text{Fe}^{3+}]/[\text{SO}_3^{2-}]$  ratio. Other way to reduce  $\text{Fe}^{3+}$  ions and to obtain and maintain the necessary Eh value range to comply with the stability field for magnetite is by applying a constant voltage to the solution throughout the experiment (the “electrochemical” method). Using this method, cubic nanoparticles (45-80 nm) of magnetite are obtained from an iron-based electrode immersed in an alkaline aqueous medium containing Fe-complexing molecules (Franger *et al.*, 2004).

Magnetite can also be precipitated at high temperatures, which results in the synthesis of larger, morphologically well-defined crystals. Magnetite can be produced by the oxidation of a  $\text{Fe}^{2+}$  solution ( $\text{FeSO}_4$ ) at  $90^\circ\text{C}$  by the addition of  $\text{KNO}_3$  while maintaining a high pH using a solution of  $\text{KOH}$ . The resulting magnetite is close to stoichiometric and forms cubes varying in sizes between 0.05-0.20  $\mu\text{m}$  (Schwertmann and Cornell, 2000). Magnetite is also known to precipitate at high temperature via the mixing of solutions of  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  and the subsequent heating of the reaction mixture in an autoclave at  $150^\circ\text{C}$  for 8 hours (Zhu *et al.*, 2007). Using this method, well-crystallized, cubic magnetite particles of about 1  $\mu\text{m}$  in diameter is obtained.

Magnetite can be formed as a secondary phase, a term which implies that the magnetite forms through the transformation of certain iron-bearing mineral phases at high or at low temperatures. At low temperature ( $\sim 25^\circ\text{C}$ ), magnetite forms by the transformation of ferrihydrite and/or green rust, both of which are thermodynamically unstable under anoxic conditions, once the pH, Eh,  $p\text{CO}_2$ ,  $[\text{Fe}^{2+}]$  of the system meet the

requirements necessary to reach the stability field for magnetite (Zachara *et al.*, 2002). Magnetite has also been shown to form through reactions between soluble  $\text{Fe}(\text{OH})_2$  and  $\text{FeOOH}$  at temperatures ranging from 25 to 100°C and pH values from 3 to 13 (Ishikawa *et al.*, 1998). Well crystallized cubic magnetite particles are obtained using this reaction, mixed with spindle- and rod-shaped, needle-like and irregular crystals of  $\text{FeOOH}$ . Also, the thermal decomposition of siderite or other Fe-rich carbonate phases at temperatures higher than 400°C in the absence of oxygen has been shown to result in the formation of magnetite. This reaction has been explored in some detail (Golden *et al.*, 2001, 2004; Thomas-Keprta *et al.*, 2009; Jimenez-Lopez *et al.*, 2008), in connection with controversy over the origin of nanometer-sized magnetite crystals within the Martian meteorite ALH84001 (McKay *et al.*, 1996).

Most of the abovementioned methods are mainly designed to cover specific technological application, and, therefore, the precipitation of magnetite occurs in an environment that does not usually represent natural conditions. In this scenario, the problem arises when it comes to compare inorganic magnetite with biotic magnetite. This problem is important to decide whether or not magnetite is a good and reliable biomarker and thus, the presence of magnetite with certain characteristics may reveal traces of life in Earth or elsewhere. Therefore, the aim of this paper is to design a method to precipitate magnetite under conditions that are compatible with life and, simultaneously, under conditions that can be found in natural environments. To comply with these objectives, the precipitation of magnetites has been performed at 25°C, from free-drift experiments, by following a co-precipitation method in which magnetite formed from a solution containing carbonate salts, which are commonly found in natural environments. This study proposes an easy method to precipitate inorganic magnetite, which is compatible with natural environments. The resulting magnetite has

been extensively characterized and it is a good candidate to be used as a inorganic reference to compare to biotic magnetite.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. Materials**

All chemicals used  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$  and  $\text{NaOH}$  were of reagent grade from Sigma Aldrich.  $\text{O}_2$ -free deionized water (Milli-Q) was prepared by boiling deionized water for one hour, and then cooling in an ice bath while sparging with ultra pure  $\text{N}_2$  for one hour. Once cold, the oxygen-free water is immediately placed inside an anaerobic Coy chamber.

### **2.2. Experimental Procedures**

Experiments were carried out inside an anaerobic chamber (Coy Lab) at room temperature and 1 atm pressure. The atmosphere inside the chamber was  $\text{N}_2/\text{H}_2$  (4%) mixture. The trace  $\text{O}_2$  inside the chamber was removed by two palladium pellets, which catalyze the reaction of such oxygen with the hydrogen that fill the chamber to form water. Silica gel was also introduced inside the Coy chamber to remove the excess of  $\text{H}_2\text{O}$  and keep a humidity level below 30%. The chamber was also equipped with gas analyzers to continually monitor  $\text{O}_{2(\text{g})}$  and  $\text{H}_{2(\text{g})}$  levels throughout the course of the experiment.

To initiate the experiments, a  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$  solution (0.75 L, 25 mM/25 mM) was prepared using MilliQ water. It was boiled, bubbled with  $\text{CO}_2$  during an hour and placed quickly into the Coy chamber to keep it anaerobic.  $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$  was added to this solution up to a 25 mM concentration. This solution with the following composition: 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 25 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  and 25 mM  $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$  with a pH value of 7.79 and a Eh value of -392 is here referred as initial solution.

With the goal of driving the initial solution into the calculated stability field of magnetite (i.e. high pH values and low Eh values), different volumes of solutions of NaOH (1 M) and FeCl<sub>3</sub> (0.5 M) were added to the initial solution while the Eh and pH values were monitored continuously. The solutions of FeCl<sub>3</sub> and NaOH were prepared by mixing the reactives with O<sub>2</sub> free water. A volume of 100 ml of NaOH and 26 ml of FeCl<sub>3</sub> were added to the initial solution to reach a pH value of 11.68 and an Eh value of -301.7 mV. This solution, with a final concentration of 25 mM of NaHCO<sub>3</sub>, 25 mM of NaCO<sub>3</sub>, 25 mM of Fe(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 15 mM of FeCl<sub>3</sub> and 114 mM of NaOH is here referred as MIS solution. This MIS solution was poured in three 1 L Pyrex bottles until they were completely filled. The Pyrex bottles were tightly closed with Teflon caps and kept at 25°C inside the Coy chamber for a month (here referred as MIS30). With the goal of determining the effect of the incubation time on the size of magnetite, other sets of experiments were performed identically to those explained above, but they were incubated just for four days (here referred as MIS30).

### 2.3. Analysis

A volume of 20 ml of the master solutions was saved for chemical analyses (dissolved O<sub>2</sub>, Fe<sup>2+</sup><sub>(aq)</sub> and Fe<sub>T(aq)</sub>). The dissolved O<sub>2</sub> was measured on 10 ml of the master solution by using the K-7759 CHEMets kit. Accuracy was ± 10 ppm. The pH and Eh values were measured by using a portable Thermo Orion 250 A+ pHmeter calibrated using NIST-traceable standard buffer solutions for slope correction (pH 4 and 7) and temperature compensation, while the calibration for Eh measurements was performed by using quinhydrone added to the standard buffer solutions at pH 4 and 7, according to the manufacturer's instructions. Based on repeated measurements, accuracy for pH and Eh was calculated at ± 0.05 and ± 13 mV (1σ), respectively. Aqueous ferrous cation (Fe<sup>2+</sup><sub>(aq)</sub>) and total iron (Fe<sub>T(aq)</sub>) were measured by using the

1,10-Phenanthroline method for  $\text{Fe}^{2+}$  and the Ferrover method for the  $\text{Fe}_{\text{T(aq)}}$  (Hach, manufacturer's instructions) with a Hach DR 850 colorimeter. The analytical error for both analyses was  $\pm 1 \mu\text{M}$ .  $\text{Fe}^{3+}_{\text{(aq)}}$  concentration was calculated as the difference between the measured values of  $\text{Fe}_{\text{T(aq)}}$  iron and  $\text{Fe}^{2+}_{\text{(aq)}}$ .

After the complexation of the experiments (4 days and 30 days), the solutions were filtered under vacuum through a  $0.45\mu\text{m}$  Millipore membrane within the anaerobic chamber to avoid potential oxidation of the solid samples. The filtered solids were immediately freeze-dried (FLEXI-DRY- $\mu\text{P}$ ).

The mineralogy of the solids, collected in both MIS30 and MIS4 experiments, was determined by using a single-crystal x-ray diffractometer equipped with an area detector (Bruker D8 SMART APEX, Germany). A frame (or 2D diffraction pattern) was collected using the following experimental conditions: Mo  $\text{K}\alpha$ , 50 kV, 30 mA, 0.5 mm collimator diameter and 30 seconds exposure time. Sample powders, agglutinated by using glue, were analyzed in transmission mode. XRD2DScan software (Rodriguez-Navarro, 2006) was used to convert 2D diffraction patterns into regular  $2\theta$  linear scans. This software was also used for background subtraction and integration of peaks in the  $2\theta$  scans.

The morphology and size of the crystals collected in MIS30 and MIS4 experiments were studied by High Resolution Transmission Electron Microscopy (HRTEM). The microscope used was a Philips CM20, equipped with Energy Dispersive x-ray Microanalysis (EDAX). Those analyses allowed the study of the morphology of the solids, the d-spacing [determined from selected area electron diffraction (SAED)] and the gross chemical composition of individual crystals. For HR-TEM analyses, samples were fixed with glutaraldehyde and post-fixed with osmium tetroxide. Afterwards, the sample was dehydrated with ethanol, and embedded in Embed 812

resin. Ultrathin sections (50-70 nm) were prepared (Reicher Ultracut S microtome, DIATOME diamond blade). The samples were placed in copper grids and carbon coated.

The magnetic susceptibility, hysteresis loop and first magnetization curve were determined on 2.490 mg of the MIS30 solid, by using a MANICS DSM-8 magnetometer, at 300 and 10000 Mg.

Differential scanning calorimetry analyses (DSC) were performed on 9.608 mg of MIS30 samples by using a SHIMADZU model TGA-50H thermogravimeter. The samples were analyzed under anaerobic conditions to avoid potential oxidations. The heating rate was  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . Thermogravimetric analysis (TGA) was also run on  $\approx 10$  mg of solid, by heating the sample in an alumina cell under  $\text{N}_2$  atmosphere, at a rate of  $20^{\circ}\text{C min}^{-1}$  up to a final temperature of  $950^{\circ}\text{C}$ . The gases evolved during the decomposition of the solid were, as well, analyzed.

Raman analyses (Kaiser HoloSpec, with a He-Ne 632.8 nm laser interfaced with a Nikon Eclipse E600 microscope) were run on  $\approx 1$  mg of MIS30 sample. Spectra were collected over a  $100\text{-}3800\text{ cm}^{-1}$  range at a spectral resolution of  $4\text{ cm}^{-1}$ . Since the samples were highly thermolabile, very low laser power (0.4 mW) and a long acquisition time was used (3 min). Nevertheless, spectra showed a very low intensity and a small noise to signal ratio. Spectra were taken at several different points from each sample to check their consistency.

### **3. RESULTS AND DISCUSSION**

The solution, initially orange and non-magnetic, starts turning darker in a few minutes after titration and, two hours later, a black, strong magnetic precipitate is observed in the solution. Since  $\text{Fe}^{3+}$  oxide minerals are highly insoluble (Schwertmann



and Cornell, 2000; Schwertmann, 1991) they will easily precipitate during the first stages of the process. Actually, this result is in accordance with that predicted by the Eh-pH diagram calculated for our experiments. As it can be seen in Figure 1, the MIS solution was slightly over the stability field for magnetite, situating in the stability field for Fe<sup>3+</sup> oxides. Based on the Nerst equation, the Eh is describes as following:

$$Eh = E_0 + \frac{RT}{nF} \log \frac{Fe^{3+}}{Fe^{2+}} \quad (1)$$

where  $E_0$  is the standart potential,  $R$  is the constant for the ideal gases,  $T$  is the temperature,  $n$  the numbers of electron accepted and  $F$  the Faraday constant. For the reaction of the oxidation of Fe<sup>3+</sup>, at 25°C, and assuming  $\gamma_{Fe^{3+}}$  (activity coefficient for Fe<sup>3+</sup>) and  $\gamma_{Fe^{2+}}$  (activity coefficient for Fe<sup>2+</sup>) equal to one, the Nerst equation could be written as following (Garrels and Christ, 1990):

$$Eh = 0.77 + \frac{0.05916}{n} \log \left[ \frac{Fe^{3+}}{Fe^{2+}} \right] \quad (2)$$

From this equation, once the Fe<sup>3+</sup> oxides form in our MIS solution, the concentration of Fe<sup>3+</sup> decreases, an so, the Eh value. Since the pH is held constant, the MIS solution will eventually enter the stability field for magnetite, making thermodynamically stable the precipitation of such a mineral phase compared to that of the precipitation of Fe<sup>3+</sup> oxides. Those previously formed Fe<sup>3+</sup> mineral dissolve over the time course of the experiment, being the final solid composed of 100% magnetite (octahedral isometric system), according to XRD analyses. The dissolution of previously formed mineral phases to give raise to more stable ones, described by the Ostwald Step Rule, is a well-known phenomenon described to occur during the formation of minerals (i.e., Morse and Casey, 1988; Ogino *et al.*, 1987, Jimenez-Lopez *et al.*, 2001, 2004).

Regarding the morphology of the crystals, and according to HRTEM analyses, MIS4 samples are isomorphic (Figure 2a and b), while MIS30 are rectangles, rhombus,

hexagons, bars and spherulites (Fig. 2c). Since these images are bi-dimensional cuts of three-dimensional crystals, the 3D morphology of the crystals cannot be determined exactly. Nevertheless, the 2D images corresponding to MIS30 sample can result from euhedric, prismatic, prismatic elongated in one direction, cubic and rhombic 3D crystals. The magnetite crystals from MIS4 experiments exhibit a size range from 40 to 50 nm (within the single magnetic domain range, Butler and Banerjee, 1975), while the size of those from the MIS30 experiments is within the interval 300-400 nm (multimagnetic domain, Butler and Banerjee, 1975). EDAX analyses of several crystals showed that the chemical composition of those crystals was Fe and O (Fig. 2d). SAED analyses of the crystals showed d-spacings of 4.78 and 4.14. When these spacing were compared with those of the JCPDs cards, they fits with the magnetite spacing in [111] direction.

It is remarkable that we have observed size ranges of our inorganically produced magnetites that are much bigger than that obtained from other authors. It is also interesting that the size of our crystals could be modified just varying the time for the incubation, so, the longer the incubation time, the bigger the crystals. Regarding co-precipitation methods, Nyirő-Kósa *et al.* (2009) precipitated magnetite from solutions based on chloride salts, added with  $\text{NH}_4$  and  $\text{NaOH}$ , at temperatures ranging from 9 to  $90^\circ\text{C}$ . These authors obtained magnetite crystals within a size range from 11 to 120 nm, depending on the pH values (from 3.8 to 13.1). As in our experiments, these authors also observed varying morphologies associated to the size of the crystals. For instance, crystals with diameters between 10 and 25 nm had irregular or rounded crystal morphologies, whereas those with diameters greater than 50 nm were octahedral. Vayssières *et al.* (1998), also working with nitrate salts and  $\text{FeCl}_2$  added with ( $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  or  $\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{NO}_3$ ) obtained magnetite crystals, at a temperature range from 25 to

45°C, with crystal sizes within the range from 1.5 to 12.5 nm, just depending on the pH values and ionic strength of the solution from which magnetite precipitated. The magnetites produced by a reduction-precipitation method are also usually small, with an average diameter of about 10 nm or even less (Schwertmann and Murad, 1990; Qu *et al.*, 1999) and magnetites produced by electrochemical synthesis usually exhibit size ranges of 45-80 nm (Franger *et al.*, 2004). Interestingly, the size range of our magnetites is closer to that of the magnetites produced at high temperatures. For instance, the magnetites produced by Schwertmann and Cornell (2000) by the oxidation of a Fe<sup>2+</sup> solution (FeSO<sub>4</sub>) at 90°C had a size range of 0.05-0.20 µm. Also, Zhu *et al.*, (2007) obtained magnetite crystals of about 1 µm in diameter by mixing solutions of FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O and N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O and heating them at 150°C for 8 hours. The fact that we are able to change the size based on the incubation time is probably due to the dissolution of the smaller crystal to favor the growth of the bigger ones, according to an Ostwalds Rippening process (Morse and Casey, 1988). By means of this process, the system reduces its free energy. Therefore, we are proposing an easy and low cost method to inorganically produce magnetite at 25°C, in which the magnetite crystals can exhibit relatively high sizes (200-300 nm), or sizes within the single magnetic domain range, just depending on the incubation time.

Moreover, the solution from which magnetite precipitate can be found in high pH areas of natural environments where magnetite forms. For instance, it has been demonstrated by Zachara *et al.* (2002), and Perez-Gonzalez *et al.* (2010) that the precipitation of magnetite induced by *Shewanella oneidensis* requires high pH values for the precipitation to occur. Those high pH values are reached at the cell wall and decrease from this wall to the bulk culture medium, triggering the precipitation of magnetite precisely at the cell wall (Zachara *et al.*, 2002). Therefore, and although the

pH values of the environment where bacteria grow is about 7 to 8, high pH values are locally created by bacterial metabolic activity in the surroundings of the cell wall, and this local environment may be represented by the solution from which our inorganic magnetite forms.

Much attention was paid to determine whether or not the final solid was maghemite or magnetite. Most of the methods proposed to far in the relevant literature that claims to produce magnetite actually do not test whether the final product is indeed magnetite or maghemite. The differentiation between these two minerals phases is somehow difficult just from XRD analyses, since only the reflections (221) and (320) [present in maghemite, but not in magnetite (Bernal *et al.*, 1957)] can distinguish both minerals. These reflections were not observed in the XRD pattern from our sample. Nevertheless, the distinction of these two minerals can be satisfactorily done by means of Raman analyses (Hanesch, 2009). The spectrum shows a sharp peak at  $670\text{ cm}^{-1}$  (Fig. 5), which is indicative for magnetite and also, for the good crystallinity of our sample (a poorly ordered substance would show a broader peak). The characteristic peaks for maghemite ( $350, 512, 664, 726$  and  $1330\text{cm}^{-1}$ ) were not observed.

Chemical stability and the hidratation levels of the sample were analyzed by DSC (Fig. 3a). Sample shows an initial exothermic reaction about  $70^{\circ}\text{C}$  due to  $\text{H}_2\text{O}$  lost. Later, two other peaks at  $181.13^{\circ}\text{C}$  and  $361.67^{\circ}\text{C}$  are observed, also corresponding to exothermic reactions. The energy lost at each of these transformations is  $41.28\text{ J/g}$  and  $5.48\text{ J/g}$ , respectively. That energy loss fits the ones expected for magnetite during the oxidation of  $\text{Fe}^{2+}$  (Mackenzie, 1970). TGA analyses of the magnetite (Fig. 3b) showed a first mass lost within the  $100\text{-}300^{\circ}\text{C}$  range (sample loses about 5% of its initial mass). Later, within  $300\text{-}400^{\circ}\text{C}$  range, the sample underwent an additional 1% mass reduction.

Analysis of evolved gasses associated to both events indicated the only presence of H<sub>2</sub>O.

Magnetic measurements of MIS30 magnetites show typical values for magnetite in both the first imanation curve and different field imanation curves (Fig. 4a and 4b). The lower magnetization saturation value determined for our sample (364,3KA/m; Figure 4a) is lower than the expected standard value for magnetite (570 KA/m). Such a difference is usual when the sample is hydrated (Lima et. al 2006). The hydration of our sample is confirmed by TGA results, explaining the lower magnetization saturation value. However, the hysteresis loop (Fig. 4c) perfectly fits that of a soft magnetic material easy to magnetize and demagnetize, being that curve typical from magnetite (Schwertmann and Cornell, 2000).

#### **4. CONCLUSIONS**

We have developed an easy method to inorganically produced magnetite under anaerobic conditions at 25°C in free-drift experiment. The synthesis of the magnetic nanoparticles by following our procedure is low cost, since high temperatures and/or additional processing of the sample is not required. Within a time frame of days, 100% magnetite is produced with a varying size from the single magnetic domain range to the superparamagnetic range, just by controlling the time of incubation.

Moreover, the method proposed in this study is compatible with certain natural systems and may be a good candidate as an inorganic control to compare to biogenically produced magnetites.

## **Acknowledgements**

Financial funding was provided by grant CGL2007-63859 from the Spanish Ministry of Culture (MEC). Thanks to Prof. Dr. Gonzalez-Muñoz for ideas and support, Prof. Dr. Romanek for providing the Coy chamber and to the CIC personal from the University of Granada for technical assistance.

## References

- Arató, B., Z. Szányi, C. Flies, D. Schüler, R. B. Frankel, P. R. Buseck, and M. Pósfai (2005), Crystal-size and shape distributions of magnetite from uncultured magnetotactic bacteria as a potential biomarker, *Am. Mineral.*, **90**, 1233-1241, doi:10.2138/am.2005.1778.
- Bahrig B. (1985) Paleo-environment information from deep water siderite (Lake of Laach, West Germany). In lacustrine Petroleum Source Rocks (eds. A.J. Fleet, K. Kelts and M.R. Talbot) *Geol. Soc. Spec. Publ.* **40**, 153-158.
- Begg A. C., Sprong D., Balm, A. and Martin, J. M. C. (2002) Premature chromosome condensation and cell separation studies in biopsies from head and neck tumors for radiosensitivity prediction. *Radiother. Oncol.* **62**, 335-343.
- Bernal, J.D., Dasgupta, D.R., and Mackay A.L. (1957) Oriented transformations in iron oxides and hydroxides. *Nature*, **28**, 654-647.
- Bhuvanesh N.S.P. and Reibenspies J.H. (2003) A novel approach to micro-sample X-ray powder diffraction using nylon loops. *Journal of Applied Crystallography*, **36** (6), 1480-1481.
- Bricker O.P. (1975) Environmental factors in the inorganic chemistry of natural systems: the estuarine sediment environment. In *Environmental Inorganic Chemistry* (ed. K.J. Irgolic); Chap. 5, 135-153.
- Butler, R. F., and Banerjee, S. K. (1975). Theoretical single-domain grain size range in magnetite and titanomagnetite. *J. Geophys. Res.* **80**, 4049–4058.
- Call D. R., Brockman, F. J. and Chandler D. P. (2001) Detecting and genotyping *Escherichia coli* O157:H7 Using multiplexed PCR and nucleic acid microarrays. *Int. J. Food Microbiol.* **67**, 71-80.
- Chakraborty, A. J. (1999) Kinetics of the reduction of hematite to magnetite near its Curie transition. *Magn. Magn. Mater.* **204**, 57-60.
- Emerson S. (1976) Early diagenesis in anaerobic lake sediments: Chemical equilibria in interstitial waters. *Geochim. Cosmochim. Acta.* **40**, 925-934.
- Franger, S. Berthet, P. and Berthon, J. (2004) Electrochemical synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles in alkaline aqueous solutions containing complexing agents. *J. Solid State Electrochem.* **8**, 218–223.

- Garside J. (1982) Nucleation. En *Biological Mineralization and Demineralization* (ed. G.H. Nancollas); Life Science Research Report 23. Springer-Verlag, 23-35.
- Golden, D. C., D. W. Ming, C. S. Schwandt, H. V. Lauer, R. A. Socki, R. V. Morris, G. E. Lofgren, and G. A. McKay (2001), A simple inorganic process for formation of carbonates, magnetite and sulfides in Martian meteorite ALH84001, *Am. Mineral.*, **86**, 370-375.
- Hanesch, M. (2009) Raman spectroscopy of iron oxides and (oxy)hydroxides at low laser power and possible applications in environmental magnetic studies. *Geophys. J. Int.* (2009) **177**, 941–948.
- Ishikawa, T., Kondo Y., Yasukawa, A. and Kandori, K. (1998), Formation of magnetite in the presence of ferric oxyhydroxides. *Corros. Sci.*, **40**, 1239-1251, doi:10.1016/S0010-938X(98)00045-6.
- Jimenez-Lopez C., Romanek C.S., Huertas F.J., Ohmoto H. and Caballero E. (2004) Oxygen isotope fractionation in synthetic magnesian calcite. *Geochim. Cosmochim. Acta.* **68(16)**, 3367-3377.
- Jimenez-Lopez, C., Romanek, C.S., Rodriguez-Navarro, A., Perez-Gonzalez, T. and Rodriguez-Navarro, C.M. (2008) Cation incorporation in magnetites formed upon thermal decomposition of ankerites, paper presented at General Assembly of the European Geosciences Union, Vienna, Austria.
- Nyirő-Kósa, I., Csákberényinagy, D. and Pósfai, M. (2009) Size and shape control of precipitated magnetite nanoparticles. *Eur. J. Mineral.* **21**, 293–302.
- Tseng, J.Y., Chang, C.Y., Chen, Y.H., Chang, C.F. and Chiang, P.C. (2007) Synthesis of micro-size magnetic polymer adsorbent and its application for the removal of Cu(II) ion. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **295**, 209–216.
- Kanno S., Oshima K., Shimomura M. and Miyauchi S. (2005) Immobilization of enzyme to magnetic particles modified with polyacrylic acid. *Polymer Preprints*, **54(1)**, 2385.
- Kelts K. (1988) Environments of deposition of lacustrine petroleum source rocks: an introduction. In *Lacustrine Petroleum Source Rocks* (eds. A.J. Fleet, K. Kelts and M.R. Talbot); Geol. Soc. Spec. Publ. **40**, 3-26.
- Kim D. K., Zhang, Y., Kehr, J., Klason, T., Bjelke, B. and Muhammed, M. (2001) Synthesis and characterization of surfactant-coated superparamagnetic monodispersed iron oxide nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **255**, 256.



- Koutzarova, T., Kolev, S., Ghelev, Ch. Paneva, D. and Nedkov, I. (2006) "Microstructural study and size control of iron oxide nanoparticles produced by microemulsion technique." *Physica Status Solidi C: Conferences* **3**(5): 1302-1307.
- Kumagai, M., Kano, M.R., Morishita, Y., Ota, M., Imai, Y., Nishiyama, N., Sekino, M., Ueno, S., Miyazono, K. and Kataoka, K. (2009) Enhanced magnetic resonance imaging of experimental pancreatic tumor in vivo by block copolymer-coated magnetite nanoparticles with TGF- $\beta$  inhibitor. *Journal of Controlled Release*, **140** (3), 306-311.
- Lima, E., Brandl, A.L., Arelaro, A.D. and Goya, G.F. (2006) Spin disorder and magnetic anisotropy in Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *Journal of applied physics* **99**(8) art. no. 083908.
- Liu, Z.L., Wang, X., Yao, K.L., Du, G.H., Lu, Q.H., Ding, Z.H., Tao, J., Ning, Q., Luo, X.P., Tian, D.Y. and Xi, D. (2004), Synthesis of magnetite nanoparticles in W/O microemulsion, *J. Mater. Sci.*, **39**, 2633-2636, doi:10.1023/B:JMSE.0000020046.68106.22.
- Mackenzie, R.C. (1970) Differential thermal analyses. Academic press.
- Mann, S. and Hannington, J. P. (1988), Formation of iron oxides in unilamellar vesicles, *J. Colloid Interf. Sci.*, **122**, 326-335, doi:10.1016/0021-9797(88)90368-2.
- McMichael R.D., Shull L.J., Swartzendruber L.H., Bennett R.E. and Walson J. (1992) Magnetocaloric effect in superparamagnets. *Magn. Magn. Mater.* **111**, 29–33.
- McKay, D.S., Gibson Jr. E. K., Thomas-Keptra K. L., Vali H., Romanek C. S., Clemett S. J., Chillie X. D. F., Maechling C. R. and Zare R. N. (1996), Search for past life on Mars: possible relic biogenic activity in Martian meteorite ALH84001, *Science*, **273**, 924-930, doi:10.1126/science.273.5277.924.
- Michard A., Beucaire C. and Michard G. (1988) Uranium and rare earth elements in CO<sub>2</sub>-rich waters from Vals-les Bains (France). *Geochim. Cosmochim. Acta.* **51**, 901-909.
- Morse, J.W. and Casey, W.H., (1988). Ostwald processes and mineral paragenesis in sediments. *Am. J. Sci.* **288**, 537–560.
- Mozley P. S. and Carothers W. W. (1992) Elemental and isotopic composition of siderite in the Kupanuk Formation, Alaska: Effect of microbial activity and water/sediment interaction on early pore-water chemistry. *J. Sediment. Petrol.* **64**, 681-692.

- Mura C. V., Becker M. I., Orellana A. and Wolff D. J. (2002) Immunopurification of Golgi vesicles by magnetic sorting. *Immuno. Methods*, **260**, 263-271.
- Neal, A. L., K. M. Rosso, G. G. Geesey, Y. A. Gorby, and B. J. Little (2003), Surface structure effects on direct reduction of iron oxides by *Shewanella oneidensis*, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **67**, 4489-4503, doi:10.1016/S0016-7037(03)00386-7.
- Nixon C.A., Koval R.D., Noble G.S. and Slaff (1992) Preparation and characterization of novel magnetite-coated ion-exchange particles. *Chem. Of Mater.* **4**,117–121.
- Nyirő-Kósa, I., D. C. Nagy, and M. Pósfai (2009), Size and shape control of precipitated magnetite nanoparticles, *Eur. J. Mineral.*, **21**, 293-302, doi:10.1127/0935-1221/2009/0021-1920.
- Ogino, T., Suzuki, T. and Sawada, K. (1987) The formation and transformation mechanism of calcium carbonate in water. *Geochim. Cosmochim. Acta.* **51**, 2757-2767.
- Ohmoto H. (1996) Evidence in pre-2.2 Ga paleosols for the early evolution of atmospheric oxygen and terrestrial biota. *Geology*, **24**, 1135-1138.
- Peikov, V. T., Jeon, K. S. and Lane, A. M. (1999) Characterization of magnetic inks by measurements of frequency dependence of AC susceptibility. *J. Magn. Magn. Mater.* **193**, 307-310.
- Perez, J.M., Simeone, F.J., Saeki, Y., Josephson, L. and Weissleder, R. (2003) Viral-induced self-assembly of magnetic nanoparticles allows the detection of viral particles in biological media. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 10192–10193.
- Perez-Gonzalez, T., Jimenez-Lopez, C., Neal, A. L., Rull-Perez, F., Rodriguez-Navarro, A., Fernandez-Vivas, A. and Iañez-Pareja, E. (2010), Magnetite biomineralization induced by *Shewanella oneidensis*, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **74**, 967-979. doi:10.1016/j.gca.2009.10.035.
- Pinho, M. S., Gregori, M. L., Nunes R. C. R. and Soares, B. G. (2001) Aging effect on the reflectivity measurements of polychloroprene matrices containing carbon black and carbonyl-iron powder. *Polym. Degrad. Stab.* **73(1)**, 1-5.
- Prozorov, T., Mallapragada, S. K., Narasimhan, B., Wang, L., Palo, P., Nilsen-Hamilton, M., Williams, T. J., Bazylinski, D. A., Prozorov, R., and Canfield, P. C. (2007) Protein-mediated synthesis of uniform superparamagnetic magnetite nanocrystals. *Adv. Funct. Mater.* **17**, 951–957.

- Ptacek C.J. (1992) Experimental determination of siderite solubility in high ionic-strength aqueous solutions. Ph. D. Thesis, Univ. Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada.
- Qu, S., Yang, H., Ren, D., Kan, S., Zou, G., Li, D. and Li, M. (1999) Magnetite nanoparticles prepared by precipitation from partially reduced ferric chloride aqueous solutions, *J. Colloid Interf. Sci.*, **215**, 190-192, doi:10.1006/jcis.1999.6185.
- Rajan S., Mackenzie F. T. and Glenn C. R. (1996) A thermodynamic model for water column precipitation of siderite in the Plio- Pleistocene Black Sea. *Am. J. Sci.* **296**, 506-548.
- Richter, M., Kube, M., Bazylnski, D. A., Lombardot, T., Reinhardt, R., Glockner, F. O. and Schüler, D. (2007). Comparative genome analysis of four magnetotactic bacteria reveals a complex set of group specific genes with putative functions in magnetosome biomineralization and magnetotaxis. *J. Bacteriol.* **189 (13)**, 4899-4910.
- Roulin V. G., Deverre J. R., Lemaire L., Hindré F., Julienne M. C. V., Vienet R. and Benoit J. P. (2002) Anti-cancer drug diffusion within living rat brain tissue: An experimental study using [3H](6)-5-fluorouracil-loaded PLGA microspheres. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **53**, 293-299.
- Schwertmann, U. and Cornell (2000). *Iron Oxides in the Laboratory: Preparation and Characterization* Wiley-VCH; 2 edition.
- Schwertmann U. (1991) Solubility and dissolution of iron oxides. *Plant and Soil* **130**: 1-25.
- Schwertmann, U., and E. Murad (1990), The influence of aluminum on iron oxides: XIV. Aluminum substituted magnetite synthesized at ambient temperatures, *Clay Clay Mineral.*, **38**, 196-202, doi:10.1346/CCMN.1990.0380211.
- Shengchun Q., Haibin Y., Dawei R., Shihai K., Guangtian Z., Dongmei L. and Minghui L. (1999) Magnetite Nanoparticles Prepared by Precipitation from Partially Reduced Ferric Chloride Aqueous Solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, **215**, 190–192.
- Simonson B.M. (1985) Sedimentological constraints of the origins of Precambrian iron-formations. *Geological Society of America Bulletin*, **96**, 244-252.
- Simonson B.M. and Hassler S.W. (1996) Was the deposition of large Precambrian iron formations linked to major marine transgressions? *Journal of geology*, **104**, 665-676.

- Sokolova, T., J. Hanel, R. U. Onyenwoke, A.-L. Reysenbach, A. Banta, R. Geyer, J. M. González, W. B. Whitman, and J. Wiegel (2007), Novel chemolithotrophic, thermophilic, anaerobic bacteria *Thermolithobacter carboxydivorans* sp. nov., *Extremophiles*, *11*, 145-147, doi:10.1007/s00792-006-0022-5.
- Sen T., Sebastianelli A. and Bruce I.J. (2006). Mesoporous silica-magnetite nanocomposite: Fabrication and applications in magnetic bioseparations. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 7130–7131.
- Thomas-Keprta, K. L., Bazylinski, D. A., Kirschvink, J. L., Clemett, S. J., McKay, D. S., Wentworth, S. J., Vali H., Gibson Jr., E. K. and Romanek C. S. (2000), Elongated prismatic magnetite crystals in ALH84001 carbonate globules: potential Martian magnetofossils, *Geochim. Cosmochim. Acta*, *64*, 4049-4081, doi:10.1016/S0016-7037(00)00481-6.
- Tseng, J.Y., Chang, C.W. Chen, Y.H Chang C.F. and Chiang P.C.(2007), Synthesis of micro-size magnetic polymer adsorbent and its application for the removal of Cu(II) ion, *Colloid Surface A*, *295*, 209-216, doi:10.1016/j.colsurfa.2006.09.001.
- Vayssières L., Chanéac C., Tronc E. and Jolivet J.P. (1998), Size tailoring of magnetite particles formed by aqueous precipitation: an example of thermodynamic stability of nanometric oxide particles. *Journal of Colloid and Interface Science* **205**, 205–212, doi:10.1006/jcis.1998.5614.
- Ward, A. J. I., and Friberg S. (1989), Preparing narrow size distribution particles from amphiphilic association structure, *MRS Bull.*, **14**, 41.
- Wunderbaldinger P., Josephson L. and Weissleder R. (2002) Tat peptide directs enhanced clearance and hepatic permeability of magnetic nanoparticles. *Bioconjugate Chem.* **13**, 264-268.
- Zachara, J. M., Kukkadapu R. K., Fredrickson J. K., Gorby Y. A. and Smith S. C. (2002), Biomineralization of poorly crystalline Fe(III) oxides by dissimilatory metal reducing bacteria (DMRB), *Geomicrobiol. J.*, *19*, 179-207, doi:10.1080/01490450252864271.
- Zavarzina, D. G., Kolganova T. V., Boulygina E. S., Kostrikina N. A., Tourova T. P. and Zavarzin G. A. (2006), *Geoalkalibacter ferrihydriticus* gen. nov. sp. nov., the first alkaliphilic representative of the family *Geobacteraceae*, isolated from a soda lake, *Microbiology (Mikrobiologiya)*, *75*, 673-682, doi:10.1134/S0026261706060099.

Zhang, C., Vali H., Romanek C. S., Phelps T. J. and Liu S. V. (1998), Formation of single-domain magnetite by a thermophilic bacterium, *Am. Mineral.*, **83**, 1409-1418.

Zhu, H., Yang, D. and Zhu, L. (2007) Hydrothermal growth and characterization of magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) thin films. *Surface & Coatings Technology*, **201**, 5870–5874.

**TABLE CAPTIONS**

**Table 1.** Values of the pH, Eh and  $\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$  at the beginning, after titration and the end of the experiment.

Experiment type	Initial solution			MIS (0 days)			MIS (30 days)		
	pH $\pm$ 0.05	Eh (mV) $\pm$ 13 mV	$\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$ (mM) $\pm$ 0.1	pH $\pm$ 0.05	Eh (mV) $\pm$ 13 mV	$\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$ (mM) $\pm$ 0.1	pH $\pm$ 0.05	Eh (mV) $\pm$ 13 mV	$\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$ (mM) $\pm$ 0.1
MIS	7.79	-392	4.1	11.68	-	0.123	11.82	-	0.101
					301.7			290.2	

## FIGURE CAPTIONS

**Figure 1.** Stability diagram for magnetite and siderite in close system and at different chemical conditions of iron concentration and alkalinity (Alk). Blue dot represents initial conditions after titration.

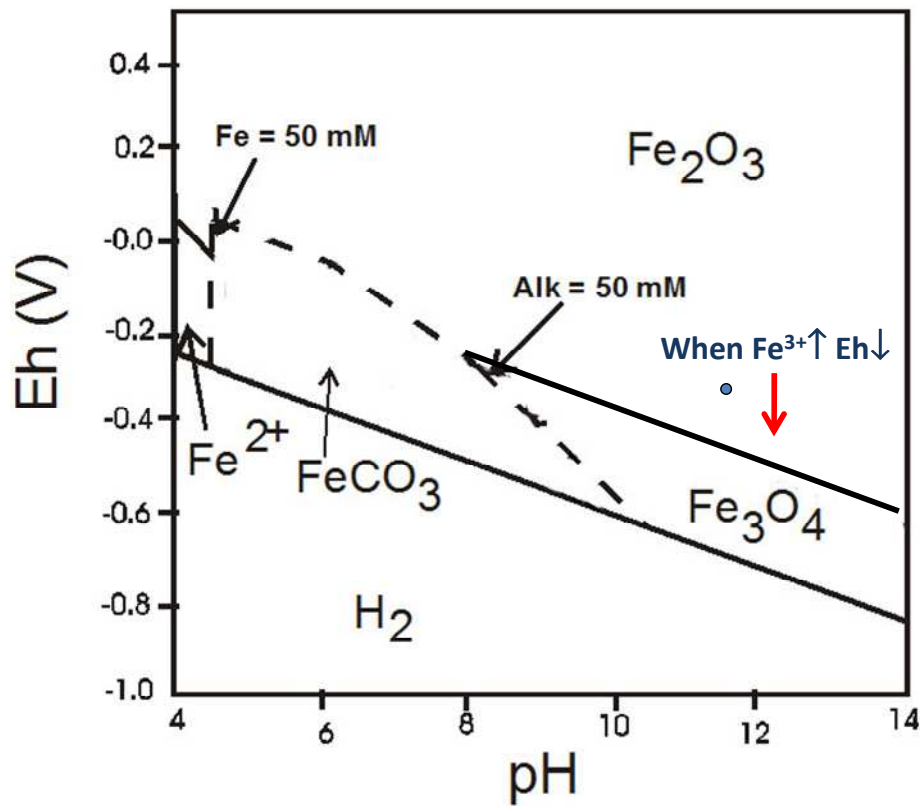
**Figure 2.** HR-TEM images and EDAX analyses of magnetite. a) General image of MIS4 crystals; b) Detail of MIS4 crystals; c) General image of MIS30 crystals; d) Detail of MIS30 crystals. SAED analysis shows typical d-spacing for magnetite. Rectangles on crystals show where EDAX and SAED analyses were performed.

**Figure 3.** a) Differential scanning calorimetry (DSC) of the MIS30 sample. b) Thermogravimetric analysis of the MIS30 sample. Mass loss is indicated in the figure.

**Figure 4.** Magnetic susceptibility curves for the MIS30 magnetite. a) First imantation curve. b) Different field imantation curves. c) Hysteresis loop. Black squares represent first field intensity which increases up to saturation point. Red dots represent reduction of the field intensity up to negative values and saturation point. Green triangles represent remagnetization because the application of a positive field.

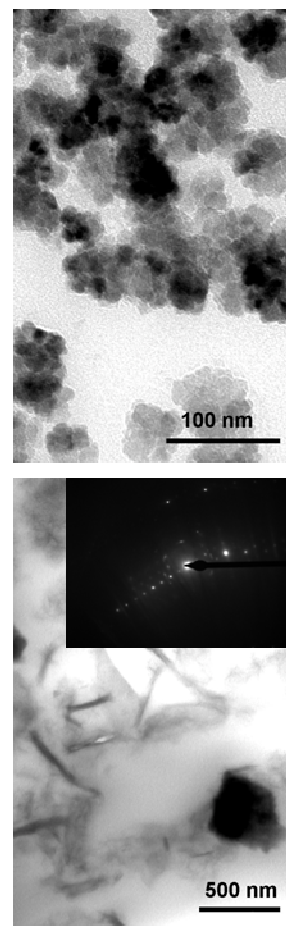
**Figure 5.** Raman spectra of MIS30 magnetites.

Figure 1.





**Figure 2.**



**Figure 3.**

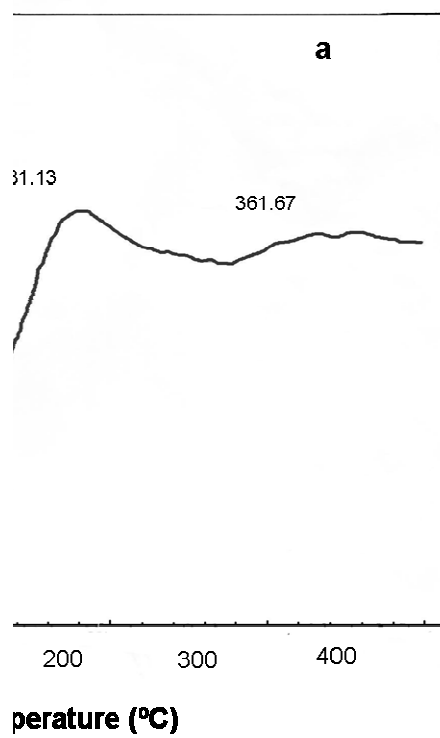


Figure 4.

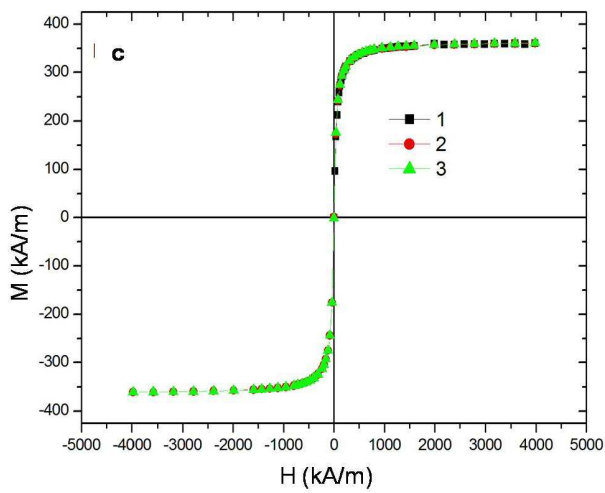
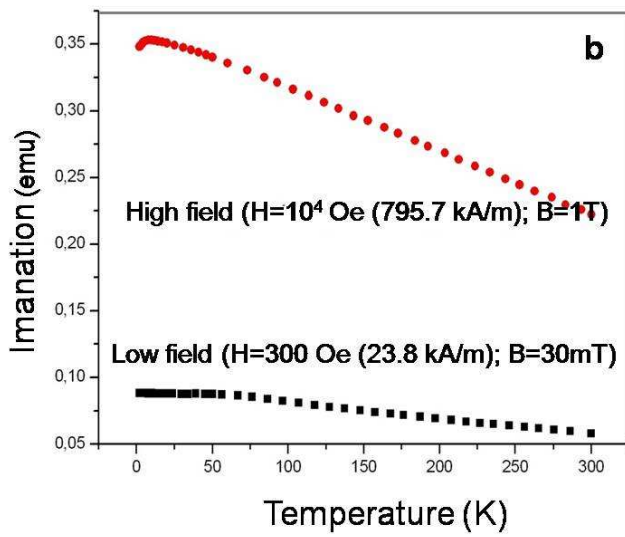
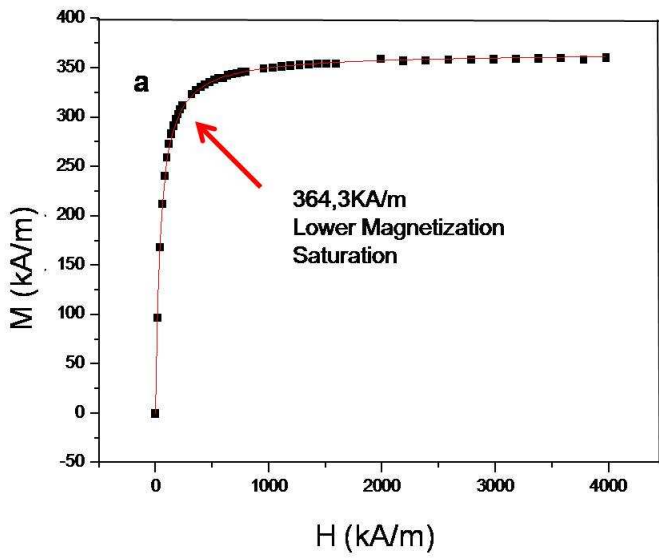
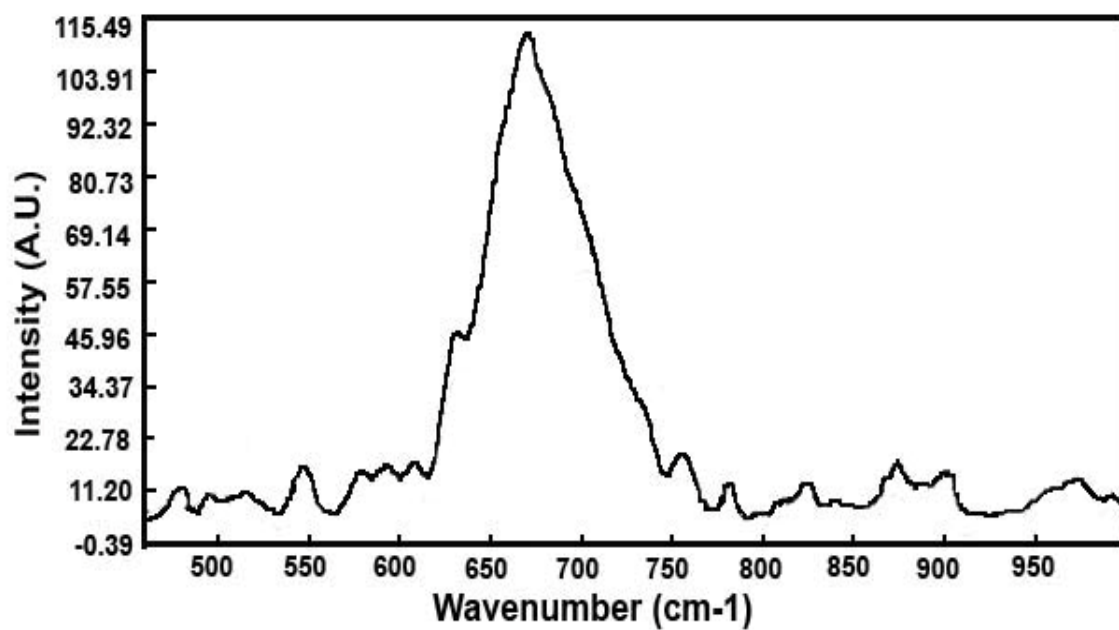


Figure 5.





# **Study of the magnetites formed by the thermal decomposition of synthetic (Ca,Mg,Fe)CO<sub>3</sub>**

C. Jimenez-Lopez<sup>1,\*</sup>, C. Rodriguez-Navarro<sup>3,\*</sup>, T. Perez Gonzalez<sup>1</sup>, A. Rodriguez-Navarro<sup>2</sup>, D. Bazylinski<sup>4</sup> and C. Romanek<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, <sup>2</sup>Departamento de Mineralogía y Petrología. Facultad de Ciencias, Universidad de Granada. Campus de Fuentenueva s/n, 18071 Granada, SPAIN

<sup>3</sup>Department of Earth and Environmental Sciences, University of Kentucky, Lexington, Kentucky, USA

<sup>4</sup>School of Life Sciences, University of Nevada at Las Vegas, Las Vegas, Nevada, USA

## **ABSTRACT**

The discovery, in the Martian meteorite ALH84001, of nanometer-sized crystals of magnetite with specific features, that, in Earth, resemble those formed by magnetotactic bacteria, has opened a great debate regarding the biogenic vs. inorganic origin of these magnetites. While some authors claim a biogenic origin, other have proposed the thermal decomposition of a precursor carbonate as an inorganic path for the formation of those magnetites. In this study, the product of the thermal decomposition of synthetic (Ca,Mg,Fe)CO<sub>3</sub> has been explored following two decomposition procedures: (1) heating at 700°C and 1atm P<sub>CO2</sub> and (2) decomposing under vacuum by a HR-TEM electron beam. Both types of decomposition resulted in the formation of oriented aggregates of magnetite nanocrystals that conserved the morphology of the precursor (pseudomorphs). There was a topotactical (3D lattice

continuity) relationship between the precursor and the product. The mineral transformation occurred as a unique decomposition event. All analyzed crystals incorporated Ca and/or Mg into the crystalline structure of the resulting magnetite, forming a solid solution. Mixtures of pure oxide (CaO, FeO and MgO) or carbonate phases were not observed in any case. Our results disagree with the hypothesis of inorganic formation of ALH84001 magnetites by the thermal decomposition of the carbonate precursor and suggest that studies involving structural relations within crystals and their relative orientations may help identify whether or not such crystals were produced by a thermal decomposition of a carbonate precursor.

## **1.INTRODUCTION**

Over the years nanometer-sized magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) crystals have been recovered from many modern and ancient environments, for instance, in terrestrial and marine sediments (Mozley and Carothers, 1992; Rajan *et al.*, 1996), degraded oil deposits (Ptacek, 1992), estuarine and lake sediments (Kelts 1988; Michard *et al.*, 1988), and even from meteorites (Thomas-Keprta *et al.*, 2000). In some cases these crystals have been used as “magnetofossils” for evidence of the past presence of specific microbes. For instance, the presence of magnetite has been used as possible evidence for respiratory processes in the early evolution of the Earth (Walker, 1987; Vargas *et al.*, 1998), as evidence for a vast terrestrial subsurface biosphere (Gold, 1992), and even for evidence of life on ancient Mars (McKay *et al.*, 1996). The rationale for this use of magnetite is based on the fact that this mineral can be produced either inorganically or biologically, through both biologically-induced mineralization (BIM) (Frankel and Bazylinski, 2003) and biologically-controlled mineralization (BCM) (Bazylinski and Frankel, 2003).

Inorganic magnetite can be produced as a primary or a secondary phase. The methods regarding the formation of magnetite as a primary phase are the best developed, since large quantities of material are produced. All these procedures involve the precipitation of magnetite from Fe-bearing solutions at temperatures within the range from 9 to 90°C, somehow forced to fall into the stability field for magnetite determined by the Eh-pH diagrams calculated from the equations of Garrels and Christ (1990). This “forcing” of the solution can be done by adding titrants to raise the pH and low the Eh value of the solution and/or by applying a constant voltage to that solution from which magnetite is forming.

In the context of magnetite precipitation as a secondary phase, magnetite forms through the transformation of certain iron-bearing mineral phases at high or at low temperatures. At low temperature (~25°C), magnetite forms by the transformation of ferrihydrite and/or green rust, both of which are thermodynamically unstable under anoxic conditions, once the pH, Eh,  $\text{PCO}_2$ ,  $[\text{Fe}^{2+}]$  of the system meet the requirements necessary to reach the stability field for magnetite (Zachara *et al.*, 2002). Also, magnetite can form through reactions between soluble  $\text{Fe}(\text{OH})_2$  and  $\text{FeOOH}$  at temperatures ranging from 25 to 100°C and pH values from 3 to 13 (Ishikawa *et al.*, 1998). The third most used method for the synthesis of magnetite as a secondary phase is the thermal decomposition of siderite or other Fe-rich carbonate phases at temperatures higher than 400°C in the absence of oxygen. This reaction has been explored in some detail (Golden *et al.*, 2001, 2004; Jimenez-Lopez *et al.*, 2008; Thomas-Keprta *et al.*, 2009), in connection with the controversy over the origin of nanometer-sized magnetite crystals within the Martian meteorite ALH84001.

ALH84001 meteorite contains carbonate disks that are believed to have precipitated 3.9 Ga ago at beginning of the Noachian epoch on Mars during which both



the oldest extant Martian surfaces were formed. Intimately associated within and throughout these carbonate disks are nanocrystal magnetites ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) with unusual chemical and physical properties, whose origins have become the source of considerable debate (Thomas-Keprta *et al.*, 2009). Such a debate originated when McKay *et al.* (1996) proposed those magnetites as an evidence for a past microbial life on Mars, because they share some special features with those precipitated in Earth by magnetotactic bacteria, more specifically by the magnetotactic vibrio MV-1 (Thomas-Keprta *et al.*, 2000).

The controversy over the origin of these magnetites exists and the debate continues. Some authors claim an inorganic origin of ALH84001 magnetites, proposing the thermal decomposition of the carbonate disks as the inorganic mechanism for the formation of those magnetites. Remarkable are the studies of Golden *et al.* (2000, 2001 and 2004) in this direction. First, these authors inorganically synthesized carbonate globules similar to those found in ALH84001 from supersaturated, Mg-rich, Ca-Mg-Fe solutions at temperatures of  $150^\circ\text{C}$ . From these observations, they provided the first experimental data to support a low temperature, inorganic formation for the carbonates in ALH84001 (Golden *et al.*, 2000). In a later study, Golden *et al.* (2001) hydrothermally synthesized chemically zoned carbonate globules and Fe sulfides at  $150^\circ\text{C}$  from multiple fluxes of Ca-Mg-Fe- $\text{NaHCO}_3$ -S solutions. These authors followed a step procedure. In each step, they mixed certain solutions and hydrothermally produced a solid phase. Once this solid phase was formed, they collected and rinse this solid and further introduced the solid in another solution to continue the precipitation process. By these means, these authors used a Ca-Mg-Fe- $\text{NaHCO}_3$  solution in the first place to produce and ankerite  $[(\text{Ca}, \text{Mg}, \text{Fe})\text{CO}_3]$ . In the following steps, they used pure Mg or  $\text{FeCO}_3$  solution along with S, to produce layers or pure carbonates and pyrite ( $\text{FeS}_2$ ). As

the last step, they heated up the zoned particles to 470°C in CO<sub>2</sub> at 13.3 kPa, getting, as the final product, a mixture of ankerite, magnetite, pyrrhotite (Fe<sub>7</sub>S<sub>8</sub>) and magnesite (MgCO<sub>3</sub>). Golden *et al.* (2001) analyzed the resulting magnetites and concluded that they were chemically pure, single-domain and defect-free crystals. In a subsequent study, Golden *et al.* (2004) determined that the morphology of these magnetites correspond to that of a [111]-elongated truncated hexaoctahedron ([111]-THO), [111]-elongated cubo-octahedron ([111]-ECO), and [111]-elongated simple octahedron ([111]-ESO). Golden *et al.* (2004) compared the morphologies of the magnetites resulting from his experiments with that of the magnetites found in ALH84001 and recovered from magnetotactic bacteria MV-1, and concluded that all [111]-elongated morphologies were present in the three types of sample, but in different proportions. While in the ALH84001 Martian meteorite and in their inorganic laboratory products, the most common [111]-elongated magnetite crystal morphology is [111]-ECO, the most common one for MV-1 is [111]-THO. Based on their results, these authors proposed an exclusively inorganic origin of [111]-elongated magnetite crystals in ALH84001.

The results of Golden *et al.* (2001 and 2004) are in stark disagreement with those found by Thomas-Keprta *et al.* (2009). These authors detailed characterized the compositional and structural relationships of the carbonate disks and associated magnetites with the orthopyroxene matrix in which they are embedded. Then, they thermally decomposed Roxbury siderite [(Fe<sub>0.84</sub>Mg<sub>0.10</sub>Mn<sub>0.04</sub>Ca<sub>0.02</sub>)CO<sub>3</sub>; Lane and Christensen (1997)], since it is considered a (compositional) terrestrial analogous to the Fe-rich component of ALH84001 carbonates disks [(Fe<sub>0.750</sub>Mg<sub>0.240</sub>Mn<sub>0.003</sub>Ca<sub>0.004</sub>)CO<sub>3</sub>; Treiman (2003)] where the controversial magnetites are embedded, and studied the chemical composition of the resulting magnetites. Thomas-Keprta *et al.* (2009) used

two types of thermal decomposition: the “slow” one and the “fast” one. In the “slow” procedure, the decomposition of the Roxbury siderite occurred under a very slow, controlled heating. The siderite sample was heated at a rate of  $1 \text{ K}\cdot\text{min}^{-1}$  to a maximum temperature of  $848 \text{ K}$  ( $575^\circ\text{C}$ ), and, after being held at this temperature for 24 hours, the sample was cooled back to room temperature at a rate of  $\sim -10^{-2} \text{ K}\cdot\text{s}^{-1}$ . On the contrary, in the “fast” procedure, the heating event was essentially instantaneous. The siderite sample was heated under vacuum with a pulsed  $10.6 \mu\text{m}$   $\text{CO}_2$  laser (PRF-150 Laser Science, Inc.) focused onto the sample using a Cassegrainian microscope objective. The heating rates were on the order of  $\sim 10^8 - 10^9 \text{ K}\cdot\text{s}^{-1}$  with a peak temperature of  $\sim 573-673 \text{ K}$  ( $300-400^\circ\text{C}$ ) being reached at the laser focus. Thomas-Keprta *et al.* (2009) observed the formation of (Ca, Mg,Mn)-ferrites in both cases. From their observation, these authors concluded that the vast majority of the nanocrystal magnetites present in the carbonate disks of the ALH84001 meteorite could not have formed by any of the currently proposed thermal decomposition scenarios. Instead, Thomas-Keprta *et al.* (2009) support an allochthonous origin for the ALH84001 magnetite, unrelated to any shock or thermal processing of the carbonates in which these magnetites are embedded. However, there is a problem in the experiments of Thomas-Keprta *et al.* (2009). These authors claim that a separation between the calcitic component of the  $(\text{Ca},\text{Mg},\text{Fe})\text{CO}_3$  solid solution occurs prior to the formation of the product. However, they observe only Mn and Mg-substituted magnetites once the ankerites are decomposed. Therefore, where is Ca? These authors do not go provide any further information, so the Ca problem remains unsolved. Moreover, since Thomas-Keprta *et al.*, (2009) used natural samples in their study (Roxbury siderite), the potential exists that chemical heterogeneity of the samples, presence of traces chemical impurities, even the presence

of some organics may lead to a super estimation (o sub estimation) of the incorporation of cations other than Fe into the resulting product.

In this paper, we study the chemical composition of the magnetites resulting from the thermal decomposition of synthetic  $(\text{Ca,Mg,Fe})\text{CO}_3$  with varying relative mol% of Ca, Mg and Fe. We paid close attention to the occurrence of calcium in the resulting solid and the structural relationship between the precursor and the product solids, which may shed light regarding the biogenic/abiotic origin of ALH84001 magnetites. The decomposition of our samples has been performed following two procedures, one of them by heating the sample up to 700°C and the other, by decomposing the sample under the electron beam of a Transmission Electron Microscope, while holding the sample under vacuum conditions.

## 2.MATERIAL AND METHODS

Ankerite samples synthesized in the laboratory at 25 and 70°C, in free drift experiments, from solutions containing  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$ ,  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  and  $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$  (Table 1) were used as precursors to obtain magnetite. These ankerite samples were prepared and characterized by Romanek *et al.* (2009), corresponding to samples FD15  $(\text{Ca}_{0.28}\text{Mg}_{0.13}\text{Fe}_{0.59})\text{CO}_3$ , FD16  $(\text{Mg}_{0.12}\text{Fe}_{0.88})\text{CO}_3$ , FD20  $(\text{Ca}_{0.22}\text{Mg}_{0.55}\text{Fe}_{0.23})\text{CO}_3$  and FD21  $(\text{Mg}_{0.71}\text{Fe}_{0.29})\text{CO}_3$ . Ankerites were separated into two aliquots and decomposed to magnetite by using two different procedures, each one applied to one of the aliquots:

(1) By heating the sample to 700°C in Differential Scanning Calorimetry (DSC, SHIMADZU model TGA-50H) at 1 atm  $\text{CO}_2$  pressure (20cc/min). The resulting set of samples is here referred as DSC-magnetites.

Because of the size of the sample, the mineralogy of DSC-samples was determined by using a single-crystal x-ray diffractometer equipped with an area detector

(Bruker D8 SMART APEX, Germany). A frame (or 2D diffraction pattern) was collected using the following experimental conditions: Mo K $\alpha$ , 50 kV, 30 mA, 0.5 mm collimator diameter and 30 seconds exposure time. Sample powders were analyzed in transmission mode. XRD2DScan software (Rodriguez-Navarro, 2006) was used to convert 2D diffraction patterns into regular 2 $\theta$  linear scans. This software was also used for background subtraction and integration of peaks in the 2 $\theta$  scans.

The chemical composition of individual crystals was analyzed by EDAX-HR-TEM. About 20 individual crystals were analyzed for each decomposed ankerite sample (FD15, FD16, FD20 and FD21). Quantification of the relative amounts of Ca and Mg detected in each sample was performed by using the peak for Si as the reference.

(2) By heating selected ankerite crystals under the electron beam in a High Resolution Transmission Electron Microscope (HR-TEM, Philips CM200, 200 kV). In these experiments, SAED (selected area electron diffraction) was performed on selected ankerite crystals in order to determine the zone axis. Those measured d-spacings were compared to JCPDs cards from ICDD (International Center for Diffraction Data) for the mineral identification and determination of atomic planes parallel to the electron beam. Then after, this ankerite crystal, hold in such an orientation, was kept under the electron beam for time periods ranging from 5 to 20 minutes, with the goal of decomposing it into magnetite crystals. Once the heating was done, SAED was performed in the resulting product, with the goal of determining the new zone axis.

Identical procedure was followed for each selected ankerite crystal from FD15, FD16, FD20 and FD21 samples (about 5 crystals from each sample). The resulting set of magnetite crystals are here referred as *in situ*- magnetites. The chemical composition of selected individual ankerite crystals as well as was the resulting *in situ*- magnetites was analyzed by EDAX-HR-TEM.

### 3. RESULTS

According to DSC data (Fig.1), when the ankerite samples FD15, FD16 reached a temperature of 490 and 480°C, respectively, they decomposed to form other solid phase. The analyses of evolved gases show that such a decomposition released CO<sub>2</sub>. The temperature at which FD20 and FD21 decomposed was of 570°C for the first sample and 560°C for FD21. Similarly, the gas evolved at this temperature was CO<sub>2</sub>. The decomposition of all these solids resulted, according to XRD analyses, in the formation of 100% magnetite in DSC-FD15 and DSC-FD21 and a mixture of magnetite and a little bit of hematite in samples DSC-FD16 and DSC-20. No other non-ferrous oxides (in particular, no CaO and/or MgO) were detected. No evidence was observed for residual carbonate indicating the decomposition reaction had proceeded to completion.

Each ankerite sample heated by using DSC decomposed into an aggregate of magnetite crystals (Figs. 2 to 5) that kept the morphology of the precursor (Figs. 2a-b, 3a-b, 4a-b and 5a-b). The size of the DSC-magnetite crystals varied within the range from 5 to 40 nm. Morphologies of the sections of DSC-magnetites ranged from hexagonal, to rectangular, rhombic and irregular (Figs. 2, 3, 4 and 5. Arrangements of chains of magnetite crystals were detected in all samples (Figs. 2e, 3c and 5c) with the exception of DSC-FD20. When it was possible to analyze a single crystal separately from others by SAED (Fig. 3c and 3f), these patterns showed a crystalline structure, with d-spacing of systematically being of 4.8 and 2.26. DSC magnetites appears oriented one with respect to another in many cases, as it is shown in the HR-TEM dark field images of chains from DSC-FD15 and DSC-FD16 samples (Fig. 6). The SAED patterns of the different areas of the chain (Figs. 6c and d) show that the crystals from those areas have the same orientation. This observation is consistent in many samples

analyzed. Other samples, especially those of DSC-FD20 do not show any orientation with the samples, possibly due to the lack of orientation between crystals that composed any ankerite particle in the original FD20 sample [it was polycrystalline (Fig. 4a)].

EDAX-HR-TEM analyses of individual DSC-FD15 and DSC-FD20 magnetite crystals show the presence of Ca and Mg (Figs. 2d, 2f, 4d and 4f), varying within the range 3 - 3.3% Mg and 3.7- 5.6% Ca in FD15 and 6.8 – 33.4% Mg and 0.3 – 13.21% Ca in FD20. Similarly, the analyses of individual magnetite crystals from samples DSC-FD16 and DSC-FD21 show the presence of Ca and Mg in individual analyzed crystal, varying within the range 0.5 – 5.9% Mg and 0% Ca in DSC-FD16 and 1.4 - 32.9% Mg and 0% Ca in DSC-FD21 (Figs. 3d, 3f, 5d and 5f).

Results for the magnetites formed by the *in situ* decomposition of ankerites under the HR-TEM electron beam are very similar to those already detailed for the DSC magnetites. After being exposed for 20 minutes to the electron beam, each ankerite crystal decomposed to a pseudomorph composed by an aggregation of ~5-10 nm magnetite crystals (Figs. 7 to 9). Identically to DSC-magnetites, EDAX-HR-TEM analyses of individual crystals of *in situ* –FD20 magnetites show the presence of Ca and Mg (Figs. 8c and 8f), varying within the range 24-33% Mg and 7.5-16.4% Ca. Similarly, *in situ*-FD16 and -FD21 showed the presence of Ca and Mg in individual analyzed crystal, varying within the range 2.7-8.2% Mg and 0.6-1.7% Ca in *in situ*-FD16 and 6.7-41.4% Mg and 0-1% Ca in *in situ*-FD21 (Figs. 9d and 9f). While the approximate percentages of calcium incorporation in individual crystals are equivalent in DSC-magnetites compared to *in situ*-magnetites, the amount of Mg detected in the crystals is higher in the latter.

A more profound study was performed in *in situ*-FD16 and *in situ*-FD21 samples with the goal of determining whether or not the decomposition of the ankerites into

magnetite crystal is topotactic. The measured d-spacing from the SAED image of the FD16 ankerites (Figs. 7a and 7b) are closer to those determined for siderite than to the d-spacing for ankerite (Table 2a). In some directions (those determined for the hkl index 113 and 116), the measured d-spacing are lower than those corresponding to siderite, which is reasonable for a Mg-substituted siderite (which is the case of FD16). The zone axis calculated based on the SAED image for FD16 is  $[12\bar{1}]$ . After heating the selected crystal for 20 minutes, a perfectly orientated oxide with respect to carbonate is observed (Fig. 7c and 7d). The pseudomorph showed the typical mottled texture observed following beam damage of carbonates (Wenk *et al.* 1983). The oxide is fcc magnetite type, but the d-spacing are systematically shorter than the regular ones for magnetite (Table 2b). These results are in agreement with the detected incorporation of Mg into the structure of siderite, due to the smaller ionic radius of  $Mg^{2+}$  (57 pm) compared to that of  $Fe^{2+}$  (63 pm). The diffraction image corresponds to the zone axis from “impure magnetite”  $[\bar{1}10]$  and so, this zone axis is parallel to that  $[12\bar{1}]$  from the precursor carbonate. Therefore, the atomic planes of the carbonate (012) are parallel (//) to those (311) from the oxide. The relationship is clearly topotactic.

SAED analysis of FD21 sample (Figs 9a and 9b) yields the d-spacing listed in Table 3a. Those d-spacing revealed that FD21 solid is closer to an ankerite than it is to a siderite. The carbonate zone axis is  $[21\bar{2}]$ . Once heated for 20 minutes, the formation of an aggregate of oriented magnetite is observed (although some crystals are not and so, diffraction rings appear in SAED analyses: Figs. 9c and 9d). Such a lack of orientation is probably originated because the precursor carbonate was not homogeneous (demonstrated in SAED analyses of FD21: Fig. 9b). According to d-spacing calculated from Fig. 9d (listed in Table 3b), the zone axis of the magnetite is  $[001]$ . Therefore, this



magnetite axis [001] is //  $[21\bar{2}]$  axis ankerite, thus existing a topotactical relationship between the precursor and the product.

#### 4. DISCUSSION

DSC data (Fig. 1) show the existence of only one peak during the heating process of FD15, FD16, FD20 and FD21 samples at 480-570°C (the lower Fe substitution, the lower temperature), which is consistent with only one decomposition event. The gas evolved at this temperature was CO<sub>2</sub>, indicating the transition from a carbonate phase to an oxide phase. This unique decomposition event agrees with that observed by Thomas-Keprta *et al.* (2009) when decomposing (Ca,Mg,Fe,Mn)CO<sub>3</sub> (Roxbury siderite) following the “slow” heating procedure (575°C under vacuum), but disagrees with that observed by Brearley (2003), who concluded that a complex carbonate solid solution can undergo progressive decomposition, such that one component in solid solution breaks down without the entire phase decomposing. These decompositions would result in CO<sub>2</sub> exolution at different stages. This was not observed in our experiments, and therefore, according to our data, the decomposition of the mixed carbonate occurred at once. Our observation that the lower the Fe substitutions into the siderite structure, the lower the temperature needed for the decomposition of the carbonate is consistent with the findings of Hurst *et al.*, (1993). From our data, such a decomposition event resulted in the formation of Ca- and Mg-substituted magnetite as a solid solution, and not just as a mixture of phases (CaO + (Mg,Fe)<sub>3</sub>O<sub>4</sub>). Therefore, we demonstrated that a mixed solid solution carbonate could be precursor of a mixed solid solution oxide phase. Moreover, although working in a relatively high P<sub>CO2</sub>, and heating the sample up to 700°C, we do not observe the spinoidal separation of our substituted magnetites into the pure end-members, nor the re-carbonation of the oxides, since

neither carbonates nor other non-ferrous oxides are detected by XRD in our decomposition products. These results partially agree and partially not with previously reported by other authors.

For instance, the formation of a solid solution as the result of the thermal decomposition of ankerites does not agree with the results of Chai and Navrotsky (1996), who examined the thermal decomposition of  $\text{Ca}(\text{Fe}_x\text{Mg}_{1-x})(\text{CO}_3)_2$  (in  $\text{O}_2$  at  $700^\circ\text{C}$ ) and observed the formation of  $\text{CaO}$ ,  $\text{MgO}$  and  $\text{Ca}_2\text{Fe}_2\text{O}_5$ . However, our observation of the formation of a Mg-substituted magnetite (solid solution) from the thermal decomposition of Mg-substituted ankerites does agree with that found by many authors (e.g., Gallagher and Warne, 1981; Dubrawski, 1991; Gotor *et al.*, 2000; Isambert *et al.*, 2006; Thomas-Keprta *et al.*, 2009).

One of the novelties of our study is that, other than Mg, we also find Ca incorporation in magnetite, forming a solid solution. These results are interesting because, while the incorporation of Mg and/or Mn in magnetites is somehow not so difficult, due to the similar atomic radius of Mg and Mn (57 pm and 66 pm, respectively; Shannon *et al.*, 1976) compared to that of  $\text{Fe}^{2+}$  (63 pm; Shannon *et al.*, 1976), the incorporation of Ca is much more difficult, being the atomic radius of Ca (100 pm; Shannon *et al.*, 1976), much higher than that for  $\text{Fe}^{2+}$ . This Ca incorporation into their resulting secondary magnetites was not observed by Thomas-Keprta *et al.* (2009), or by other authors who also decomposed ankerites containing Ca (Ware and French, 1984; Gallagher and Warne, 1981; Dubrawski, 1991; Hurst *et al.*, 1993; Isambert and Valet, 2003; Cohn 2006; Isambert *et al.*, 2006). The explanation given by Thomas-Keprta *et al.* (2009) is that “the decomposition of ankerite-dolomite solid solution is an example of a spinodal decomposition in which a phase transform / separation to calcite and a siderite-magnesite solid solution occurs prior to nucleation

and growth of the decomposition product phases". This argument, however, requires the detection of either  $\text{CaCO}_3$  (and/or  $\text{CaO}$ ) in their resulting products, since, if their argument is true,  $\text{CaCO}_3$  (once separated from the siderite-magnesite solid solution) should either have decomposed to  $\text{CaO}$  or remained as  $\text{CaCO}_3$ . Moreover, the potential exists that, once decomposed to  $\text{CaO}$ , such a phase reacts with  $\text{CO}_2$  to yield  $\text{CaCO}_3$  carbonate again (Grasa *et al.*, 2008; Montes-Hernandez *et al.*, 2008; Nikulshina *et al.*, 2009). However, these authors or previous studies by other authors (Gallagher and Warne, 1981; Dubrawski, 1991; Cohn 2006; Isambert *et al.*, 2006) do not observe the formation of any of these phases. This failure to detect Ca in the resulting magnetite may be due to the little substitution of Ca in the precursor ankerite in these studies [maximum 1.5% in Gallagher and Warne (1981); trace amounts in Dubrawski (1991) and Cohn (2006); maximum 2% in Isambert *et al.* (2006); 4% in Thomas-Keprta *et al.*, (2009)] compared to the amount of Ca in the precursor ankerite in the present study (27.4% in FD15 and 21.7% in FD20). Therefore, even if Ca is incorporated in the resulting magnetite, such incorporation may be below the detection limit to be recognized. Our hypothesis for the incorporation of Ca in secondary magnetites lies in the context of the topotactic transformation from ankerite to magnetite observed in our *in situ* experiments. We assume the model proposed by Rodriguez-Navarro *et al.* (2009) to explain the topotactic decomposition of  $\text{CaCO}_3$  into  $\text{CaO}$ . According to these authors, the transformation occurs as a consequence of  $\text{CO}_2$  loss accompanied by limited atom displacement and shrinking of planes. During this process, new temporal structures appear as well as empty spaces between cations (Rodriguez-Navarro *et al.*, 2009). Therefore, we hypothesize that calcium (being present in the crystalline structure of the precursor) might be incorporated into these "loose" temporal structures that finally evolve to produce the oxide. Further analyses should be done to confirm this hypothesis,

like Raman analyses, to detect possible alterations of the structure of these Ca-substituted secondary magnetites compared to those stoichiometric secondary magnetites.

Nevertheless, our results agree with those of the previous studies regarding the production of non-stoichiometric magnetites by thermally decomposing ankerites. Therefore, these results are strikingly different to those of Golden *et al.* (2004), who claimed that chemically pure magnetites can be obtained from the thermal decomposition of magnesium siderites (in this case from Copper Lake) at 470°C under anoxic conditions. Based on these results, they proposed an inorganic mechanism for the formation of the chemically pure magnetites in ALH84001. However, Bell (2007) showed that the Copper Lake siderite used by Golden *et al.* (2004) was a finely intermixed sample of nearly pure siderite embedded within impure siderite. Based on our DSC data, the temperature needed to decompose our ankerites is 470-560°C, and, since the decomposition temperature increases with increasing substitutions of Ca-Mg and Mn in ankerites (Hurst *et al.*, 1993), during heating as described by Golden *et al.* (2004) only the most Fe-rich portion of the siderite they used would have decomposed forming nearly pure magnetite. Thus it seems that Golden *et al.* (2004) did not produce chemically pure magnetite from mixed composition siderite since the temperature was too low to decompose the mixed cation carbonate and only the decomposition threshold for nearly pure siderite was reached. These observations were previously pointed out by Thomas-Keprta *et al.* (2009).

Therefore, our results support and extend those of Thomas-Keprta *et al.* (2009) confirming that the thermal decomposition of substituted siderites would not produce the chemically pure magnetites found in ALH84001 meteorite, and, therefore, these findings rule out the model proposed by Golden *et al.*, (2004) regarding an inorganic

origin of ALH84001 “pure” magnetites. Different is the case of the few ALH84001 “impure” magnetites (Ca-Mg-Si magnetites; described in Thomas-Keptra et al. 2009). While the incorporation of Ca and Mg in these magnetites could result from the thermal decomposition of a Ca-Mg-siderite, their formation by this inorganic process is not compatible with the structural relationship between precursor and product observed in our experiments.

Based on the results from the *in situ* decompositions of the siderite/ankerite samples FD16 and FD21, the decomposition ankerite-magnetite is topotactic (meaning three dimensional lattice continuity). This result is in good agreement to the observed decomposition of the ankerite crystals in an oriented aggregate of magnetite crystals (Fig.6) and with the observations of many studies regarding the decomposition of different carbonates and hydroxides (listed below). From these studies it is possible to claim that there is an increasing amount of evidence that the endothermic decomposition reactions of a solid phase A into two phases B (solid) + C (gas) (like the decomposition of our Mg-Ca-substituted siderites into oxide + CO<sub>2</sub>) is topotactic (Rodriguez-Navarro et al. 2009). This means that the product crystals of the reaction maintain the orientation of the precursor mineral. Structural features of the precursor survive relatively unchanged in the product crystals (Dasgupta, 1961). Topotaxy has been found to occur in the decomposition of many hydroxides and oxy-hydroxides (e.g., Chaix-Pluchery et al., 1983; Kim et al., 1987; Figlarz et al., 1990), dolomite (MgCa(CO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) (Carter and Buseck, 1985), ankerite (MgFe(CO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) (Dasgupta, 1965), siderite (FeCO<sub>3</sub>) (Dasgupta, 1961), magnesite (MgCO<sub>3</sub>) (Dasgupta, 1964; Kim et al., 1987) and calcite (CaCO<sub>3</sub>) (Rodriguez-Navarro et al., 2009).

Barber and Scott (2002) examined magnetite and periclase (MgO) crystals in the Fe-Mg-Ca carbonates in the Martian meteorite ALH84001 using transmission electron

microscopy, to evaluate whether there was any kind of structural relationship with the carbonate matrix that might indicate whether the crystals originated from thermal decomposition of the carbonates. They found that magnetite crystals growing in small voids and in microfractures occasionally had epitaxial relationships with the carbonate, while those nanocrystals fully embedded in the ferroan carbonate showed topotaxy (3-D lattice continuity) with the carbonate matrix rather than epitaxy. The structural relationship between the two minerals (magnetite and carbonate matrix) was not deduced from their samples, but supported by the findings of McTigue and Wenk (1985) regarding the structural relationship between calcite and calcium oxide. These relationships were the following:  $\{111\}_{\text{mag}} //$  (i.e. parallel)  $(0001)_{\text{carb}}$  and  $\{110\}_{\text{mag}} // \{11\bar{2}0\}_{\text{carb}}$ . Based on these results, Barber and Scott (2002) concluded that the ALH84001 magnetite crystals resulted from the thermal decomposition of the carbonates, thus claiming an inorganic origin for the ALH84001 magnetites.

However, there are several drawbacks that may invalidate the conclusion of these authors. Firstly, there were thousands of magnetite crystals that in ALH84001 that show no structural relationship with the ankerite matrix. Secondly, Barber and Scott (2002) assumed that the thermal decomposition of the ankerite matrix would result in pure oxides (MgO, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and CaO), a supposition that is in sharp contrast with the findings in the present study and those of Thomas-Keprta *et al.* (2009) and (2010). If Barber and Scott's (2002) assumption was true, periclase (MgO) would probably have been present in relatively large amounts in ALH84001 and yet very little was found. Finally, Barber and Scott (2002) based their conclusions in the findings of McTigue and Wenk (1985) on the structural relationship between CaCO<sub>3</sub> and CaO that more recent studies (Rodriguez-Navarro *et al.*, 2009) demonstrate untrue. While the structural relationship between the magnetite and carbonate matrix determined by Barber and Scott (2002) was

$\{111\}_{\text{mag}}$  // (i.e. parallel)  $(0001)_{\text{carb}}$ , the structural relationship between the calcium carbonate and the calcium oxide found by Rodriguez-Navarro *et al.* (2009) was that  $[110]_{\text{oxide}}$  // PBC (Periodic Bond Chains) of the calcite (directions  $[441]$  and equivalents,  $[010]$ ,  $[110]$  and  $[\bar{2}21]$ ). The c-axis of siderite contains layers of  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{CO}_3^{2-}$  that alternate each other (Fig. 10a). Also, the  $[111]$  direction of the magnetite show the same alternance of  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{O}^{2-}$  ions (Fig. 10c), but with shorter distance between them compared to the distances  $\text{Fe}^{2+}\text{-CO}_3^{2-}$  in the ankerite. The hypothesis of Barber and Scott (2002) is that those directions (c-axis of siderite and  $[111]_{\text{magnetite}}$ ) were parallel, with the structure shrinking after  $\text{CO}_2$  release, to meet the shorter distances between ions. However, the observations of Rodriguez-Navarro *et al.* (2009) demonstrate that what really occurs is that, after the  $\text{CO}_2$  exolution, the  $\text{CO}_3$  group in the PBC directions of calcite (or siderite: Fig. 10b) converts to  $\text{O}^{2-}$ , which now can move and rearrange along with the  $\text{Ca}^{2+}$  ions to reach the disposition of ions along the  $[110]$  direction of oxide. Therefore, the directions that remain parallel during the thermal decomposition of a carbonate is the PBC directions of the carbonate and the  $[110]$  of the oxide. If this is the case, then the newly formed magnetites would align meeting the oxides corners (aligning their  $[110]$  directions) along the old PBC direction of the ankerite (Fig. 10d). Such a configuration, which is clearly shown in Figure 2e is clearly different than that observed for the alignment of the chain of magnetosomes in magnetotactic bacteria (Frankel and Bazylinski, 2006), also this configuration has not been described in ALH84001 magnetites (nor “pure” or “impure”), and may be used to recognize whether magnetites found in natural environments are product of a thermal decomposition of a precursor carbonate.

## **5. CONCLUSIONS**

The thermal decomposition of (Ca, Mg, Fe)CO<sub>3</sub> at 700°C and 1 atm CO<sub>2</sub> occurs at 480-570°C (the lower the temperature the less Fe substitutions) as an unique decomposition event. Both this procedure and the decomposition of ankerites under vacuum by the HR-TEM electron beam resulted in the formation of an oriented aggregate of magnetite nanoparticles that kept the morphology and structural features of the precursor (pseudomorph). All the analyzed magnetites contained Ca and/or Mg into their crystalline structure, forming a solid solution rather than a mixture of pure oxide phases. No re-carbonation of the already formed oxide was observed. Therefore, it is not possible to obtain chemically pure magnetites from the thermal decomposition of a (Ca, Mg, Fe)CO<sub>3</sub>. Moreover, our results indicate that such decomposition is topotactic. This structural relationship between the precursor and the product confers a specific orientation between the resulting magnetite crystals that is clearly different from that of the magnetosome of magnetotactic bacteria and for the magnetites found in ALH84001. Therefore, our results rule out the formation of ALH84001 magnetites by a thermal decomposition of a carbonate precursor.

## **Acknowledgements**

Financial funding was provided by grant CGL2007-63859 from the Spanish Ministry of Culture (MEC). Thanks go to Johnson Space Center (NASA) for offering the DSC needed to form DSC-magnetites, and to the CIC personal from the University of Granada for technical assistance.



## References

- Barber, D.J. and Scott, E.R.D. (2002) Origin of supposedly biogenic magnetite in the Martian meteorite Allan Hills 84001. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99 (10), 6556-6561.
- Bazylinski D. A. and R. B. Frankel R.B. (2003) Biologically controlled mineralization in prokaryotes, *Rev. Mineral. Geochem.*, 54, 95-114, doi: 10.2113/0540217.
- Bell, M. S. (2007), Experimental shock decomposition of siderite and the origin of magnetite in Martian meteorite ALH84001, *Meteorit. Planet. Sci.*, 42, 935–949.
- Brearley A. J. (2003) Magnetite in ALH 84001: an origin by shockinduced thermal decomposition of iron carbonate. *Meteorit. Planet. Sci.* 38, 849–870.
- Carter, E.D. and Buseck, P.E. (1985) Mechanism of decomposition of dolomite,  $\text{Ca}_0.5\text{Mg}_0.5\text{CO}_3$ , in the electron microscope. *Ultramicroscopy* 18, 241–252.
- Chaix-Pluchery, O., Pannetier, J., Bouillot, J., Niepce, J.C. (1987) Structural prereactional transformations in  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . *J. Solid State Chem.* 67 (2), pp. 225-234.
- Cohn, A. (2006) Formation of magnetite nanoparticles by thermal decomposition of iron bearing carbonates: implications for the evidence of fossil life on Mars. In National Nanotechnology Infrastructure Network, Research Experience for Undergraduates, Accomplishments Program, Cornell, NY, USA, pp. 58–59.
- Dasgupta, D.R. (1961) Topotactic transformations in iron oxides and oxyhydroxides. *Ind. J. Physics*, 35,401-409.
- Dasgupta, D. R. (1965) *Mineral. Mag.* 35, 131–139.
- Devouard, B., Posfai, M., Hua, X., Bazylinski, D. A., Frankel, R. B. and Buseck, P. R. (1998). Magnetite from magnetotactic bacteria: Size distributions and twinning. *Am. Mineral.* 83, 1387–1398.
- Dubrawski, J. V. (1991), Thermal decomposition of some siderite-magnesite minerals using DSC, *J. Therm. Anal.*, 37, 1213-1221, doi:10.1007/BF01913855.
- Figlarz, M., Gérard, B., Delahaye-Vidal, A., Dumont, B., Harb, F., Coucou, A. and Fievet, F. (1990) Topotaxy, nucleation and growth. *Solid State Ionics* 43 (C), pp. 143-170.

- Frankel, R. B., and D. A. Bazylinski (2003), Biologically induced mineralization by bacteria, *Rev. Mineral. Geochem.*, 54, 217-237.
- Frankel, R.B. and Bazylinski, D.A. (2006) How magnetotactic bacteria make magnetosomes queue up. *Trends in microbiology* , 14 (8), 329-331.
- Gallagher, P. K., and S. S. J. Warne (1981), Thermomagnetometry and thermal decomposition of siderite, *Thermochim. Acta*, 43, 253-267.
- Garrels, R. M., and C. L. Christ (1990), *Solutions, Minerals and Equilibria*. Jones and Bartlett, Boston.
- Gold, T. (1992), The deep, hot biosphere. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 6045-6049, doi:10.1073/pnas.89.13.6045.
- Golden, D.C., , Morris, R.V., Yang, S.V., Lofgren, G.E.(2000) An experimental study on kinetically-driven precipitation of calcium-magnesium-iron carbonates from solution: Implications for the low-temperature formation of carbonates in martian meteorite Allan Hills 84001. *Meteorit. Planet. Sci.* 35 (3), 457-465.
- Golden, D. C., Ming, D.W., Schwandt, C.S., Lauer, H. V, Socki, R. A., Morris, R. V., Lofgren, G. E. and McKay, G. A. (2001), A simple inorganic process for formation of carbonates, magnetite and sulfides in Martian meteorite ALH84001, *Am. Mineral.*, 86, 370-375.
- Golden, D. C., Ming, D. W., Morris, R. V., Brearley, A., Lauer, H. V., Treiman, A. H., Zolensky, M. E., Schwandt, C. S., Lofgren, G. E. and McKay, G. A. (2004), Evidence for exclusively inorganic formation of magnetite in Martian meteorite ALH84001, *Am. Mineral.*, 89, 681-695.
- Gotor, F. J., M. Macias, A. Ortega, and J. M. Criado (2000), Comparative study of the kinetics of the thermal decomposition of synthetic and natural siderite samples, *Phys. Chem. Miner.*, 27, 495-503, doi:10.1007/s002690000093.
- Grasa, G.S., Abanades, J.C., Alonso, M. and Gonzalez, B. (2008) Reactivity of highly cycled particles of CaO in a carbonation/calcination loop. *Chem. Eng. J.* 137, 561–567.
- Hurst H. J., Levy J. H. and Patterson J. H. (1993) Siderite decomposition in retorting atmospheres. *Fuel*, 72, 885–890.
- Isambert A. and Valet J.-P. (2003) Stable Mn-magnetite derived from Mn-siderite by heating in air. *Earth Planet. Sci. Lett.* 108, EMP2-1–EMP2-9.

- Isambert A., De Resseguier T., Gloter A., Reynard B., Guyot F. and Valet J.-P. (2006) Magnetite-like nanocrystals formed by laser-driven shocks in siderite. *Earth Planet. Sci. Lett.* 243, 820– 827.
- Ishikawa, T., Kondo, Y., Yasukawa, A. and Kandori, K. (1998), Formation of magnetite in the presence of ferric oxyhydroxides. *Corros. Sci.*, 40, 1239-1251, doi: 10.1016/S0010-938X (98)00045-6.
- Jimenez-Lopez, C., Romanek, C.S., Rodriguez-Navarro, A., Perez-Gonzalez, T. and Rodriguez-Navarro, C.M. (2008) Cation incorporation in magnetites formed upon thermal decomposition of ankerites, paper presented at General Assembly of the European Geosciences Union, Vienna, Austria.
- Kelts K. (1988) Environments of deposition of lacustrine petroleum source rocks: an introduction. In Lacustrine Petroleum Source Rocks (eds. A.J. Fleet, K. Kelts and M.R. Talbot); *Geol. Soc. Spec. Publ.* 40, 3-26.
- Kim, M.G., Dahmen, U. and Searcy, A.W. (1987) Structural transformations in the decomposition of Mg(OH)<sub>2</sub> and MgCO<sub>3</sub>. *J. Am. Ceramic Soc.* 70, 146-154.
- Lane, M.D. and Christensen, P.R. (1997) Thermal infrared emission spectroscopy of anhydrous carbonates. *Journal of Geophysical Research E: Planets* 102 (E11), 25581-25592.
- McKay, D. S., Gibson, E. K., Jr., Thomas-Keprta, K. L., Vali, H., Romanek, C. S., Clemett, S. J., Chillier, X. D., Maechling, C. R., and Zare, R. N. (1996). Search for past life on Mars: Possible relic biogenic activity in martian meteorite ALH84001. *Science*, 273, 924–930.
- McTigue, J. W. & Wenk, H.-R. (1985) Microstructures and orientation relationships in the dry-state aragonite-calcite and calcite-lime phase transformations. *Am. Mineral.* **70**, (11-12), 1253–1261.
- Michard A., Beucaire C. and Michard G. (1988) Uranium and rare earth elements in CO<sub>2</sub>-rich waters from Vals-les Bains (France). *Geochim. Cosmochim. Acta.* 51, 901-909.
- Montes-Hernandez, G., Pérez-López, R., Renard, F., Nieto, J.M. and Charlet, L. (2008) Mineral sequestration of CO<sub>2</sub> by aqueous carbonation of coal combustion fly-ash. *J. Hazard. Mat.* 161 (2-3), 1347 – 1354.
- Mozley P. S. and Carothers W. W. (1992) Elemental and isotopic composition of siderite in the Kupanuk Formation, Alaska: Effect of microbial activity and water/sediment interaction on early pore-water chemistry. *J. Sediment. Petrol.* 64, 681-692.

- Nikulshina, V., Gebald, C. and Steinfeld, A. (2009) CO<sub>2</sub> capture from atmospheric air via consecutive CaO-carbonation CaCO<sub>3</sub>-calcination cycles in a fluidized-bed solar reactor. *Chem. Eng.J.* 146, 244–248.
- Ptacek C.J. (1992) Experimental determination of siderite solubility in high ionic-strength aqueous solutions. Ph. D. Thesis, Univ. Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada.
- Rajan S., Mackenzie F. T. and Glenn C. R. (1996) A thermodynamic model for water column precipitation of siderite in the Plio- Pleistocene Black Sea. *Am. J. Sci.* 296, 506-548.
- Rodriguez-Navarro A. (2006) XRD2DScan: new software for polycrystalline materials characterization using two-dimensional X-ray diffraction. *J. Appl. Crystallogr.* 39, 905-909.
- Rodriguez-Navarro, C., Ruiz-Agudo, E., Luque, A., Rodriguez-Navarro, A.B. and Ortega-Huertas, M. (2009). Thermal decomposition of calcite: Mechanisms of formation and textural evolution of CaO nanocrystals. *Am. Mineral.* 94 (4), 578-593.
- Romanek, C.S., Jiménez-López, C., Navarro, A.R., Sánchez-Román, M., Sahai, N. and Coleman, M. (2009). Inorganic synthesis of Fe-Ca-Mg carbonates at low temperature. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 73 (18), 5361-5376.
- Shannon, R.D. (1976) Revised Effective Ionic Radii and Systematic Studies of Interatomic Distances in Halides and Chalcogenides. *Acta Crystallographica.* A32, 751.
- Thomas-Keprta, K. L., Bazylnski, D. A., Kirschvink, J. L., Clemett, S. J., McKay, D. S., Wentworth, S. J., Vali, H., Gibson Jr., E. K. and Romanek, C. S. (2000), Elongated prismatic magnetite crystals in ALH84001 carbonate globules: potential Martian magnetofossils, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 64, 4049-4081, doi:10.1016/S0016-7037(00)00481-6.
- Thomas-Keprta, K.L., Clemett, S.J., McKay, D.S., Gibson, E.K. and , Wentworth, S.J. (2009). Origins of magnetite nanocrystals in Martian meteorite ALH84001. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 73 (21), 6631-6677.
- Thomas-Keprta, K.L., Clemett, S.J., Wentworth, S.J., McKay, D.S. and Gibson, E.K. (2010) New insights into the origin of magnetite crystals in ALH84001 carbonate disks. 41<sup>st</sup> *Lunar and Planetary Science Conference.* 1064.

- Treiman A. H. (2003) Submicron magnetite grains and carbon compounds in Martian meteorite ALH84001: inorganic, abiotic formation by shock and thermal metamorphism. *Astrobiology* 3, 369–392.
- Vargas, M., K. Kashefi, E. L. Blunt-Harris, and D.R. Lovley (1998), Microbiological evidence for Fe(III) reduction on early Earth, *Nature*, 395, 65-67, doi:10.1038/25720.
- Walker, J. C. G. (1987), Was the Archaean biosphere upside down? *Nature*, 329, 710-712, doi:10.1038/329710a0.
- Ware S. S. J. and French D. H. (1984) The application of simultaneous DTA and TG to some aspects of oil shale mineralogy. *Thermochim. Acta* 76, 179–200.
- Wenk, H.R., Barber, D.J. and Reeder, R.J. (1983) Microstructures in carbonates. *Carbonates: Mineralogy and Chemistry*, 301-367.
- Zachara, J. M., Kukkadapu R. K., Fredrickson J. K., Gorby Y. A. and Smith S. C. (2002), Biomineralization of poorly crystalline Fe(III) oxides by dissimilatory metal reducing bacteria (DMRB), *Geomicrobiol. J.*, 19, 179-207, doi:10.1080/01490450252864271.
- <http://staff.aist.go.jp/nomura-k/english/itscgallery-e.htm>
- <http://www.ifm.eng.cam.ac.uk/people/sc444/>

**TABLE CAPTIONS**

**Table 1.-** Ankerite precursors [Data taken from Romanek *et al.* (2009)]

Sample	T (°C)	Incubation time (months)	Starting solution				Solids			XRD
			NaHCO <sub>3</sub> (mM)	Fe(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (mM)	Ca(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (mM)	Mg(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (mM)	X <sub>Fe</sub> (%)	X <sub>Ca</sub> (%)	X <sub>Mg</sub> (%)	
FD15	25	2	60	2.0	2.1	52.9	59.3	27.4	13.3	Siderite*
FD16	25	2	60	2.3	0	48.8	87.7	0	12.3	Siderite*
FD20	70	2	60	2.1	2.3	52.9	23.7	21.7	54.6	Magnesite*
FD21	70	2	60	1.9	0	53.1	29.1	0	70.9	Magnesite*

\*XRD pattern was shifted with respect to pure end member.

**Table 2a.** d-spacing based on SAED pattern of a FD16 crystal before decomposition.

<b>hkl</b>	<b>Siderite (Å)</b>	<b>Ankerite (Å)</b>	<b>Measured (Å)</b>
012	3.59	3.70	3.59
113	2.13	2.19	2.08
202	1.96	2.05	1.97
116	1.72	1.82	1.65

**Table 2b.** d-spacing based on SAED pattern of a *in situ*-FD16 magnetite crystal after decomposition.

<b>hkl</b>	<b>Magnetite (Å)</b>	<b>Periclase (Å)</b>	<b>Measured (Å)</b>
220	2.96	1.49	2.89
311	2.53	1.27	2.49
222	2.42	1.21	2.38
400	2.09		2.08

**Table 3a.** d-spacing based on SAED pattern of a FD20 crystal before decomposition.

<b>hkl</b>	<b>Siderite (Å)</b>	<b>Ankerite (Å)</b>	<b>Measured (Å)</b>
012	3.59	3.70	
113	2.13	2.19	
021	--	2.06	2.10
202	1.96	2.05	2.02
116	1.72	1.82	1.65
122	1.50	1.54	1.53

**Table 3b.** d-spacing based on SAED pattern of a *in situ*-FD21 magnetite crystal after decomposition.

<b>hkl</b>	<b>Magnetite (Å)</b>	<b>Periclase (Å)</b>	<b>Measured (Å)</b>
111	4.84	2.43	--
220	2.96	1.49	2.95
311	2.53	1.27	--
222	2.42	1.21	--
400	2.09		2.09
440	1.483		1.47
444	1.211		1.21



## FIGURE CAPTIONS

**Figure 1.-** Differential Scanning Calorimetry (DSC) showing the decomposition of FD15, FD16, FD20 and FD21 ankerite samples to DSC-FD15, DSC-FD16, DSC-FD20 and DSC-FD21 magnetites. The results of the analyses of evolved gases are also indicate.

**Figure 2.-** **A)** SEM photomicrograph of FD15 ankerite crystals (Data taken from Romanek *et al.* (2009)). **B)** HR-TEM of FD15 ankerite crystals. **C)** HR-TEM image of DSC-FD15 magnetite crystals. **D)** EDAX- HR-TEM analyses of the selected area are limited by the white rectangle in Figure 2c. Solid arrows indicate the peak for Mg and dashed arrows indicate the peak for Ca. **E)** Chain of DSC magnetites in which the individual magnetite crystals are aligned by meeting their corners. EDAX analyses of the selected area marked with a white rectangle. Solid arrows indicate the peak for Mg and dashed arrows indicate the peak for Ca. **F)** Detail of Fig. 2e and SAED pattern of the marked area.

**Figure 3.-** **A)** SEM photomicrograph of FD16 ankerite crystals (Romanek *et al.* (2009)). **B)** HR-TEM of FD16 ankerite crystals. **C, E)** HR-TEM images of DSC-FD16 magnetite crystals. **D, F)** EDAX- HR-TEM analyses of the selected area are limited by the white rectangle in Figures 3c and 3e. Solid arrows indicate the peak for Mg. SAED in Figs. 3c and 3f corresponds to the area marked with the white rectangle in Figs 3c and 3e, respectively.

**Figure 4.-** **A)** SEM photomicrograph of FD20 ankerite crystals (Data taken from Romanek *et al.* (2009)). **B)** HR-TEM of FD20 ankerite crystals. **C, E)** HR-TEM image of DSC- FD20 magnetites. SAED in Fig. 4c of the area marked with the white rectangle. **D, F)** EDAX- HR-TEM analyses of the selected area are limited by the white

rectangle in Figures 4c and 4e. Solid arrows indicate the peak for Mg and dashed arrows indicate the peak for Ca.

**Figure 5.-** **A)** SEM photomicrograph of FD21 ankerite crystals (Romanek *et al.* (2009)). **B)** HR-TEM of FD21 ankerite crystals. **C, E)** HR-TEM images of DSC-FD21 magnetite crystals. **D, F)** EDAX- HR-TEM analyses of the selected area are limited by the white rectangle in Figs. 5c and 5e. Solid arrows indicate the peak for Mg.

**Figure 6.-** **A)** Chain of magnetite crystals from DSC-FD16. **B)** HR-TEM dark field image of this chain. All the crystals showing the same brightness are oriented in the same direction. **C, D)** SAED pattern of the upper and lower part of the chain. **E)** Chain of magnetite crystals from DSC-FD15. **F)** HR-TEM dark field image of this chain.

**Figure 7.-** **A)** HR-TEM of FD16 siderite crystal with EDAX analysis. **B)** SAED pattern of the previous crystal. **C)** HR-TEM of *insitu*-FD16 magnetite crystal with EDAX analysis. **D)** SAED pattern of the previous crystal. **E)** HR-TEM of *insitu*-FD16 magnetite crystal with SAED analyses. **F)** HR-TEM-EDAX analyses of the previous crystal. EDAX- HR-TEM analyses of the selected area are limited by the white rectangle. Solid arrow indicates the peak for Mg.

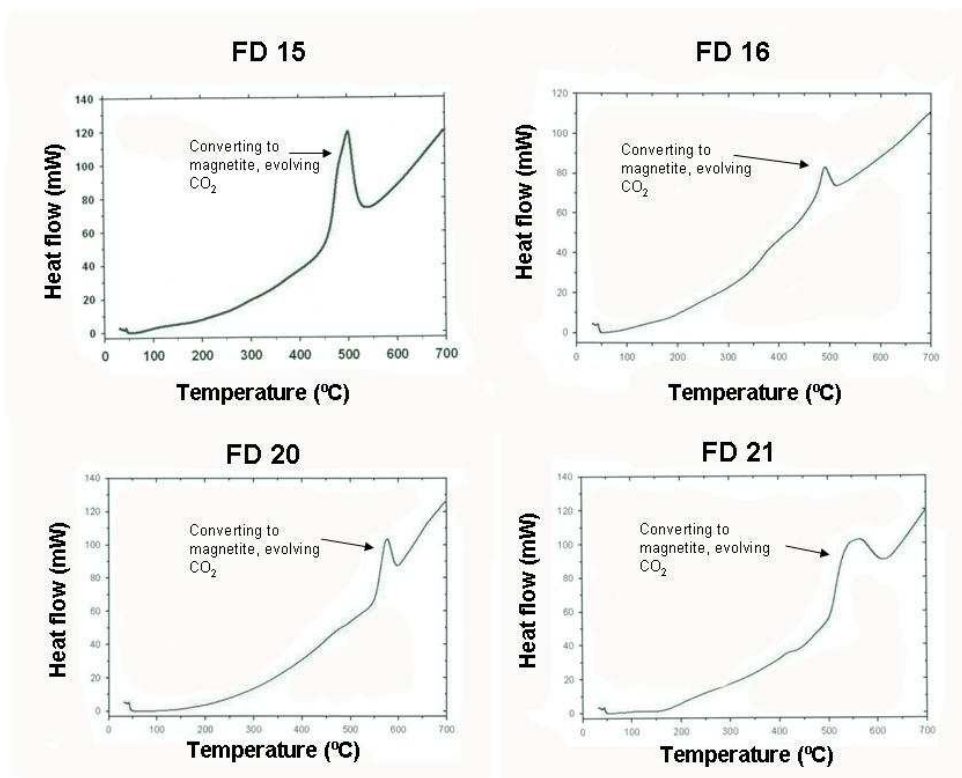
**Figure 8.-****A)** HR-TEM of FD20 siderite crystal with EDAX analysis. **B)** SAED pattern of the previous crystal. **C)** HR-TEM of *insitu*-FD20 magnetite crystal with EDAX analysis. **D)** SAED pattern of the previous crystal. **E)** HR-TEM of *insitu*-FD20 magnetite crystal with SAED pattern. **F)** HR-TEM-EDAX analyses of the previous crystal. EDAX- HR-TEM analyses of the selected area are limited by the white rectangle. Solid arrow indicates the peak for Mg.

**Figure 9.-****A)** HR-TEM of FD21 siderite crystal with EDAX analysis. **B)** SAED pattern of the previous crystal. **C)** HR-TEM of *insitu*-FD21 magnetite crystal with EDAX analysis. **D)** SAED pattern of the previous crystal. **E)** HR-TEM of *insitu*-FD21

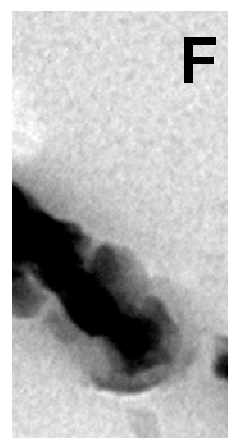
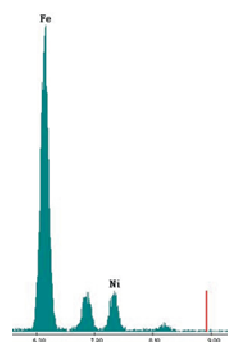
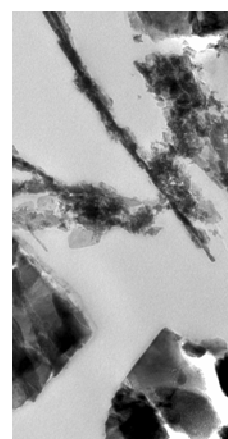
magnetite crystal with SAED analyses. **F)** HR-TEM-EDAX analyses of the previous crystal. EDAX- HR-TEM analyses of the selected area are limited by the white rectangle. Solid arrow indicates the peak for Mg.

**Figure 10.- A, B)** Siderite crystal. The ion ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ) alternance along the c-axis is highlighted in Figure 10a, while the PBC (Periodic Bonds Chains) of siderite are indicated in Fig. 2b, along with a drawing of the disposition of the  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{CO}_3^{2-}$  cations along a PBC direction. (Figures are taken from Encyclopedia Britannica 1994; <http://staff.aist.go.jp/nomura-k/english/itscgallery-e.htm> and <http://www.ifm.eng.cam.ac.uk/people/sc444/>). **C)** Magnetite crystal. **D)** Representation of the alignment of the newly formed magnetite crystals (with parallels [110]) along one of the PBC directions of the precursor siderite [ $(\text{PBC})_{\text{siderite}}//[\text{110}]_{\text{magnetite}}$ ].

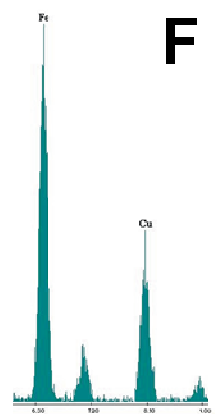
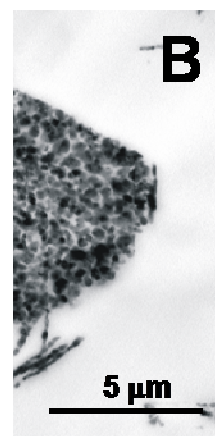
Figure 1.



**Figure 2.**



**Figure 3.**



**Figure 4.**



**D**



**F**

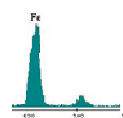


Figure 5.

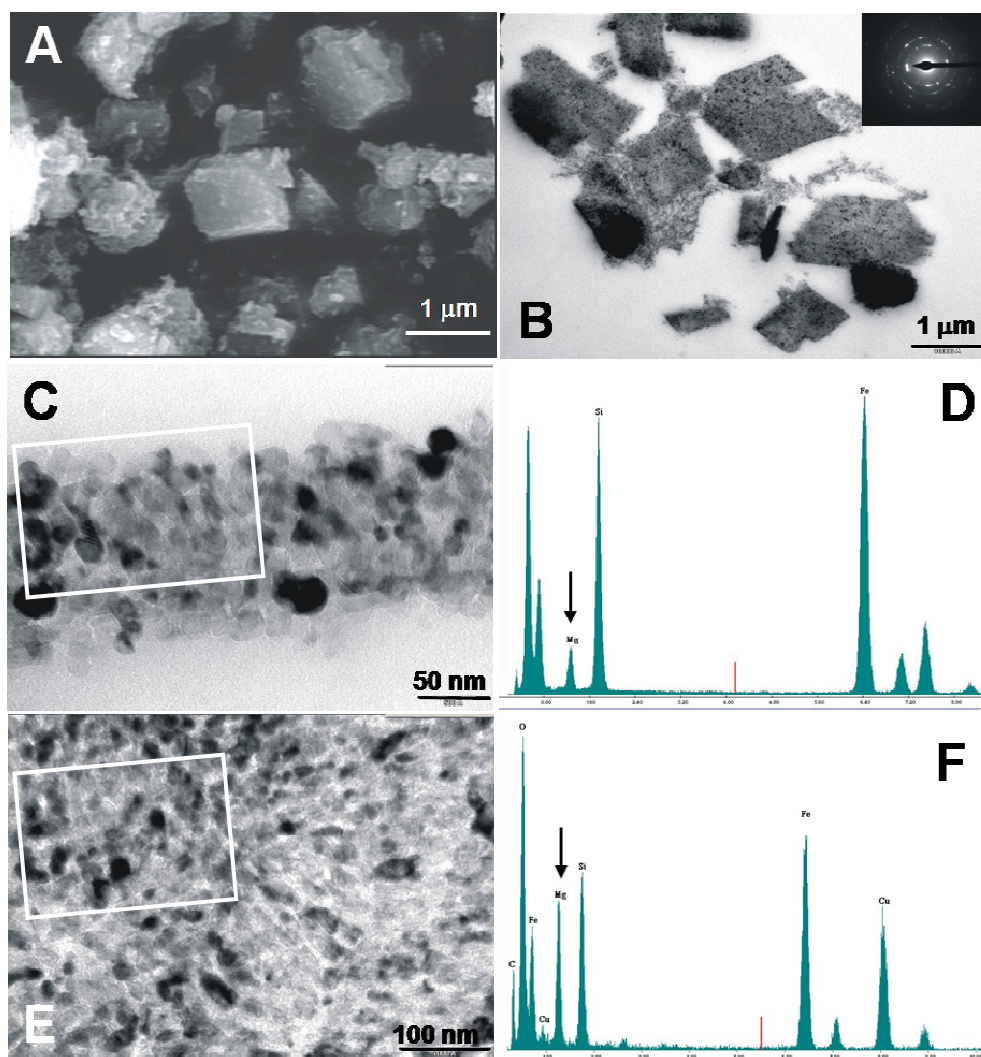
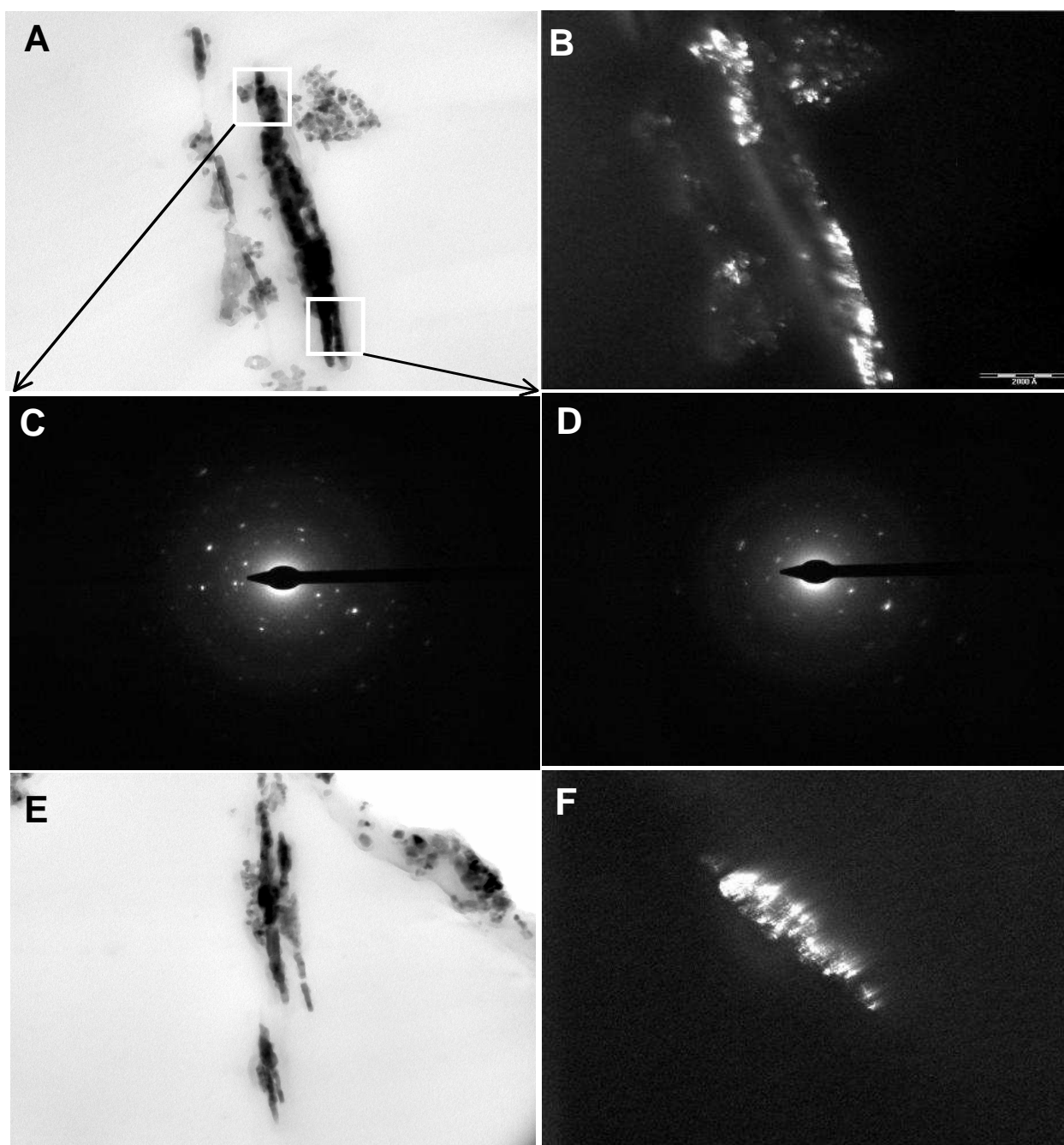
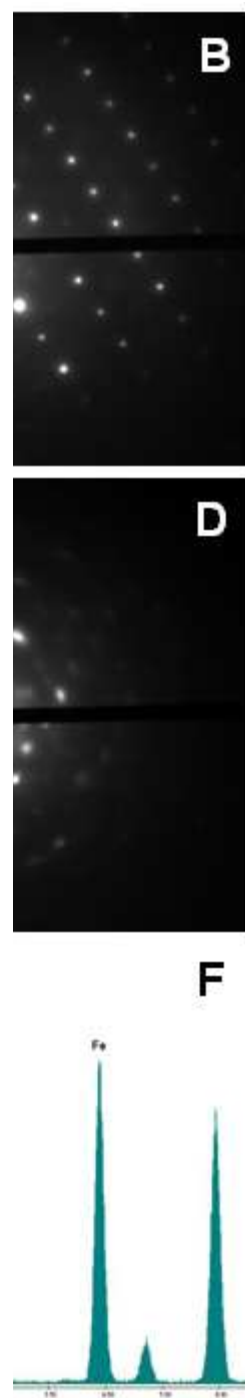




Figure 6



**Figure 7.**



**Figure 8.**



Figure 9.

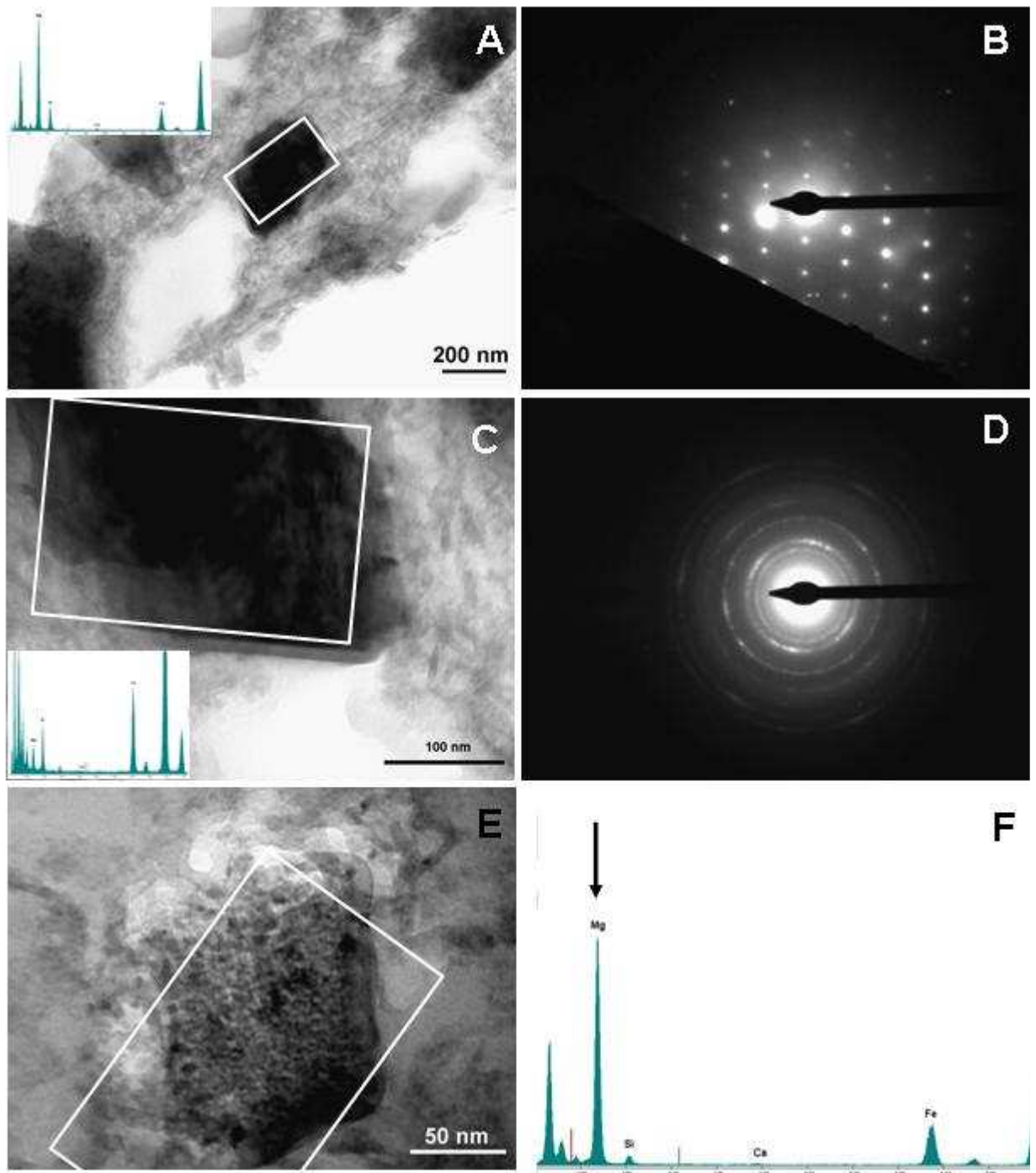
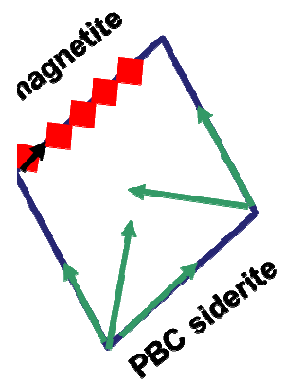
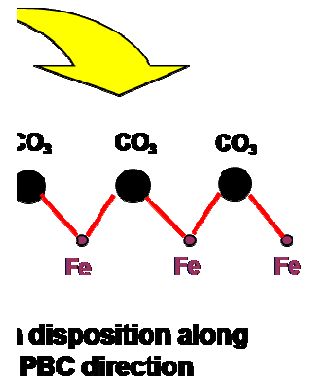


Figure 10.



## **Capítulo V: Magnetitas biológicamente inducidas**



## Magnetite biomineralization induced by *Shewanella oneidensis*

Teresa Perez-Gonzalez<sup>1</sup>, Concepcion Jimenez-Lopez<sup>1,\*</sup>, Andrew L. Neal<sup>2</sup>, Fernando Rull-Perez<sup>3</sup>, Alejandro Rodriguez-Navarro<sup>4</sup>, Antonia Fernandez-Vivas<sup>1</sup>, Enrique Iañez-Pareja<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Universidad de Granada, Campus de Fuentenueva s/n, 18071, Granada, SPAIN.

<sup>2</sup>Centre for Soils and Ecosystem Function, Rothamsted Research, West Common, Harpenden, Herts. AL5 2JQ. UNITED KINGDOM.

<sup>3</sup>Unidad asociada CSIC, Cristalografía y Mineralogía, Universidad de Valladolid, Prado de la Magdalena s/n, 47006, Valladolid, SPAIN.

<sup>4</sup>Departamento de Mineralogía y Petrología, Universidad de Granada, Campus de Fuentenueva s/n, 18071, Granada, SPAIN.

### ABSTRACT

*Shewanella oneidensis* is a dissimilatory iron reducing bacterium capable of inducing the extracellular precipitation of magnetite. This precipitation requires a combination of passive and active mechanisms. Precipitation occurs as a consequence of active production of  $\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$  when bacteria utilize ferrihydrite as a terminal electron acceptor, and the pH rise probably due to the bacterial metabolism of amino acids. As for passive mechanisms, the localized concentration of  $\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$  and  $\text{Fe}^{3+}_{(\text{aq})}$  at the net negatively charged cell wall, cell structures and/or cell debris induces a local rise of supersaturation of the system with respect to magnetite, triggering the precipitation of such a phase.

These biologically induced magnetites are morphologically identical to those formed inorganically in free-drift experiments (closed system; 25 °C, 1 atm total pressure), both from aqueous solutions containing  $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{NaCO}_3$  and  $\text{NaOH}$ , and also from sterile culture medium added with  $\text{FeCl}_2$ . However, organic



material becomes incorporated in substantial amounts into the crystal structure of *S. oneidensis*-induced magnetites, modifying such a structure compared to that of inorganic magnetites. This structural change and the presence of organic matter are detected by Raman and FT-IR spectroscopic analyses and may be used as a biomarker to recognize the biogenic origin of natural magnetites.

## 1. INTRODUCTION

Magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) is a common iron oxide, found in igneous, metamorphic and sedimentary environments, and even in extra-terrestrial material (ALH84001, Thomas-Keprta et al., 2000).  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  can be produced either inorganically or biologically; the later possible by both biologically induced (BIM) and biologically controlled (BCM) mineralization. BIM refers to extracellular precipitation of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  as a consequence of changes in the chemistry of the culture media induced by bacterial metabolic activity (Zhang et al., 1997; Zachara et al., 2002; Kukkadapu et al., 2005, 2006; Roh et al., 2006), also helped by the decrease on the energy barrier needed for precipitation by the influence of cell wall, membranes and debris (Bazylinski et al., 2007). In contrast, BCM refers to intracellular mineral synthesis as a result of an exquisitely controlled biomineralization process, probably genetically regulated (Bazylinski and Schubbe, 2007; Schuler, 2008).

The production of magnetite by BIM is commonly observed among dissimilatory iron reducing bacteria (DIRB). These microorganisms are present in a variety of environments such as fresh and marine waters (Lovley et al., 1990; Caccavo et al., 1992; Roh et al., 2006), soda lakes (Zavarzina et al., 2006), thermal springs (Sokolova et al., 2007), leachate ponds (Ye et al., 2004), mining-impacted lake sediments and drainage waters (Cummings et al., 1999; Kusel, 2003; Johnson and

Hallberg, 2003). This biologically induced mineralization of magnetite has been extensively studied in a number of microorganisms, including mesophilic *Shewanella putrefaciens* CN32 (Zachara et al., 2002, Kukkadapu et al., 2006), *Shewanella* sp. PV-4 (Roh et al., 2006), several species of *Geobacter* (Lovley, 1997; Fredrickson et al., 1998; Zachara et al., 2002; Vali et al., 2004), *Ferribacterium limneticum* (Cummings et al., 1999), alkalophilic *Geoalkalibacter ferrihydriticus* (Zavarzina et al., 2006) and *Alkaliphilus metalliredigens* (Ye et al., 2004), and thermophiles such as TOR-39 (Zhang et al., 1998), *Thermolithobacter ferrireducens* and *T. carboxydivorans* (Sokolova et al., 2007), and appears to be particularly significant in anaerobic habitats or at oxic-anoxic interfaces. Extensive work has been performed on the mineralogy of the Fe-bearing solids precipitated through BIM by different DIRBs, as a function of media composition, electron donor and acceptor, additives and physicochemical parameters of the culture media (*S. putrefaciens* CN32: Zachara et al., 2002; Kukkadapu et al., 2004, 2005, 2006; *Shewanella* sp. PV-4: Roh et al., 2006). However, the main goal of these studies was not the extensive characterization of the biogenic magnetites, but rather, to gain a better understanding of the bioreduction process.

*Shewanella oneidensis*, (formerly *S. putrefaciens* MR-1), is a Gram-negative  $\gamma$ -proteobacterium, first isolated from Lake Oneida, New York (Myers and Nealson, 1988). *S. oneidensis* is able to use lactate, acetate, pyruvate and some amino acids as carbon sources. Respiration of these substrates is coupled to reduction of several terminal electron acceptors such as oxygen ( $O_2$ ), nitrate ( $NO_3^-$ ), nitrite ( $NO_2^-$ ), sulfite ( $SO_3^{2-}$ ), thiosulfate ( $S_2O_3^{2-}$ ), tetrathionate ( $S_4O_6^{2-}$ ), trimethylamine N-oxide (TMAO), fumarate, glycine, ferric iron ( $Fe^{3+}$ ), manganese ( $Mn^{4+}$ ), uranium ( $U^{6+}$ ), and elemental sulfur (Myers and Nealson, 1988; Venkateswaran et al., 1999). When *S. oneidensis* uses  $Fe^{3+}_{(aq)}$  as terminal electron acceptor,  $Fe^{2+}_{(aq)}$  is produced and under appropriate solution

conditions, this dissimilatory  $\text{Fe}^{3+}_{(\text{aq})}$  reduction can induce extracellular precipitation of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Neal et al., 2003). Remarkably, in spite of the large number of bacterial species capable of BIM of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  and the great detail in which the biomineralization process has been described for some species (*S. putrefaciens* CN32: Zachara et al., 2002; Kukkadapu et al., 2004, 2005, 2006; *Shewanella* sp. PV-4: Roh et al., 2006), such precipitates have not been as extensively characterized as biologically controlled  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  produced by magnetotactic bacteria (Bazylinski et al., 1994; Devouard et al., 1998; Faivre and Zuddas, 2006). BCM produced  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  presents unique features that can be used to identify the biogenic origin of natural samples (terrestrial or extra-terrestrial; Thomas-Keprta et al., 2000). Partially because of that, the characterization of BCM magnetites has been the focus of many studies over the years. In the contrary, biologically induced  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  is not thought to share those features, and thus is not presently useful as a biomarker (Thomas-Keprta et al., 2000; Bazylinski et al., 2007). As a result, there are only a few studies on the morphology and isotopic composition of biologically induced magnetites (Zhang et al., 1998; Sparks et al., 1990). Based solely on morphologic data, it is widely accepted that biologically induced magnetites are indistinguishable from inorganic forms (Thomas-Keprta et al., 2000; Bazylinski et al., 2007).

Therefore, the main goals of this paper are, firstly, to study in detail the magnetite biologically induced by a DIRB, *S. oneidensis*, with the objective of determining whether or not such a biologically induced magnetite is distinguishable from an inorganic counterpart, and, secondly, to further investigate the role of *S. oneidensis*, cell structures and cell fractions in the biomineralization process.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

In order to study whether biologically induced Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> is indistinguishable from inorganically-produced magnetite, two types of magnetite were synthesized: One was induced by *S. oneidensis* (referred to as biotic magnetite), the other was produced inorganically (referred to as inorganic magnetite).

## 2.1. Biotic magnetite experiments

### 2.1.1. Microorganisms and inoculum preparation

The microorganism used was *S. oneidensis* ATCC 700550. This microorganism was grown in 75 mL of Tryptic Soy Broth (TSB, Scharlau Chemie) incubated overnight at 28 °C under shaking (180 rpm). Cells were harvested and washed three times in 2 mM KCl by centrifugation (6000 rpm; Sorvall Super T21). Finally, cells were resuspended in 60 mL 2 mM KCl (approximately 6x10<sup>10</sup> colony forming units mL<sup>-1</sup>). This cell suspension was used in the following experiments:

3) L-experiments: The cell suspension was used directly as an inoculum.

2) UV-experiments: The cell suspension was killed by UV irradiation and used as an inoculum. This experiment was employed to assess the role of the cell outer membrane on magnetite precipitation, excluding the role of bacterial metabolism. To ensure full and uniform irradiation, cells suspensions were first diluted five fold in a 2 mM KCl solution and exposed to UV radiation for 2 h. After exposure, cells were concentrated up to the original cell density. This suspension was used as inoculums, but, first, 100 µL of this suspension was plated onto TSB solid medium and incubated at 20 °C for three days to confirm the absence of culturable cells. Five replicates were prepared per inoculum. Also, the UV-killed inoculum was observed by Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM, Gemini-1350, LEO, Carl Zeiss) to assess that dead cells remained intact (Fig. 1).

3) FP-experiments: The cell suspension was concentrated and cells were disrupted by using a French press (Thermo, 9000 p.s.i., three experiments). This experiment was performed to assess the role of cell debris on magnetite precipitation, while excluding the role of bacterial metabolic activity. After cell disruption, the suspension was diluted to the original 60 mL and used as an inoculum. Again, 100 µL of the inoculum was plated onto TSB solid medium. Five replicas were prepared per inoculum.

### 2.1.2. Culture media

The basic culture medium was prepared by modifying the one described by Kostka and Nealson (1998). The original phosphate buffer was substituted by 30 mM Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic

acid) (PIPES) buffer . The modified medium also contained 32 mM lactate, 9 mM ammonium sulfate, 6 mM  $K_2HPO_4$ , 3.3 mM  $KH_2PO_4$ , 2 mM  $NaHCO_3$ , 1 mM  $MgSO_4$ , 0.5 mM  $CaCl_2$ , 67.2  $\mu M$   $Na_2$ -EDTA, 56.6  $\mu M$   $H_3BO_3$ , 10  $\mu M$   $NaCl$ , 5.4  $\mu M$   $FeSO_4$ , 5  $\mu M$   $CoSO_4$ , 5  $\mu M$   $Ni(NH_4)_2SO_4$ , 3.9  $\mu M$   $Na_2MoO_4$ , 20 mg  $L^{-1}$  each of arginine, serine and glutamic acid. Medium pH was poised at pH 7. All the chemicals were procured from Sigma.

Culture medium was made anoxic by boiling for 3 min and then by bubbling with  $N_2$  for half an hour, while cooling in an ice bath. The medium was then placed inside an anaerobic chamber (COY Laboratory Products Inc.) containing an atmosphere of 4%  $H_2$ /96 % $N_2$  continually circulated through palladium catalysts to reduce trace  $O_{2(g)}$  to  $H_2O$ . The chamber also contained anhydrous  $CaSO_4$  to trap water produced on the catalyst and it was equipped with gas analyzers to continually monitor  $O_{2(g)}$  and  $H_{2(g)}$  levels throughout the course of the experiment. Aliquots of 750 mL were transferred to thirty six 1 L Pyrex bottles. These bottles were sealed with modified screw caps, having a rubber septum allowing inoculation and further addition of chemicals. Bottles were autoclaved at 121 °C for 20 min. These bottles were used to study chemical evolution of the system during magnetite biomineralization.

A second set of experiments were conducted in smaller volumes, with the goal of further analyzing the mineral phase. In this case, 70 mL aliquots of medium were placed in 100 mL bottles. These bottles were sealed and sterilized as described above.

After sterilization, and immediately before inoculation, all the bottles were supplemented with 2-Line ferrihydrite (0.2 g  $L^{-1}$ ; Schwertmann and Cornell, 1991) and a filter sterilized amino acid solution (Kostka and Nealson, 1998). This buffered medium will be referred to as BpH7.

Also, two non-buffered culture media, here referred to as NBpH7 and NBpH8, were prepared by excluding PIPES buffer from BpH7. The pH of these two culture media was adjusted to pH 7 and pH 8, respectively, with a solution of  $NH_4OH$ . 70 mL volumes of NBpH7 and NBpH8 were dispensed into 100 mL bottles, sealed, sterilized and supplemented as described for BpH7.

### *2.1.3. Experimental procedure*

#### *2.1.3.1. L-experiments*

Eleven of the 12 Pyrex bottles containing 750 mL of medium were inoculated with 3.75 mL of *S. oneidensis* cell suspension. The remaining bottle served as a sterile control. Two replicate experiments were performed. The bottles were placed in the anaerobic chamber at 25 °C and 1 atm total pressure.

Out of the eleven inoculated bottles, a single bottle was opened at predetermined time intervals

during the experiment (0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56 h, 5, 10 and 30 days). For each bottle, solution pH, Eh, optical density at 625 nm ( $OD_{625}$ ),  $O_2$  pressure, ferrous iron ( $Fe^{2+}$ ) concentration and total iron concentration ( $Fe_T$ ) were measured.

Solids were recovered at the end of the experiment (30 days) from both the 1L Pyrex bottles and also from the five 70 mL bottles containing culture medium BpH7, inoculated with *S. oneidensis* and incubated under identical conditions to those detailed for the 1 L Pyrex bottles.

#### 2.1.3.2. UV- and FP- experiment

Both sets of experiments were run in 100 mL bottles, following the scheme detailed in Table 1. For each bottle containing BpH7, NBpH7 and NBpH8, the medium was supplemented with 700  $\mu$ L of a 142 mM  $FeCl_2$  solution as a source of  $Fe^{2+}_{(aq)}$  in the absence of bacterial metabolic activity. The 15 bottles constituting the UV-experiment were inoculated with 0.7 mL of UV-killed *S. oneidensis* culture, while the fifteen bottles in FP-experiment were inoculated with 0.7 mL of French press-killed *S. oneidensis* culture. As described in Table 1, sterile controls were prepared with additional variation, detailed as following: (a) six bottles (two for each medium: BpH7, NBpH7 and NBpH8), not supplemented with the  $FeCl_2$  solution; (b) twelve bottles (four for each medium: BpH7, NBpH7 and NBpH) supplemented with 700  $\mu$ L of  $FeCl_2$  solution. All these experiments were run at 25 °C for one month.

## 2.2. Inorganic magnetite experiments

Two types of experiments to produce inorganic magnetite were conducted, here referred as “aqueous experiments” and “BpH7 experiments”.

#### 2.2.1. Aqueous experiments

A  $NaHCO_3$ - $Na_2CO_3$  solution (25 mM/25 mM) was prepared using  $O_2$ -free deionized water (Milli-Q), prepared by boiling deionized water for 1 h, and then cooling in an ice bath while sparging with ultra pure  $N_2$  for 1 h. This  $NaHCO_3$ - $Na_2CO_3$  solution was placed into a container, which was sealed and quickly placed into the anaerobic chamber to keep it anoxic.  $Fe(ClO_4)_2$  was added to a final concentration of 25 mM. This solution had a pH of 6.95 and an Eh of -406 mV.

To reach the stability field for magnetite, calculated by using equations of Garrels and Christ (1990), different aliquots of  $O_2$ -free 10 M NaOH and 2.5 M  $FeCl_3$  were added to the starting solution until a pH value of 11.82 was reached ( Eh = -286.2 mV). All the chemicals were of reagent grade provided by Sigma Aldrich. The final solution was distributed into 1 L Pyrex bottles (filling each one

with 0.75 L). Those Pyrex bottles were kept for a month in the anaerobic chamber at 25 °C.

### 2.2.2. BpH7 experiments

Additional experiments were conducted to further elucidate the role of the sterile culture medium used on L-experiments on magnetite formation. Several 1L Pyrex bottles containing sterile culture medium BpH7 were prepared, amended with up to 25 mM  $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$  ( $E_h = -20$  mV) and, some of them, further added with different volumes of  $\text{O}_2$ -free 10 M NaOH and 2.5 M  $\text{FeCl}_3$  until a pH of 8.00 ( $E_h = -20$  mV) or pH = 10.18 were reached ( $E_h = -294$  mV). These experiments are here referred as BpH7 (pH= 7), BpH7 (pH= 8) and BpH7 (pH = 10.18), respectively.

The pH and  $E_h$  values of the different solutions were measured at the beginning and conclusion of each experiment in all types of experiments.

## 2.3. Analyses

### 2.3.1. Analyses of the culture medium

The pH and  $E_h$  values were measured using a portable Thermo Orion 250 A+ pH meter calibrated using NIST-traceable standard buffer solutions for slope correction (pH 4 and 7) and temperature compensation, while the calibration for  $E_h$  measurements was performed by using quinhydrone added to the standard buffer solutions at pH 4 and 7, according to the manufacturer's instructions. Based on repeated measurements, accuracy for pH and  $E_h$  was calculated at  $\pm 0.05$  and  $\pm 13$  mV ( $1\sigma$ ), respectively. The presence of  $\text{O}_2$  was quantified using a K-7759 CHEMets kit for dissolved oxygen. Aqueous ferrous cation ( $\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$ ) and total iron ( $\text{Fe}_{\text{T}(\text{aq})}$ ) were measured by using the 1,10-Phenanthroline method for  $\text{Fe}^{2+}$  and the Ferrover method for the  $\text{Fe}_{\text{T}(\text{aq})}$  (Hach, manufacturer's instructions) with a Hach DR 850 colorimeter. The analytical error for both analyses was  $\pm 1$   $\mu\text{M}$ .  $\text{Fe}^{3+}_{(\text{aq})}$  concentration was calculated as the difference between the measured values of  $\text{Fe}_{\text{T}(\text{aq})}$  iron and  $\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$ . Optical density at a wave length of 625 nm ( $\text{OD}_{625}$ ) was measured in L-experiments by using a Thermo Genesys 10 UV spectrophotometer.

### 2.3.2 Analyses of the solids

At the end of the experiments (30 days), the solution was vacuum-filtered (Buchi Vac 500) through a 0.45  $\mu\text{m}$  Millipore filter within the anaerobic chamber to avoid potential oxidation of the solid samples. Solids were collected and freeze-dried (FLEXI-DRY- $\mu\text{P}$ ). The mineralogy of the solids was determined by X-ray diffraction (XRD). Different fractions of each sample were analyzed by High

Resolution Transmission Electron Microscopy (HR-TEM), Raman spectroscopy, Thermogravimetric Analyses (TGA) and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR).

XRD analyses were performed using a single-crystal X-ray diffractometer equipped with an area detector (Bruker D8 SMART APEX, Germany). For each sample, a frame (or 2D diffraction pattern) was collected using the following experimental conditions: Mo K $\alpha$ , 50 kV, 30 mA, 0.5 mm collimator diameter and 30 s exposure times. Sample powders were analyzed in transmission mode. XRD2DScan software (Rodriguez-Navarro, 2006) was used to convert 2D diffraction patterns into regular powder  $2\theta$  linear scans. The benefits of employing the single-crystal diffractometer for XRD analyses are worth mentioning: this equipment uses Mo K $\alpha$  instead of Cu K $\alpha$  radiation, reducing the fluorescence produced by iron rich minerals and substantially improving the signal to noise ratio in the resultant diffractograms. Additionally, the use of a small collimated beam and a highly sensitive CCD area detector allows measurement of very small samples (< 1 mg), important in these types of experiments where the amount of sample is limited.

The microscope used for HR-TEM analyses was a Philips CM20, equipped with Energy Dispersive X-ray Microanalysis (EDAX). Those analyses allowed the study of the morphology of the solids, the d-spacing [determined from selected area electron diffraction (SAED)] and the gross chemical composition of individual crystals. For HR-TEM analyses, samples were fixed with glutaraldehyde and post-fixed with osmium tetroxide. For biotic experiments, samples were also stained with uranyl acetate. Afterwards, the sample was dehydrated with ethanol, and embedded in Embed 812. Ultrathin sections (50-70 nm) were prepared (Reicher Ultracut S microtome, DIATOME diamond blade). The samples were placed in copper grids and carbon coated.

Raman analyses (Kaiser HoloSpec, with a He-Ne 632.8 nm laser interfaced with a Nikon Eclipse E600 microscope) were run on  $\approx 1$  mg of sample. Spectra were collected over a 100-3800  $\text{cm}^{-1}$  range at a spectral resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$ . Since the samples were highly thermolabile, very low laser power (0.4 mW) and a long acquisition time was used (3 min). Nevertheless, spectra showed a very low intensity and a small noise to signal ratio. Spectra were taken at several different points from each sample to check their consistency.

Solid samples used for TGA were further washed with 10% SDS three times to remove cells and other organic materials. This separation was carried out by centrifugation at 6000 rpm for 10 min, and then suspending the pellet in O<sub>2</sub>-free water. The washed samples were freeze-dried. TGA (SHIMADZU



model TGA-50H) was run on  $\approx 10$  mg of solid, by heating the sample in an alumina cell under  $N_2$  atmosphere, at a rate of  $20\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  up to a final temperature of  $950\text{ }^\circ\text{C}$ . The gases evolved during the decomposition of the solid were as well analyzed.

FT-IR analyses were performed on an IR200 spectrometer (Thermo-Nicolet) with a spectral resolution of  $4\text{ cm}^{-1}$  and 128 scans. Prior to FT-IR analysis, precipitates were pressed into KBr pellets (3 mg of magnetite + 95 mg of KBr). To further determine if there was organic matter occluded within magnetite crystals, a subsample of magnetite collected from L-experiments was treated with a 5 % NaOH solution overnight, washed with deionised water and centrifuged several times, in order to remove any absorbed organic matter. FT-IR analyses were performed in samples collected from L-experiments, both unwashed and washed with NaOH.

### **3. RESULTS**

#### **3.1. L-experiments**

##### *3.1.1. Chemical evolution of the culture medium*

Chemical measurements of the two replicates show identical trends, although the absolute values at each time interval are different. The exact values at each time point are not equivalent for several reasons: (1) they are greatly dependent on the size of the inoculum and the initial chemistry of the culture medium; (2) the measurements are performed at discrete time points (non-continuous) and (3) there are, at least, two mechanisms with opposite effects on the evolution of  $Fe^{2+}_{(aq)}$  and  $Fe^{3+}_{(aq)}$  (discussed below) so the values at each time point would be the net result of the competitive rates of these two mechanisms. Therefore, the values at each time point do not provide any relevant information. However, important information can be extracted from the trends in the evolution of chemical parameters, which are reproducible in all the replicas. Therefore, for simplicity, data of only one of the replicates are explained in the present paper (Table 2a).

The pH of the culture medium varied between 6.40-6.97 over the time course

experiment (Table 2a), having a unique excursion of 6.14 at 48 h. An Eh value of around 20 mV was measured at the beginning of the experiment and then decreased throughout the experiment, to a minimum value of -258.1 mV at the conclusion of the experiment. The decreasing trend in Eh was interrupted at 48 h, where Eh values increased to 48.8 mV. OD<sub>625</sub> was hardly measurable during the first 48 h, while no absorbance was measure then after, probably because most of the cells are attached to the ferrihydrite. Fe<sub>T(aq)</sub> increased during the first 40 h from 35 μM to 164 μM, and then fluctuated within the 73-168 μM range. It was 135 μM at the end of the experiment (Table 2a; Fig. 2). Fe<sup>2+</sup><sub>(aq)</sub> showed an increase from 0.9 μM to 47 μM up to 40 h, and then fluctuated within the range 2-35 μM. It decreased until the end of the experiment, where it reached a concentration of 33 μM (Fig. 2). Finally, Fe<sup>3+</sup><sub>(aq)</sub> concentration increased from 34 μM to a maximum value of 137 μM at 32 h. Then it fluctuated within the range 70 to 133 μM and stabilized at 102 μM by the end of the experiment (Fig. 2).

### 3.1.2. Analysis of the Solids

XRD diffractograms showed characteristic peaks of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Significant peak broadening was observed due to the nanocrystalline nature of the precipitate. Lepidocrocite (γ-FeO(OH)) was also detected during the initial stages of the experiment, while only Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> was detected at the end of the experiment.

HR-TEM-EDAX analyses showed Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> crystals with an average size of 40-50 nm (Fig. 3), within the single-domain size range. The observed sections were rectangular, rhombic, hexagonal and spherical in shape (Fig. 3a,c and e), corresponding to euhedral crystals with prismatic, cubic and rhombic forms. SAED analyses of crystals showed typical d-spacings for magnetite, confirming the mineralogy of the precipitate. EDAX analyses of more than thirty crystals showed that the chemical composition of those crystals was Fe and O, but S and P were also detected (Figs. 3d and f). The

presence of Cu (Cu grid) and Si (detector) were also observed. Note that individual crystals were separated by poorly electron absorbing material (Fig. 3b).

Raman analyses of the *S. oneidensis* biologically induced magnetites showed very similar spectra (Fig. 4). The spectrum shows the characteristic oxide peaks at a shift of  $700\text{ cm}^{-1}$ . However, this peak is both broader and less intense than the same peak observed in inorganic magnetite samples, indicating that biologically induced magnetite was generally less crystalline. The magnetite peak is shifted toward higher frequencies in this magnetite induced by *S. oneidensis* compared to that of inorganic magnetite.

TGA analyses of *S. oneidensis*-induced magnetite show two marked mass loss events, which can be attributed to organic matter combustion (Fig. 5a). The first mass loss occurred within the range of  $100\text{-}280\text{ }^{\circ}\text{C}$ , constituting about 5% of the initial sample mass. Analysis of the gases showed the presence of both  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{CO}_2$  (Fig. 5b). A second important mass loss event was observed in the  $250\text{-}550\text{ }^{\circ}\text{C}$  range. In this case, the sample lost an additional 20% of its mass. The evolved gas at this temperature range was  $\text{CO}_2$ . The two mass loss events are due to the thermal decomposition of absorbed (first loss event) and intra-crystalline (second loss event) organic matter (Fig. 5b). Remarkably  $\text{CO}_2$  evolution from the sample was detected up to  $750\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

FT-IR spectra of the solid showed a peak at  $588\text{ cm}^{-1}$  (Fig. 6). This peak is characteristic of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  though it is shifted to a slightly higher wavenumber compared to that of inorganic magnetites (typically  $570\text{ cm}^{-1}$ ). Additional peaks at  $890$  and  $790\text{ cm}^{-1}$  were also present in both inorganic and biogenic magnetite samples. FT-IR spectra of L-samples showed additional bands at  $1533$  and  $1637\text{ cm}^{-1}$  typical of amide groups (Fig. 6). Interestingly, these bands are preserved even after treating magnetite samples with NaOH solution overnight and extensive washing. This suggests that the organic

component is occluded within the crystals.

### **3.2. UV- and FP-experiments**

XRD of solids collected from both UV- and FP-experiments indicated that they were Fe<sup>3+</sup> oxides. No magnetite was found in any of the UV- or FP-experiments. Therefore, the formation of magnetite seems to require the presence of metabolically active bacteria.

### **3.3. Inorganic experiments**

Only magnetite precipitation was detected in aqueous experiments and in inorganic BpH7 experiments at a pH value of 10.18 (Eh = -294 mV), while Fe<sup>3+</sup>-bearing solids were observed to precipitate in inorganic BpH7 experiments at pH values of 7 and 8 (Eh = -20 mV). These results are consistent with observations of Zachara et al. (2002), who stated that ferrihydrite was unstable with respect to magnetite under anoxic conditions, once the pH-Eh requirements for the stability field of magnetite were met. Under less reducing conditions (such as those in inorganic BpH7 experiments at pH values of 7 and 8) ferrihydrite was metastable with respect to Fe<sup>3+</sup> oxides.

The precipitation of magnetite was substantial in inorganic aqueous and inorganic BpH7 (pH = 10.18) experiments. The pH of the aqueous experiments increased from 7.64 at the beginning to 11.82 at the end. Similarly, the pH of the inorganic BpH7 experiment at pH 10.18 also increased from 10.18 to 11.67. However, inorganic BpH7 experiment at pH values of 7 and 8 remained largely unchanged at the conclusion of the experiment (Table 2b).

The X-ray diffractograms of solids collected in both aqueous and inorganic BpH7 experiment (pH = 10.18) show well defined peaks at the characteristic  $2\theta$  angles

of magnetite, indicating the precipitate to be a pure, well crystallized magnetite. Analysis by HR-TEM showed crystals with an average size ranging from 200 to 400 nm (Figs. 7a,b,c,e and f). Poorly crystalline Fe oxide bars were also observed (Fig. 7d). No differences in morphology were detected between inorganic magnetite from aqueous experiments and BpH7 (pH= 10.18) magnetite. These morphologies were also identical to those induced by *S. oneidensis*. The 2D crystal sections were rectangles, rhombuses, hexagons and spherulites. EDAX analyses of the crystals showed the presence of Fe and O. No S or P was detected in any of the analyzed samples. Raman spectra of the two types of samples clearly show only the characteristic peak for magnetite ( $670\text{ cm}^{-1}$ ). However, magnetite precipitated in inorganic BpH7 experiment (pH = 10.18) is slightly less crystalline than the magnetite precipitated in aqueous experiments, since the oxide peak of the latter shows a narrower Lorentzian shape (Fig. 4).

TGA analyses of the magnetite formed in aqueous experiments showed a first mass loss within the 100-300 °C range, during which the sample lost about 5% of its initial mass (Fig. 5a). Within the range 300-400 °C, the sample underwent an additional 1 % mass reduction. Analysis of evolved gasses in this case indicated the presence of only H<sub>2</sub>O associated to both events. Similarly, the inorganic magnetite from BpH7 experiment (pH = 10.18) showed a mass loss of approximately 8% up to 400°C, stabilizing thereafter (Fig. 5a). The analysis of evolved gases within the first temperature range showed an initial release of H<sub>2</sub>O and, almost simultaneously, a small amount of CO<sub>2</sub> (Fig. 5c). Since no organics were detected within the mineral structure by FT-IR and/or HR-TEM-EDAX, and no changes were observed by Raman, such a CO<sub>2</sub> release is probably associated to the combustion of the adsorbed organics present in the culture medium.

FT-IR spectra of the solids, both aqueous and inorganic BpH7 experiment (pH =

10.18), show only the characteristic peaks of magnetite at  $570\text{ cm}^{-1}$  (Fig. 6).

## 4. DISCUSSION

### 4.1. Role of *S. oneidensis* in magnetite precipitation

Bacterially induced mineralization of different biominerals has been reported to occur as a result of both active and passive mechanisms by a considerable number of studies. Active mechanisms refer to mineral formation as a result of chemical changes in the environment caused by bacterial metabolic activity; passive mechanisms refer to the formation of minerals mediated by bacterial wall, cell membranes and/or cell debris, which act as nuclei for crystallization (Fortin and Beveridge, 2000; Southam, 2000).

Changes in the culture medium chemistry observed during the time course experiments provide evidence regarding passive mechanisms occurring during precipitation of magnetite induced by *S. oneidensis*. Since the sole initial source of iron is the solid ferrihydrite,  $\text{Fe}_{\text{T(aq)}}$  increases during the initial stages (Fig. 2) result from dissolution of ferrihydrite, releasing ferric iron into solution. Under anoxic conditions, and once this  $\text{Fe}^{3+}_{\text{(aq)}}$  is available, *S. oneidensis* can use such a cation as a terminal electron acceptor, producing  $\text{Fe}^{2+}_{\text{(aq)}}$ . Therefore, the concentration of  $\text{Fe}^{2+}_{\text{(aq)}}$  increases over time at these earlier stages,  $\text{Fe}^{2+}_{\text{(aq)}}$  being measurable after 40h (Table 2a). At these early stages (up to 32 h), the concentration of aqueous  $\text{Fe}^{3+}_{\text{(aq)}}$  increases as a consequence of the continued dissolution of ferrihydrite, and therefore the dissolution rate of such ferrihydrite was higher than the rate at which bacteria were utilizing  $\text{Fe}^{3+}_{\text{(aq)}}$  as an electron acceptor. Once  $\text{Fe}^{2+}_{\text{(aq)}}$  reaches a critical concentration, the system becomes supersaturated with respect to magnetite, initiating precipitation. This precipitation is observed as a decrease in the concentration of  $\text{Fe}^{2+}_{\text{(aq)}}$ , noticeable within 40-48 h. This observation is confirmed by the Eh values, which increase during this

time interval due to the consumption of  $\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$ .

Fluctuations in  $\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$  observed later, could be due either to further dissolution-precipitation events of the previously formed solid, or to an increase in bacterial reduction capacity coupled to an increase in the size of the bacterial population. Our hypothesis is that dissolution-precipitation phenomena did occur after 48 h. In fact, dissolution-reprecipitation of previously formed solids is commonly observed when crystals precipitate from supersaturated solutions (Ogino et al., 1987; Jimenez-Lopez et al., 2004). Such a phenomenon may be caused either by dissolution of metastable phases giving rise to more stable (Ostwald Step Rule; Morse and Casey, 1988), or by dissolution of smaller crystals in favor of the formation of more stable bigger ones (Ostwald Ripening Process; Morse and Casey, 1988). Both processes may have occurred in our experiments. In fact, a less stable phase than magnetite (lepidocrocite) was detected together with magnetite at intermediate time intervals, but was not detected at the latter stages of the experiment. Dissolution of small crystals following the Ostwald Ripening Process may have also occurred, since crystals with different sizes were observed by HR-TEM. This observation dismisses “size” as a discriminating factor between inorganic and *S. oneidensis*-induced magnetites.

Another important consideration is that, according to our results, passive mechanisms alone are insufficient to induce magnetite precipitation, since no magnetite formation was detected under the test conditions when *S. oneidensis* was not alive (UV- and FP-experiments). The presence of living bacterium appears to be a prerequisite for magnetite precipitation. The results from inorganic experiments show that magnetite precipitation only occurs when the pH values and  $\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$  concentrations are higher than those of the bulk culture medium used in L-experiments. Therefore, the presence of metabolically active *S. oneidensis* may serve to create localized areas where high pH

and  $\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$  levels are attained, allowing precipitation of magnetite in those areas. Firstly, and in the context of pH values, the potential pH increase would be noticeable in the environment surrounding the bacterium, although it may not affect the bulk pH in a buffered medium. Although there is no experimental evidence of this local rise of the pH value, since such a measurement in the environment of a single cell is technically impossible, such a hypothesis is consistent with the model proposed by Zachara et al. (2002) for the formation of magnetite by DIRBs as a result of the bioreduction of ferrihydrite. These authors proposed that magnetite precipitation would occur if there was a moderate flux of  $\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$  from the cell to the surrounding medium while meeting a pH gradient, being the pH values maxima at the cell wall and decreasing moving toward the bulk culture medium. Our results show an increase on the pH value of the culture medium in L-experiments that was not detected in FP- or UV-experiments. However, such an increase cannot be attributed only to bacterial metabolic activity, but also to the process of magnetite precipitation itself, since such an increase is also observed in the inorganic experiments where magnetite precipitated. Therefore, in our experimental measurements, the effects on the pH of bacterial metabolic activity and magnetite precipitation could not be disentangled.

Secondly, and related to  $\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$ , it has been demonstrated that the negatively charged structures (i.e. cell walls, membranes, debris and other organics) attract cations (Fowle and Fein, 2001; Rodriguez-Navarro et al., 2003, 2007; Van-Lith et al., 2003; Bazylinski et al., 2007; Neal et al., 2007; Gonzalez-Muñoz et al., 2008). Thus, concentration of  $\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$  and  $\text{Fe}^{3+}_{(\text{aq})}$  are expected to increase locally in these specific areas, increasing the local supersaturation with respect to magnetite, thus allowing the precipitation of such a phase. At the same time, no precipitation would occur in the bulk culture medium, since the Eh-pH conditions do not fall within the expected stability



field for magnetite.

In UV- and FP-experiments, in the absence of bacterial metabolic activity, there was no localized pH rise (Table 2b). Although cell walls (UV-experiments) and cell debris (FP-experiments) probably concentrated  $\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$  and  $\text{Fe}^{3+}_{(\text{aq})}$  at their negatively charged areas, that was not enough supersaturation to induce magnetite precipitation.

#### **4.2. Differences between *S. oneidensis* Mediated Magnetite and Inorganic Magnetite**

According to our results, morphology is a poor candidate to differentiate between inorganic and *S. oneidensis*-induced magnetite since the observed 2D section morphologies of magnetite fractions collected from experiments of both origins were similar. This observation concurs with earlier conclusions (i.e. Thomas-Keprta et al., 2000; Bazylinski et al., 2007). There was, in fact, a remarkable variation in crystal size: inorganically produced magnetite crystals are typically larger than bacterially induced crystals. However, such a difference cannot be considered a candidate to differentiate between inorganic and *S. oneidensis*-induced magnetites, since the size of crystals depends on a variety of factors including supersaturation, time of growth, dissolution-reprecipitation phenomena (Garside, 1982) and the pH of the surrounding medium (Jolivet et al., 1997). For instance, it has been observed that as pH increases from 9 to 12, particle size is reduced from 12 to 2 nm, at ionic strengths ranging from 0.5 to 3 M (Vayssières et al., 1998).

TGA analyses show markedly different thermal behaviour for magnetites of different origin. Biologically-induced crystallites lost about 25% mass during the heating process in the two events above mentioned. On the contrary, inorganic magnetites lost 6% and 8% of its mass. In the case of *S. oneidensis*-induced magnetites,

thermal decomposition of the solid resulted in release of CO<sub>2</sub>, suggesting the presence of organic inclusions. The two mass loss events are interpreted to be due to the presence of adsorbed (first loss event) and occluded organics (second loss event) in the mineral. The former organic matter is typically lost at lower temperatures than the later one (Zaremba et al., 1998). The presence of substantial amounts of intra-crystalline occluded organic matter is further confirmed by the presence of amide absorption bands in FT-IR spectra, even when magnetite was treated with NaOH and washed extensively to remove adsorbed organic matter. This indicates that organic matter is incorporated during crystal growth. These amide peaks are not present in the inorganic magnetites, neither aqueous nor inorganic BpH7 experiment (pH = 10.18), and are a distinctive feature of the bacterially induced magnetite.

Interestingly, Raman spectroscopy also shows marked differences between the two magnetites with different origin (Fig. 4). The spectra indicate the structure and crystallinity of these two magnetites are quite different. More specifically, biogenic magnetites were less crystalline than inorganic ones, indicated by the line broadening and reduced intensity of the 660 cm<sup>-1</sup> peak observed for the biogenic magnetite. The crystal structure is altered, possibly due to the incorporation of organic matter. Such incorporation may also account for the shift in the magnetite peak from 570 cm<sup>-1</sup> (inorganic magnetite) to 588 cm<sup>-1</sup> (biogenic-magnetite) and the peak broadening observed in FT-IR spectra (Fig. 6). Interestingly, no changes in the spectra were observed when magnetite grew in a sterile culture medium containing organics, indicating no organic incorporation within magnetite structure.

It has been shown that cell structures, cell debris or even by-products of bacterial metabolism not only act as nuclei for the precipitation of biominerals, but become incorporated within the crystal structure to quite significant amounts. This

conclusion is based on analysis of vaterite ( $\text{CaCO}_3$ ) induced by *Myxococcus xanthus* when compared to vaterite obtained inorganically from solution (Rodriguez-Navarro et al., 2007). Incorporation of organics within the vaterite crystal structure modifies the structure, stabilizing the mineral. The weakly electron adsorbent material separating magnetite crystals observed in *S. oneidensis*-induced magnetite may be organics identified by FT-IR and TGA analysis. This is consistent with EDAX analyses that show the presence of phosphorous and sulfur in these samples (Fig. 3d and f). These elements are common components of bacterial extracellular polymeric substances and cell walls (e.g. proteins containing sulfur aminoacids, phospholipids). These organics can transform and remain within the crystal during long periods of time, even under harsh environmental conditions. For instance, lipids and structural biopolymers are known for their overall recalcitrance under harsh environmental conditions (Engel and Macko, 1993). In particular, some lipids are known to be stable over billion year timescales when buried in the subsurface and isolated from oxygen (Eglinton et al., 1964; Summons et al., 1988; Brocks and Summons, 2003). In fact, lipids are the biomarkers most commonly used to study and reconstruct terrestrial ecosystems. Moreover, other organics can survive over extended periods of time and can be recognized in fossils and used as biomarkers (organic material in paleozoic microfossils: Igisu et al., 2009; terpenoids: Simoneit et al., 2007; carotenoids, chlorophyll and a chlorophyll-like compound: Jorge-Villar et al., 2007). Nevertheless, and although more work is needed to determine whether or not the incorporation of organics into BIM minerals is universal, both this incorporation and the corresponding alteration in the mineral structure could be considered as a biosignature. Therefore, it is not only the presence of organics within the crystals what could be used to recognize

biological origin, but also, the changes in the mineral structure that the incorporation of those organics would have caused.

## 5. CONCLUSIONS

The precipitation of *S. oneidensis*-induced magnetites occurs by a combination of passive and active mechanisms and, therefore requires the presence of a metabolically active bacterial population that induces local pH increases surrounding the cells and local rises of  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$  at the negatively charged areas in the cell wall, cell structures and/or cell debris. The conjunction of all these factors creates local supersaturated conditions that induce the precipitation of magnetite.

Organic matter becomes incorporated in spectroscopically substantial amounts into the crystal structure of *S. oneidensis*-induced magnetites, modifying the crystal structure compared to inorganic magnetites. This change in the mineral structure and the presence of organic matter are detected by Raman and FT-IR analyses and may be candidate biomarkers to identify the biogenic origin of natural magnetites.

## Acknowledgments

This work was supported by Spanish Ministerio de Educación y Ciencia grant BES2005-9130, CGL2004-03910 and CGL2007-63859 projects. Rothamsted Research is an institute of the United Kingdom Biotechnology and Biological Sciences Research Council. The personnel of the Centro de Instrumentación Científica (CIC; Granada University) assisted with the TGA/DSC and HR-TEM, EDAX and SAED analyses. We thank C. Romanek and M. T. Gonzalez-Muñoz for their suggestions and advice. C. Romanek also provided the Coy Chamber used in these experiments. We also thank C.

Valverde Tercedor for help in the laboratory and J. Santamarina Urbano for XRD analyses. We also thank the comments of three anonymous referees that have greatly improved the manuscript.

## References

- Bazylinski D.A. and Schubbe S. (2007) Controlled Biomineralization by and Applications of Magnetotactic Bacteria *Adv. Appl. Microbiol.* **62**, 21-62.
- Bazylinski D.A., Frankel R.B. and Konhauser K.O. (2007) Modes of biomineralization of magnetite by microbes. *Geomicrobiol. J.* **24**, 465-475.
- Bazylinski D.A., Garratt-Reed A.J. and Frankel R.B. (1994) Electron microscopic studies of magnetosomes in magnetotactic bacteria. *Microsc. Res. Techniq.* **27**, 389-407.
- Beveridge T.J. and Murray R.G.E. (1980) Sites of metal deposition in the cell walls of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **141**, 876-887.
- Brocks J.J. and Summons R.E. (2003) Treatise on Geochemistry. D.H.a.K.K.T. Heinrich, Pergamon, Oxford.
- Caccavo Jr. F., Blakemore R.P. and Lovley D.R. (1992) A hydrogen-oxidizing, Fe(III)-reducing microorganism from the Great Bay estuary, New Hampshire. *Appl. Environ. Microbiol.* **58** (10), 3211-3216.
- Cummings D.E., Caccavo Jr. F., Spring S. and Rosenzweig R.F. (1999) *Ferribacterium limneticum*, gen. nov., sp. nov., a Fe(III)-reducing microorganism isolated from mining-impacted freshwater lake sediments. *Arch. Microbiol.* **171**, 183-188.
- Devouard B., Pósfai M., Hua X., Bazylinski D.A., Frankel R.B. and Buseck P.R. (1998) Magnetite from magnetotactic bacteria: Size distributions and twinning. *Am. Mineral.* **83**, 1387-1398.
- Eglinton G., Scott P.M., Besky T., Burlingame A.L. and Calvin M. (1964) Hydrocarbons of biological origin from a one-billion-year-old sediments. *Science.* **145**, 263-264.
- Engel M.H. and Macko S.A. (1993) Org. Geochem. Principles and Applications. Plenum Press, New York.
- Faivre D. and Zuddas P. (2006) An integrated approach for determining the origin of magnetite nanoparticles. *Earth Planet SC Lett.* **243** (1/2), 53-60.
- Fein J.B. (2000) Quantifying the effects of bacteria on adsorption reactions in water-rock systems. *Chem. Geol.* **169**, 265-280.
- Fortin D. and Beveridge T.J. (2000) Mechanistic routes to biomineral surface development. Biomineralization: From Biology to Biotechnology and Medical Application. Baeuerlein E., Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Fowle D.A. and Fein J.B. (2001) Quantifying the effects of *Bacillus subtilis* cell walls on the precipitation of copper hydroxide from aqueous solution. *Geomicrobiol. J.* (18), 77-91.
- Fredrickson J.K., Zachara J.M., Kennedy D.W., Dong H., Onstott T.C., Hinman N.W. and Li S-M. (1998) Biogenic iron mineralization accompanying the dissimilatory reduction of hydrous ferric oxide by a

- groundwater bacterium. *Geochim. Cosmochim. Acta.* **62** (19/20), 3239-3257.
- Garrels R.M. and Christ C.L. (1990) *Solutions, Minerals and Equilibria*. Jones and Bartlett, Boston.
- Garside J. (1982) *Biological Mineralization and Demineralization*. Nancollas GH. Springer-Verlag, Berlin.
- Gonzalez -Muñoz M.T., De-Linares C., Martinez-Ruiz F., Morcillo F., Martin-Ramos D. and Arias J.M. (2008) Ca–Mg kutnahorite and struvite production by *Idiomarina* strains at modern seawater salinities. *Chemosphere*, **72**, 465-472.
- Igisu M., Ueno Y., Shimojima M., Nakashima S., Awramik S.M., Ohta H. and Maruyama S. (2009) Micro-FTIR spectroscopic signatures of Bacterial lipids in Proterozoic microfossils. *Precambrian Research*, **173**(1-4), 19-26.
- Jimenez-Lopez C., Romanek C.S., Huertas F.J., Ohmoto H. and Caballero E. (2004) Oxygen isotope fractionation in synthetic magnesian calcite *Geochim. Cosmochim. Acta.* **68**(16), 3367-3377.
- Johnson D.B. and Hallberg K.B. (2003) The microbiology of acidic mine waters. *Res. Microbiol.* **154** (7), 466-473.
- Jolivet J.P., Vayssières L., Chaneac C. and Tronc E. (1997) Precipitation of spinel iron oxide: nanoparticle size control. *Materials Research Society Symposium – Proceedings*, **432**, 145-150.
- Jorge-Villar S.E., Benning L.G., Edwards H.G.M. and AMASE team (2007) Raman and SEM analysis of a biocolonised hot spring travertine terrace in Svalbard, Norway. *Geochemical Transactions* **8**, 8. doi:10.1186/1467-4866-8-8.
- Kostka J.E. and Nealson K.H. (1998) Isolation, cultivation and characterization of iron- and manganese-reducing bacteria. *Techniques in Microbial Ecology*, Oxford University Press.
- Kukkadapu R.K., Zachara J.M., Fredrickson J.K., McKinley J.P., Kennedy D.W. I., Smith S.C. and Dong H. (2006) Reductive biotransformation of Fe in shale-limestone saprolite containing Fe(III) oxides and Fe(II)/Fe(III) phyllosilicates. *Geochim. Cosmochim. Acta.* **70**(14), 3662-3676.
- Kukkadapu R.K., Zachara J.M., Fredrickson J.K. Kennedy, D.W.I., Dohnalkova A.C. and McCready D.E. (2005) Ferrous hydroxy carbonate is a stable transformation product of biogenic magnetite. *American Mineralogist*, **90**(2-3), 510-515.
- Kukkadapu R.K., Zachara J.M., Fredrickson J.K. and Kennedy D.W.I. (2004). Biotransformation of two-line silica-ferrihydrite by a dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium: Formation of carbonate green rust in the presence of phosphate.. *Geochim. Cosmochim. Acta.* **68**(13), 2799-2814.
- Kusel K. (2003) Microbial cycling of iron and sulfur in acidic coal mining lake sediments. *Water, Air Soil Poll.*

**3 (1)**, 67-90.

- Lovley D.R. (1997) Microbial Fe(III) reduction in subsurface environments. *FEMS Microbiol. Rev.* **20**, 305-313.
- Lovley D.R., Chapelle F.H. and Phillips E.J.P. (1990) Fe(III)-reducing bacteria in deeply buried sediments of the Atlantic Coastal Plain. *Geology*. **18(10)**, 954-957.
- Morse J. W. and Casey W. H. (1988) Ostwald processes and mineral paragenesis in sediments. *Am. J. Sci.* **288**, 537-560.
- Myers C.R. and Neelson K.H. (1988) Microbial reduction of manganese oxides: Interactions with irons and sulphur. *Geochim. Cosmochim. Acta.* **52(11)**, 2727-2732.
- Neal A.L., Dublin S.N., Taylor J., Bates D.J., Burns J.L., Apkarian R. and DiChristina T.J. (2007) Terminal electron acceptors influence the quantity and chemical composition of capsular exopolysaccharides produced by anaerobically growing *Shewanella* spp. *Biomacromolecules*. **8**, 166-174.
- Neal A.L., Rosso K.M., Geesey G.G., Gorby, Y.A. and Little B.J. (2003) Surface structure effects on direct reduction of iron oxides by *Shewanella oneidensis*. *Geochim. Cosmochim. Acta.* **67(23)**, 4489-4503.
- Ogino T., Suzuki T. and Sawada K. (1987) The formation and transformation mechanism of calcium carbonate in water. *Geochim. Cosmochim. Acta.* **51**, 2757-2767.
- Peters K.E., Walters C.C. and Moldowan J.M. (2005) *The Biomarker Guide*. Cambridge University Press.
- Rodriguez-Navarro A. (2006) XRD2DScan: new software for polycrystalline materials characterization using two-dimensional X-ray diffraction. *J. Appl. Crystallogr.* **39**, 905-909.
- Rodriguez-Navarro C., Jimenez-Lopez C., Rodriguez-Navarro A., Gonzalez-Muñoz M.T. and Rodriguez-Gallego M. (2007) Bacterially mediated mineralization of vaterite. *Geochim. Cosmochim. Acta.* **71**, 1197-1213.
- Rodriguez-Navarro C., Rodriguez-Gallego M., Ben Chekroun K. and Gonzalez-Muñoz M.T. (2003) Conservation of Ornamental Stone by *Myxococcus xanthus*-Induced Carbonate Biomineralization *Appl. Environ. Microbiol.* **69(4)**, 2182-2193.
- Roh Y., Gao H., Vali H., Kennedy D.W., Yang Z.K., Gao W., Dohnalkova A.C., Stapleton R.D., Moon J.W., Phelps T.J., Fredrickson J.K. and Zhou J. (2006) Metal Reduction and Iron Biomineralization by a Psychrotolerant Fe(III)-Reducing Bacterium, *Shewanella* sp. Strain PV-4. *Appl. Environ. Microbiol.* **72(5)**, 3236-3244.
- Schuler D. (2008). Genetics and cell biology of magnetosome formation in magnetotactic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 654-672.



- Schwertmann U. and Cornell R.M. (1991) *Iron Oxides in the Laboratory*. Wiley-VCH.
- Simoneit B.R.T., Otto A. and Wilde V. (2007) Novel phenolic biomarker triterpenoids of fossil laticifers in Eocene brown coal from Geiseltal, Germany. *Organic Geochemistry*. **34**, 121–129.
- Sokolova T., Hanel J., Onyenwoke R.U., Reysenbach A.-L., Banta A., Geyer R., González J. M., Whitman W. B. and Wiegel J. (2007) Novel chemolithotrophic, thermophilic, anaerobic bacteria *Thermolithobacter carboxydivorans* sp. nov. *Extremophiles*. **11**, 145-147.
- Southam G. (2000) Bacterial surface-mediated mineral formation. Environmental Microbe-Mineral Interactions. Lovley ASM Press, Washington DC.
- Sparks N.H.C., Mann S., Bazylinski D.A., Lovley D.R., Jannasch, H.W. and Frankel R.B. (1990) Structure and morphology of magnetite anaerobically-produced by a marine magnetotactic bacterium and a dissimilatory iron-reducing bacterium. *Earth Planet SC Lett.* **98**, 14-22.
- Summons R.E., Powell T.G. and Boreham C.J. (1988) Petroleum geology and geochemistry of the Middle Proterozoic McArthur Basin, Northern Australia: III. Composition of extractable hydrocarbons *Geochim. Cosmochim. Acta*. **52**, 1747-1763.
- Thomas-Keprta K.L., Bazylinski D.A., Kirschvink J.L., Clemett S.J., McKay D.S., Wentworth S.J., Vali H., Gibson Jr. E.K. and Romanek C.S. (2000) Elongated prismatic magnetite crystals in ALH84001 carbonate globules: Potential Martian magnetofossils. *Geochim. Cosmochim. Acta*. **64(23)**, 4049-4081.
- Vali H., Weiss B., Li Y.-L., Sears S.K., Soon S.K., Kirschvink J.L., and Zhang C.L. (2004) Formation of tabular single-domain magnetite induced by *Geobacter metallireducens* GS-15. *PNAS*. **101(46)**, 16121-16126.
- Van-Lith Y., Warthmann R., Vasconcelos C. and McKenzie J.A. (2003) Microbial fossilization in carbonate sediments: a result of bacterial surface involvement in dolomite precipitation. *Sedimentology*. **50**, 237–245.
- Vayssières L., Chanéac C., Tronc E. and Jolivet J.P. (1998) Size Tailoring of Magnetite Particles Formed by Aqueous Precipitation: An Example of Thermodynamic Stability of Nanometric Oxide Particles. *J. Colloid Interf. Sci.* **205**, 205-212.
- Venkateswaran K., Moser D.P., Dollhopf M.E., Lies D.P., Saffarini D.A., MacGregor B.J., Ringelberg D.B., White, D.C., Nishijima M., Sano H., Burghardt J., Stackebrandt E. and Nealson K.H. (1999) Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *Int. J Syst. Bacteriol.* **49**, 705-724.
- Ye Q., Roh, Y., Carroll S.L., Blair B., Zhou J., Zhang, C.L. and Fields M.W. (2004) Alkaline Anaerobic Respiration: Isolation and Characterization of a Novel Alkaliphilic and Metal-Reducing Bacterium. *Appl.*

*Environ. Microbiol.* **70**(9), 5595-5602.

Zachara J.M., Kukkadapu R.K., Fredrickson J.K., Gorby Y.A. and Smith S.C. (2002) Biomineralization of Poorly Crystalline Fe(III) Oxides by Dissimilatory Metal Reducing Bacteria (DMRB). *Geomicrobiol. Journal.* **19**, 179-207.

Zaremba C. M., Morse D. E., Mann S., Hansma, P. H. and Stucky G. D. (1998) Aragonite-hydroxyapatite conversion in gastropod (abalone) nacre. *Chem. Mater.* **10**, 3813-3824.

Zavarzina D. G., Kolganova T. V., Boulygina E. S., Kostrikina N. A., Tourova T. P. and Zavarzin G. A. (2006) *Geoalkalibacter ferrihydriticus* gen. nov. sp. nov., the First Alkaliphic Representative of the Family *Geobacteraceae*, Isolated from a Soda Lake. *Microbiology.* **75**(6), 673-682.

Zhang C. L., Liu S., Phelps T. J., Cole D. R., Horita J., Fortier S. M., Elless M. and Valley J. W. (1997) Physiochemical, mineralogical, and isotopic characterization of magnetite-rich iron oxides formed by thermophilic iron-reducing bacteria. *Geochim. Cosmochim. Acta.* **61**, 4621-4632.

Zhang C., Vali H., Romanek C.S., Phelps T.J. and Liu S.V. (1998) Formation of single-domain magnetite by a thermophilic bacterium. *Am. Mineral.* **83**, 1409-1418.

## TABLE CAPTIONS

**Table 1.** Number of bottles prepared under each experimental condition in UV- and FP-experiments.

Culture medium	UV-experiments	FP-experiments	Controls	
			Sterile, without FeCl <sub>2</sub>	Sterile, with FeCl <sub>2</sub>
<b>BpH 7</b>	5	5	2	4
<b>NBpH 7</b>	5	5	2	4
<b>NBpH 8</b>	5	5	2	4

**Table 2a)** L-experiments: experimental values measured in the culture medium during the time course experiment. Only data for a representative experiment is shown.

<b>Time</b>	<b>pH</b>	<b>Eh(mV)</b>	<b>OD<sub>625</sub> (nm)</b>	<b>Fe<sub>T(aq)</sub>(<math>\mu</math>M)</b>	<b>Fe<sup>2+</sup><sub>(aq)</sub>(<math>\mu</math>M)</b>
0h	6.69	20.1	0.003	35	1
8h	6.72	23.7	0	86	8
16h	6.89	10.7	0.012	101	9
24h	6.77	11.2	0	146	36
32h	6.79	14.0	0	167	29
40h	6.90	10.2	0	164	47
48h	6.14	48.8	0.007	73	2
56h	6.91	4.4	0	148	25
5d	6.40	-166.5	0	168	35
10d	6.47	-182.0	0	135	32
30d	6.97	-258.1	0	135	33

**b)** Measured initial and final pH values of the different experiments. Those experiments in which magnetite were obtained are marked with (\*).

<b>pH</b>	<b>L-experiments*</b>	<b>UV BpH 7</b>	<b>FP BpH 7</b>	<b>Inorganic BpH7 (pH = 10.18)*</b>	<b>Inorganic aqueous experiment*</b>
Initial	6.7	6.4	6.7	10.18 (with Fe(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> )	7.64
Final	7.02	6.25	6.6	11.67	11.82

## FIGURE CAPTIONS

**Figure 1.** Field emission scanning electron microscopy (FESEM) images of the inocula used in L-experiments and UV- experiments.

**Figure 2.** Evolution of the concentration of  $\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$ ,  $\text{Fe}^{3+}_{(\text{aq})}$  and  $\text{Fe}_{\text{T}(\text{aq})}$  during the time course of L-experiments.

**Figure 3.** HR-TEM images and EDAX analyses of the *S. oneidensis*- induced magnetites. a) General view; b) low-electron adsorbing area surrounding a crystal (marked with an arrow); c) and d) detail of a crystal and EDAX analysis; e) and f) magnetite crystal and EDAX analysis. Rectangles on crystals show the area where EDAX analyses were performed.

**Figure 4.** Raman spectra of: (1) *S. oneidensis*-induced magnetite; (2) inorganic magnetite and (3) inorganic BpH7 magnetite (pH= 10.18).

**Figure 5.** Thermogravimetric analyses (TGA) of a) *S. oneidensis*-induced magnetite and inorganic magnetites. Mass losses are indicated in the figure. Analyses of evolved gases during the decomposition of b) *S. oneidensis*-induced magnetite and c) inorganic BpH7 (pH= 10.18) magnetite.

**Figure 6.** FT-IR spectra of: (a) inorganic aqueous magnetite, (b) inorganic BpH7 experiment (pH = 10.18) magnetite, (c) *S. oneidensis*-induced magnetite treated with NaOH and (d) *S. oneidensis*-induced magnetite.

**Figure 7.** HR-TEM pictures and EDAX analyses of inorganic magnetite. a) General view; b) magnetite crystals; c) detail of the rhombic crystal; d) iron oxide needle; e) isomorphous crystal; f) isomorphous crystal. Rectangles on crystals show the area where EDAX analyses were performed.

## TABLE CAPTIONS

**Table 1.** Number of bottles prepared under each experimental condition in UV- and FP-experiments.

Culture medium	UV-experiments	FP-experiments	Controls	
			Sterile, without FeCl <sub>2</sub>	Sterile, with FeCl <sub>2</sub>
<b>BpH 7</b>	5	5	2	4
<b>NBpH 7</b>	5	5	2	4
<b>NBpH 8</b>	5	5	2	4

**Table 2a)** L-experiments: experimental values measured in the culture medium during the time course experiment. Only data for a representative experiment is shown.

<b>Time</b>	<b>pH</b>	<b>Eh(mV)</b>	<b>OD<sub>625</sub> (nm)</b>	<b>Fe<sub>T(aq)</sub>(<math>\mu</math>M)</b>	<b>Fe<sup>2+</sup><sub>(aq)</sub>(<math>\mu</math>M)</b>
0h	6.69	20.1	0.003	35	1
8h	6.72	23.7	0	86	8
16h	6.89	10.7	0.012	101	9
24h	6.77	11.2	0	146	36
32h	6.79	14.0	0	167	29
40h	6.90	10.2	0	164	47
48h	6.14	48.8	0.007	73	2
56h	6.91	4.4	0	148	25
5d	6.40	-166.5	0	168	35
10d	6.47	-182.0	0	135	32
30d	6.97	-258.1	0	135	33

**b)** Measured initial and final pH values of the different experiments. Those experiments in which magnetite were obtained are marked with (\*).

<b>pH</b>	<b>L-experiments*</b>	<b>UV BpH 7</b>	<b>FP BpH 7</b>	<b>Inorganic BpH7 (pH = 10.18)*</b>	<b>Inorganic aqueous experiment*</b>
Initial	6.7	6.4	6.7	10.18 (with Fe(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> )	7.64
Final	7.02	6.25	6.6	11.67	11.82

## FIGURE CAPTIONS

**Figure 1.** Field emission scanning electron microscopy (FESEM) images of the inocula used in L-experiments and UV- experiments.

**Figure 2.** Evolution of the concentration of  $\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$ ,  $\text{Fe}^{3+}_{(\text{aq})}$  and  $\text{Fe}_{\text{T}(\text{aq})}$  during the time course of L-experiments.

**Figure 3.** HR-TEM images and EDAX analyses of the *S. oneidensis*- induced magnetites. a) General view; b) low-electron adsorbing area surrounding a crystal (marked with an arrow); c) and d) detail of a crystal and EDAX analysis; e) and f) magnetite crystal and EDAX analysis. Rectangles on crystals show where EDAX analyses were performed.

**Figure 4.** Raman spectra of: (1) *S. oneidensis*-induced magnetite; (2) inorganic magnetite and (3) inorganic BpH7 magnetite (pH= 10.18).

**Figure 5.** Thermogravimetric analyses (TGA) of a) *S. oneidensis*-induced magnetite and inorganic magnetites. Mass losses are indicated in the figure. Analyses of evolved gases during the decomposition of b) *S. oneidensis*-induced magnetite and c) inorganic BpH7 (pH= 10.18) magnetite.

**Figure 6.** FT-IR spectra of: (a) inorganic aqueous magnetite, (b) inorganic BpH7 experiment (pH = 10.18) magnetite, (c) *S. oneidensis*-induced magnetite treated with NaOH and (d) *S. oneidensis*-induced magnetite.

**Figure 7.** HR-TEM pictures and EDAX analyses of inorganic magnetite. a) General view; b) magnetite crystals; c) detail of the rhombic crystal; d) iron oxide needle; e) isomorphous crystal; f) isomorphous crystal. Rectangles on crystals show where EDAX analyses were performed.



**Figure 1**

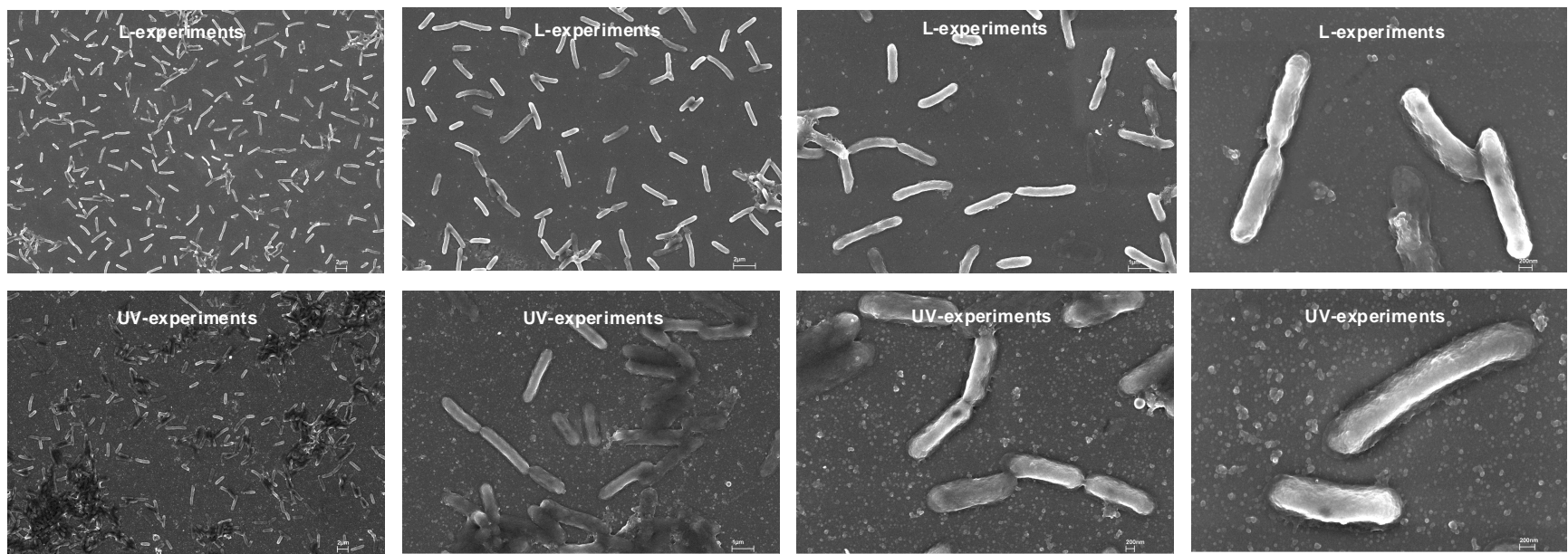
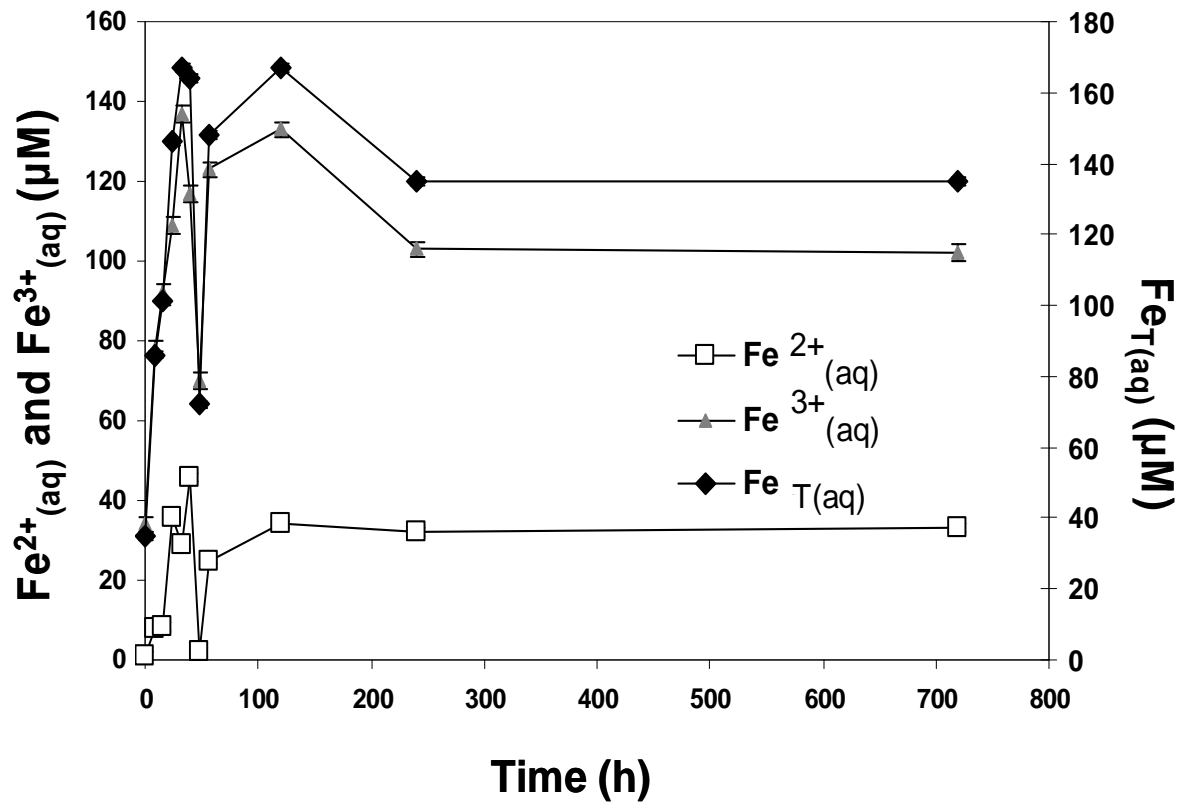


Figure 2



**Figure 3**

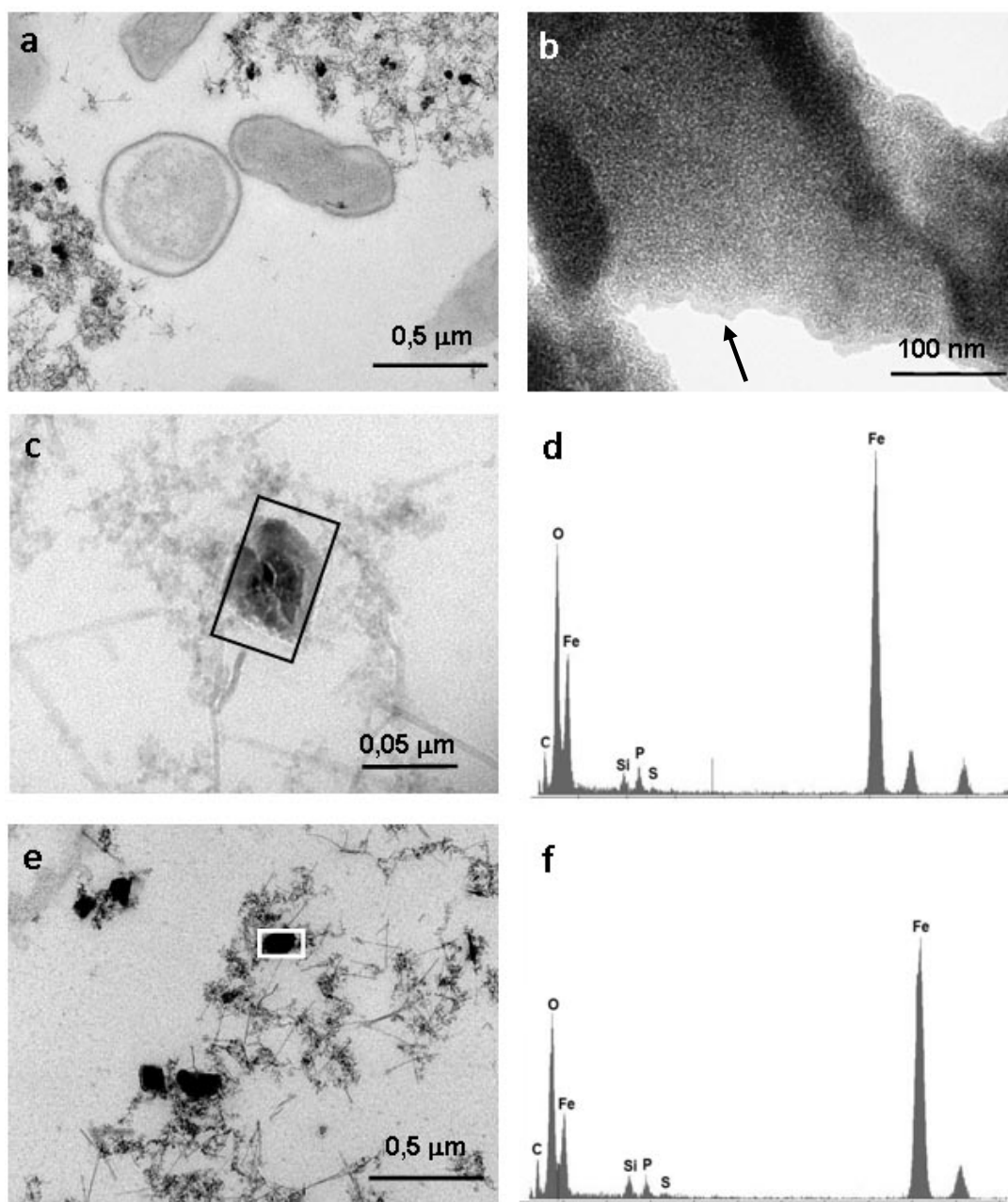


Figure 4

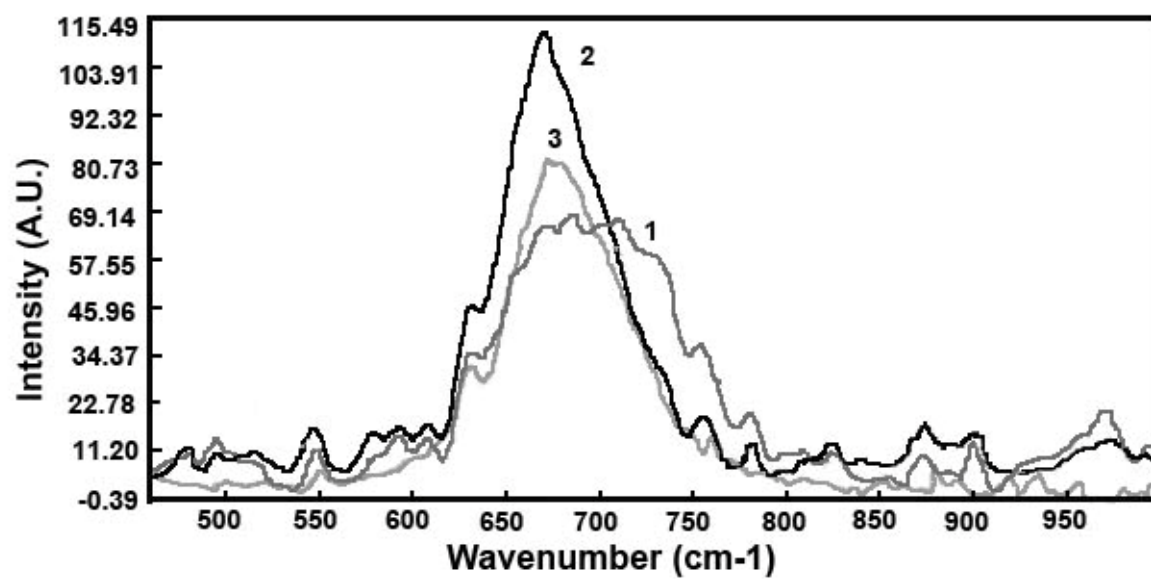


Figure 5

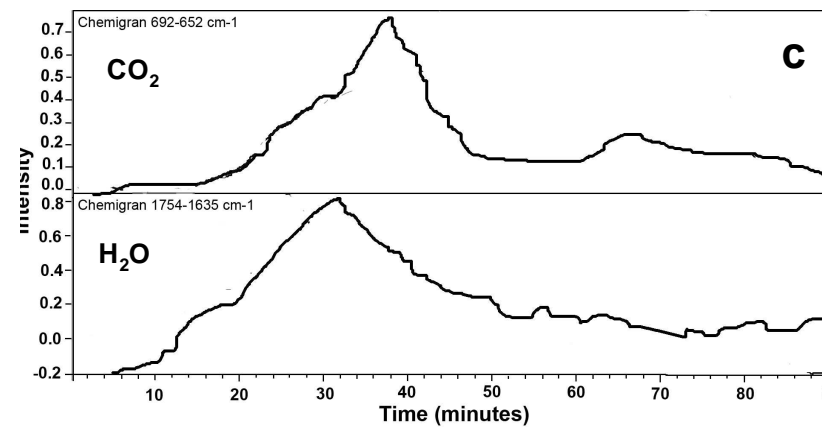
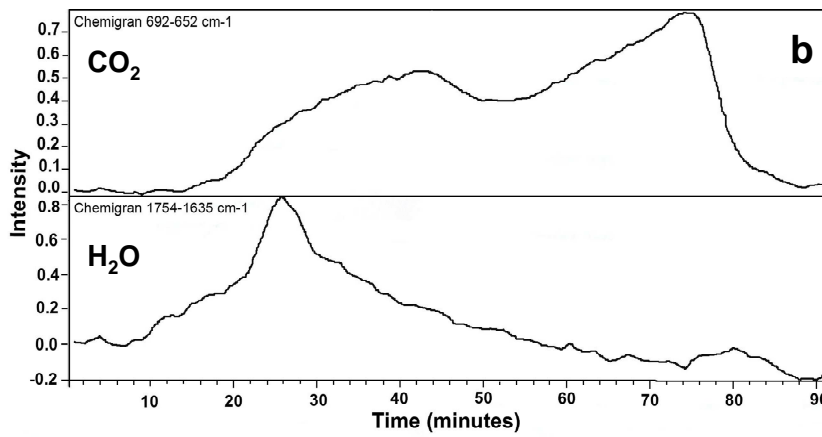
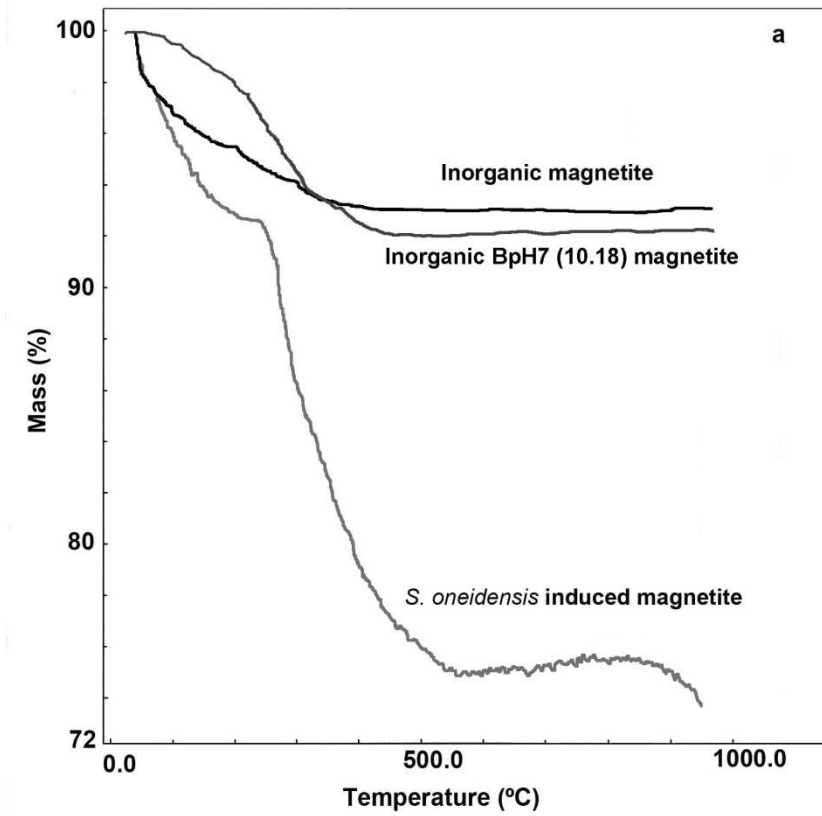


Figure 6

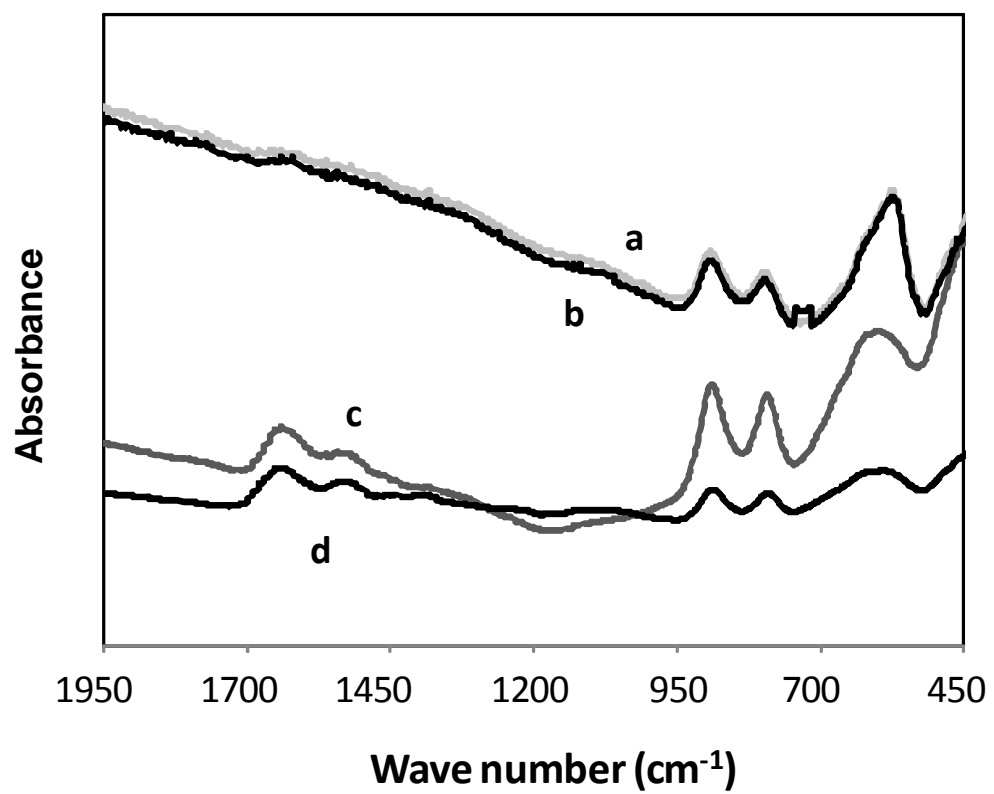
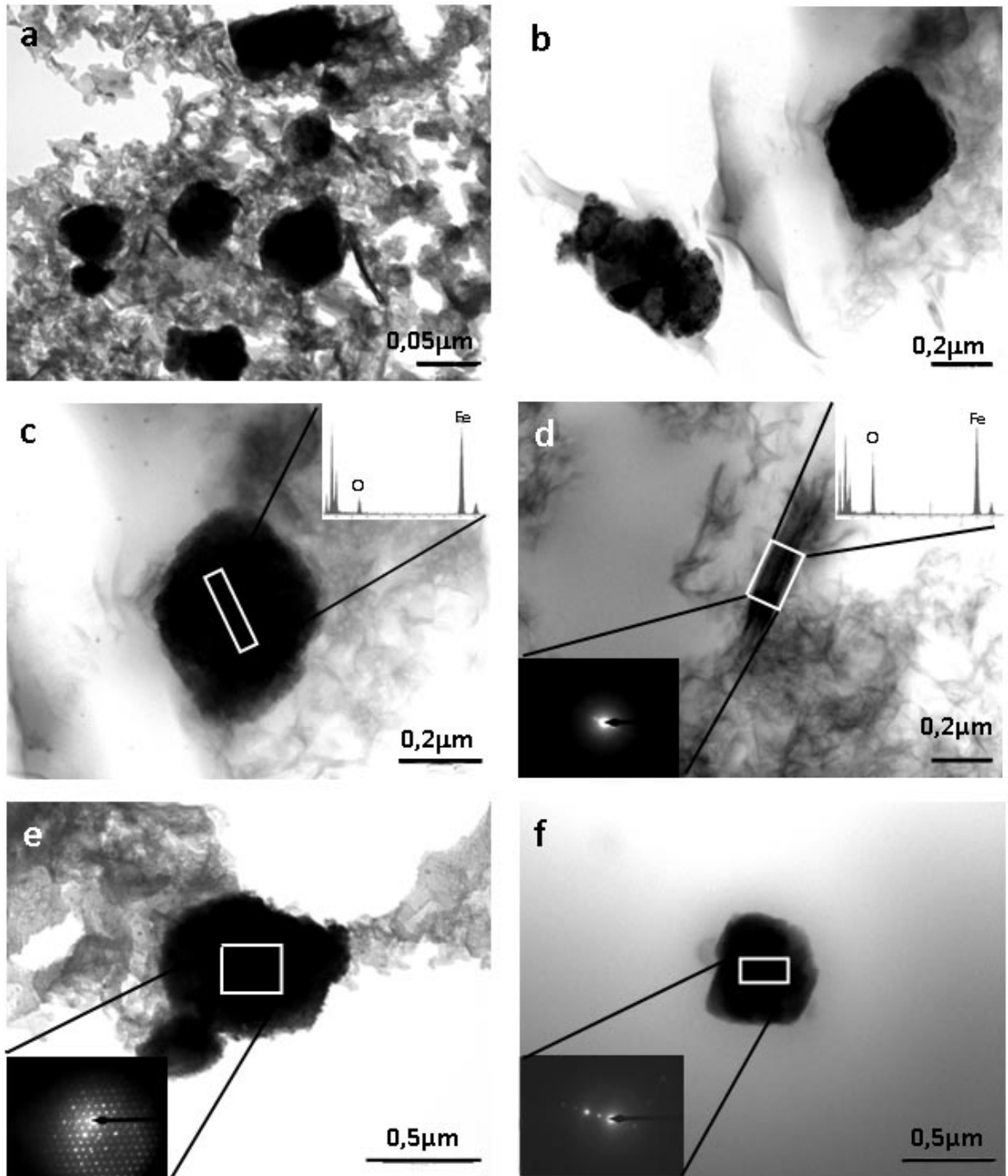


Figure 7



## Chemical purity of *Shewanella oneidensis* induced magnetites

T. Perez-Gonzalez<sup>1</sup>, C. Valverde-Tercedor<sup>1</sup>, A. Yebra<sup>2</sup>, C. Jimenez-Lopez<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Universidad de Granada, Campus de Fuentenueva s/n, 18071, Granada, SPAIN.

<sup>2</sup>Departamento de Geología. Universidad de Jaen

### ABSTRACT

Magnetite is an iron oxide common on Earth and even found in extraterrestrial materials like Martian meteorite ALH84001. The incorporation of cations other than Fe into biologically induced magnetites has not been extensively studied in the literature. Experiments have been performed by either inducing the precipitation of magnetite by the bioreduction of substituted precursors or by adding the “foreign” cations as salts into the culture medium while using a pure precursor. Nevertheless, little work has been done on characterizing the resulting magnetites and the results are, somehow, contradictory. In this paper, we analyze the incorporation of cations into the crystalline structure of magnetite formed both inorganically and biologically induced by *Shewanella oneidensis*, when the “foreign” cations are added as salt to the solution from where the magnetite is precipitating. While Ca is excluded from the crystal structure (in both inorganic/biotic magnetites), Mg incorporates into the crystal structure of inorganic magnetites and Mn induces a mineralogical transition from magnetite to jacobsite. Regarding biotic magnetites, when they form in an environment as a result of the bioreduction of a non-substituted ferrihydrite, the resulting magnetite will not easily incorporate cations other than Fe, unless those cations have atomic radius extremely similar to that of Fe. We also observed that the presence of Mg and



Mn, even at relatively low concentrations, in the culture media where *S. oneidensis* grow, favors both ferrihydrite dissolution and the efficiency of ferrihydrite bioreduction.

## 1. INTRODUCTION

Magnetite, a ferrous-diferrous oxide ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), is a commonly-occurring mineral on Earth, usually found in natural terrestrial environments ranging from igneous and metamorphic rocks to all kinds of sedimentary environments (e.g.: Michard *et al.*, 1988; Mozley and Carothers, 1992; Ptacek, 1992; Rajan *et al.*, 1996; Hall and Muzatti, 1999; Sitzman *et al.*, 2000). It has also been found in extraterrestrial materials [e.g., the Martian meteorite ALH84001 (Thomas-Keprta *et al.*, 2000)]. Magnetite can be produced either inorganically or biologically, through both biologically-induced mineralization (BIM: Frankel and Bazylinski, 2003) and biologically-controlled mineralization (BCM: Bazylinski and Frankel, 2003). Magnetite has been found to be a byproduct of microbial  $\text{Fe}^{3+}$  respiration (e.g., Lovely *et al.*, 1987) and therefore the presence of magnetite has been used as possible evidence for respiratory processes in the early evolution of the Earth (Walker, 1987; Vargas *et al.*, 1998), as evidence for a vast terrestrial subsurface biosphere (Gold, 1992), and even for evidence of life on ancient Mars (McKay *et al.*, 1996).

The biomineralization of magnetite by prokaryotes can be separated into the two mechanistic modes above mentioned: biologically induced mineralization and biologically controlled mineralization. Magnetite precipitated by bacteria through BIM processes generally forms as a result of the metabolic activity of the organisms and successive chemical reactions that involve metabolic byproducts. Organisms secrete one or more metabolic products that react with ions or compounds in the environment resulting in the subsequent extracellular precipitation of mineral particles (Frankel and

Bazylinski, 2003). This process is most commonly recognized and studied in the dissimilatory iron-reducing bacteria (DIRBs) although other microorganisms may also be involved. These facultative anaerobic to strict anaerobic microorganisms respire with Fe(III), reducing it to Fe(II), as a terminal electron acceptor under anaerobic conditions. In the laboratory, DIRBs most frequently use poorly crystalline Fe(III) oxides as electron acceptor with ferrihydrite and nanogoethite the most easily used by cells (Zachara *et al.*, 2002). However, metabolic activity by itself is not enough to induce the formation of magnetite. These microorganisms also provide the system with surfaces such as cell walls, membranes, debris and/or polymeric materials (exopolymers) which act as important sites for the adsorption of ions and subsequent mineral nucleation and growth (Beveridge and Murray, 1980; Konhauser, 1998), helping the system to lower the free energy needed for magnetite formation. Previous experimental results such as those of Lovley *et al.*, (1987) and Perez-Gonzalez *et al.* (2010) show that both factors, i.e., active metabolic activity and the presence of the above mentioned surfaces are necessary for magnetite to form. Such a phenomenon is explained by the fact that, only when both mechanisms are present, the system reaches (at least, locally) an appropriate combination of high pH values and high Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> concentration at the negatively charged areas of the cell wall, membranes, debris, exopolymers or byproducts of bacterial metabolic activity (Lovley, 1990; Bazylinski *et al.*, 2007; Konhauser, 2007; Perez-Gonzalez *et al.*, 2010). The mineralogy of the precipitate strongly depends on several factors such as media composition, electron donor and acceptor, additives and physicochemical parameters of the culture media (*Shewanella putrefaciens* CN32: Zachara *et al.*, 2002; Kukkadapu *et al.*, 2004, 2005, 2006; *Shewanella* sp. PV-4: Roh *et al.*, 2006). In essence, BIM is similar to inorganic mineralization under the same environmental conditions and the mineral particles of both origins share much of their

features (Thomas-Keprta *et al.*, 2000; Bazylinski *et al.*, 2007). In contrast, magnetites produced through a biologically controlled mineralization (BCM) are the result of an exquisitely controlled process exerted by which the magnetotactic bacteria. The generally structurally well-ordered, chemical composition, narrow size distribution and species-specific, consistent, crystal habits are a consequence of such a significant degree of control over the nucleation and growth of the mineral (Bazylinski and Frankel, 2003).

The incorporation of foreign cations into the structure of magnetite is a topic of interest for several reasons. On one hand, the “chemical purity” of BCM magnetites is one of the six criteria integrated in the “Magnetite Assay for Biogenicity” proposed by Thomas-Keprta *et al.* (2000) to recognize biological origin of natural magnetites. On the other, the incorporation of cations different of iron has proven to change the magnetic properties of magnetite nanoparticles. Such a tuning is of great interest in nanotechnology. Magnetite produced by magnetotactic bacteria is generally considered to be pure stoichiometric  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , lacking other metal contaminants (e.g., Mann and Frankel, 1989; Sparks *et al.*, 1990; Meldrum *et al.*, 1993; Bazylinski, 1995; Bazylinski and Moskowitz, 1997; Thomas-Keprta *et al.*, 2000) although some exceptions have been reported. Trace amounts of titanium has been found in magnetite from uncultured bacteria from unamended natural sediments (Towe and Moench, 1981). Moreover, some uncultured magnetotactic bacteria appear to incorporate manganese in their magnetosomes when  $\text{MnCl}_2$  was added to the microcosms containing the cells (Keim *et al.*, 2009). This cation is also probably incorporated into the crystalline structure of BCM magnetites produced by *Magnetospirillum gryphiswaldense* when this bacterium was first grown in a Fe-poor culture medium, and then in a second medium containing equal amounts of iron and manganese (Prozorov *et al.*, in revision). In addition, cells of

three species of *Magnetospirillum* in culture have been shown to incorporate cobalt present in the growth medium in magnetosome magnetite, most probably in the surface layers of the crystals (Staniland *et al.*, 2008).

The chemical composition of biologically induced magnetites has been far less studied than that of biologically controlled magnetites. Fredrickson *et al.* (2001), Parmar *et al.* (2001), Roh *et al.* (2001) and Coker *et al.* (2008) studied bacterial reduction of cation-substituted ferrihydrites or other amorphous ferric oxides by using different species of *Shewanella* and/or *Geobacter*. The mineralogy, size and morphology of the resulting magnetites were studied. However, in general, no much attention was paid to the incorporation of foreign cations into the structure of magnetite. Fredrickson *et al.* (2001) studied the reduction of Ni<sup>2+</sup>-substituted (5 mol%) hydrous ferric oxide (HFO) by *S. putrefaciens* CN32 and observed that such bioreduction was inhibited by the presence of Ni. However, when they stimulated the Fe bioreduction by adding anthraquinone disulfonate (AQDS), magnetite precipitated at relatively low Ni substitutions in the electron acceptor (7 μM). By measuring the concentration of Ni in solution, these authors inferred the presence of Ni into the structure of magnetite, however, such an incorporation was not directly measured in this study. Parmar *et al.* (2001) also studied the bioreduction of hydrous ferric oxide by *S. putrefaciens* CN32. As a difference to the study by Fredrickson *et al.* (2001), Parmar *et al.* (2001), did not worked with Ni-substituted HFO, but the Ni was added to the media as salts. They observed that Ni strongly lowered the capability of the cells for HFO reduction and also, they concluded that the resulting magnetite did not incorporated Ni into the crystal structure. Roh *et al.* (2001) studied the bioreduction of amorphous iron oxihydroxides (FeOOH) by *Thermoanaerobacter ethanolicus* (Thor-39) in a medium added with salts of Cr<sup>6+</sup>, Co<sup>3+</sup>, Co<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup>. In this study, magnetites formed as a consequence of such Fe

bioreduction and were analyzed by synchrotron and electron microprobe. Those analyses confirmed the incorporation of all these cations into the structure of magnetite. However, these results were criticized by Coker *et al.* (2008). These authors used *Geobacter sulfurreducens* and *S. oneidensis* to reduce synthetic amorphous FeOOH doped with different cations: Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and a combination of Mn<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> in the experiments performed with *Geobacter*, and Co<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup> in the experiments performed with *Shewanella*. These authors did study in detail the magnetite formed as a consequence of the bioreduction of iron by these bacteria. They reported the formation of 20-30 nm sized magnetite crystals that incorporated all the dopant cations.

In this study, the incorporation of calcium, magnesium and manganese into the structure of magnetites induced by *S. oneidensis* is analyzed when this bacterium uses pure ferrihydrite as electron terminal acceptor, in a culture medium containing the above mentioned cations, added as CaSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> and MnSO<sub>4</sub>. The chemistry of the culture media has also been monitored during the experiment. *Shewanella oneidensis*, (formerly *S. putrefaciens* MR-1), is a Gram-negative  $\gamma$ - proteobacterium, first isolated from Lake Oneida, New York (Myers and Nealson, 1988). *S. oneidensis* is able to use lactate, acetate, pyruvate and some amino acids as carbon sources. Respiration of these substrates is coupled to reduction of several terminal electron acceptors (Myers and Nealson, 1988; Venkateswaran *et al.*, 1999). When *S. oneidensis* uses Fe<sup>3+</sup><sub>(aq)</sub> as terminal electron acceptor, produces Fe<sup>2+</sup><sub>(aq)</sub> and, under appropriate solution conditions, this dissimilatory Fe<sup>3+</sup><sub>(aq)</sub> reduction can induce extracellular precipitation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (Neal *et al.*, 2003). The incorporation of cations in BIM magnetites is also compared in this study to that in inorganic magnetites, grown from doped-solution (i.e.: containing calcium, magnesium or manganese), in free-drift experiments held at 25°C and 1 atm total pressure.

## 2. MATERIALS AND METHODS

Two types of magnetite were synthesized: One was induced by *S. oneidensis* (referred to as biotic magnetite), the other was produced inorganically (referred to as inorganic magnetite).

### 2.1. Biotic Magnetite Experiments

#### 2.1.1. Microorganism and Inoculum Preparation

The microorganism used was *Shewanella oneidensis* ATCC 700550. This microorganism was grown in 75 mL of Tryptic Soy Broth (TSB, Scharlau Chemie) incubated overnight at 28°C under shaking (180 rpm). Cells were harvested and washed three times in KCl (2 mM) by centrifugation (6000 rpm, Sorvall Super T21). Finally, cells were resuspended in 60 mL KCl (2 mM) (approximately  $6 \times 10^{10}$  colony forming units mL<sup>-1</sup>). This cell suspension was used as inoculum.

#### 2.1.2. Media

The basic culture medium was prepared by modifying the one described by Kostka and Nealson (1998). The original phosphate buffer was substituted by 30 mM Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid) (PIPES) buffer. The modified medium also contained 32 mM lactate, 9 mM ammonium sulfate, 6 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3.3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 67.2 μM Na<sub>2</sub>-EDTA, 56.6 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 10 μM NaCl, 5.4 μM FeSO<sub>4</sub>, 5 μM CoSO<sub>4</sub>, 5 μM Ni(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3.9 μM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 20 mg L<sup>-1</sup> each of arginine, serine and glutamic acid. Medium pH was poised at pH 7. All the chemicals were procured from Sigma.

Culture medium was made anoxic by boiling for 3 minutes and then by bubbling with N<sub>2</sub> for half an hour, while cooling in an ice bath. The medium was then placed inside an anaerobic chamber (COY Laboratory Products Inc.) containing an atmosphere of 4% H<sub>2</sub>/96%N<sub>2</sub> continually circulated through palladium catalysts to reduce trace O<sub>2(g)</sub> to H<sub>2</sub>O. The chamber also contained anhydrous CaSO<sub>4</sub> to trap water produced on the catalyst and it was equipped with gas analyzers to continually monitor O<sub>2(g)</sub> and H<sub>2(g)</sub> levels throughout the course of the experiment. Aliquots of 750 mL were transferred to thirty six 1 L Pyrex bottles. These bottles were sealed with modified screw caps, having a rubber septum allowing inoculation and further addition of chemicals. The rubber stopper was washed with ethanol prior to any inoculation to prevent contamination.

Bottles were autoclaved at 121°C for 20 minutes. These bottles were used to study chemical evolution of the system during magnetite biomineralization.

After sterilization, and immediately before inoculation, all the bottles were supplemented with 2-Line ferrihydrite [ $0.2 \text{ g L}^{-1}$ ; Schwertmann and Cornell (1991)] and a filter sterilized amino acid solution (Kostka and Nealson, 1998). This buffered medium will be referred to as BpH7.

Solutions 25 mM of  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaSO}_4$  and  $\text{MnSO}_4$  were prepared independently by using chemicals provided by Sigma and MilliQ water. Each solution was dispensed in 100 ml Pyrex bottles, sealed with a rubber stopper. All the solutions were made anoxic by bubbling with ultrapure  $\text{N}_2$  for 20 minutes (Carbueros metálicos, Seville, Spain), that was passed, prior to bubbling, through a hot Cu furnace (Supelco) to remove trace  $\text{O}_2$ . After that, the bottle was sealed and then, the headspace was filled with  $\text{N}_2$  for 5 minutes. All the bottles were autoclaved at  $121^\circ\text{C}$  during 20 minutes. Calcium doped culture medium (here referred as BpH7-Ca) was prepared by adding 7.5 ml of the  $\text{CaSO}_4$  solution to bottles containing BpH7 culture medium. The final concentration of calcium in solution was 0.25 mM. Identically, BpH7-Mg and BpH7-Mn culture media were prepared by adding, respectively, 7.5 ml of  $\text{MgSO}_4$  and  $\text{MnSO}_4$  solutions to the culture medium BpH7.

### 2.1.3. Experimental procedure

Four sets of twelve 1L Pyrex bottles were filled with 750 mL of the respective culture media as following: (a) first set (control experiment) was filled with BpH7 culture medium, here referred as BpH7 type (these experiments are published in Perez-Gonzalez *et al.*, 2010), (b) second set (here referred as BpH7-Ca type) was filled with BpH7-Ca culture medium, (c) third set (here referred as BpH7-Mg type) was filled with BpH7-Mg culture medium and (d) fourth set (here referred as BpH7-Mn type, was filled with BpH7-Mn culture medium. Two replicas of each set were performed. These BpH7-Ca, BpH7-Mg and BpH7-Mn are here referred as “foreign” cations experiments.

In each set, eleven out of the twelve bottles were inoculated with *S. oneidensis*, by introducing 3.75 ml of the inoculum in each bottle trough the rubber septum. The remaining non inoculated bottle acted as a control. All experiments were introduced in the Coy Chamber and held at  $25^\circ\text{C}$  and 1 atm total pressure for different time intervals (0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56 hours, 5, 10 and 30 days). At the predetermined time interval, a single inoculated bottle of each set was opened, and the pH, Eh, absorbance,  $\text{Fe}_{\text{T(aq)}}$  concentration and  $\text{Fe}_{\text{(aq)}}^{2+}$  concentration were measured in the solution. At the end of the experiment (30 days) the solid was also recovered by vacuum-filtering, as detailed below.

## 2.2. Inorganic magnetites

A  $\text{NaHCO}_3\text{-Na}_2\text{CO}_3$  solution (25 mM/25 mM) was prepared using  $\text{O}_2$ -free deionized water (Milli-Q). This oxygen-free water was prepared by boiling deionized water for one hour, and then cooling in an ice bath while sparging with ultra pure  $\text{N}_2$  for one hour. This  $\text{NaHCO}_3\text{-Na}_2\text{CO}_3$  solution was placed into a container, which was quickly placed into the anaerobic chamber to keep it anoxic. Then,  $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$  was added to a final concentration of 25 mM. This solution had a pH of 6.95 and an Eh of -406 mV. This solution is here referred as master inorganic solution (MIS), and it is the control experiment.

$\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ,  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  and  $\text{Mn}(\text{ClO}_4)_2$  solutions (0.5 M) were prepared separately using  $\text{O}_2$ -free deionized water (Milli-Q). Different volumes of each solution were added to the master inorganic solution, to obtain final solutions with different concentration of each cation, ranging from 0 to 25 mM. Five different mixtures (here referred as MIS-Ca, MIS-Mg, MIS-Mn, MIS-Mx1, MIS-Mx2) were prepared, with final concentrations detailed in Table 3.

To reach the stability field for magnetite, calculated by using equations of Garrels and Christ (1990), different aliquots of  $\text{O}_2$ -free NaOH (10 M) and  $\text{FeCl}_3$  (2.5 M) solutions were added to each one of the experiments, until the solution begun to turn black. Such a pH was of 11.8 for MIS experiments, 12.2 for MIS-Ca, 10.28 for MIS-Mg, 12.2 for MIS-Mn, 12.2 for MIS-Mx1 and 11.71 for MIS-Mx2. All the chemicals were of reagent grade provided by Sigma Aldrich.

The final solutions of each type of experiment were distributed into 1 L Pyrex bottles (filling each one with 0.75 L). Three replica of each experiment was prepared. All the Pyrex bottles were kept for a month in the anaerobic chamber at 25°C. At the end of the experiment (30 days), the pH, Eh and cation concentrations ( $\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$ ,  $\text{Ca}^{2+}_{(\text{aq})}$ ,  $\text{Mg}^{2+}_{(\text{aq})}$  and  $\text{Mn}^{2+}_{(\text{aq})}$ ) were measured from each solution. The solid was recovered by vacuum filtering, as detailed below.

## 2.3. Analyses

### 2.3.1. Analyses of the solution

The pH and Eh values were measured using a portable Thermo Orion 250 A+ pHmeter calibrated using NIST-traceable standard buffer solutions for slope correction (pH 4 and 7) and temperature compensation, while the calibration for Eh measurements was performed by using quinhydrone added to the standard buffer solutions at pH 4 and 7, according to the manufacturer's



instructions. Based on repeated measurements, accuracy for pH and Eh was calculated at  $\pm 0.05$  and  $\pm 13$  mV ( $1\sigma$ ), respectively. Aqueous ferrous cation ( $\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$ ) and total iron ( $\text{Fe}_{\text{T}(\text{aq})}$ ) were measured in the biotic experiments by using the 1,10-Phenanthroline method for  $\text{Fe}^{2+}$  and the Ferrover method for the  $\text{Fe}_{\text{T}(\text{aq})}$  (Hach, manufacturer's instructions) with a Hach DR 850 colorimeter. The analytical error for both analyses was  $\pm 1 \mu\text{M}$ .  $\text{Fe}^{3+}_{(\text{aq})}$  concentration was calculated as the difference between the measured values of  $\text{Fe}_{\text{T}(\text{aq})}$  iron and  $\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$ . The total Ca, Mg and Mn concentration in the solution was measured by atomic absorption spectroscopy (AAS) by using a Perkin Elmer 5100 spectrometer, error analysis was estimated at  $\pm 0.1$  mM, based on the repeated measurement of samples and standards (as above). Optical Density at a wave length of 625 nm ( $\text{OD}_{625}$ ) was measured in the biotic experiments by using a Thermo Genesys 10 UV spectrophotometer.

Supersaturation and other parameters from MIS experiments were calculated with Phreeqc interactive 2.15.0 program (USGS).

### 2.3.2. Analyses of the solid

At the end of the experiments (30 days), the solutions were vacuum-filtered (Buchi Vac 500) through a  $0.45 \mu\text{m}$  Millipore filter inside the COY Chamber. Solids were collected and freeze-dried (FLEXI-DRY- $\mu\text{P}$ ). The mineralogy of the solids was determined by x-ray diffraction (XRD). Different fractions of each sample were also analysed by Raman spectrometry and by High Resolution Transmission Electron Microscopy (HR-TEM).

X-ray diffraction analyses were performed on BpH7 samples using a Philips PW 1710 diffractometer, with graphite monochromator. For every sample, a frame (or 2D diffraction pattern) was collected using the following experimental conditions: Mo  $93\text{K}\alpha$ , 50 kV, 30 mA, 0.5 mm collimator diameter and 30s exposure times. Sample powders were analysed in transmission mode. XRD2DScan software (Rodriguez-Navarro, 2006) was used to convert 2D diffraction patterns into regular  $2\theta$  linear scans. It is worth mentioning, the benefits of employing the single crystal diffractometer for XRD analyses. On one hand, this equipment uses Mo instead of Cu radiation which reduces the fluorescence produced by iron rich minerals, improving substantially the signal to noise ratio in the diffractograms obtained. On the other hand, the use of a small collimated beam and a highly sensitive CCD area detector allows the measurement of very small samples ( $< 1$  mg) which is very important in this type of experiments in which the amount of sample is limited. On MIS samples a single-crystal x-ray

diffractometer equipped with an area detector (Bruker D8 SMART APEX, Germany) was used using the same experimental conditions.

The microscope used for HR-TEM analyses was a Philips CM20, equipped with Energy Dispersive x-ray Microanalysis (EDAX). Those analyses allowed the study of the morphology of the solids, the d-spacing [determined from selected area electron diffraction (SAED)] and the gross chemical composition of individual crystals. For HR-TEM analyses, samples were fixed with glutaraldehyde and post-fixed with osmium tetroxide. For biotic experiments, samples were also stained with uranyl acetate. Afterwards, the sample was dehydrated with ethanol, and embedded in Embed 812 resin. Ultrathin sections (50-70 nm) were prepared (Reicher Ultracut S microtome, DIATOME diamond blade). The samples were placed in copper grids and carbon coated. Over thirty crystals were analyzed from each type of experiment to confirm reproducibility. Si in the samples was used as standard for quantification.

Raman analyses (Renishaw Raman “In Via” reflex, with a Ar: 785 nm laser interfaced with a Lieka DM LM microscope) were run on  $\approx 1$  mg of sample. Spectra were collected over a 200-2000  $\text{cm}^{-1}$  range. Since the samples were highly thermolabile, very low laser power (0.5%) and a long acquisition time was used (3 min). Nevertheless, spectra showed a very low intensity and a small noise to signal ratio. Spectra were taken at several different points from each sample to check their consistency.

### **3. RESULTS**

#### **3.1. Biotic magnetites**

##### **3.1.1. Evolution of the chemistry of the culture media**

Chemical measurements of the replicates show identical trends, although the absolute values at each time interval are different. That holds true for all biotic experiments. The exact values at each time point are not equivalent for several reasons detailed in Perez-Gonzalez *et al.* (2010), that are: 1) the values are greatly dependent on the size of the inoculum and the initial chemistry of the culture medium; 2) the measurements are performed at discrete time points (non-continuous) and 3) there are, at least, two mechanisms with opposite effects on the evolution of  $\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$  and  $\text{Fe}^{3+}_{(\text{aq})}$ , being the values, at each time point, the net result of the competitive rates of these two

mechanisms. Therefore, the values at each time point do not provide any relevant information. However, important information can be extracted from the trends in the evolution of chemical parameters, which are reproducible in all the replicas within a specific experiment type, i.e., BpH7-Ca, BpH7-Mg and BpH7-Mn. Therefore, for simplicity, data of only one of the replicates are showed in the present paper (Table 2).

Some differences, compared to the control, are shown in the evolution of the chemistry of the culture media due to the presence of Ca, Mg or Mn (Fig. 1a vs Figs. 1b, c and d and Table 1). The pH of the BpH7 culture medium varied between 6.14-6.97 over the time course experiment, while the pH range for the BpH7-Ca experiments was 6.30-7.66, that for Mg-BpH 7 was 5.05-7.50 and, finally, the pH range for the BpH7-Mn experiment was 6.99-7.64. Therefore, the pH values of the experiments containing “foreign” cations were higher than that of the control. In all experiments, the Eh values tend to decrease throughout the time course experiment: from 20 to -258.1 mV in BpH7 experiment, from 23.7 to -7.2 mV in BpH7-Ca, from 63.8 to -274.4 mV in BpH7-Mg, and from -88.0 to -267.0 mV in BpH7-Mn. Such a decrease, was not, nevertheless, continuous, but showed fluctuations. OD<sub>625</sub> was hardly measurable during the experiments, holding that true for all the types. This is probably because most of the cells are attached to the ferrihydrite.

Fe<sub>T(aq)</sub> increased during the time course experiment from 35 to 135 μM in the BpH7 experiment, from 105 to 480 μM in the BpH7-Ca experiment, from 16 to 387 μM in the BpH7-Mg experiment, and from 304 to 442 μM in the BpH7-Mn experiment (Table 2, Fig.1). Such an increase was not continuous, but showed fluctuations during the first stages of the experiment. The concentration of Fe<sub>T(aq)</sub> during these first stages is quite similar in all BpH7 experiments, independently of the presence of “foreign” cations, indicating that the presence of these “foreign” cations does not interfere with

the initial dissolution of the amorphous ferrihydrite. However, then after, a marked difference is observed in the “foreign” cations experiments, and it is that, while the  $Fe_{T(aq)}$  stabilized at the latter stages of the experiment in the control, it continued increasing in the “foreign” cations runs (Fig. 1).

Similarly,  $Fe^{2+}_{(aq)}$  increased from 1 to 33  $\mu M$  in the BpH7 experiment during the time course experiment, from 0.2 to 41  $\mu M$  in the BpH7-Ca experiment, from 15 to 294  $\mu M$  in the BpH7-Mg experiment, and from 0 to 315  $\mu M$  in the BpH7-Mn experiment (Table 2, Fig.1). Again, such an increase was not continuous, but it was interrupted at 32 and 48 hours in the control experiment and at 40 and 56 hours in the “foreign” cations experiments indicating a delay on the precipitation of magnetite in these latter experiments. Identically to what occurred with  $Fe_{T(aq)}$ , while the values of  $Fe^{2+}_{(aq)}$  stabilized at the end of the experiment in the control run, it continued increasing in the “foreign” cations experiments and it did not stabilize within the time of the experiment, with the exception of BpH7-Ca experiment (Fig. 1). Also, it is interesting that, while the concentrations of  $Fe^{2+}_{(aq)}$  and  $Fe_{T(aq)}$  approach each other up to the 200 hours time interval in the BpH7-Mg and BpH7-Mn experiments, indicating an efficient bioreduction, the concentration of  $Fe_{T(aq)}$  is considerably higher than that of  $Fe^{2+}_{(aq)}$  in BpH7 and, specially in BpH7-Ca experiments, indicating a less efficient bioreduction and also, the presence of a considerable amount of available  $Fe^{3+}_{(aq)}$  in BpH7-Ca experiments. It is worth noting that these noticeable variations on the chemistry of the solutions occurred and were reproducible even though the concentrations of  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  introduced in the BpH7-Ca and BpH7-Mg experiments only slightly varied the already existing concentrations of those cations in BpH7 medium.

$Ca^{2+}_{(aq)}$  varied from 0.16 to 0.07 mM from the beginning to the end of the experiment, showing a minimum value of 0.06 mM at the 8 hours time interval.  $Mg^{2+}_{(aq)}$

was 0.20 mM at the beginning of the experiment and 0.15 mM at the end, showing a minimum value of 0.13 mM at 24 at 48 hours.  $Mn^{2+}_{(aq)}$  decreased from 0.22 to 0.18 mM from the beginning to the end of the experiment, showing a minimum value of 0.12 mM at the 5 days time interval. Nevertheless, the variations of the concentrations of these cations are within the experimental error (Table 2).

### 3.1.2. Chemistry of the solid

A black strong magnetic precipitated appeared in all BpH7 experiments independently of the presence of “foreign” cations. Solid mineralogy was determined by XRD analyses. BpH7 showed magnetite as a main phase and a mixture of other iron oxides like ferrihydrite, although in a much less amount, and, preferentially during the first stages of the experiment. The solid collected at the end of BpH7 experiments was pure magnetite. Identically, the solid collected at the end of the experiment in BpH7-Mn was 100% magnetite, showing a narrow peak, corresponding to a well crystallized sample. In the contrary, the solid collected in BpH7-Ca and BpH7-Mg was a mixture of several iron oxides and oxohydroxides like lepidocrocite, ferrihydrite, goethite and magnetite. Magnetite and ferrihydrite were the main phases, and goethite and lepidocrocite were just barely detected in these runs, probably resulting from the oxidation of the metastable ferrihydrite (according to the stability diagrams of Zachara et al. 2002), during the preparation of the samples for XRD analyses. A notable magnetite peak broadening was observed in these two experiments, indicating poorly crystallinity. No calcium or magnesium oxides were detected by XRD.

HRTEM-EDAX images of the solids collected in BpH7-Ca, BpH7-Mg and BpH7-Mn show a matrix of amorphous material (composed by Fe and O, according to EDAX analysis, being possible ferrihydrite), in which magnetite crystals are embedded

(Figs. 2, 3 and 4). The size range of those magnetite crystals is from 10 to 500 nm, although most of the crystals are smaller than 100 nm (within the single-domain size range). The observed sections were rectangular, rhombic, hexagonal and spherical in shape (Figs. 2b, 2c, 3b, 3c, 3e and 4e), corresponding to euhedral crystals with prismatic, cubic and rhombic forms. SAED analyses of crystals showed typical d-spacings for magnetite, confirming the mineralogy of the precipitate. These observations hold true for all the “foreign” cations experiments. EDAX analyses of more than thirty crystals showed that the chemical composition of those crystals was Fe and O. Cu (Cu grid) and Si (detector) were also observed and P and S, due to the presence of organics. No Mg or Ca were detected in any of the magnetites collected from BpH7-Ca and Mg-BpH 7 experiments, respectively (Figs. 2d, 2f, 3d and 3f), or, at least, not enough signal to be noticeable from the background. In contrast, Mn was detected in the section of the magnetite crystals collected from BpH7-Mn experiments (representing ~ 0.9%; Fig. 4d and 4f). The detection of Mn within the magnetite crystals was highly reproducible in all the crystals analyzed from BpH7-Mn experiments.

Raman analyses (Fig. 5 a) showed the main peak for magnetite  $670\text{ cm}^{-1}$  in all the samples. BpH7-Ca and BpH7-Mg experiments show a quite broad magnetite peak, indicating a poorly crystalline magnetite. Peaks for goethite and lepidocrocite also appear at  $450$  and  $600\text{ cm}^{-1}$ . These data confirm XRD results. BpH7-Mn also shows the main peak for magnetite at  $670\text{ cm}^{-1}$ . Although this peak is broader than that of BpH7 experiment, is not as broad as that of BpH7-Ca and BpH7-Mg. Therefore, although this BpH7-Mn magnetite is not as well crystallized as that of BpH7 one, it is better crystallized than the magnetite obtained from the experiments BpH7-Ca and BpH7-Mg. Also, no other ferrous or ferric oxides are detected by Raman in the solid collected from BpH7-Mn. Comparing these results to those of inorganic magnetites (next section), a

shift to higher vibration frequencies is observed, indicating an alteration in the crystalline structure of all these biotic magnetites.

### 3.2. Inorganic magnetites

The pH and Eh values remained fairly constant from the moment at which the addition of titrants stopped until the end of the experiment (30 days) (Table 2). For instance, the pH value varied less than 0.2 units in all experiments and Eh values varied less than 18 mV. No increasing or decreasing tendency was observed in the measured pH and Eh values. The concentration of  $\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$  decreased from the beginning to the end of the experiment, being practically all removed from the solution at the end of the experiment. Also, the concentration of  $\text{Ca}^{2+}_{(\text{aq})}$ ,  $\text{Mg}^{2+}_{(\text{aq})}$  and  $\text{Mn}^{2+}_{(\text{aq})}$ , greatly decreased during the experiment.

A magnetic, dark precipitate formed in all experiments, with the exception of MIS-Mn. According to XRD data, the solid collected in these MIS-Mn experiments was rhodochrosite ( $\text{MnCO}_3$ ) and jacobsonite ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ ) along with a very amorphous phase. In contrast, magnetite was detected by XRD in all the other MIS experiments, constituting 100% of the solid in MIS runs. In MIS-Ca experiment, the solid was a mixture of magnetite and calcite, being the strongest peak the one for magnetite. In MIS-Mg experiments only peaks for magnetite were detected, although slightly shifted to higher angles. The analyses of MIS-Mx1 and MIS-Mx2 revealed the presence of magnetite peaks as the main phase (slightly shifted in the case of MIS-Mx1) and calcite peaks.

Calculated supersaturation for calcite ( $\Omega_{\text{calcite}}$ ) and rhodochrosite ( $\Omega_{\text{rhodochrosite}}$ ) are listed for the relevant experiment: MIS-Ca: ( $\Omega_{\text{calcite}} = 125.9$  to  $28.183$ ), MIS-Mn ( $\Omega_{\text{rhodochrosite}} = 5495$  to  $0$ ), MIS-Mx1 ( $\Omega_{\text{calcite}} = 47.86$  to  $5.888$ ) and MIS-Mx2 ( $\Omega_{\text{calcite}} =$

114.81 to 16.982).

HR-TEM images of the solid collected in MIS-Ca experiments (Figure 6) show isomorphic magnetite crystals with a size range between 40 and 50 nm (small magnetite crystals, SMC) (Fig. 6b) and big euhedral magnetite crystals (BMC) with a size range between 100 and 150 nm (Fig. 6e) along with calcite crystals (CC) (Fig. 6c). Crystals show the same 2D microscope sections as those observed in biogenic samples from BpH7 runs. EDAX analysis of the magnetite crystals show only Fe and O, no Ca, P and/or S were detected. Identically, HR-TEM images of the solid collected in MIS-Mg (Figure 7) show a matrix of isomorphic crystals with a size range between 40 and 50 nm along with non-crystalline bars (Fig. 7a and b). Crystals show rectangular, rhombic, hexagonal and spherical microscope sections (Fig. 7c and 7e). EDAX analysis of the magnetite crystals shows Fe, O and Mg (from 1 to 5%: Fig. 7d). On the contrary, Mg is clearly detected (20%) along with Fe and O in the non-crystalline bars (Fig. 7f). No P and/or S were detected. These results are identical for MIS-Mx1 (Figure 8) and MIS-Mx2 (Figure 9), where isomorphic crystals between 40 and 50 nm appear along with amorphous bars (Fig. 8a, b and c and 9a, b and c). Crystals show the same microscope sections as in the MIS-Mg sample. As in MIS-Mg experiment, the Mg content of the bars (20%) is much higher than that of the magnetite crystals (from 1 to 5%: Figures 8d and 9d). As in the other inorganic experiments, no Ca, P and/or S were detected.

Raman analyses show a well-defined peak for the magnetite collected in all MIS and MIS-bearing experiments (Fig. 5b), with the exception of MIS-Ca run, in which the peak, although share roughly the same width (between 600 and 700  $\text{cm}^{-1}$ ) is much less intense than in the other cases (in MIS-Mn, no magnetite was obtained). A peak corresponding to calcite (1100  $\text{cm}^{-1}$ ) is also observed in this sample and in all samples collected from MIS experiments containing Ca (MIS-Ca, MIS-Mx1 and MIS-Mx2).



The magnetite peak in the MIS experiments is the most intense compared to that of the other MIS-bearing experiments, indicating that the magnetite collected in the MIS runs is more crystalline than that collected in the other foreign cation bearing experiments. A slight shift to higher frequencies is detected in the magnetite peak of MIS-Mg and MIS-Mx1.

Regarding biotic experiments, Raman spectra show well crystallized magnetite in all samples, although the width of these peaks (between 600 and 750  $\text{cm}^{-1}$ ) is higher compared to that of inorganic magnetites. This result indicates that biotic magnetites are not as well crystallized as inorganic ones. Moreover, the spectra corresponding to Ca- and Mg bearing experiment show additional peaks for goethite and lepidocrocite.

## **4. DISCUSSION**

### **4.1. “Foreign” Cations Incorporation in Inorganic Magnetites**

The presence of cations different to Fe in the MIS solution from which magnetite precipitated did not lead to the incorporation of those cations into the crystal structure of magnetite, with the exception of Mg. When Ca was present in the solution (MIS-Ca) experiments, even at concentrations much higher to those of Fe (see Table 1), this cation was not incorporated in the crystalline structure of the resulting magnetite, but precipitated as calcite. Two main reasons may explain this result: on one hand, the system is supersaturated with respect to calcite ( $\Omega_{\text{calcite}} = 125.9$ ), thus, making thermodynamically stable the precipitation of such a phase. Moreover, on the other hand, the incorporation of  $\text{Ca}^{2+}$  into the crystalline structure of magnetite is not easy, due to the relatively big ionic radius of this cation ( $\sim 100$  pm; Shannon, 1976), compared to that of  $\text{Fe}^{2+}$  (63 pm; Shannon, 1976) and  $\text{Fe}^{3+}$  (49 pm; Shannon, 1976). Therefore, and since the solution is supersaturated in other mineral phase that contains calcium, the

precipitation of calcite will be both thermodynamically and kinetically favored with respect to the incorporation of  $\text{Ca}^{2+}$  in magnetite to form a solid solution. The same observation holds true for all Ca-bearing MIS experiments (MIS-Mx1 and MIS-Mx2), since the system is supersaturated with respect to the formation of this phase ( $\Omega_{\text{calcite}} = 47.86$  to  $5.888$  in MIS-Mx1 and  $\Omega_{\text{calcite}} = 114.81$  to  $16.982$  in MIS-Mx2).

The case of MIS-Mn is somehow similar. Although the ionic radius of  $\text{Mn}^{2+}$  (66 pm; Shannon, 1976) is quite similar to that of  $\text{Fe}^{2+}$  (63 pm), no magnetite precipitation is observed. Instead, other mineral phases that contain Mn form, more specifically, rhodochrosite and jacobite. Since the precipitation of these phases is thermodynamically stable ( $\Omega_{\text{rhodochrosite}} = 4.78$ ), Mn will preferentially be incorporated into these two mineral phases. It is interesting that Mn easily substitutes  $\text{Fe}^{2+}$ , forming not just a substituted magnetite with a few Mn cations incorporated into its crystalline structure, but inducing a complete mineralogical transition from magnetite to jacobite ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ ), which is a mineral from the spinel group, belonging to the magnetite series. This result is in agreement with previous findings, since it is well known that Mn may easily substitute iron to form mineral series between magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) and jacobite ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ ), and moreover, even solid solutions between siderite ( $\text{FeCO}_3$ ) and rhodochrosite ( $\text{MnCO}_3$ ) (Deer et al., 1978).

Different is the case of the solid collected in MIS-Mg experiments. In this case, only magnetite formed, but this magnetite contained Mg into its crystalline structure. Such incorporation is confirmed by EDAX-HRTEM of sliced crystals and by the observed shift to higher angles in the XRD spectra. Such incorporation of Mg is not intense enough to significantly alter the structure of Mg-magnetite compared to that of pure magnetite, as observed in Raman spectra. Mg has an atomic radius of 57 pm, in between that of  $\text{Fe}^{3+}$  and  $\text{Fe}^{2+}$  (Shannon, 1973). Generally experiments on doped

magnetites have used other metals like Ni, Co, Zn and Mn. Coker *et al.* 2008 successfully introduced different metals in ferrites using dissimilatory iron reducing bacteria. Nickel ferrites contained only Ni<sup>2+</sup> (ionic radii= 55 pm), with at least 80% in O<sub>h</sub> coordination. Cobalt ferrites contained only Co<sup>2+</sup> (ionic radii= 58 pm) but with a significant proportion (up to 45%) in tetrahedral coordination (Td), showing a slight preference for T<sub>d</sub> sites. The Mn-ferrites contained Mn<sup>2+</sup> (ionic radii= 66 pm) only on the octahedral (O<sub>h</sub>) sites but a mixture of Mn<sup>2+</sup> and Mn<sup>3+</sup> (ionic radii= 58) on T<sub>d</sub> sites when the amount of Mn exceeded 3% (compared to the amount of Fe) or some Zn<sup>2+</sup> (ionic radii= 60 pm) was also present. All these cations have atomic radii very similar to Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> so they can easily be fitted in Td and Oh coordination. Cations incorporation into a solid phase could be the result of the transformation of an already “doped” precursor (secondary formation of the mineral) or, on the contrary, by the addition of those “foreign” cations as salts into the solution from which the mineral precipitates as a primary phase. Comparing the experiments of the present paper to those of Jimenez-Lopez *et al.* (2010, in preparation) regarding calcium and magnesium incorporation into the crystalline structure of magnetite, it can be concluded that, while Ca and Mg incorporated in big amounts into the crystalline structure of magnetite when this magnetite formed as a secondary phase from the thermal decomposition of (Mg,Ca,Fe)CO<sub>3</sub> (Jimenez-Lopez *et al.*, 2010, in preparation) Ca did not incorporated at all (and Mg in little amounts), into the crystalline structure of magnetite when this phase precipitates as a primary phase from a solution in which those cations were added as salts (present study). Since Coker *et al.* (2008) used substituted ferrihydrites to form magnetite, then, this magnetite is expected to incorporate higher amount of “foreign” cations compared to our experiments. The decomposition of precursors to form new phases (secondary precipitation) involves structural modifications and reorganization in

the crystalline lattice (Rodriguez-Navarro *et al.*, 2009) that may allow the “foreign” cations to incorporate easily into the crystalline structure of the product. For instance, Rodriguez-Navarro *et al.* (2009) proposed a model for CaCO<sub>3</sub> transformation into CaO, based on a pseudomorphic and topotactic decomposition of the precursor. Such a transformation occurs as a consequence of CO<sub>2</sub> loss accompanied by limited atom displacement and shrinking of planes. During this process new temporal structures appear, as well as empty spaces between cations (Rodriguez-Navarro *et al.*, 2009). Therefore, we hypothesize that “foreign” cations other than Fe, even with higher atomic radius may be incorporated into this temporal structures that finally evolve to produce the oxide. If the “foreign” cations are added as salts in the medium, and being the crystalline structure of magnetite highly compact, the incorporation of those “foreign” may be forbidden unless a void space is created somehow in the structure and/or, those cations have an atomic radius very similar to that of Fe (which is the case of Mn).

Mg also appears connected to amorphous material in our experiments. The abundance on Mg in this kind of solid may be linked to the high energy required for Mg dehydration. In order to precipitate Mg-bearing magnetite, in a first step, Mg must dehydrate, at least partially, before its adsorption at the crystal-solution interface. Later, in a second step, Mg needs to totally dehydrate in order to be stable into the crystalline structure of magnetite. The cation dehydration energies are directly related to surface charge densities which increase from 0.1624 for Ca<sup>2+</sup> to 0.2906 for Fe<sup>2+</sup> to 0.3707 for Mg<sup>2+</sup> (Lippmann, 1973). Thus, the energy required for Mg<sup>2+</sup> to shed its inner and outer hydration shells is relatively high compared to that for Fe<sup>2+</sup> or Ca<sup>2+</sup>. However, total Mg dehydration is not necessary if the solid in which is incorporated is amorphous (Lippmann, 1973), which explain the higher Mg content in the amorphous solid compared to that in the crystalline precipitate observed in the HR-TEM analyses of the

solid collected in MIS-Mg experiments. This observation holds true for MIS-Mx experiments.

#### **4.2. “Foreign” Cations Incorporation in *S. oneidensis*-induced Magnetites**

Magnetite precipitated in all biotic experiments, as a result of both the chemical changes in the environment caused by bacterial metabolic activity and the role of bacterial wall, cell membranes and/or cell debris acting as nuclei for crystallization. These results are in accordance with those previously reported by Fortin and Beveridge (2000), Southman (2000) and Perez-Gonzalez et al. (2010), among others. However, and with the exception of Mn, any “foreign” cation was incorporated into the crystal structure of magnetite, according to EDAX-HRTEM, XRD and Raman analyses. This difficulty for cations other than Fe to get incorporated into the structure of magnetite, somehow expected due to the compact structure of this mineral, is in sharp contrast with the findings of Coker et al. (2008). In our experiments, magnetite forms as a result of the bacterial reduction of pure ferrihydrite, being the “foreign” cations added as salts to the culture medium. This scenario is different than that of the experiments of Coker et al. (2008), in which magnetite formed as a result of the bacterial reduction of an already substituted ferrihydrite. The aqueous transformation of ferrihydrite is complex and depends on the temperature, pH, and the presence of various cations, anions, and organic species in the reaction slurry. Two different reaction pathways have been identified, mostly for the inorganic transformation of ferrihydrite under oxic conditions: a dissolution-reprecipitation mechanism for the transformation to goethite, and a dissolution-solid state transformation for the transformation to hematite (Jambor and Dutrizac, 1998). Regarding the bacterially induced aqueous transformation of ferrihydrite into magnetite, some authors describe it as a dissolution-reprecipitation

mechanism (Hansel et al., 2003), while other (Zachara et al., 2002) argue a topotactic (solid-state) conversion. The first mechanism requires the release of  $\text{Fe}^{3+}$  to the solution, to be later reduced to  $\text{Fe}^{2+}$ , the triggering magnetite precipitation, which is according to the evolution of  $\text{Fe}_{\text{T(aq)}}$  observed in our experiments (detailed below). However, the second mechanism (topotactic transformation) implies direct reduction of  $\text{Fe}^{3+}$  to  $\text{Fe}^{2+}$  by the bacterial cytochrome *c*, with minimal movement of this cation (therefore excluding Fe release into the solution), and a release of  $\text{OH}^-$  as water (Jambor and Dutrizac, 1998). Since the amount of ferrihydrite added to the culture medium was ~ 2mM, and the maximum  $\text{Fe}_{\text{T(aq)}}$  released to the solution was 0.5 mM, most of the ferrihydrite was not solubilized, thus, also enabling the formation of magnetite through the topotactic transformation mechanism proposed by Zachara *et al.* (2002).

While the formation of a solid solution, in which the magnetite incorporates cations other than Fe may be difficult and restricted to certain cations (as observed in our inorganic magnetites), the formation of magnetite through the topotactic transformation of ferrihydrite may somehow overcome this problem. According with the topotactic mechanisms proposed by Bernal *et al.*, (1957) and Jambor and Dutrizac (1998), during the transformation of the precursor ferrihydrite into the magnetite, void spaces may be temporarily created within the structure, due to the release of  $\text{OH}^-$  from the crystal to the solution. Our hypothesis is that those transient void spaces may allow the easier incorporation of cations different to Fe, (specially those cations with a relatively higher atomic radius). Then after, the structure would shrink and adjust to that of the resulting magnetite (Jambor and Dutrizac, 1998).

On the contrary,  $\text{Mn}^{2+}$  (with an atomic radius very similar to that of  $\text{Fe}^{2+}$ , 66 pm versus 63 pm, respectively; Shannon *et al.*, 1973) is detected inside the crystalline structure of the magnetites precipitated in the present study, according to EDAX-

HRTEM analyses. However, such incorporation is not as strong as in inorganic magnetites, since it is not enough to be detected by XRD and even Raman, as no significant changes in the crystalline structure of magnetite are observed. This was expectable, since being the atomic radius of manganese and ferrous cation so similar, the substitution of Fe for Mn would not cause a noticeable deformation in the magnetite lattice. Therefore, one interesting observation that can be inferred from our experiments is that, when biologically induced magnetite forms in an environment as a result of the bioreduction of a non-substituted iron oxy-hydroxide, the resulting magnetite will not easily incorporate cations other than Fe, unless those cations have atomic radius extremely similar to that of Fe.

The differences in the amount of Mn incorporated in inorganic and biotic magnetites are explained by the lower Mn concentration in the culture medium of biotic experiments compared to that in the inorganic experiments. The same holds true for Mg. However, the concentrations of “foreign” cations in the biotic experiments were chosen to be enough to dope the culture media while allowing the growth of *S. oneidensis*. At these low concentrations of cations, Mg is probably accumulated intracellularly by the cell, decreasing the availability of this cation in the culture medium.

Comparing the mineral structure of biotic versus non-biotic magnetites, Raman spectra show that non-biotic magnetites are more crystalline than biotic magnetites. This result, combined to the systematic observation of P and S by EDAX-HRTEM inside the crystals and according to the results of Perez-Gonzalez et al., (2010) leads us to the conclusion that the biotic magnetites formed in the present study probably incorporated organic material within the crystal structure, resulting in a disturbed structure that is detectable by Raman.

It is also interesting that, even though being present in the culture media at quite low concentrations, the chemistry of the culture media is altered due to the presence of “foreign” cations. The increase in the total iron concentration observed in Fig. 1a to d was the result of the solubilization of the amorphous ferrihydrite and subsequent release of  $\text{Fe}^{3+}_{(\text{aq})}$  in the solution. Bacterial bioreduction of ferrihydrite is triggered by this solubilization of  $\text{Fe}^{3+}$  to the culture medium. According to the evolution of  $\text{Fe}_{\text{T}(\text{aq})}$  during the first 48 hours of our experiment, the presence of foreign cations does not interfere with the dissolution of amorphous ferrihydrite at these first stages, since the amount of  $\text{Fe}_{\text{T}(\text{aq})}$  reaches similar values within the same time frame in all experiments. However, the presence of those “foreign” cations seems to favor ferrihydrite dissolution then after, since the values of  $\text{Fe}_{\text{t}(\text{aq})}$  measure over time in “foreign” cation bearing experiments are higher compared to BpH ones (“foreign” cations free). Jambor and Dutrizac (1998) identified that sulfate ions and  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  cations easily adsorb onto ferrihydrite surface, altering the dissolution pattern on this ferrihydrite. The effect is probably due to the sulfate group, since a model of ferrihydrite enhanced dissolution based on the competition for the hydration water (Ruiz-Agudo et al., 2009) between the “foreign” cations and the  $\text{Fe}^{3+}$  contained into the magnetite is not supported, given the fact that the latter cation is the one who shows the greater affinity for the water, being its hydration enthalpy ( $-4430 \text{ kJmol}^{-1}$ : Phillips and Williams, 1965) much greater than that for the other cations [ $\text{Ca}^{2+}$ :  $-1577$ ;  $\text{Mg}^{2+}$ :  $-1921$ , and  $\text{Mn}^{2+}$ :  $-1841$ : Phillips and Williams (1965)].

Moreover, the presence of Mg and Mn seems to increase the efficiency of the bacterial bioreduction, since the concentration of  $\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$  is maximum in those experiments and closely approaches that of  $\text{Fe}_{\text{T}(\text{aq})}$ . The presence of these Mg and Mn probably enhances bacterial metabolic activity, since these two cations are well known



to easily be incorporated by the cells. Mg is a cofactor in many enzyme reactions it is very important in cell division and it is responsible along with K in P uptake and release in the cells (Barat *et al.*, 2005). Manganese acts as a catalyst and cofactor in many enzymatic processes involved in the synthesis of fatty acids and cholesterol. However, this enhanced bioreduction is not translated to an enhanced magnetite formation by a dissolution-precipitation mechanism, since a massive precipitation of magnetite was not observed in our Mg- and Mn-bearing experiments. Two main factors may account for this limited magnetite precipitation: (1) low concentrations of  $\text{Fe}^{3+}_{(\text{aq})}$  that reduces the supersaturation of the system with respect to magnetite, and (2) the blocking of active sites of growth in the mineral surface due to the adsorption of hydrated  $\text{Mg}^{2+}$  that cannot be incorporated until it loses its hydration sphere (Lippman, 1973; Deleuze and Brantley, 1997; Jimenez-Lopez *et al.*, 2004, 2006). It is well known that in most solutions, divalent cations exist in the form of ion pairs (Fouillac and Criaud, 1984) and free ions that are bound to waters of hydration (Burgess, 1999). When these species sorb to surfaces, they need to shed some of its hydration sphere. However, to be incorporated into the crystalline structure, they need to shed the entire hydration sphere. This dehydration energy is directly related to surface charge densities, which increase with decreasing atomic radius (Lippmann, 1973). Thus, the energy required for  $\text{Mg}^{2+}$  to shed its inner and outer shells of hydration is relatively high compared to that of  $\text{Fe}^{2+}$ , thus limiting the growth of the crystal until the cation to be incorporated is fully dehydrated.

## 5. CONCLUSIONS

The presence of calcium, magnesium and manganese in a solution at relatively high concentration compared to that of iron (7 to 10 fold) results in a Mg-substituted magnetite and triggers the mineralogical transition from magnetite to rhodochrosite and jacobsonite, a spinel mineral belonging to the magnetite series. However, no Ca was detected to incorporate into the crystalline structure of magnetite, probably because of the impossibility of incorporating such a big cation into the very compact structure of magnetite.

However, only Mn incorporates in *S. oneidensis* induced magnetites when these bacteria grow in the presence of calcium, magnesium and manganese. Therefore, our conclusion is that when biologically induced magnetite forms in an environment as a result of the bioreduction of a non-substituted ferrihydrite, the resulting magnetite will not easily incorporate cations other than Fe, unless those cations have atomic radius extremely similar to that of Fe (as it is the case of Mn).

Finally, we can observe a great change in the evolution of the chemistry of the culture media in those experiments containing calcium, magnesium and manganese compared to that for the “foreign” cations free control experiment, even though the concentration of the “foreign” cations is only slightly increased compared to that of the control experiment. The presence of Ca, Mg and Mn seems to favor ferrihydrite dissolution. Moreover, the presence of Mg and Mn appears to increase the effectiveness for ferrihydrite bioreduction.

## **Acknowledgements**

Financial funding was provided by grant CGL2007-63859 from the Spanish Ministry of Culture (MEC). Thanks to Dr. Gonzalez-Muñoz for the assistance and her help during the design and interpretation of the results, the CIC personal from the University of Granada for technical assistance and Juan Santamarina Urbano for its assistance in XRD analyses.

## References

- Barat, R., Montoya, T., Seco, A. and Ferrer, J. (2005) The role of potassium, magnesium and calcium in the enhanced biological phosphorus removal treatment plants. *Environmental Technology*, 26 (9), 983-992.
- Bazylinski D. A. and Moskowitz B.M. (1997) Microbial biomineralization of magnetic iron minerals: microbiology, magnetism and environmental significance, *Rev. Mineral.*, 35, 181-223.
- Bazylinski D. A. and R. B. Frankel R.B. (2003) Biologically controlled mineralization in prokaryotes, *Rev. Mineral. Geochem*, 54, 95-114, doi: 10.2113/0540217.
- Bazylinski D. A. and R. B. Frankel R.B. (2003) Biologically controlled mineralization in prokaryotes, *Rev. Mineral. Geochem*, 54, 95
- Bazylinski D. A., Frankel R. B. and Konhauser K. O. (2007) Modes of biomineralization of magnetite by microbes, *Geomicrobiol. J.*, 24, 465-475, doi: 10.1080/01490450701572259.
- Bazylinski, D. A. (1995), Structure and function of the bacterial magnetosome, *ASM News*, 61, 337-343.
- Bernal, J.D., Dasgupta, D.R. and Mackay A.L. (1957) Oriented transformations in iron oxides and hydroxides. *Nature*, 28, 645-647.
- Berner R. A. (1975) The role of magnesium in the crystal growth of calcite and aragonite from sea water. *Geochim. Cosmochim. Acta* 39, 489–504.
- Beveridge J. and Murray R.G.E. (1980) Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.* 141, 876–887.
- Burgess J. (1999) *Ions in Solution: Basic Principles of Chemical Interactions*. Howood Publishing, Chichester England, 222.
- Coker V.S., Pearce C.I., Patrick R.A.D., Van Der Laan G., Telling N.D., Charnock J.M., Arenholz E. and LLoyd J.R. (2008) Probing the site occupancies of Co-,Ni-, and Mn-substituted biogenic magnetite using XAS and XMCD. *American Mineralogist* 93 (7), 1119-1132.
- Deer, W. A., Howie, R. A. and Zussman, J. (1978) *Rock Forming Minerals*, 2nd ed.; Longmans, London.
- Deleuze M. and Brantley S. (1997) Inhibition of calcite crystal growth by Mg<sup>2+</sup> at 100°C and 100 bars: influence of growth regime. *Geochim. Cosmochim. Acta* 7, 1475–1485.
- Fortin D. and Beveridge T.J. (2000) Mechanistic routes to biomineral surface development. *Biomineralization: From Biology to Biotechnology and Medical Application*. Baeuerlein E., Wiley-

VCH, Weinheim, Germany.

- Fouillac C. and Criaud A. (1984) Carbonate and bicarbonate trace metal complexes – critical reevaluation of stability-constants. *Geochem. J.* 18, 297–303.
- Frankel, R. B., and Bazylinski, D. A. (2003), Biologically induced mineralization by bacteria, *Rev. Mineral. Geochem.*, 54, 217
- Fredrickson, J.K., Zachara, J.M., Kukkadapu, R.K., Gorby, Y.A., Smith, S.C. and Brown, C.F. (2001) Biotransformation of Ni-substituted hydrous ferric oxide by an Fe(III)-reducing bacterium. *Environmental Science and Technology* 35 (4), 703-712.
- Fubini, B. and Stone, F.S. (1983) Physico-chemical properties of  $\text{MnCO}_3$ - $\text{CaCO}_3$  and  $\text{MnO}$ - $\text{CaO}$  solid solution. *J. Chem. Soc. Faraday T* 79 (1983), pp. 1215–1227.
- Gold, T. (1992), The deep, hot biosphere. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 6045-6049, doi:10.1073/pnas.89.13.6045.
- Hall J.M. and Muzzatti A. (1999) Delayed magnetization of the deeper kilometer of oceanic crust at Ocean Drilling Project Site 504. *Journal of Geophysical Research B: Solid Earth* 104 (B6), 12843-12851.
- Hansel, C.M., Benner, S.G., Neiss, J., Dohnalkova, A., Kukkadapu, R.V. and Fendorf, S. (2003) Secondary mineralization pathways induced by dissimilatory iron reduction of ferrihydrite under advective flow. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 67(16), 2977–2992.
- Jambor J.L. and Dutrizac, J.E. (1998) Occurrence and Constitution of Natural and Synthetic Ferrihydrite, a Widespread Iron Oxyhydroxide. *Chem. Rev.* 1998, 98, 2549-2585.
- Jiménez-López, C., Romanek, C.S. and Caballero, E. (2006) Chemical, mineralogical and isotope behaviour, and phase transformation. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 70 (5), 1163-1171.
- Jiménez-López, C., Romanek, C.S., Huertas, F.J., Ohmoto, H. and Caballero, E. (2004) Oxygen isotope fractionation in synthetic magnesian calcite. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 68 (16), 3367-3377.
- Keim C. M., Lins U. and Farina M. (2009) Manganese in biogenic magnetite crystals from magnetotactic bacteria, *FEMS Microbiol. Lett.*, 292, 250-253, doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01499.x.
- Konhauser, K. O. (1998), Diversity of bacterial iron mineralization, *Earth-Sci. Rev.*, 43, 91-121, doi:10.1016/S0012-8252(97)00036-6
- Konhauser, K.O. (2007) Introduction to Geomicrobiology. Blackwell publishing.

- Kostka J.E. and Nealson K.H. (1998) Isolation, cultivation and characterization of iron- and manganese-reducing bacteria. *Techniques in Microbial Ecology*, Oxford University Press.
- Kukkadapu R. K., Zachara J. M., Fredrickson J. K., Kennedy D.W.I., Dohnalkova A. C., and McCready D. E. (2005) Ferrous hydroxy carbonate is a stable transformation product of biogenic magnetite, *Am. Mineral.*, *90*, 510-515, doi:10.2138/am.2005.1727.
- Kukkadapu R.K., Zachara J.M., Fredrickson J.K. and Kennedy D.W.I. (2004). Biotransformation of two-line silica-ferrihydrite by a dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium: Formation of carbonate green rust in the presence of phosphate. *Geochim. Cosmochim. Acta.* *68*(13), 2799-2814.
- Kukkadapu, R. K., Zachara J. M., Fredrickson J. K., McKinley J. P., Kennedy D. W., Smith S. C. and Dong H.(2006) Reductive biotransformation of Fe in shale-limestone saprolite containing Fe(III) oxides and Fe(II)/Fe(III) phyllosilicates, *Geochim. Cosmochim. Acta*, *70*, 3662-3676, doi:10.1016/j.gca.2006.05.004.
- Lippmann F. (1973) *Sedimentary Carbonate Minerals*. Springer- Verlag, Berlin, 228.
- Lovley D. R. (1987) Organic-matter mineralization with the reduction of ferric iron: A review. *Geomicrobiol. J.*, *5*, 375-399, doi: 10.1080/01490458709385975.
- Lovley D.R., Chapelle F.H. and Phillips E.J.P. (1990) Fe(III)-reducing bacteria in deeply buried sediments of the Atlantic Coastal Plain. *Geology*. *18*(10), 954-957.
- Mann S., and Frankel R.B.(1989), Magnetite biomineralization in unicellular organisms, in *Biom mineralization: Chemical and Biochemical Perspectives*, edited by S. Mann, J. Webb and R. J. P. Williams, pp. 389-426, VCH Publishers, New York.
- McKay, D. S., Gibson, E. K., Jr., Thomas-Keprta, K. L., Vali, H., Romanek, C. S., Clemett, S. J., Chillier, X. D., Maechling, C. R., and Zare, R. N. (1996). Search for past life on Mars: Possible relic biogenic activity in martian meteorite ALH84001. *Science* *273*, 924–930.
- Meldrum, F. C., S. Mann, B. R. Heywood, R. B. Frankel, and D. A. Bazylinski (1993), Electron microscopy study of magnetosomes in a cultured coccoid magnetotactic bacterium, *P. Roy. Soc. Lond. B Bio.*, *251*, 231-236, doi:10.1098/rspb.1993.0034.
- Michard A., Beucaire C. and Michard G. (1988) Uranium and rare earth elements in CO<sub>2</sub>-rich waters from Vals-les Bains (France). *Geochim. Cosmochim. Acta* *51*, 901-909.
- Morse J. W. and Casey W. H. (1988) Ostwald processes and mineral paragenesis in sediments. *Am. J. Sci.* *288*, 537-560.

- Mozley P. S. and Carothers W. W. (1992) Elemental and isotopic composition of siderite in the Kupanuk Formation, Alaska: Effect of microbial activity and water/sediment interaction on early pore-water chemistry. *J. Sediment. Petrol.* 64, 681-692.
- Mucci A. and Morse J. W. (1983) The incorporation of Mg<sup>2+</sup> and Sr<sup>2+</sup> into calcite overgrowths: influences of growth rate and solution composition. *Geochim. Cosmochim. Acta* 47, 217–233.
- Myers C.R. and Nealon K.H. (1988) Microbial reduction of manganese oxides: Interactions with irons and sulphur. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 52(11), 2727-2732.
- Neal A.L., Rosso K.M., Geesey G.G., Gorby, Y.A. and Little B.J. (2003) Surface structure effects on direct reduction of iron oxides by *Shewanella oneidensis*. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 67(23), 4489-4503.
- Parmar, N., Gorby, Y. A., Beveridge, T. J. and Ferris, F. G. (2001) 'Formation of Green Rust and Immobilization of Nickel in Response to Bacterial Reduction of Hydrous Ferric Oxide, *Geomicrobiology Journal*, 18: 4, 375 — 385. 10.1080/014904501753210549
- Perez-Gonzalez, T., C. Jimenez-Lopez, A. L. Neal, F. Rull-Perez, A. Rodriguez-Navarro, A. Fernandez-Vivas, and E. Iañez-Pareja (2010), Magnetite biomineralization induced by *Shewanella oneidensis*, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 74(3), 967-979.
- Phillips C. S. G. and Williams R. J. P. (1965) *Inorganic Chemistry*. Oxford University Press, New York.
- Prozorov, T., Perez-Gonzalez, T., Jimenez-Lopez C., Mallapragada S.K., Howse P., Bazylinski D. and Prozorov R. (2009) Doped up: The incorporation of Manganese into the Crystal Lattice of Magnetosome Magnetite (In revision).
- Ptacek C.J. (1992) Experimental determination of siderite solubility in high ionic-strength aqueous solutions. Ph. D. Thesis, Univ. Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada.
- Rajan S., Mackenzie F. T. and Glenn C. R. (1996) A thermodynamic model for water column precipitation of siderite in the Plio- Pleistocene Black Sea. *Am. J. Sci.* 296, 506-548.
- Rodriguez-Navarro A. (2006) XRD2DScan: new software for polycrystalline materials characterization using two-dimensional X-ray diffraction. *J. Appl. Crystallogr.* 39, 905-909.
- Rodriguez-Navarro, C., Ruiz-Agudo, E., Luque, A., Rodriguez-Navarro, A.B. and Ortega-Huertas, M. (2009). Thermal decomposition of calcite: Mechanisms of formation and textural evolution of CaO nanocrystals. *American Mineralogist*, 94 (4), 578-593.
- Roh, Y., Lauf, R.J., McMillan, A.D., Zhang, C., Rawn, C.J., Bai, J. and Phelps, T.J. (2001) Microbial

- synthesis and the characterization of metal-substituted magnetites. *Solid State Communications*, 118 (10), 529-53. DOI: 10.1016/S0038-1098(01)00146-6.
- Roh, Y., H. Gao, H. Vali, D. W. Kennedy, Z. K. Yang, W. Gao, A. C. Dohnalkova, R. D. Stapleton, J.-W. Moon, T. J. Phelps, J. K. Fredrickson, and J. Zhou (2006), Metal reduction and iron biomineralization by a psychrotolerant Fe(III)-reducing bacterium, *Shewanella* sp. Strain PV-4, *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 3236-3244, doi:10.1128/AEM.72.5.3236-3244.2006.
- Ruiz-Agudo, E., Putnis, C.V., Jimenez-Lopez, C. and Rodriguez-Navarro, C. (2009) An atomic force microscopy study of calcite dissolution in saline solutions: The role of magnesium ions. *Geochim. Cosmochim. Acta*. 73, 3201–3217.
- Schwertmann U. and Cornell R.M. (1991) *Iron Oxides in the Laboratory*. Wiley-VCH.
- Shannon, R.D. (1976) Revised Effective Ionic Radii and Systematic Studies of Interatomic Distances in Halides and Chalcogenides. *Acta Crystallographica*. A32, 751-767.
- Sitzman, S.D., Banfield, J.F. and Valley, J.W. (2000) Microstructural characterization of metamorphic magnetite crystals with implications for oxygen isotope distribution. *American Mineralogist* 85 (1), 14-21.
- Southam G. (2000) Bacterial surface-mediated mineral formation. *Environmental Microbe-Mineral Interactions*. Lovley ASM Press, Washington DC.
- Sparks, N. H. C., S. Mann, D. A. Bazylinski, D. R. Lovley, H. W. Jannasch, and R. B. Frankel (1990), Structure and morphology of magnetite anaerobically-produced by a marine magnetotactic bacterium and a dissimilatory iron-reducing bacterium, *Earth Planet. Sci. Lett.*, 98, 14-22, doi:10.1016/0012-821X(90)90084-B.
- Staniland S., W. Williams, N. Telling, G. Van Der Laan, A. Harrison, and B. Ward (2008), Controlled cobalt doping of magnetosomes *in vivo*, *Nat. Nanotechnol.*, 3, 158-162, doi:10.1038/nnano.2008.35.
- Thomas-Keprta, K. L., D. A. Bazylinski, J. L. Kirschvink, S. J. Clemett, D. S. McKay, S. J. Wentworth, H. Vali, E. K. Gibson Jr., and C. S. Romanek (2000), Elongated prismatic magnetite crystals in ALH84001 carbonate globules: potential Martian magnetofossils, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 64, 4049-4081, doi:10.1016/S0016-7037(00)00481-6.
- Towe, K. M., and T. T. Moench (1981) Electron-optical characterization of bacterial magnetite, *Earth Planet. Sci. Lett.*, 52, 213-220, doi:10.1016/0012-821X(81)90222-3
- Vargas, M., K. Kashefi, E. L. Blunt-Harris, and D.R. Lovley (1998), Microbiological evidence for



Fe(III) reduction on early Earth, *Nature*, 395, 65-67, doi:10.1038/25720.

Venkateswaran K., Moser D.P., Dollhopf M.E., Lies D.P., Saffarini D.A., MacGregor B.J., Ringelberg D.B., White, D.C., Nishijima M., Sano H., Burghardt J., Stackebrandt E. and Nealson K.H. (1999) Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *Int. J Syst. Bacteriol.* 49, 705-724.

Walker, J. C. G. (1987), Was the Archaean biosphere upside down? *Nature*, 329, 710-712, doi:10.1038/329710a0.

Zachara, J. M., R. K. Kukkadapu, J. K. Fredrickson, Y. A. Gorby, and S. C. Smith (2002), Biomineralization of poorly crystalline Fe(III) oxides by dissimilatory metal reducing bacteria (DMRB), *Geomicrobiol. J.*, 19, 179-207, doi:10.1080/01490450252864271

## TABLE CAPTIONS

**Table 1.** Evolution of the pH, absorbance,  $\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$ ,  $\text{Fe}^{3+}_{(\text{aq})}$ ,  $\text{Fe}_{\text{T}(\text{aq})}$  and the relevant cation (i.e.: Ca, Mg and Mn) other than Fe in the solution of the experiments BpH7 (data from Perez-Gonzalez *et al.*, 2010), BpH7-Ca, BpMgH7 and BpH7-Mn.

Experyment type	Time	pH $\pm 0.05$	Eh(mV) $\pm 13 \text{ mV}$	Abs(nm)	$\text{Fe}_{\text{T}(\text{aq})}(\mu\text{M})$ $\pm 1 \mu\text{M}$	$\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}(\mu\text{M})$ $\pm 1 \mu\text{M}$	“Foreign” cation (mM) Ca <sup>2+</sup> <sub>(aq)</sub> for BpH7-Ca Mg <sup>2+</sup> <sub>(aq)</sub> for BpH7-Mg Mn <sup>2+</sup> <sub>(aq)</sub> for BpH7-Mn $\pm 0.1 \text{ mM}$
BpH7	0h	6.69	20.1	0.003	35	1	
	8h	6.72	23.7	0	86	8	
	16h	6.89	10.7	0.012	101	9	
	24h	6.77	11.2	0	146	36	
	32h	6.79	14.0	0	167	29	
	40h	6.90	10.2	0	164	47	
	48h	6.14	48.8	0.007	73	2	
	56h	6.91	4.4	0	148	25	
	5d	6.40	-166.5	0	168	35	
	10d	6.47	-182.0	0	135	32	
	30d	6.97	-258.1	0	135	33	
BpH7-Ca	0h	6.77	23.7	0.004	105	0.2	0.095
	8h	6.3	44.4	0.048	64	13	0.050
	16h	6.77	19.1	0	85	20	0.059
	24h	6.69	15.9	0	150	38	0.069
	32h	6.52	28.9	0	131	34	0.064
	40h	6.46	31.8	0	171	25	0.062
	48h	6.92	8.1	0	153	32	0.064
	56h	6.17	48.5	0	130	16	0.067
	5d	6.42	36.5	0.003	105	45	0.065

	10d	7	6.5	0	158	32	0.068	
	30d	7.66	-7.2	0	480	41	0.065	
BpH7-Mg	0h	5.66	63.8	0	16	15	0.134	
	8h	5.05	93.9	0.017	150	20	0.182	
	16h	5.75	52.2	0.044	140	13	0.113	
	24h	6.98	-15	0.027	161	20	0.116	
	32h	6.13	31.4	0.011	213	213	0.113	
	40h	6.02	38.1	0.014	93	47	0.121	
	48h	5.92	44.4	0	177	104	0	
	56h	5.21	84.6	0	288	38	0.161	
	5d	7.38	-245.8	0	337	177	0.141	
	10d	7.5	-274.4	0	387	294	0.123	
	30d	5.66	63.8	0	471	466	0.134	
	BpH7-Mn	0h	6.99	-88	0	304	0	0.153
		8h	7.2	-27.1	0	45	2	0.178
16h		7.53	-198.1	0	201	12	0.169	
24h		7.37	-106.4	0	21	12	0.157	
32h		7.39	-169.9	0	61	23	0.196	
40h		7.24	-214.6	0	131	17	0.152	
48h		7.27	-157.9	0	70	32	0.178	
56h		7.44	-219.6	0	34	28	0.124	
10d		7.08	-278.6	0	200	164	0.112	
20d		7.42	-257.5	0	312	150	0.147	
30d		7.64	-267	0	442	315	0.158	

**Table 2.** Values of the pH, Eh and  $\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$  at the beginning and end of the inorganic magnetite precipitation experiments for both the control and the “foreign” cations bearing experiments.

Experiment type	Initial parameters (before titration)					
	pH $\pm 0.05$	Eh (mV) $\pm 13 \text{ mV}$	$\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$ (mM) $\pm 0.1$	$\text{Ca}^{2+}_{(\text{aq})}$ (mM) $\pm 0.1$	$\text{Mg}^{2+}_{(\text{aq})}$ (mM) $\pm 0.1$	$\text{Mn}^{2+}_{(\text{aq})}$ (mM) $\pm 0.1$
MIS	7.79	-392	4.1	0	0	0
MIS-Ca	8.97	-315	3.4	20	0	0
MIS-Mg	9.31	-430	3.8	0	120	0
MIS-Mn	9.01	-290	4.3	0	0	14
MIS-Mx1	7.73	-380.6	3.8	21	122	0
MIS-Mx2	9.2	-400	1	18	26	0
Initial parameters (after titration)						
MIS	11.68	-301.7	0.123	0	0	0
MIS-Ca	12.28	-304.4	0.053	1	0	0
MIS-Mg	11.82	-181.3	0.001	0	2	0
MIS-Mn	12.28	-202.6	0.000	0	0	0
MIS-Mx1	12.2	-293.9	0.002	0.2	0.9	0
MIS-Mx2	12.71	-254	0.005	0.6	0.8	0
Final parameters (30 days)						
MIS	11.82	-290.2	0.101	0	0	0
MIS-Ca	12,39	-319.3	0.027	0	0	0
MIS-Mg	11.71	-176.4	0.001	0	2	0
MIS-Mn	12,2	-215.4	0.000	0	0	0
MIS-Mx1	12.26	-311.9	0	0.2	0	0
MIS-Mx2	11.52	-267.5	0.002	0.6	0	0

## FIGURE CAPTIONS

**Figure 1.** Evolution of the concentration of  $\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$ ,  $\text{Fe}^{3+}_{(\text{aq})}$ ,  $\text{Fe}_{\text{T}(\text{aq})}$  and the relevant cation other than Fe (i.e. Ca, Mg and Mn) during the time course of **a)** BpH7, **b)** BpH7-Ca, **c)** BpH7-Mg and **d)** BpH7-Mn.

**Figure 2.** HR-TEM images and EDAX analyses of the *S. oneidensis*-induced magnetites collected from BpH7-Ca experiments. a, b) General view of the amorphous matrix in which the crystals are embedded; c) magnetite crystal and SAED analysis; d) EDAX analysis of the magnetite crystal shown in Figure 2c; e) and f) magnetite crystal and EDAX analysis. Rectangles on crystals show where EDAX analyses were performed.

**Figure 3.** HR-TEM images and EDAX analyses of the *S. oneidensis*-induced magnetites collected from BpH7-Mg experiments. a, b) General view of the amorphous matrix in which the crystals are embedded; c) and d) magnetite crystal and EDAX analysis; e) and f) magnetite crystal and EDAX analysis. Rectangles on crystals show where EDAX analyses were performed.

**Figure 4.** HR-TEM images and EDAX analyses of the *S. oneidensis*-induced magnetites collected from BpH7-Mn experiments. a, b) General view of the amorphous matrix in which the crystals are embedded; c) and d) magnetite crystal and EDAX analysis; e) magnetite crystal and SAED analysis; f) EDAX analysis of the magnetite crystal shown in Figure 4e. Rectangles on crystals show where EDAX analyses were performed.

**Figure 5.** Raman analyses of a) BpH7 experiments and b) MIS experiments. In both analyses black stripe represents typical peak for magnetite.

**Figure 6.** HR-TEM pictures and EDAX analyses of solids collected from MIS-Ca experiments. a, b) General view of the sample in which big crystals (BMC) are

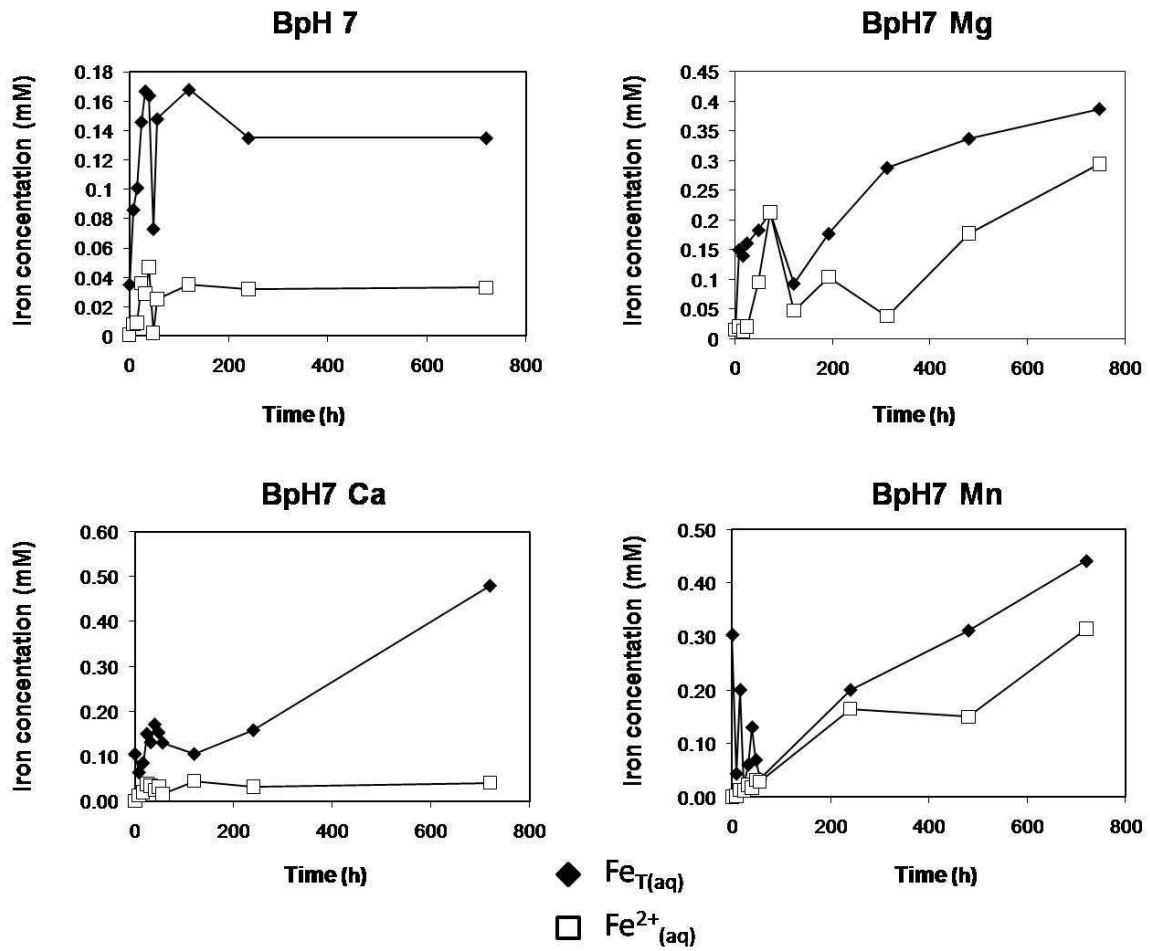
emebbed in a small crystal matrix (SMC). c) and d) Calcite crystal (CC) of  $\text{CaSO}_4$  added magnetites and EDAX analyses. e) and f) magnetite crystal and EDAX analyses. Rectangles on crystals show where EDAX analyses were performed.

**Figure 7.** HR-TEM pictures and EDAX analyses of solids collected from MIS-Mg experiments. a, b) General views of the sample in which small crystals appear along with bars. c) and d) small crystals and EDAX analyses. e) and f) bar and EDAX analyses. Rectangles on the picture show where EDAX analyses were performed.

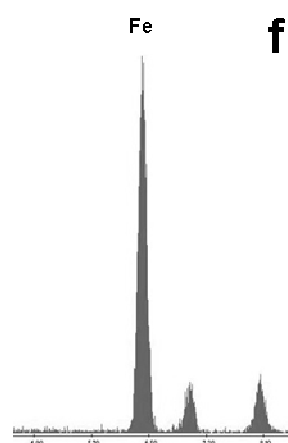
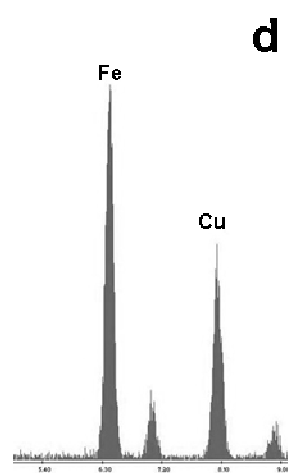
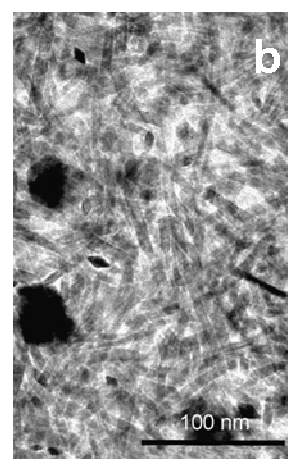
**Figure 8.** HR-TEM pictures and EDAX analyses of solids collected from MIS-Mx1 experiments. a, b) General views of the sample in which small crystals appear along with bars. c) and d) small crystals and EDAX analyses.

**Figure 9.** HR-TEM pictures and EDAX analyses of solids collected from MIS-Mx2 experiments. a, b) General views of the sample in which small crystals appear along with bars. c) and d) small crystals and EDAX analyses.

Figure 1.

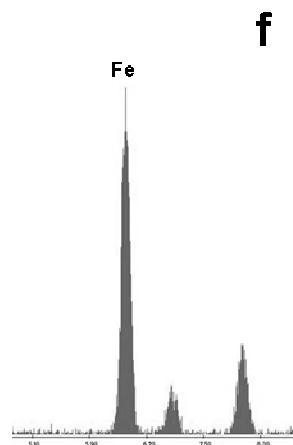
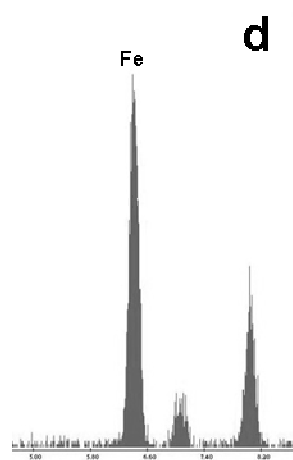
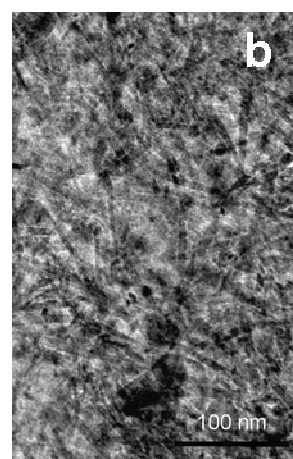


**Figure 2.**

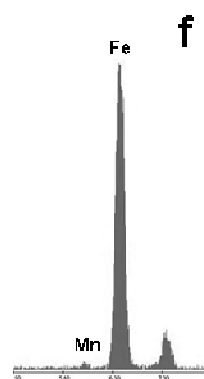
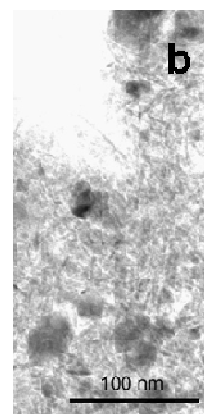




**Figure 3.**

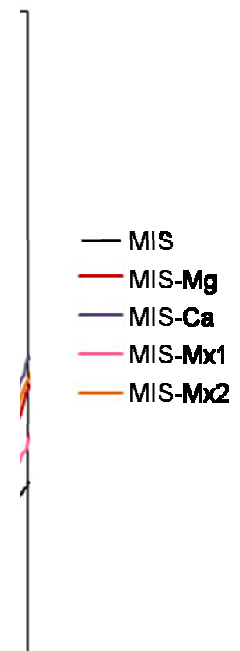


**Figure 4.**

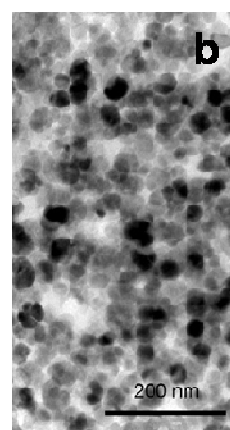


**Figure 5.**

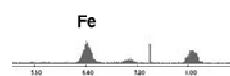
17-Ca .  
17 .  
17-Mg .  
17-Mn .



**Figure 6.**



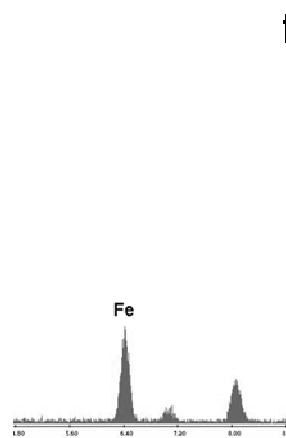
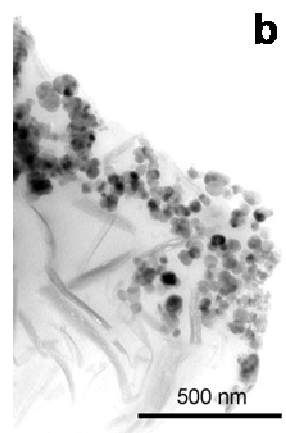
**d**



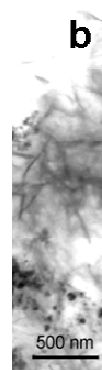
**f**



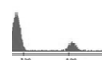
**Figure 7.**



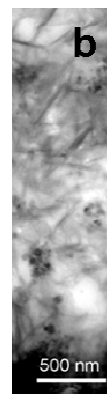
**Figure 8.**



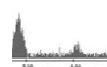
**d**



**Figure 9.**



**d**



## **Capítulo VI: Magnetitas controladas biológicamente**





# **Doped up: The incorporation of Manganese in the Crystal Lattice of Magnetosome Magnetite**

Tanya Prozorov <sup>1,\*</sup>, Teresa Perez-Gonzalez <sup>2,3</sup>, Concepcion Jimenez-Lopez <sup>2</sup>, Surya K. Mallapragada <sup>1,4</sup>, Paul Howse <sup>3</sup>, Dennis A. Bazylinski <sup>3</sup>, and Ruslan Prozorov <sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> US DOE Ames Laboratory, Ames 50011, IA

<sup>2</sup> Departamento de Microbiología, Universidad de Granada. Avda. Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain

<sup>3</sup> School of Life Sciences, University of Nevada at Las Vegas, Las Vegas, NV 89154

<sup>4</sup> Chemical and Biological Engineering, Iowa State University, Ames, IA 50011

<sup>5</sup> Physics and Astronomy, Iowa State University, Ames IA 50010

## **ABSTRACT**

The synthesis of nanometer-sized magnetic particles, through either chemical or biological means, represents one of the most promising fields of applied nanotechnology and is a rapidly growing business that generates millions of dollars. The biomineralization of magnetotactic bacterial magnetite nanoparticles is a topic of intense research due to the particles' well-ordered crystal structure, narrow size range and consistent species-specific morphologies and, as a consequence of these features, their well-defined magnetic properties. It has long been thought possible to influence the biomineralization of magnetite by controlling culture conditions of magnetotactic and dissimilatory iron-reducing bacteria in the presence of metal ions other than iron, in order to produce magnetic nanocrystals of complex stoichiometry with novel magnetic properties. Recently, the incorporation of small amounts of cobalt in magnetosome magnetite in several strains of cultured magnetotactic bacteria was reported, however only very small changes in the magnetic properties of the cultured cells grown with cobalt and their magnetosomes were observed. In addition, there was little to no evidence to show that

these metals were actually incorporated into the crystal lattice. Detection of small amount of manganese in magnetosome magnetite of uncultured magnetotactic bacteria was reported, as well, however magnetic properties of the uncultured cells and their magnetosomes were not determined. In present study, we grew cells of a magnetotactic bacterium, *Magnetospirillum gryphiswaldense* strain MSR-1, in the presence of manganese, ruthenium, zinc and vanadium. While cells grown in the presence of these ions exhibited changes in the number of magnetosomes per cell and magnetosome size, only manganese was incorporated within the magnetosome magnetite crystals. Here, for the first time we demonstrate that the magnetic properties of magnetite crystals of magnetotactic bacteria can be significantly altered, as signaled by a major shift in the Verwey transition, by the incorporation of metal ions, other than iron, in the crystal structure.

## 1. INTRODUCTION

The synthesis of nanostructured magnetic materials, via a variety of chemical routes or through biological means alike, represents a rapidly growing and one of the most promising fields of applied nanotechnology. Magnetic nanoparticles are in high demand in numerous areas, ranging from quantum computing to cancer therapy {Ai, 2005 #43; Lang, 2007 #571; Bulte, 1993 #294; Chiancone, 2004 #309; Li, 1999 #288; Matsunaga, 1998 #348; Rousseau, 1998 #112; Tartaj, 2004 #298; Bazylinski, 2004 #358; Berry, 2003 #525; Pankhurst, 2003 #526} While the controlled, low-temperature chemical synthesis of structurally perfect, single domain magnetic nanoparticles with narrow size distribution can be challenging, magnetotactic bacteria, present in many natural aqueous environments, synthesize these particles. As a result, the biomineralization of magnetite nanoparticles by these microorganisms is a topic of intense study due to the particle's well-ordered crystal structure, narrow size distribution

and consistent species-specific morphologies and, as a consequence of these features, their well-defined magnetic properties {Klem, 2005 #524; Eberbeck, 2005 #66; Fischer, 2008 #591; Frankel, 2004 #353; Hergt, 2005 #75; Lang, 2007 #571; Pankhurst, 2003 #526; Prozorov, 2007 #545}.

Although it is fairly easy to make small (<10 nm) amorphous-like and, generally, shapeless, magnetic particles via chemical routes, the magnetic moment of such magnetic nanostructures is normally too small to be suitable for practical use (e.g., be manipulated by an applied magnetic field). An ideal material can be described as one with the maximal magnetic moment per particle, where the particles exhibit good crystallinity, belong to one of the highly magnetic compounds, such as magnetite or cobalt ferrite, and are just below the superparamagnetic limit in size, so as to still remain in a monodomain state {Hernando, 2005 #572; Lang, 2006 #573; Reiss, 2005 #574; Vatta, 2006 #575; Prozorov, 2007 #580}. These strict requirements make biomineralization one of the most successful and promising approaches, because magnetite nanocrystals in magnetosomes are of the order of 35-120 nm in size, and they magnetically function for the bacteria at ambient conditions. In addition, biomineralization pathways offer bio-friendly materials with minimal harm to environment and biocompatibility, much sought in medical applications, including their use as contrast agents for Magnetic Resonance Imaging (MRI) {Ai, 2005 #43; Coroiu, 1998 #667; Dickson, 1992 #377}. Several groups reported on enhancement of MRI contrast and hyperthermic effects by controlled doping of magnetic nanoparticles {Paty, 2004 #669; Shapiro, 2008 #668; Aime, 2006 #665; Bulte, 1993 #294; Cheng, 2004 #59; Silva, 2008 #652}. Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (Mn-MRI) for tracking biological activity of viable cells has become a topic of intense research, because it can provide unique information in numerous applications {Gilad, 2008 #655;

Chung, 2009 #658; Lu, 2009 #653; Silva, 2008 #652}. However, cytotoxicity of manganese remains a major drawback of its use as a contrast agent, and establishing a reliable way to deliver  $Mn^{2+}$  to the site of interest for the MRI detection, while maintaining the lowest possible dose, is of great significance. Manganese doping of MRI-compatible materials, such as magnetite, might hold a solution for this problem.

Theoretically, it should be possible to influence the biomineralization of magnetite by controlling culture conditions through the inclusion of metal ions other than iron in the growth medium. In this way, the production of nanocrystals of complex stoichiometry using magnetotactic bacteria might be possible. Not only may this result in materials that are difficult or impossible to produce otherwise, but it is also potentially useful in learning how to tailor or tune the magnetic properties of magnetite crystals produced by magnetotactic bacteria. However, in many early experiments involving growing magnetotactic bacteria in the presence of transition metals other than iron, the incorporation of these metals was not observed. Although this may have been the result of relatively insensitive detection limits, it was concluded by many that the metal uptake mechanism for magnetosome synthesis in magnetotactic bacteria was specific for iron alone. These findings were interesting in that magnetotactic bacteria, like other prokaryotes, clearly take up metals other than iron for purposes other than to biomineralize magnetosomes. For example, cells of some species are known to take up copper for synthesis of an iron oxidase enzyme {Dubbels, 2004 #689} and manganese for the enzyme superoxide dismutase {Short, 1989 #688}.

Recently the incorporation of small amounts of cobalt in surface layers of magnetosome magnetite crystals has been demonstrated in three *Magnetospirillum* species {Staniland, 2008 #637}. In that study, only marginal changes in the magnetic properties of the *Magnetospirillum* cells grown in cobalt-containing media and their

magnetosomes were observed, including slight sample-to-sample deviations in the Verwey transition of the magnetite {Staniland, 2008 #637}. The presence of manganese in magnetosomes of uncultured magnetotactic bacteria exposed to  $\text{MnCl}_2$  was reported, however the magnetic properties of the uncultured cells and their magnetosomes were not studied {Keim, 2009 #584}. Here the samples of mud and water (“microcosms”) containing uncultured magnetotactic bacteria were exposed to  $\text{MnCl}_2$  [30], and manganese in sectioned cells and magnetosomes was detected via the high-resolution TEM. It is possible, however, that manganese originated on the surface layers of the crystals and was not actually incorporated into magnetosome magnetite, as the magnetosomes could not be sectioned without touching the surface first [30]. In fact, elemental maps of thin sections of magnetite magnetosomes showed a higher concentration of Mn at the edges of the crystals [30]. Several groups reported on the incorporation of the first-row transition metals and lanthanides into extracellular magnetites produced by anaerobic dissimilatory iron-reducing bacteria {Coker, 2008 #651; Moon, 2007 #642; Moon, 2007 #585; Roh, 2006 #643}. Although the function and mechanism of magnetite formation by iron-reducing bacteria and by magnetotactic bacteria have little in common, the reported results point to the metal-specific incorporation of metal ions into the magnetite crystalline lattice by different bacterial types. Recently, the effects of high concentration of zinc and nickel on the growth and the magnetosome formation in *Magnetospirillum magnetotacticum* strain MS-1 were reported, however no temperature dependence of magnetization was presented<sup>33</sup>.

## 2. RESULTS AND DISCUSSION

In the current study, we grew cells of *Magnetospirillum gryphiswaldense* strain MSR-1 in the presence of ruthenium, manganese, zinc and vanadium. While cells grown in the presence of these ions exhibited changes in the number of magnetosomes

per cell and magnetosome size, only manganese was found to incorporate into the bulk of magnetosome magnetite crystals. Unlike the results from previous studies, we demonstrate for the first time that the magnetic properties of magnetite crystals of magnetotactic bacteria can be significantly changed, as signaled by a major shift in the Verwey transition temperature, by the incorporation of metal ions, other than iron, in the (bulk) crystal structure of magnetosome magnetite. The magnetization measurements allow bulk characterization of the material, and often are more definitive than elemental analysis of the sections of the cells and magnetosomes. Our findings clearly demonstrate a significant potential in tuning the properties of biomineralized magnetite.

After growth, cells and magnetosome magnetite crystals appeared to be normal morphologically and in size, whether an additional metal was present or not, as summarized in Table 1. On average, the cells grown in the presence of manganese contained a slightly smaller number of magnetosomes, while those grown in the presence of ruthenium and vanadium contained a somewhat larger number of magnetosome, as compared to those cells grown solely with iron. Cells grown in the presence of zinc clearly had less magnetosomes than the control cells (Table 1), hence no magnetite magnetosome crystals were obtained from these cells. Energy Dispersive X-ray analyses (EDX) showed that, out of the four tested metals, only manganese was associated with the magnetosome magnetite crystals (Figure 1). From the results of localized EDX analysis, the Mn content was 1.04 -1.14% of the total amount of metal in the magnetosome magnetite crystals.

Figure 1 illustrates some of the results summarized in Table 1 and shows brightfield (BF) and darkfield (DF) electron micrographs and energy dispersive X-ray spectra (EDX) of magnetosome magnetite crystals purified from cells grown in the presence of  $\text{MnCl}_2$ . Similar results were obtained for cells grown in the presence of  $\text{MnSO}_4$ . The manganese peak, although small, is clearly seen in EDX spectra collected on selected areas of single magnetosomes.

Figure 2 shows ZFC-W measurements for dense cell suspensions of the bacteria ( $> 10^{10}$  cell  $\text{ml}^{-1}$ ). The magnetic signatures of the Verwey transition, labeled  $T_V$ , are clearly present in the suspension containing the control cells grown only with Fe, as well as in those suspensions of cells grown in the presence of  $\text{RuCl}_3$  and  $\text{VOSO}_4$ . In stark contrast, in both samples containing Mn-grown cell suspensions, the transition was almost completely suppressed as shown in the inset. At the lower temperatures, another feature, marked by  $T_c$  in Fig. 2, is clearly visible for all cell suspensions. The origin of this feature is most likely superparamagnetic blocking due to the collective (dipolar) interaction between the nanoparticles {Prozorov, 1999 #39}. In the case of the control,  $\text{VOSO}_4$ -grown and  $\text{RuCl}_3$ -grown cells, this collective blocking is superimposed on a large-signal due to blocking of individual magnetite chains {Prozorov, 2007 #545}. Some signal reduction might be indicative of trace amounts of Ru and V entering the surface of the magnetite nanocrystals that affect the total magnetization by surface spin canting. For suspensions of cells grown in the presence of manganese, the Verwey transition is completely suppressed and only weak collective blocking remains. The fact that  $T_c$  is almost the same for all samples reflects the fact that magnetosome size and number distributions are similar in all of them, as summarized in Table 1. It is worth noting, that no significant difference was observed in the measurements carried out on whole intact cell suspensions and lysed cells.



A comparison of the magnetization loops between cells grown in the presence of different metals is shown in Figure 3. While there was almost no difference between the  $\text{VO}_2$ -grown cells and the control cells grown on iron alone, the magnetic response of cells grown in the presence of  $\text{MnCl}_2$  is quite different and shows smaller hysteresis, a feature consistent with a change in the bulk behavior of magnetization. The difference is still seen above the Verwey transition, as shown in the inset in Figure 3.

As we previously reported, despite current opinion, the Verwey transition is not sensitive to the size of the magnetite crystal as long as one can speak of chemically-pure bulk magnetite with a well-defined crystal structure {Prozorov, 2007 #545}. In magnetosomes harvested from several lysed bacterial samples, the Verwey transition was observed to be approximately 110K, with the exception of strain MV-1, where it occurred at 117K. For comparison, in a millimeter-size single crystal of magnetite, the Verwey transition was observed approximately 120K, which is roughly the same order of magnitude {Prozorov, 2007 #545; Kakol, 1989 #648}. In simple terms, all the tested magnetite samples exhibited the Verwey transition above 100 K, and its magnetic signature appears to be due to the presence of extended crystalline structure. However, the magnetic properties of magnetite, including the Verwey transition, were found to be extremely sensitive to the chemical purity of the specimen: this transition is observed in chemically-pure magnetite single crystals, and it is known that any bulk impurities or modification of the stoichiometry completely suppresses it {Moon, 2007 #642; Moon, 2007 #585; Kakol, 1994 #623; Kakol, 1992 #624; Abellan, 1986 #627; Kakol, 1994 #622; Brabers, 1998 #614; Sorescu, 2004 #605; Sorescu, 2002 #610; Sorescu, 2003 #645}. Thus, in this way, the Verwey transition can serve as an indicator to probe the amount of contaminating metals present in a crystalline lattice.

One of key questions regarding this work is whether manganese is simply residing on the surface layer of the magnetosomes magnetite crystals, where magnetite could be considered “encapsulated” in a manganese-rich shell, with no significant change in magnetic behavior. This case would be similar to the scenario described by Staniland and co-workers {Staniland, 2008 #637}, in which cells grown with cobalt possessed magnetite crystals where the cobalt was localized to the surface layer of the biomineralized magnetite. Looking closely at their magnetization data, it is clear that the cobalt-containing magnetite showed exhibited very little deviation from the Verwey transition curve of the control samples. In contrast, our data show incorporation of a comparable amount of manganese in the magnetite crystals (1.04-1.14%, present work vs. 1.2-1.4%, as reported by Staniland and co-authors {Staniland, 2008 #637}), resulting in a complete suppression of the Verwey transition. These findings indicate that, rather than being confined solely to their surface layer, manganese is incorporated into the bulk crystal matrix of magnetosome magnetite. At this point it is impossible to draw conclusions regarding the nature and mechanism of manganese (or any other metal) incorporation in magnetite crystals biomineralized by *M. gryphiswaldense* strain MSR-1, since there appear to be numerous factors affecting metal uptake by cells. In fact, even iron uptake by magnetotactic bacteria is not well understood. Among these are the differences in biological and (bio)chemical activities of these metals, as well as by their different toxicities. However, the difference in the magnetic properties of cobalt- and manganese-containing magnetosome magnetite could be explained by the different mechanisms of magnetite substitution by these two metals. Despite numerous detailed studies of synthetic and biogenic magnetite alike, little is known about the mechanism of incorporation of metallic impurity elements into them, and it is beyond the scope of the current work. According to the reports of Coker and co-authors, the

incorporation of Co, Ni, Mn and Zn into the structure of extracellularly-produced magnetite crystals (produced by dissimilatory iron-reducing bacteria) differs, depending on whether the metals occupy octahedral or tetrahedral sites of magnetite {Coker, 2008 #651}. The authors concluded that  $\text{Co}^{2+}$  is preferentially incorporated in tetrahedral sites, while Mn-magnetites contain  $\text{Mn}^{2+}$  in octahedral sites and a mixture  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{3+}$  in tetrahedral sites {Coker, 2008 #651}. These results are in a good agreement with those reported by Sorescu and co-workers {Sorescu, 2004 #605; Sorescu, 2002 #610; Sorescu, 2003 #645}, cobalt and manganese substitution in magnetite show dissimilar behavior with only manganese ions showing preferential substitution for  $\text{Fe}^{2+}$  ions on the octahedral magnetic sublattice, thus decreasing the iron population of this lattice {Sorescu, 2003 #645}. As the Verwey transition temperature decreases with the increase of Fe vacancies in magnetite {Sorescu, 2004 #605; Sorescu, 2002 #610; Sorescu, 2003 #645}, the relatively stronger displacement of Fe due to manganese incorporation, compared to that induced by cobalt, as reported by Staniland and co-authors {Staniland, 2008 #637}, could explain the complete suppression of the Verwey transition temperatures observed only in our work. A more detailed study aimed to identify the manganese substitution in magnetite magnetosomes is currently in progress.

### 3. CONCLUSIONS

Overall, our results strongly suggest that, unlike the case of vanadium and ruthenium, manganese becomes part of the bulk crystal structure in magnetosome magnetite produced by some magnetotactic bacteria grown in the presence of either  $\text{MnCl}_2$  or  $\text{MnSO}_4$ . To the best of our knowledge, this is the first study unambiguously showing where metal ions other than iron have been incorporated into the *crystal matrix* of magnetite in cultured magnetotactic bacteria, and that shows that there is a significant potential in tuning the bulk magnetic properties of magnetite biomineralized by

magnetotactic bacteria. Our findings constitute a further step into understanding the bacterial metabolism and mechanisms of magnetite formation, in particular, metal uptake.

#### 4. EXPERIMENTAL

Cells of *Magnetospirillum gryphiswaldense* strain MSR-1 were grown microaerobically under 1% O<sub>2</sub> in N<sub>2</sub> batch cultures containing modified FSM medium {Heyen, 2003 #647}. Iron, as Fe(III) citrate, and manganese (when present), either as MnCl<sub>2</sub> or MnSO<sub>4</sub>, were added to the medium prior to inoculation at 50 μM. Other metals were added similarly as the chloride (ruthenium and zinc) or sulfate (vanadium) salts. Cells of the inoculum for all cultures were grown in medium that did not contain the major source of iron (ferric citrate); iron was present, however, was present in the mineral solution at a very low concentration, approximately 0.36 μM. Cells were harvested by centrifugation at 10,000 x g at 4°C for 20 min, washed once in 50 mM KHPO<sub>4</sub> buffer pH 7.0 and recentrifuged. Cells were then resuspended in a small amount of distilled, deionized H<sub>2</sub>O. Magnetosomes were released from cells by passing this cell suspension through a French pressure cell at 18,000 lb (in<sup>2</sup>)<sup>-1</sup> three times. They were further purified by magnetic separation<sup>40,41</sup>, sealed anaerobically, and kept frozen. Magnetization measurements on cell suspensions and lysed cells were carried out using a *Quantum Design* SQUID (Superconducting Quantum Interference Device) 5T MPMS (Magnetic Properties Measurement System). To identify the magnetic signature of the Verwey transition, samples were cooled in zero magnetic field to 5 K. Then a 500 Oe magnetic field was applied and measurements were taken while warming the sample to 296 K (ZFC-W process) and then on cooling back to 5 K (FC-C process). The Verwey transition appears as a sharp change in magnetization in both processes {Prozorov, 2007 #545}. A second type of magnetic measurement was a sweep of the magnetic field while recording magnetization at a fixed temperature (magnetization loops). Imaging of

the samples was performed without negative staining with Tecnai G<sup>2</sup> F20 Scanning Transmission Electron Microscope equipped with HAADF and EDX detectors at operating voltage 200 KV. 20 microliters of concentrated bacterial culture fixed with 2% glutaraldehyde were dispersed in 2 mL of ddH<sub>2</sub>O. 20 microliters of diluted cell suspension prepared in this manner, were deposited on carbon-supported Quantifoil copper grid. To determine the average number of magnetosomes per individual cell, over 60 cells were examined for each sample. To ensure removal of cell debris and membrane remnants prior to EM sample preparation, magnetically separated lysed cells were bleached anaerobically for 72 hours, and then washed with copious amounts of argon-sparged ddH<sub>2</sub>O before subjected to the localized EDX analysis in the nanoprobe mode. Magnetosome count and size analysis was performed on several micrographs (total >1,000 particles measured) obtained with HAADF detector.

### **Acknowledgments**

Work at the Ames Laboratory was supported by the DOE BES under Contract No. DE-AC02-07CH11358. C.J-L. acknowledges support from the project CGL2007-63859. D.A.B. acknowledges support from NSF grant EAR-0715492. R.P. acknowledges support from the Alfred P. Sloan Foundation and support from NSF grant DMR-0603841. The authors thank M. J. Kramer for helpful discussions.

### **Author contribution**

T.P. and D.A.B. conceived the idea for the study. D.A.B, T.P-G., and C.J-L designed the study. T.P.G and P.H. optimized the bacterial growth, performed the bacterial preparations and magnetosome extractions. T.P. performed and optimized TEM work and data analysis and produced Figure 1. T.P., D.A.B., C.J-L and S.K.M. participated in the interpretation of results and composing Table 1. T.P. and R.P.

designed and performed magnetization measurements and data analysis and produced Figure 2 and Figure 3. T.P. and D.A.B. composed the manuscript with contributions from all the authors. All the authors discussed the results and commented on the manuscript.

## References

- <sup>1</sup> Aime, S., Giovenzana, G. B., Longo, D., and Terreno, E., *In Vivo MR Tech. Drug Discovery Dev.*, 47 (2006).

- <sup>2</sup> Lang, C., Schuler, D., and Faivre, D., *Macromol. Biosci.* **2007** (7), 144 (2007).
- <sup>3</sup> Chiancone, E. et al., *BioMetals* **17** (3), 197 (2004).
- <sup>4</sup> Rousseau, V. et al., *Magn. Res. Mater. Phys. Biol. Med.* **6** (1), 13 (1998).
- <sup>5</sup> Tartaj, P., Gonzalez-Carreno, T., Ferrer, M. L., and Serna, C. J., *Angew. Chem. Intl. Ed.* **43** (46), 6304 (2004).
- <sup>6</sup> Berry, C. C. and Curtis, A. S. G., *J. Phys. D: Appl. Phys.* **36** (7), R198 (2003).
- <sup>7</sup> Pankhurst, Q. A., Connolly, J., Jones, S. K., and Dobson, J., *J. Phys. D: Appl. Phys.* **36** (4), R167 (2003).
- <sup>8</sup> Eberbeck, D. et al., *J. Magn. Magn. Mater.* **289**, 70 (2005).
- <sup>9</sup> Fischer, H. et al., *Earth Planet. Sci. Let.* **270** (3-4), 200 (2008).
- <sup>10</sup> Frankel, R. B. and Bazylinski, D. A., *Nanobiotechnology*, **136** (2004).
- <sup>11</sup> Hergt, R. et al., *J. Magn. Magn. Mater.* **293** (1), 80 (2005).
- <sup>12</sup> Prozorov, R. et al., *Phys. Rev. B. Cond. Mat.* **76**, 054406 1 (2007).
- <sup>13</sup> Hernando, A., Crespo, P., and Garcia, M. A., *Sci. World* **5** (Dec.), 972 (2005).
- <sup>14</sup> Reiss, G. and Huetten, A., *Nature Mater.* **4** (10), 725 (2005).
- <sup>15</sup> Prozorov, T. et al., *ACS Nano* **1** (3), 228 (2007).
- <sup>16</sup> Matsunaga, T. and Takeyama, H., *Supramol. Sci.* **5** (3-4), 391 (1998).
- <sup>17</sup> Coroiu, I., Darabont, A., and Demco, D. E., *Appl. Magn. Reson.* **15** (3-4), 531 (1998).
- <sup>18</sup> Dickson, D. P. E. and Frankel, R. B., *Magn. Prop. Fine Part., Proc. Int. Workshop Stud. Magn. Prop. Fine Part. Relev. Mater. Sci.*, 393 (1992).
- <sup>19</sup> Lang, C. and Schueler, D., *Microb. Bionanotech.* , 107 (2006).
- <sup>20</sup> Paty, B. W. et al., *Transplantation* **77** (8), 1133 (2004).
- <sup>21</sup> Shapiro, E. M. and Koretsky, A. P., *Magn Reson Med* **60** (2), 265 (2008).
- <sup>22</sup> Cheng, F.-Y. et al., *Biomaterials* **26** (7), 729 (2004).

- <sup>23</sup> Silva, A. C. and Bock, N. A., *Schizophrenia Bull.* **34** (4), 595 (2008).
- <sup>24</sup> Gilad, A. A. et al., *Magn. Reson. Med.* **60** (1), 1 (2008).
- <sup>25</sup> Chung, J., Yamada, M., and Yang Phillip, C., *Curr Protoc Stem Cell Biol* **Ch. 5**, Unit 5A 3 (2009).
- <sup>26</sup> Lu, J. et al., *Biomaterials* **30** (15), 2919 (2009).
- <sup>27</sup> Dubbels, B. L. et al., *Microbiology* **150**, 2931 (2004).
- <sup>28</sup> Short, K. A. and Blakemore, R. P., *Arch. Microbio.* **152**, 342 (1989).
- <sup>29</sup> Staniland, S. et al., *Nature Nanotechnology* **3** (3), 158 (2008).
- <sup>30</sup> Keim, C. N., Lins, U., and Farina, M., *FEMS Microbiology Let.* **292** (2), 250 (2009).
- <sup>31</sup> Coker, V. S. et al., *Am. Mineral.* **93** (7), 1119 (2008).
- <sup>32</sup> Moon, J.-W. et al., *J. Magn. Magn. Mater.* **313** (2), 283 (2007).
- <sup>33</sup> Kundu, S. et al., *Biomaterials* **30**, 4211 (2009).
- <sup>34</sup> Prozorov, R., Yeshurun, Y., Prozorov, T., and Gedanken, A., *Phys. Rev. B Cond. Mat.* **59** (10), 6956 (1999).
- <sup>35</sup> Kakol, Z. and Honig, J. M., *Phys. Rev. B: Cond. Mat.* **40** (13), 9090 (1989).
- <sup>36</sup> Kakol, Z. et al., *Acta Physica Polonica, A* **85** (1), 223 (1994).
- <sup>37</sup> Brabers, V. A. M., Walz, F., and Kronmuller, H., *Phys. Rev. B Cond. Mat.* **58** (21), 14163 (1998).
- <sup>38</sup> Sorescu, M., Diamandescu, L., Brand, R. A., and Tarabasanu-Mihaila, D., *Mater. Let.* **58** (6), 885 (2004).
- <sup>39</sup> Sorescu, M., Tarabasanu-Mihaila, D., and Diamandescu, L., *Mater. Let.* **57** (12), 1867 (2003).
- <sup>40</sup> Heyen, U. and Schüler, D., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**, 536 (2003).
- <sup>41</sup> Bazylnski, D. A., Garratt-Reed, A. J., and Frankel, R. B., *Microscopy Res. Tech.* **27** (5), 389 (1994).





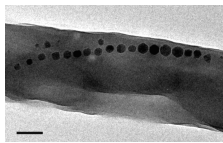
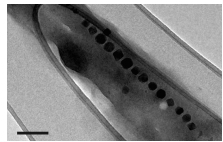
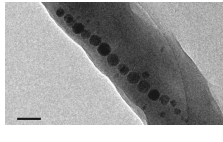
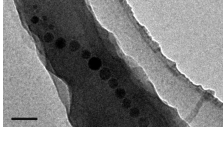
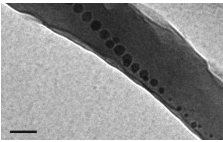
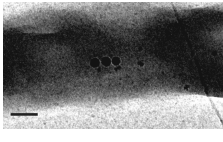
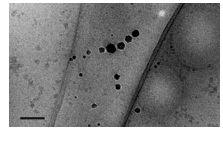
Label	Magnetosomes per cell	Magnetosome size (nm)	Dopant/Total metal (%)	BF TEM fragment
MSR-1 control	30±9	45.2±13.1	n/a	
MnCl <sub>2</sub>	23±7	41.4±11.7	1.04±0.04	
MnSO <sub>4</sub>	26±6	41.2±10.8	1.14±0.01	
RuCl <sub>3</sub>	33±9	45.7±17.5	Below detection limit	
VOSO <sub>4</sub>	39±10	44.9±19.3	Below detection limit	
Zn Cl <sub>2</sub>	5±4	31.7±12.6	n/a	
Low-Fe MSR-1 (inoculum)	14±5	37.1±18.4	n/a	

Table 1.

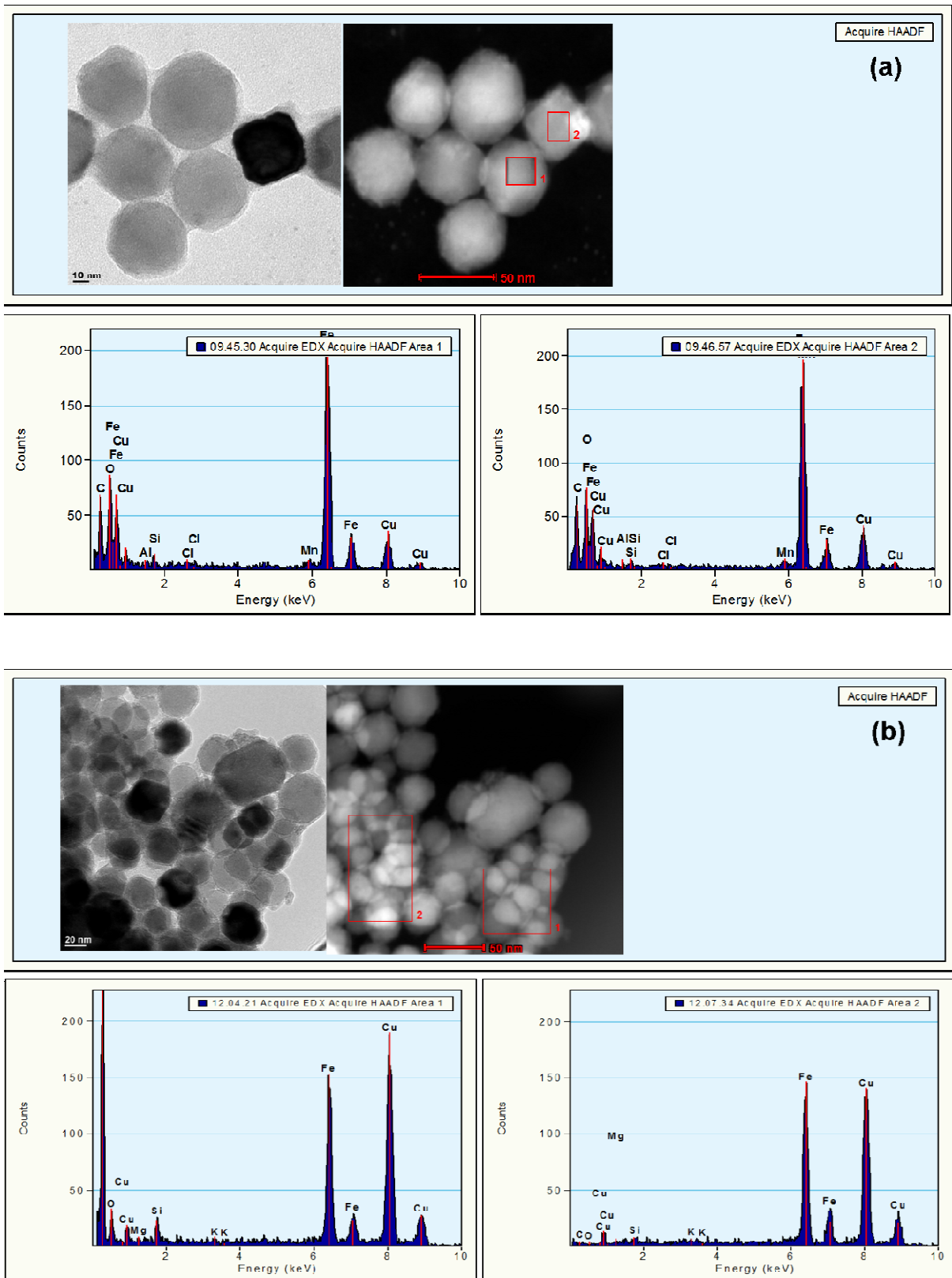


Figure 1.

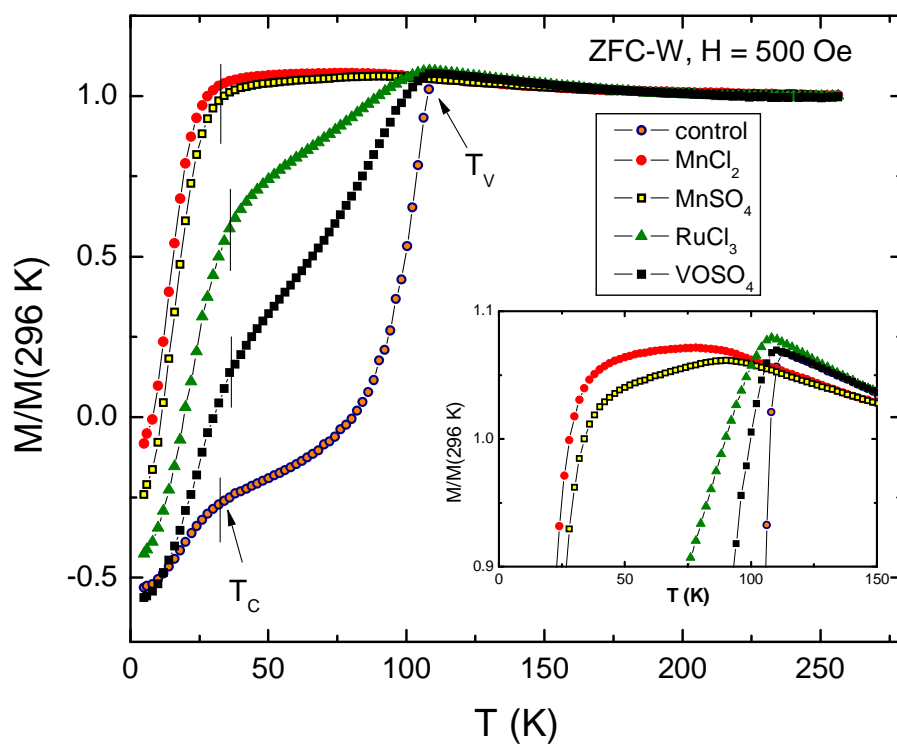


Figure 2.

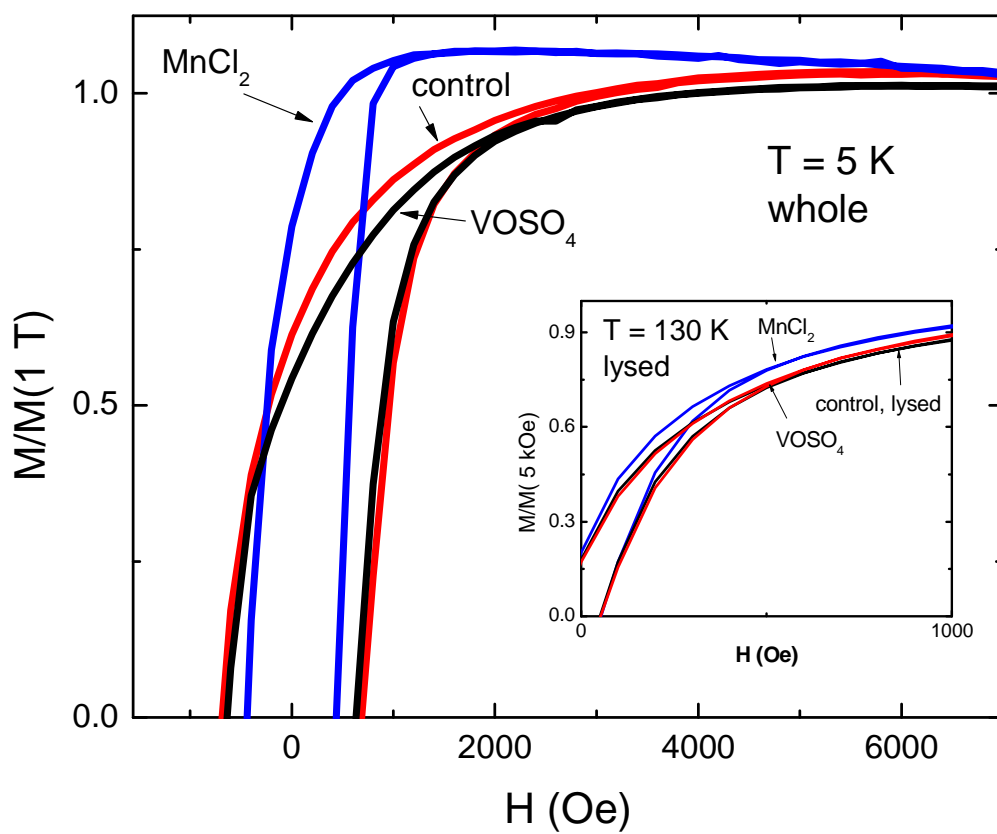


Figure 3.

## TABLE CAPTION

**Table 1.** Features of cells and magnetosomes produced by cells of *Magnetospirillum gryphiswaldense* strain MSR-1 grown with 50  $\mu\text{M}$  ferric citrate and 50  $\mu\text{M}$  of an addition metal. Cells for the inoculum for all cultures were pregrown in medium lacking the major source of iron, ferric citrate, but contained a small amount of iron (about 0.36  $\mu\text{M}$ ) present in the mineral solution. Values of numbers of magnetosomes per cell and magnetosome size are represented as mean  $\pm$  standard deviation. ND: not determined for various reasons. In the case of zinc-grown cells and the inoculum, we were unable to purify enough magnetosome magnetite crystals due to the low cell yield and low number of magnetosomes. BF TEM Bright Field Transmission Electron Micrographs Scale bar: 100 nm.

<sup>a</sup> The detection limit of the determination of introduced metal/total metal was 0.02 wt%.

## FIGURE CAPTIONS

**Figure 1.** Bright Field (BF), Dark Field Transmission Electron Micrographs obtained with High Angle Annular Dark Field detector (HAADF) and Energy Dispersive X-Ray (EDX) spectra for (a) magnetite-containing magnetosomes from lysed cells of *Magnetospirillum gryphiswaldense* strain MSR-1 grown in the presence of 50  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$  and 50  $\mu\text{M}$  ferric citrate. The EDX spectra collected on individual magnetosomes clearly demonstrate the presence of manganese in the magnetite crystals of the magnetosomes; (b) magnetosomes from lysed cells of *Magnetospirillum gryphiswaldense* strain MSR-1 grown only with 50  $\mu\text{M}$  ferric citrate. No manganese was detected in the magnetosomes.

**Figure 2.** Magnetization (M) versus temperature (T) magnetization curves (ZFC-W measurements) of dense suspensions of cells of *Magnetospirillum gryphiswaldense* strain MSR-1 grown with 50  $\mu\text{M}$  of an introduced metal indicated in the figure and 50  $\mu\text{M}$  ferric citrate. Cell suspensions were cooled in zero magnetic field to 5 K, then a 500 Oe magnetic field was applied and measurements were taken while warming the sample to 296K.  $T_V$  marks the Verwey transition and  $T_c$  marks the blocking temperature. Inset: enlarged M vs. T magnetization curve for the indicated cell suspensions.

**Figure 3.** Magnetization loops of dense suspensions of whole intact cells of *Magnetospirillum gryphiswaldense* strain MSR-1 grown in the presence of 50  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$  or  $\mu\text{M}$   $\text{VO}_2$  with  $\mu\text{M}$  ferric citrate at 5 K. Inset: similar comparison above the Verwey transition, at 130 K with lysed cells. No difference between lysed and whole cells was observed at either temperature.

## **Capítulo VII: Conclusiones**



1. Se ha formado magnetita inorgánica en unas condiciones compatibles con la vida, por lo que las partículas sintetizadas pueden servir como control inorgánico de magnetitas producidas biológicamente. Ello ha sido posible gracias al diseño, realizado en esta Tesis, de un método de co-precipitación económico para la producción inorgánica de magnetita a 25°C como fase primaria, en condiciones anóxicas. Con este método es posible producir magnetita con un tamaño de partícula que puede oscilar entre el necesario para que se comporte, bien como partícula de dominio único magnético o bien como partícula superparamagnética, simplemente variando el tiempo de incubación del experimento. Esta propiedad es de gran interés para la fabricación de nanopartículas magnéticas con interés tecnológico.

2. La hipótesis formulada por otros autores proponiendo la formación inorgánica de las magnetitas del meteorito de Marte ALH84001 mediante un proceso de descomposición termal de un carbonato precursor no es válida. Esta conclusión está basada en nuestro descubrimiento de que cuando se produce una descomposición termal de carbonatos que contienen Ca, Mg y Fe, la magnetita resultante incorpora estos cationes en su estructura cristalina. Las magnetitas obtenidas como resultado de esta descomposición, por tanto, no son químicamente puras y, como tales, no son idénticas a las encontradas en el meteorito ALH84001. Más aún, demostramos que esa descomposición es topotáctica y, como tal, infiere una orientación entre los cristalitas de magnetita que es muy diferente a la alineación encontrada entre los magnetosomas de las bacterias magnetotácticas y en la de las magnetitas del meteorito ALH84001.

3. El estudio de la orientación, alineamiento y de las relaciones estructurales entre los cristales de magnetita, en particular, y de óxidos en general, es decisivo para determinar cuándo estos óxidos se han formado por descomposición termal de un carbonato precursor.

4. La formación de magnetita biológicamente inducida por *Shewanella oneidensis* requiere, conjuntamente, de la existencia de mecanismos activos y pasivos de precipitación. Por una parte, es necesaria la presencia de células metabólicamente activas que inducen un incremento de pH en su entorno celular. Este mecanismo activo ha de combinarse con el papel que juegan las paredes celulares, membranas, restos celulares y otros compuestos orgánicos cuando actúan como núcleos de cristalización, ya que localmente concentran  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  en sus áreas cargadas negativamente. La acción conjunta de ambos factores crea unas condiciones locales de sobresaturación en las que se produce la precipitación de magnetita.

5. Hemos encontrado una nueva diferencia, no estudiada con anterioridad en magnetitas, que permite reconocer el origen biótico de muestras naturales de magnetita, y, por tanto, puede ser usada como biomarcador. Esta diferencia encontrada es la alteración en la estructura cristalina que sufren las magnetitas inducidas biológicamente por *Shewanella oneidensis*, al incorporar compuestos orgánicos en su interior. Estas alteraciones en la estructura cristalina del mineral son detectables por espectroscopía Raman.

6. La incorporación de sales de cationes diferentes al hierro, aun en pequeñas concentraciones, modifica la disolución y biorreducción de la ferrihidrita, cuando este compuesto es usado por *Shewanella oneidensis* como fuente de  $\text{Fe}^{3+}$ , el cual actuará como aceptor de electrones en la respiración anaerobia de esta bacteria.

7. El criterio de “pureza química” de las magnetitas biogénicas, usado hasta ahora para reconocer origen biótico de magnetitas naturales, no es válido. Esto es debido a que, al igual que ocurre en las magnetitas inorgánicas, las magnetitas inducidas por *Shewanella oneidensis*, así como las formadas por biomineralización controlada por *Magnetospirillum gryphiswaldense*, incorporan en su estructura cationes con radio

iónico y carga similares al hierro, cuando estas bacterias crecen en un medio que contiene esos cationes.

8. La incorporación de cationes diferentes al hierro en las magnetitas biogénicas, permite la formación de nanopartículas magnéticas no estequiométricas con propiedades magnéticas nuevas. Esta alteración puede ser muy útil en nanotecnología, ya que permite la modulación de éstas propiedades para su mejor adaptación a la aplicación tecnológica concreta. Esta conclusión se basa en nuestras observaciones de que la incorporación de Mn en las magnetitas de los magnetosomas de *Magnetospirillum gryphiswaldense* modifica las propiedades magnéticas de esta magnetita dopada comparadas con las de magnetita pura.

1. Inorganic magnetites have been formed in conditions compatible with life, so the synthesized particles can act as inorganic controls to compare to biologically produced magnetites. This has been possible because we have designed a low-cost coprecipitation method for the inorganic production of magnetite as a primary phase, at 25°C, under anoxic conditions. Thanks to this procedure, it is possible to produce magnetite with a particle size range between the one required for the particle to behave as single magnetic domain one and the one required for the particle to behave as a superparamagnetic one, just by changing experiment incubation time. This feature is of great interest in nanoparticle tailoring for technological uses.

2. The hypothesis proposed by some authors of an inorganic origin of the ALH84001 magnetite, based on the formation of those magnetites by the thermal decomposition of a carbonate precursor is not valid. Such a conclusion is based on our observations that the thermal decomposition of  $(\text{Ca,Mg,Fe})\text{CO}_3$  results in the formation of Ca-and/or Mg-substituted magnetite, forming a solid solution rather than a mixture of

pure oxide (CaO, FeO and MgO). Moreover, our observation that such a thermal decomposition of a carbonate precursor is topotactic (·D lattice continuity) imprints a special orientation between the newly formed magnetite crystals that is clearly different for the alignment of the magnetosomes of the magnetotactic bacteria and of the disposition of ALH84001 magnetites.

3. Studies involving structural relations within magnetite crystals (oxides in general) and their relative orientations may help identify whether or not such crystals were produced by a thermal decomposition of a carbonate precursor.

4. Biologically induced magnetite formation by *Shewanella oneidensis* requires of the coexistence of active and passive precipitation mechanisms. In one hand, it is necessary the presence of metabolically active cells that induce a pH increase around them. This active mechanism combines with the role that play cell wall, membranes, cell debris and other organic compounds that act as nucleation sites, locally increasing the concentration of  $Fe^{2+}$  and  $Fe^{3+}$  in their negatively charged areas. Both factors, simultaneously acting, create local supersaturation conditions that trigger magnetite precipitation.

5. A new difference, not previously studied in magnetites, has been found that enables to recognize the biotic origin of natural magnetite samples. This difference is the alteration in the crystalline structure of *Shewanella oneidensis* induced magnetite because of the incorporation of organic matter into the crystal structure. These alterations in the mineral crystalline structure are detectable by Raman spectroscopy.

6. The incorporation of cation salts different to iron, even in small concentration, modifies the dissolution rate and bioreduction of ferrihydrite when this compound is used by *Shewanella oneidensis* as  $Fe^{3+}$  donor, which will act as an electron acceptor in anaerobic respirations.

7. Chemical purity criterion for biogenic magnetites, used nowadays to recognize biotic origin of natural magnetites, is not reliable. This conclusion is based on our findings that, as happens in inorganic magnetites, both *Shewanella oneidensis* induced magnetites and the ones formed by controlled biomineralization by *Magnetospirillum gryphiswaldense*, incorporate, into their crystalline structure, cations with charge and ionic radii similar to those of iron when these bacteria grow in media containing these type of cations.

8. The incorporation of cations different to iron in biogenic magnetite enables the formation of non-stoichiometric magnetic nanoparticles with novel magnetic properties. This alteration may be very useful in nanotechnology, as it enables the modulation of these properties for the best adaptation of these magnetic nanoparticles to a specific technological application. This conclusion is based in our observations that the Mn incorporation into the crystalline structure of the magnetites, formed by *Magnetospirillum gryphiswaldense*, modifies the magnetic properties of this “doped” magnetite compared to those of the stoichiometric magnetite.



## BIBLIOGRAFIA

- Addadi, L. and Weiner, S. (1992) Control and design principles in biological mineralization. *Angewandte Chemie (International Edition in English)* 31 (2), 153-169.
- Aguirre, A. A., Balazas, G. H., Zimmerman, B. & Spraker, T. R. (1994). Evaluation of Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*) for potential pathogens associated with fibropapillomas. *J Wildl Dis* 30, 8-15.
- Akai, J., Sato T. and Okusa, S. (1991). "TEM Study on Biogenic Magnetite in Deep-Sea Sediments from the Japan Sea and the Western Pacific-Ocean." *Journal of Electron Microscopy* 40(2): 110-117.
- Amemiya, Y., Tanaka, T., Yoza, B., and Matsunaga, T. (2005). Novel detection system for biomolecules using nano-sized bacterial magnetic particles and magnetic force microscopy. *J. Biotechnol.* 120, 308-314.
- Anderson, R.T., Rooney-Varga, J., Gaw, C.V. and Lovley, D.R. (1998) Anaerobic benzene oxidation in the Fe(III)-reduction zone of petroleum-contaminated aquifers. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1222-1229.
- Arakaki, A., Hideshima, S., Nakagawa, T., Niwa, D., Tanaka, T., Matsunaga, T., and Osaka, T. (2004). Detection of biomolecular interaction between biotin and streptavidin on a self-assembled monolayer using magnetic nanoparticles. *Biotechnol. Bioeng.* 88, 543-546.
- Arakaki, A., Takeyama, H., Tanaka, T., and Matsunaga, T. (2002). Cadmium recovery by a sulfate-reducing magnetotactic bacterium, *Desulfovibrio magneticus* RS-1, using magnetic separation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98-100, 833-840.
- Arakaki, A., Webb, J., and Matsunaga, T. (2003). A novel protein tightly bound to bacterial magnetic particles in *Magnetospirillum magneticum* strain AMB-1. *J. Biol. Chem.* 278, 8745-8750.
- Arató, B., Szányi, Z., Flies, C., Schüller, D., Frankel, R. B., Buseck, P. R. and Pósfai M. (2005) Crystal-size and shape distributions of magnetite from uncultured magnetotactic bacteria as a potential biomarker, *Am. Mineral.*, 90, 1233-1241, doi:10.2138/am.2005.1778.

- Arias, J.L., Fink, D.J., Xiao, S.-Q., Heuer, A.H. and Caplan, A.I. (1993) Biomineralization and eggshells: Cell-mediated acellular compartments of mineralized extracellular matrix. *International Review of Cytology* 145, 217-250.
- Arnold, R.G., Dichristina, T.J. and Hoffmann, M.R. (1986) Inhibitor studies of dissimilative Fe(III) reduction by *Pseudomonas sp.* strain-200 (*Pseudomonas ferrireductans*). *Appl. Environ. Microbiol.* 52 (2), 281-289.
- Arnold, R.G., Dichristina, T.J., Hoffmann, M.R. and Picardal, F.W. (1990) Regulation of dissimilatory Fe(III) reduction activity in *Shewanella putrefaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (9), 2811-2817.
- Bahaj, A. S., Croudace, I. W., James, P. A. B., Moeschler, F. D., and Warwick, P. E. (1998b). Continuous radionuclide recovery from wastewater using magnetotactic bacteria. *J. Magn. Magn. Mater.* 184, 241–244.
- Bahaj, A. S., James, P. A. B., and Moeschler, F. D. (1998a). Low magnetic-field separation system for metal-loaded magnetotactic bacteria. *J. Magn. Magn. Mater.* 177, 1453–1454.
- Bahaj, A. S., James, P. A. B., and Moeschler, F. D. (1998c). Wastewater treatment by biomagnetic separation: A comparison of iron oxide and iron sulphide biomass recovery. *Water Sci. Technol.* 38, 311–317.
- Bahaj, A. S., James, P. A. B., Ellwood, D. C., and Watson, J. H. P. (1993). Characterization and growth of magnetotactic bacteria—implications of clean up of environmental pollution. *J. Appl. Physiol.* 73, 5394–5396.
- Baker RR, Mather JG, Kennaugh JH. (1983) Magnetic bones in human sinuses. *Nature. Jan* 6;301(5895):79–80.
- Balkwill, D. L., Maratea, D., and Blakemore, R. P. (1980). Ultrastructure of a magnetotactic spirillum. *J. Bacteriol.* 141, 1399–1408.
- Banfield J.F. and Zhang H. (2001) Nanoparticles in the environment. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 44, 1-58.
- Banfield, J.F. and Nealson, K.H. (1997) Geomicrobiology: interactions between microbes and minerals. In: P.H. Ribbe, Editor, *Rev. Mineralol.* vol. 35, Mineral. Soc. Am., Washington (1997), 448.



- Barber, D. J. and Scott, E. R. D. (2002), Origin of supposedly biogenic magnetite in the Martian meteorite Allan Hills 84001, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *99*, 6556-6561, doi:10.1073/pnas.102045799.
- Bauer, G. B., Fuller, M., Perry, A., Dunn, R. and Zoeger, J. (1985). Magnetoreception and biomineralization of magnetite in cetaceans. In *Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms* (ed. J. L. Kirschvink, D. S. Jones and B. J. MacFadden), 489-507. New York: Plenum Press.
- Bäuerlein, E. (2003) Biomineralization of unicellular organisms: An unusual membrane biochemistry for the production of inorganic nano- and microstructures. *Angewandte Chemie - International Edition* *42* (6), 614-641.
- Bazylinski D. A. and R. B. Frankel R.B. (2003) Biologically controlled mineralization in prokaryotes, *Rev. Mineral. Geochem*, *54*, 95-114, doi: 10.2113/0540217.
- Bazylinski D. A., Frankel R. B. and Konhauser K. O. (2007) Modes of biomineralization of magnetite by microbes, *Geomicrobiol. J.*, *24*, 465.
- Bazylinski, D. A. (1995). Structure and function of the bacterial magnetosome. *ASM News* *61*, 337–343.
- Bazylinski, D. A. and Frankel, R. B. (2000b). Biologically controlled mineralization of magnetic iron minerals by magnetotactic bacteria. In “Environmental Microbe-Mineral Interactions” (D. R. Lovely, ed.), 109–144. ASM Press, Washington, DC.
- Bazylinski, D. A. and Frankel, R. B. (2004). Magnetosome formation in prokaryotes. *Nat. Rev. Microbiol.* *2*, 217–230.
- Bazylinski, D. A. and Moskowitz, B.M. (1997). Microbial biomineralization of magnetic iron minerals: Microbiology, magnetism and environmental significance. *Rev. Mineral.* *35*, 181–223.
- Bazylinski, D. A. and Williams, T. J. (2007). Ecophysiology of magnetotactic bacteria. In “Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria” (D. Schüller, ed.), Vol. 3, 37–75. Springer, Berlin, Heidelberg.

- Bazylinski, D. A., and Blakemore, R. P. (1983). Denitrification and assimilatory nitrate reduction in *Aquaspirillum magnetotacticum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 1118–1124.
- Bazylinski, D. A., and Frankel, R. B. (2000a). Magnetic iron oxide and iron sulfide minerals within organisms. In “Biom mineralization: From Biology to Biotechnology and Medical Application” (E. Baeuerlein, ed.), 25–46. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Bazylinski, D. A., Dean, A. J., Schöler, D., Phillips, E. J., and Lovley, D. R. (2000). N<sub>2</sub>-dependent growth and nitrogenase activity in the metal-metabolizing bacteria, *Geobacter* and *Magnetospirillum* species. *Environ. Microbiol.* 2, 266–273.
- Bazylinski, D. A., Dean, A. J., Williams, T. J., Long, L. K., Middleton, S. L., and Dubbels, B. L. (2004). Chemolithoautotrophy in the marine, magnetotactic bacterial strains MV-1 and MV-2. *Arch. Microbiol.* 182, 373–387.
- Bazylinski, D. A., Frankel, R. B., and Jannasch, H. W. (1988). Anaerobic magnetite production by a marine, magnetotactic bacterium. *Nature* 334, 518–519.
- Bazylinski, D. A., Frankel, R. B., Heywood, B. R., Mann, S., King, J. W., Donaghay, P. L. and Hanson, A. K. (1995). Controlled biomineralization of magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) and greigite (Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>) in a magnetotactic bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3232–3239.
- Bazylinski, D. A., Garratt-Reed, A. J. and Frankel, R. B. (1994). Electron microscopic studies of magnetosomes in magnetotactic bacteria. *Microsc. Res. Tech.* 27, 389–401.
- Bazylinski, D. A., Garrattreed, A. J., Abedi, A. and Frankel, R. B. (1993a). Copper association with iron sulfide magnetosomes in a magnetotactic bacterium. *Arch. Microbiol.* 160, 35–42.
- Bazylinski, D. A., Heywood, B. R., Mann, S. and Frankel, R. B. (1993b). Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub> in a bacterium. *Nature* 366, 218.
- Bazylinski, D.A. and Schübbe, S. (2007), Controlled biomineralization by and applications of magnetotactic bacteria, *Adv. Appl. Microbiol.*, 62, 21-62, doi:10.1016/S0065-2164(07)62002-4.
- Bazylinski, D.A., Frankel, R.B. and Jannasch, H.W. (1988) Anaerobic magnetite production by a marine, magnetotactic bacterium. *Nature* 334 (6182), 518-519.

- Beavon, J. and Heatly, N.G. (1963) The occurrence of struvite (magnesium ammonium phosphate hexahydrate) in microbial cultures. *Journal of general microbiology* 31, 167-169.
- Begg, A. C., Sprong, D., Balm, A. and Martin, J. M. C. (2002) Premature chromosome condensation and cell separation studies in biopsies from head and neck tumors for radiosensitivity prediction. *Radiother. Oncol.* , 62, 335-343.
- Belcher, A.M. , Wu, X.H., Christensen, R.J., Hansma, P.K., Stucky G.D. and Morse D.E. (1996) Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollusk. *Nature* 381, 56–58.
- Beliaev, A. S. and Saffarini, D. A, 1998 *Shewanella putrefaciens* mtrB encodes an outer membrane protein required for Fe(III) and Mn(IV) reduction *Journal of Bacteriology* 180 (23), 6292-6297.
- Beliaev, A. S., Saffarini, D. A., McLaughlin, J.L. and Hunnicutt, D. (2001). "MtrC, an outer membrane decahaem c cytochrome required for metal reduction in *Shewanella putrefaciens* MR-1." *Molecular Microbiology* 39(3): 722-730.
- Benzerara, K., Menguy, N., Guyot, F., Skouri, F., de Luca, G., Barakat, M. and Heulin, T. (2004) Biologically controlled precipitation of calcium phosphate by *Ramlibacter tataouinensis*. *Earth and Planetary Science Letters* 228 (3-4), 439-449.
- Berner, R. A. (1967). Thermodynamic stability of sedimentary iron sulfides. *Am. J. Sci.* 265, 773–785.
- Berner, R. A. (1970). Sedimentary pyrite formation. *Am. J. Sci.* 268, 1–23.
- Beveridge T.J. (1989) Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization. *Annual Review of Microbiology* 43, 147-171.
- Blakemore, R. (1975). "Magnetotactic Bacteria." *Science* 190(4212): 377-379.
- Blakemore, R. P. (1982). "Magnetotactic Bacteria." *Annual Review of Microbiology* 36: 217-238.
- Blakemore, R. P., Frankel, R. B. and Kalmijn, A. J. (1980) South-seeking magnetotactic bacteria in the southern-hemisphere. *Nature* 286, 384–385.
- Böhm. E.L., Futterer, D. and Kaminski , E. (1978): Algal calcification in codiaceae: ultrastructure and location of skeletal deposits. *J. Phycol.* 14, 486- 493.

- Bond, D.R. and Lovley, D.R. (2002) Reduction of Fe(III) oxide by methanogens in the presence and absence of extracellular quinones. *Environ. Microbiol.* 4, 115-124.
- Borowitzka, M.A. (1982) Mechanisms in algal calcification. *Prog. Phycol. Res.* 1, 137-178.
- Braissant, O., Verrecchia, E.P. and Aragno, M. (2002) Is the contribution of bacteria to terrestrial carbon budget greatly underestimated? *Naturwissenschaften* 89 (8), 366-370.
- Brink, A. J., van Straten, A. & van Rensburg, A. J. (1995). *Shewanella (Pseudomonas) putrefaciens* bacteremia. *Clin Infect Dis* 20, 1327±1332.
- Buchler ER, Wasilewski PJ (1985) Magnetic remanence in bats. In: Kirschvink JL, Jones DS, MacFadden BJ, editors. Magnetite biomineralization and magnetoreception in organisms: a new biomagnetism. New York: Plenum Press. 483–488.
- Burgess, J. G., Kawaguchi, R., Sakaguchi, T., Thornhill, R. H., and Matsunaga, T. (1993). Evolutionary relationships among Magnetospirillum strains inferred from phylogenetic analysis of 16S rDNA sequences. *J. Bacteriol.* 175, 6689–6694.
- Burton W.K., Cabrera N. and Frank F.C. (1951) The growth of crystals and the equilibrium structure of their surfaces, *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 243, 299–358.
- Buseck, P. R., Dunin-Borkowski, R. E., Devouard, B., Frankel, R. B., McCartney, M. R., Midgley, P. A., Posfai, M., and Weyland, M. (2001). Magnetite morphology and life on Mars. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 13490–13495.
- Buskirk, R. E., O'Brien, W. P. Jr. 1985. Magnetic remanence and response to magnetic fields in Crustacea. See Kirschvink et al 1985, 365-84.
- Butler, R. F., Banerjee, S. K., and Stout, J.H. (1975). "Magnetic properties of oceanic pillow basalts from Macquarie Island." *Nature* 257(5524), 302-303.
- Caccavo Jr. F., Blakemore R.P. and Lovley D.R. (1992) A hydrogen-oxidizing, Fe(III)-reducing microorganism from the Great Bay estuary, New Hampshire. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (10), 3211-3216.
- Cairns-Smith, A.G., Hall, A. J. and Russell M. J. (1992), Mineral theories of the origin of life and an iron sulfide example, *Origins Life Evol. B.*, 22, 161-180, doi:10.1007/BF01808023.

- Call, D. R., Brockman, F. J. and Chandler, D. P. (2001) Detecting and genotyping *Escherichia coli* O157:H7 Using multiplexed PCR and nucleic acid microarrays. *Int. J. Food Microbiol.* 67, 71-80.
- Calugay, R. J., Miyashita, H., Okamura, Y. and Matsunaga, T. (2003) Siderophore production by the magnetic bacterium *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. *FEMS Microbiol. Lett.* 218, 371–375.
- Cañaveras, J.C., Hoyos, M., Sanchez-Moral, S., Sanz-Rubio, E., Bedoya, J., Soler, V., Groth, I. and Schumann, P. (1999) Microbial communities associated with hydromagnesite and needle-fiber aragonite deposits in a Karstic Cave (Altamira, Northern Spain). *Geomicrobiology Journal* 16 (1), 9-25.
- Cañaveras, J.C., Hoyos, M., Sanchez-Moral, S., Sanz-Rubio, E., Bedoya, J., Soler, V., Groth, I., Schumann, P. (2000) Microbial communities associated with hydromagnesite and needle-fiber aragonite deposits in a Karstic Cave (Altamira, Northern Spain). *Geomicrobiology Journal* 16 (1), 9-25.
- Carter, S.P. (1990) The stratification and taphonomy of shells in calcareous soils: Implications for land snail analysis in archaeology. *Journal of Archaeological Science* 17 (5), 495-507.
- Cartwright, J.H.E. and Checa, A.G. (2007) The dynamics of nacre self-assembly. *Journal of the Royal Society Interface* 4 (14), 491-504.
- Castanier S., Le M'etayer-Levrel G. and Perthuisot J-P. (2000) Bacterial roles in the precipitation of carbonate minerals. In: Riding RE, Awramik SM. editors. *Microbial Sediments*. Berlin Springer-Verlag.
- Chakraborty, A. J. (1999) Kinetics of the reduction of hematite to magnetite near its Curie transition. *Magn. Magn. Mater.* 204, 57-60.
- Chang, S.B.R., and Kirschvink J. L. (1989) Magnetofossils, the magnetization of sediments and the evolution of magnetite biomineralization, *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.*, 17, 169–195, doi:10.1146/annurev.ea.17.050189.001125.
- Chaudhuri, S.K., Lack, J.G. and Coates, J.D. (2001) Biogenic Magnetite Formation through Anaerobic Biooxidation of Fe(II). *Applied and Environmental Microbiology* 67 (6), 2844-2848.

- Checa, A.G., Esteban-Delgado, F.J., Ramírez-Rico, J. and Rodríguez-Navarro, A.B. (2009) Crystallographic reorganization of the calcitic prismatic layer of oysters. *Journal of Structural Biology* 167 (3), 261-270.
- Chekroun, K.B., Rodríguez-Navarro, C., González-Muñoz, M.T., Arias, J.M., Cultrone, G., and Rodríguez-Gallego, M. (2004) Precipitation and growth morphology of calcium carbonate induced by *Myxococcus xanthus*: Implications for recognition of bacterial carbonates. *Journal of Sedimentary Research* 74 (6), 868-876.
- Clemett, S. J., Thomas-Keprta, K. L., Shimmin, J., Morphey, M., McIntosh, J. R., Bazylinski, D. A., Kirschvink, J. L., McKay, D. S., Wentworth, S. J., Vali, H., Gibson, E. K., Jr., and Romanek, C. S. (2002). Crystal morphology of MV-1 magnetite. *Am. Mineral.* 87, 1727–1730.
- Coates, J.D. and Anderson, R.T. (2000) Emerging techniques for anaerobic bioremediation of contaminated environments. *Trends in Biotechnology* 18 (10), 408-412.
- Coates, J.D., Bhupathiraju, V.K., Achenbach, L.A., McInerney, M.J. and Lovley, D.R. (2001) *Geobacter hydrogenophilus*, *Geobacter chapellei* and *Geobacter grbiciae*, three new, strictly anaerobic, dissimilatory Fe(III)-reducers. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51 (2), 581-588.
- Coates, J.D., Councill, T.B., Ellis, D.J. and Lovley, D.R. (1998) Carbohydrateoxidation coupled to Fe (III) reduction, a novel form of anaerobic metabolism. *Anaerobe* 4, 277-282.
- Coates, J.D., Ellis, D.J. and Lovley, D.R. (1999) *Geothrixfermentans* gen. novosp. nov., an acetate-oxidizing Fe(III) reducer capable of growth via fermentation. *Internat. J. Sys. Bacteriol.* 49, 1615-1622.
- Coates, J.D., Lonergan, D.J., Jenter, H. and Lovley, D.R. (1996) Isolation of *Geobacter* species from diverse sedimentary environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1531-1536.
- Coker V.S., Pearce C.I., Patrick R.A.D., Van Der Laan G., Telling N.D., Charnock J.M., Arenholz E. and Lloyd J.R. (2008) Probing the site occupancies of Co-, Ni-, and Mn-substituted biogenic magnetite using XAS and XMCD. *Am. Mineral.* 93 (7), 1119-1132.

- Coleman, M.L., Hedrick, D.B., Lovley, D.R., White, D.C. and Pye, K. (1993) Reduction of Fe(III) in sediments by sulphate-reducing bacteria. *Nature* 361, 436-438.
- Cooper, D.C., Picardal, F., Rivera, J. and Talbot, C. (2002) Zinc immobilization and magnetite formation via ferric oxide reduction by *Shewanella putrefaciens* 200. *Environmental Science and Technology* 34 (1), 100-106.
- Cornell R.M. and Schwertmann U. (1996) *The Iron Oxides Structure, Properties, Reactions, Occurrence and Uses*. VCH Weinheim.
- Cox, B. L., Popa, R., Bazylinski, D. A., Lanoil, B., Douglas, S., Belz, A., Engler, D. L. and Nealson, K. H. (2002) Organization and elemental analysis of P-, S-, and Fe-rich inclusions in a population of freshwater magnetococci. *Geomicrobiol. J.* 19, 387-406.
- Cummings D.E., Caccavo Jr. F., Spring S. and Rosenzweig R.F. (1999) *Ferribacterium limneticum*, gen. nov., sp. nov., a Fe(III)-reducing microorganism isolated from mining-impacted freshwater lake sediments. *Arch. Microbiol.* 171, 183-188.
- de Duve, C. (1995a) The beginnings of life on Earth, *Am. Sci.*, 38, 428-437.
- de Duve, C. (1995b), *Vital Dust: Life as a Cosmic Imperative*, 362, Basic Books, New York.
- DeLong, E. F., Frankel, R. B., and Bazylinski, D. A. (1993). Multiple evolutionary origins of magnetotaxis in bacteria. *Science* 259, 803-806.
- Devouard, B., Posfai, M., Hua, X., Bazylinski, D. A., Frankel, R. B. and Buseck, P. R. (1998). Magnetite from magnetotactic bacteria: Size distributions and twinning. *Am. Mineral.* 83, 1387-1398.
- Diaz-Ricci, J. C., and Kirschvink, J. L. (1992). Magnetic domain state and coercivity predictions for biogenic greigite (Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>): A comparison of theory with magnetosome observations. *J. Geophys. Res.* 97, 17309-17315.
- DiChristina, T. J., Moore, C. M. and Haller, C.A. (2002). "Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction by *Shewanella putrefaciens* requires ferE, a homolog of the pulE (gspE) type II protein secretion gene." *Journal of Bacteriology* 184(1), 142-151.

- Dong, H., J. K. Fredrickson, D. W. Kennedy, J. M. Zachara, R. K. Kukkadapu, and T. C. Onstott (2000), Mineral transformation associated with the microbial reduction of magnetite, *Chem. Geol.*, 169, 299–318, doi:10.1016/S0009-2541(00)00210-2.
- Dubbels, B. L., DiSpirito, A. A., Morton, J. D., Semrau, J. D., Neto, J. N., and Bazylinski, D. A. (2004). Evidence for a copper-dependent iron transport system in the marine, magnetotactic bacterium strain MV-1. *Microbiology* 150, 2931–2945.
- Dunin-Borkowski, R. E., McCartney, M. R., Frankel, R. B., Bazylinski, D. A., Posfai, M., and Buseck, P. R. (1998). Magnetic microstructure of magnetotactic bacteria by electron holography. *Science* 282, 1868–1870.
- Dunin-Borkowski, R. E., McCartney, M. R., Posfai, M., Frankel, R. B., Bazylinski, D. A., and Buseck, P. R. (2001). Off-axis electron holography of magnetotactic bacteria: Magnetic microstructure of strains MV-1 and MS-1. *Eur. J. Mineral.* 13, 671–684.
- Dupraz, C., and P. T. Visscher (2005) Microbial lithification in marine stromatolites and hypersaline mats. *Trends Microbiol.*, 13, 429-436, doi:10.1016/j.tim.2005.07.008.
- Ehrlich H.L. (2004) Microbial collaborations in biogeochemical transformations. *Northeastern Geology and Environmental Sciences* 26 (1-2), 43-47.
- Esquivel, D.M., Lins De Barros, H.G.P. and Farina, M. (1983) Magnetotactic microorganisms in the Rio de Janeiro region | [MICROORGANISMES MAGNETOTACTIQUES DE LA REGION DE RIO DE JANEIRO]. *Biology of the Cell* 47 (2), 227-233.
- Evans, M. E., and Heller, F. (2003). “Environmental Magnetism: Principles and Applications of Enviromagnetics.” Academic Press, San Diego.
- Faivre, D. and Zuddas, P. (2006) An integrated approach for determining the origin of magnetite nanoparticles. *Earth and Planetary Science Letters* 243 (1-2), 53-60.
- Falini et al., 1995 G. Falini, S. Albeck, S. Weiner and L. Addadi, Control of aragonite or calcite polymorphism by Mollusk shell macromolecules, *Science* 271 (1995), 67–69.
- Farina, M., Esquivel, D. M. S., and Debarros, H. G. P. L. (1990). Magnetic iron-sulfur crystals from a magnetotactic microorganism. *Nature* 343, 256–258.



- Fernandez de Henestrosa, A. R., Cune, J., Mazon, G., Dubbels, B. L., Bazylinski, D. A., and Barbe, J. (2003). Characterization of a new LexA binding motif in the marine magnetotactic bacterium strain MC-1. *J. Bacteriol.* 185, 4471–4482.
- Fortin D. and Beveridge T.J. (2000) Mechanistic routes to biomineral surface development. *Biomineralization: From Biology to Biotechnology and Medical Application*. Baeuerlein E., Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Fowle, D. A., and J. B. Fein. (2001), Quantifying the effects of *Bacillus subtilis* cell walls on the precipitation of copper hydroxide from aqueous solution, *Geomicrobiol. J.*, 18, 77-91, doi:10.1080/01490450151079815.
- Franger, S., P. Berthet, and J. Berthon (2004), Electrochemical synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles in alkaline aqueous solutions containing complexing agents, *J. Solid State Electr.*, 8, 218-223, doi:10.1007/s10008-003-0469-6.
- Frankel, R. B. (1984). Magnetic guidance of organisms. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 13, 85–103.
- Frankel, R. B., and D. A. Bazylinski (2003), Biologically induced mineralization by bacteria, *Rev. Mineral. Geochem.*, 54, 217-247, doi:10.2113/0540095.
- Frankel, R. B., Bazylinski, D. A., Johnson, M. S., and Taylor, B. L. (1997). Magneto-aerotaxis in marine coccoid bacteria. *Biophys. J.* 73, 994–1000.
- Frankel, R. B., Blakemore, R. P., and Wolfe, R. S. (1979). Magnetite in freshwater magnetotactic bacteria. *Science* 203, 1355–1356.
- Frankel, R. B., Williams, T. J., and Bazylinski, D. A. (2007). Magneto-aerotaxis. In “Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria” (D. Schüler, ed.), Vol. 3, 1–24. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Frankel, R. B., Zhang, J. P., and Bazylinski, D. A. (1998). Single magnetic domains in magnetotactic bacteria. *J. Geophys. Res., Solid Earth* 103, 30601–30604.

- Fujita, Y., Redden, G.D., Ingram, J.C., Cortez, M.M., Ferris, F.G., Smith, R.W. (2004) Strontium incorporation into calcite generated by bacterial ureolysis. *Geochim. Cosmochim. Acta* 68 (15), 3261-3270.
- Fuller, M., Goree, W. S. & Goodman, W. L. (1985). An introduction to the use of SQUID magnetometers in biomagnetism. In *Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms: A New Biomagnetism* (ed. J. L. Kirschvink, D. S. Jones & B. J. MacFadden), 103-151. New York, London: Plenum Press.
- Funaki, M., Sakai, H., and Matsunaga, T. (1989). Identification of the magnetic poles on strong magnetic grains from meteorites using magnetotactic bacteria. *J. Geomagn. Geoelectr.* 41, 77-87.
- Funaki, M., Sakai, H., Matsunaga, T., and Hirose, S. (1992). The S-pole distribution on magnetic grains in pyroxenite determined by magnetotactic bacteria. *Phys. Earth Planet. Inter.* 70, 253-260.
- Gajdardziska-Josifovska, M., McClean, R.G., Schofield, M.A., Sommer, C.V. and Kean, W.F. (2001) Discovery of nanocrystalline botanical magnetite. *European Journal of Mineralogy* 13 (5), 863-870.
- Garrels, R. M., and C. L. Christ (1990), *Solutions, Minerals and Equilibria*, 450, Jones and Bartlett, Boston.
- Garside J. (1982) Nucleation. En *Biological Mineralization and Demineralization* (ed. G.H. Nancollas); Life Science Research Report 23. Springer-Verlag, 23-35.
- Garside J. (1983) Tailoring of crystal growth. *Chemical Engineer (London)* (392), 66-68
- Gilmour, D. (1990). Halotolerant and halophilic microorganisms. In *Microbiology of Extreme Environments*, 147-177. Edited by C. Edwards. Milton Keynes: Open University Press.
- Gold, T. (1992), The deep, hot biosphere. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 6045-6049, doi:10.1073/pnas.89.13.6045.
- Golden, D. C., D. W. Ming, C. S. Schwandt, H. V. Lauer, R. A. Socki, R. V. Morris, G. E. Lofgren, and G. A. McKay (2001), A simple inorganic process for formation of carbonates, magnetite and sulfides in Martian meteorite ALH84001, *Am. Mineral.*, 86, 370-375.

- Golden, D. C., Ming, D. W., Morris, R. V., Brearley, A., Lauer, H. V., Treiman, A. H., Zolensky, M. E., Schwandt, C. S., Lofgren, G. E. and McKay, G. A. (2004), Evidence for exclusively inorganic formation of magnetite in Martian meteorite ALH84001, *Am. Mineral.*, 89, 681-695.
- Gonzalez -Muñoz M.T., De-Linares C., Martinez-Ruiz F., Morcillo F., Martin-Ramos D. and Arias J.M. (2008) Ca–Mg kutnahorite and struvite production by *Idiomarina* strains at modern seawater salinities. *Chemosphere*, 72, 465-472.
- González-Muñoz, M., Fernández-Luque, B., Martínez-Ruiz, F., Chekroun, K.B., Arias, J.M., Rodríguez-Gallego, M., Martínez-Cañamero, M., de Linares, C. and Paytans, A. (2003) Precipitation of barite by *Myxococcus xanthus*: Possible implications for the biogeochemical cycle of barium. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (9), 5722-5725.
- González-Muñoz, M.T., Ben Omar, N. and Arias, J.M. (1996) Biomineralization: A review of some of its most relevant aspects | [Biomineralización: Revisión de algunos de sus aspectos más destacados]. *Ars Pharmaceutica* 37 (3), 483-518.
- González-Muñoz, M.T., Ben Omar, N., Martínez-Cañamero, M., Rodríguez-Gallego, M., Galindo, A.L., Arias, J.M. (1996). "Struvite and calcite crystallization induced by cellular membranes of *Myxococcus xanthus*." *Journal of Crystal Growth* 163(4): 434-439.
- Gorby, Y. A., T. J. Beveridge, and R. P. Blakemore (1988), Characterization of the bacterial magnetosome membrane, *J. Bacteriol.*, 170, 834-841.
- Gorby, Y. and Lovley, D.R. (1991a) Electron transport in the dissimilatory iron-reducer, GS-15. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 867-870.
- GOULD, J. L., KIRSCHVINK, J. L. & DEFFEYES, K. S. (1978). Bees have magnetic remanence. *Science* 201,1026-1028.
- Grünberg, K., Müller, E. C., Otto, A., Reszka, R., Linder, D., Kube, M., Reinhardt, R., and Schüler, D. (2004). Biochemical and proteomic analysis of the magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1040–1050.

- Hall, J.M. and Muzzatti, A. (1999) Delayed magnetization of the deeper kilometer of oceanic crust at Ocean Drilling Project Site 504. *Journal of Geophysical Research B: Solid Earth* 104 (B6), 12843-12851.
- Hamilton, S.E., King, G., Tesch, D., Riddles, P.W., Keough, D.T., Jell, J. and Zerner, B. (1982)  $\gamma$ -Carboxyglutamic acid in invertebrates: Its identification in hermatypic corals. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 108 (2), 610-613.
- Harasko, G., Pfützner, H., and Futschik, K. (1995). Domain analysis by means of magnetotactic bacteria. *IEEE T. Magn.* 31, 938–949.
- Harasko, G., Pfützner, H., Rapp, E., Futschik, K., and Schüller, D. (1993). Determination of the concentration of magnetotactic bacteria by means of susceptibility measurements *Jpn. J. Appl. Phys.* 32(Part 1), 252–260.
- Heinen, W. (1960) Silicium-Stoffwechsel bei Mikroorganismen - I. Mitteilung Aufnahme von Silicium durch Bakterien. *Archiv für Mikrobiologie* 37 (3), 199-210.
- Herbert Waite, J., Saleuddin, A.S.M. and Andersen, S.O. (1979) Periostracin - A soluble precursor of sclerotized periostracum in *Mytilus edulis* L. *Journal of Comparative Physiology B* 130 (4), 301-307.
- Hernández y Hernández, MA (2009). Estudios de precipitación de CaCO<sub>3</sub> como herramienta para entender los procesos de biomineralización, usando como modelo biológico la cáscara de huevo de gallina. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Directores: Alejandro Rodríguez Navarro y Juan M. García Ruiz.
- Hesse, P. P. (1994), Evidence for bacterial palaeoecological origin or mineral magnetic cycles in oxic and sub-oxic Tasman Sea sediments, *Mar. Geol.*, 117, 1-17, doi:10.1016/0025-3227(94)90003-5.
- Heywood, B. R., Bazylinski, D. A., Garrattreed, A., Mann, S., and Frankel, R. B. (1990). Controlled biosynthesis of greigite (Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>) in magnetotactic bacteria. *Naturwissenschaften* 77, 536–538.
- Heywood, B. R., Mann, S., and Frankel, R. B. (1991). Structure, morphology and growth of biogenic greigite (Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>). In “Materials Synthesis Based on Biological Processes” (M. Alpert, P. Calvert, R. B. Frankel, P. Rieke and D. Tirrel, eds.), 93–108. Materials Research Society, Pittsburgh.

- Hillis L. (1959), A revision of the genus *Halimeda* (order Siphonales), Publ. Inst. Mar. Sci., Univ. Texas 6:321- 403.
- Hongliang Zhu, Deren Yang, Luming Zhu (2007) Hydrothermal growth and characterization of magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) thin films, *Surface & Coatings Technology* 201, 5870–5874.
- Hua, T.-E. and Li, C.-W. (2007) Silica biomineralization in the radula of a limpet *Notoacmea schrenckii* (Gastropoda: Acmaeidae). *Zoological Studies* 46 (4), 379-388.
- Ichinose, N., Y. Ozaki, and S. Kashu (1992), *Superfine Particle Technology*, 223 , Springer Verlag, London.
- Isambert, A., Menguy, N., Larquet, E., Guyot, F. and Valet, J.-P. (2007) Transmission electron microscopy study of magnetites in a freshwater population of magnetotactic bacteria. *American Mineralogist* 92 (4), 621-630.
- Ishikawa, T., Y. Kondo, A. Yasukawa, and K. Kandori (1998), Formation of magnetite in the presence of ferric oxyhydroxides. *Corros. Sci.*, 40, 1239-1251, doi:10.1016/S0010-938X(98)00045-6.
- Jiao, Y., Kappler, A., Croal, L.R. and Newman, D.K. (2005) Isolation and characterization of a genetically tractable photoautotrophic Fe(II)-oxidizing bacterium, *Rhodospseudomonas palustris* strain TIE-1. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (8), 4487-4496.
- Jimenez-Lopez, C., Jroundi, F., Pascolini, C. Rodriguez-Navarro, C.Piñar-Larrubia, G. Rodriguez-Gallego, M. Gonzalez-Muñoz, M.T. et al. (2008). "Consolidation of quarry calcarenite by calcium carbonate precipitation induced by bacteria activated among the microbiota inhabiting the stone." *International Biodeterioration and Biodegradation* 62(4): 352-363.
- Jimenez-Lopez, C., Rodriguez-Navarro, C., Piñar, G., Carrillo-Rosúa, F.J., Rodriguez-Gallego, M., Gonzalez-Muñoz, M.T. (2007) Consolidation of degraded ornamental porous limestone stone by calcium carbonate precipitation induced by the microbiota inhabiting the stone. *Chemosphere* 68 (10), 1929-1936.
- Johnson D.B. and Hallberg K.B. (2003) The microbiology of acidic mine waters. *Res. Microbiol.* 154 (7), 466-473.

- Jolivet, J.P., Vayssieres, L., Chaneac, C. and Tronc, E. (1997) Precipitation of spinel iron oxide: nanoparticle size control. *Materials Research Society Symposium – Proceedings*. 432, 145-150.
- Jones, D., Wilson, M. J. and McHardy, W. J. (1986) Effects of lichens on mineral surfaces. *Biodeterioration* 7. Selected papers presented at the 7th International Biodeterioration Symposium, Cambridge, UK.
- Jorgensen, B. R. & Huß, H. H. (1989). Growth and activity of *Shewanella putrefaciens* isolated from spoiling fish. *Int J Food Microbiol* 9, 51-62.
- Kanno S., Oshima K., Shimomura M., Miyauchi S.(2005) Immobilization of enzyme to magnetic particles modified with poly(acrylic acid), *Polymer Preprints, Japan* Volume 54, Issue 1, 2385 .
- Karlin, R., Lyle, M. and Heath, G.R. (1987) Authigenic magnetite formation in suboxic marine sediments. *Nature* 326 (6112), 490-493.
- Kashefi, K., Tor, J.M., Holmes, D.E., VanPraagh, C.V.G., Reysenbach, A.-L. and Lovley, D.R. (2002b) *Geoglobus ahangari*, gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic Archaeum capable of oxidizing organic acids and growing autotrophically on hydrogen with Fe(III) serving as the sole electron acceptor. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 719-728.
- Kawaguchi, R., Burgess, J. G., Sakaguchi, T., Takeyama, H., Thornhill, R. H., and Matsunaga, T. (1995). Phylogenetic analysis of a novel sulfate-reducing magnetic bacterium, RS-1, demonstrates its membership of the  $\delta$ -Proteobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 126, 277–282.
- Keefe W.E. (1976) Formation of crystalline deposits by several genera of the family Enterobacteriaceae. *Infection and Immunity*, Volume 14, Issue 2, 1976, 590-592.
- Keim, C. M., U. Lins, and M. Farina (2009), Manganese in biogenic magnetite crystals from magnetotactic bacteria, *FEMS Microbiol. Lett.*, 292, 250-253, doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01499.x.
- Keim, C. N., Martins, J. L., Lins de Barros, H., Lins, U., and Farina, M. (2007). Structure, behavior, ecology and diversity of multicellular magnetotactic prokaryotes. In “Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria” (D. Schü ler, ed.), Vol. 3, 103–132. Springer, Berlin, Heidelberg.

- Keim, C.N., Abreu, F., Lins, U., De Barros, H.L. and Farina, M. (2004b) Cell organization and ultrastructure of a magnetotactic multicellular organism. *Journal of Structural Biology* 145 (3), 254-262.
- Keim, C.N., Martins, J.L., Abreu, F., Rosado, A.S., De Barros, H.L., Borojevic, R., Lins, U. and Farina, M.(2004a) Multicellular life cycle of magnetotactic prokaryotes. *FEMS Microbiology Letters* 240 (2), 203-208.
- Kelts K. (1988) Environments of deposition of lacustrine petroleum source rocks: an introduction. In Lacustrine Petroleum Source Rocks (eds. A.J. Fleet, K. Kelts and M.R. Talbot); *Geol. Soc. Spec. Publ.* 40, 3-26.
- Kim, D. K.; Zhang, Y.; Kehr, J.; Klason, T.; Bjelke, B.; Muhammed, M. (2001) Synthesis and characterization of surfactant-coated superparamagnetic monodispersed iron oxide nanoparticles *J. Magn. Magn. Mater.*, 255, 256.
- Kirschvink, J. L. 1981. Ferromagnetic crystals (magnetite?) in human tissue. *J. Exp. Biol.* 92: 333-35.
- Kirschvink, J.L. and Lowenstam, H.A. (1979) Mineralization and magnetization of chiton teeth: paleomagnetic, sedimentologic, and biologic implications of organic magnetite. *Earth and Planetary Science Letters* 44 (2), 193-204.
- Knauth, L.P. and Epstein, S. (1976) Hydrogen and oxygen isotope ratios in nodular and bedded cherts. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 40 (9), 1095-1108.
- Knauth, L.P. and Lowe, D.R. (1978) Oxygen isotope geochemistry of cherts from the Onverwacht Group (3.4 billion years), Transvaal, South Africa, with implications for secular variations in the isotopic composition of cherts. *Earth and Planetary Science Letters* 41 (2), 209-222.
- Knorre, H. V., and W. E. Krumbein (2000), Bacterial calcification, in *Microbial Sediments*, edited by R. A. Riding and S.M. Awranik, 25-31, Springer-Verlag, Berlin.
- Köhler, S.J., Cubillas, P., Rodríguez-Blanco, J.D., Bauer, C., Prieto, M. (2007) Removal of cadmium from wastewaters by aragonite shells and the influence of other divalent cations. *Environmental Science and Technology* 41 (1), 112-118.

- Komeili, A. (2007). Cell biology of magnetosome formation. In “Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria” (D. Schüler, ed.), Vol. 3, 163–174. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Komeili, A., Li, Z., Newman, D. K., and Jensen, G. J. (2006). Magnetosomes are cell membrane invaginations organized by the actin-like protein MamK. *Science* 311, 242–245.
- Komeili, A., Vali, H., Beveridge, T. J., and Newman, D. K. (2004). Magnetosome vesicles are present before magnetite formation, and MamA is required for their activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 3839–3844.
- Konhauser K.O. (1998) Diversity of bacterial iron mineralization. *Earth Science Reviews* 43 (3-4), 91-12.
- Konhauser, K.O. (2007) Introduction to Geomicrobiology. Blackwell publishing.
- Kostka, J. E., Stucki, J. W., Nealson, K. H. & Wu, J. (1996). Reduction of structural Fe(III) in smectite by a pure culture of *Shewanella putrefaciens* strain MR-1. *Clays and Clay Minerals* 44, 522±529.
- Koutzarova, T., Kolev, S., Ghelev, Ch. Paneva, D. and Nedkov, I. (2006) "Microstructural study and size control of iron oxide nanoparticles produced by microemulsion technique." *Physica Status Solidi C: Conferences* 3(5), 1302-1307.
- Krichevsky, A., Smith, M. J., Whitman, L. J., Johnson, M. B., Clinton, T. W., Perry, L. L., Applegate, B. M., O'Connor, K., and Csonka, L. N. (2007). Trapping motile magnetotactic bacteria with a magnetic recording head. *J. Appl. Physiol.* 101, 014701-1–014701-6.
- Kuhara, M., Takeyama, H., Tanaka, T., and Matsunaga, T. (2004). Magnetic cell separation using antibody binding with protein A expressed on bacterial magnetic particles. *Anal. Chem.* 76, 6207–6213.
- Kukkadapu R.K., Zachara J.M., Fredrickson J.K. Kennedy, D.W.I., Dohnalkova A.C. and McCready D.E. (2005) Ferrous hydroxy carbonate is a stable transformation product of biogenic magnetite. *Am. Mineral.*, 90(2-3), 510-515.
- Kukkadapu R.K., Zachara J.M., Fredrickson J.K., McKinley J.P., Kennedy D.W. I., Smith S.C. and Dong H. (2006) Reductive biotransformation of Fe in shale-limestone saprolite containing Fe(III) oxides and Fe(II)/Fe(III) phyllosilicates. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 70(14), 3662-3676.



- Kukkadapu R.K., Zachara J.M., Fredrickson J.K. and Kennedy D.W.I. (2004). Biotransformation of two-line silica-ferrhydrite by a dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium: Formation of carbonate green rust in the presence of phosphate. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 68(13), 2799-2814.
- Kusel K. (2003) Microbial cycling of iron and sulfur in acidic coal mining lake sediments. *Water, Air Soil Poll.* 3 (1), 67-90.
- Lalonde, S.V., Konhauser, K.O., Reysenbach, A.-L. and Ferris, F.G. (2005) The experimental silicification of Aquificales and their role in hot spring sinter formation. *Geobiology* 3 (1), 41-52.
- Leang, C., Coppi, M.V. and Lovley D.R. (2003) OmcB, a c-type polyheme cytochrome, involved in Fe(III) reduction in *Geobacter sulfurreducens* *Journal of Bacteriology* 185 (7), 2096-2103.
- Ledger P.W. y Franc, S. (1978) Calcification of the collagenous axial skeleton of *Veretillum cynomorium* Pall. (Cnidaria: Pennatulacea). *Cell and Tissue Research* 192 (2), 249-266.
- Lennie, A. R., Redfern, S. A. T., Champness, P. E., Stoddart, C. P., Schofield, P. F., and Vaughan, D. J. (1997). Transformation of mackinawite to greigite: An in situ X-ray powder diffraction and transmission electron microscope study. *Am. Mineral.* 82, 302–309.
- Liu, Z.L., Wang, X., Yao, K.L., Du, G.H., Lu, Q.H., Ding, Z.H., Tao, J., Ning, Q., Luo, X.P., Tian, D.Y. and Xi, D. (2004), Synthesis of magnetite nanoparticles in W/O microemulsion, *J. Mater. Sci.*, 39, 2633-2636, doi:10.1023/B:JMSC.0000020046.68106.22.
- Lovley, D. R. (1991). "Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction." *Microbiological Reviews* 55(2), 259-287.
- Lovley, D. R. and J. C. Woodward (1996). "Mechanisms for chelator stimulation of microbial Fe(III) - oxide reduction." *Chemical Geology* 132(1-4 SPEC. ISS.): 19-24.
- Lovley, D.R. (1987) Organic matter mineralization with the reduction of ferric iron: A review. *Geomicrobiol. J.* 5, 375-399.
- Lovley, D.R. (1990) Magnetite formation during microbial dissimilatory iron reduction. In: *Iron Biominerals* (R.B. Frankel and R.P. Blakemore, eds.), 151-166. Plenum Press, New York.
- Lovley, D.R. (1993) Dissimilatory metal reduction. *Ann. Rev. Microbiol.* 47, 263-290.

- Lovley, D.R. (1997a) Microbial Fe(III) reduction in subsurface environments. *FEMS Microbiol. Rev.* 20, 305-315.
- Lovley, D.R. and Coates, J.D. (2000) Novel forms of anaerobic respiration of environmental relevance. *Curro Opin. Microbiol.* 3, 252-256.
- Lovley, D.R. and Lonergan, D.J. (1990) Anaerobic oxidation of toluene, phenol, and p-cresol by the dissimilatory iron-reducing organism GS-15. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1858-1864.
- Lovley, D.R. and Phillips, E.J.P. (1988b) Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1472-1480.
- Lovley, D.R. and Phillips, E.J.P. (1994) Reduction of chromate by *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough) and its C3 cytochrome. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 726-728.
- Lovley, D.R., Chapelle, F.H. and Phillips, E.J.P. (1990) Fe(III)-reducing bacteria in deeply buried sediments of the Atlantic Coastal Plain. *Geology* 18, 954-957.
- Lovley, D.R., Roden, E.E., Phillips, E.J.P. and Woodward, J.C. (1993b) Enzymatic iron and uranium reduction by sulfate-reducing bacteria. *Marine Geol.* 113,41-53.
- Lovley, D.R., Widman, P.K., Woodward, J.e. and Phillips, E.J.P. (1993c) Reduction of uranium by cytochrome C3 of *Desulfovibrio vulgaris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3572-3576.
- Lowenstam, H. A. (1981), Minerals formed by organisms, *Science*, 211, 1126-1131, doi: 10.1126/science.7008198.
- Lowenstam, H. A., y S. Weiner, (1989), *On Biomineralization*. 324 , Oxford Univ. Press, New York.
- Lowenstam, H.A. (1967) Lepidocrocite, an apatite mineral, and magnetite in teeth of chitons (polyplacophora). *Science* 156 (3780), 1373-1375.
- Lowenstam, H.A., Traub, W. and Weiner, S. (1984) Nautilus hard parts: a study of the mineral and organic constituents. *Paleobiology* 10 (2), 268-279.
- MacFadden B J, Jones D S Kirschvink J L, Jones D S, MacFadden B J (1985) in *Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms*, eds Kirschvink J L, Jones D S, MacFadden B J (Plenum, New York), 407-415.

- Machel, H.G. (2001) Bacterial and thermochemical sulfate reduction in diagenetic settings - old and new insights. *Sedimentary Geology* 140 (1-2), 143-175.
- Mann, S. (1986), On the nature of boundary-organized biomineralization, *J. Inorg. Chem.*, 28, 363-371.
- Mann, S. and Hannington, J. P. (1988), Formation of iron oxides in unilamellar vesicles, *J. Colloid Interf. Sci.*, 122, 326-335, doi:10.1016/0021-9797(88)90368-2.
- Mann, S., and R. B. Frankel (1989), Magnetite biomineralization in unicellular organisms, in *Biomineralization: Chemical and Biochemical Perspectives*, edited by S. Mann, J. Webb and R. J. P. Williams, 389-426, VCH Publishers, New York.
- Mann, S., Frankel, R. B., and Blakemore, R. P. (1984a). Structure, morphology and crystal growth of bacterial magnetite. *Nature* 310, 405–407.
- Mann, S., Moench, T. T., and Williams, R. J. P. (1984b). A high resolution electron microscopic investigation of bacterial magnetite. Implications for crystal growth. *Proc. Roy. Soc. London B* 221, 385–393.
- Mann, S., Sparks, N. H. C., and Blakemore, R. P. (1987a). Ultrastructure and characterization of anisotropic magnetic inclusions in magnetotactic bacteria. *Proc. Roy. Soc. London B* 231, 469–476.
- Mann, S., Sparks, N. H. C., and Blakemore, R. P. (1987b). Structure, morphology and crystal growth of anisotropic magnetite crystals in magnetotactic bacteria. *Proc. Roy. Soc. London B* 231, 477–487.
- Mann, S., Sparks, N. H. C., Frankel, R. B., Bazylinski, D. A., and Jannasch, H. W. (1990). Biomineralization of ferrimagnetic greigite (Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>) and iron pyrite (FeS<sub>2</sub>) in a magnetotactic bacterium. *Nature* 343, 258–261.
- Mann, S., Sparks, N.H., Walker, M.M. and Kirschvink, J.L. (1988) Ultrastructure, morphology and organization of biogenic magnetite from sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*: implications for magnetoreception. *Journal of Experimental Biology* 140, 35-49.
- Maratea, D., and Blakemore, R. P. (1981). *Aquaspirillum magnetotacticum* sp. nov, a magnetic spirillum. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 31, 452–455.

- Maruyama, K., Takeyama, H., Nemoto, E., Tanaka, T., Yoda, K., and Matsunaga, T. (2004). Single nucleotide polymorphism detection in aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) gene using bacterial magnetic particles based on dissociation curve analysis. *Biotechnol. Bioeng.* 87, 687–694.
- Matsunaga, T. (1991). Applications of bacterial magnets. *Trends Biotechnol.* 9, 91–95.
- Matsunaga, T., and Arakaki, A. (2007). Molecular bioengineering of bacterial magnetic particles for biotechnological applications. In “Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria” (D. Schüler, ed.), Vol. 3, 227–254. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Matsunaga, T., and Kamiya, S. (1987). Use of magnetic particles isolated from magnetotactic bacteria for enzyme immobilization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26, 328–332.
- Matsunaga, T., and Takeyama, H. (1998). Biomagnetic nanoparticle formation and application. *Supramol. Sci.* 5, 391–394.
- Matsunaga, T., Arakaki, A., and Takahoko, M. (2002). Preparation of luciferase-bacterial magnetic particle complex by artificial integration of MagA-luciferase fusion protein into the bacterial magnetic particle membrane. *Biotechnol. Bioeng.* 77, 614–618.
- Matsunaga, T., Hashimoto, K., Nakamura, N., Nakamura, K., and Hashimoto, S. (1989). Phagocytosis of bacterial magnetite by leucocytes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31, 401–405.
- Matsunaga, T., Higashi, Y., and Tsujimura, N. (1997). Drug delivery by magnetoliposomes containing bacterial magnetic particles. *Cell Eng.* 2, 7–11.
- Matsunaga, T., Okamura, Y., Fukuda, Y., Wahyudi, A. T., Murase, Y., and Takeyama, H. (2005). Complete genome sequence of the facultative anaerobic magnetotactic bacterium *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1. *DNA Res.* 12, 157–166.
- Matsunaga, T., Sakaguchi, T., and Tadokoro, F. (1991). Magnetite formation by a magnetic bacterium capable of growing aerobically. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35, 651–655.
- Matsunaga, T., Sato, R., Kamiya, S., Tanaka, T., and Takeyama, H. (1999). Chemiluminescence enzyme immunoassay using Protein A-bacterial magnetite complex. *J. Magn. Magn. Mater.* 194, 126–131.

- Matsunaga, T., Tadokoro, F., and Nakamura, N. (1990). Mass culture of magnetic bacteria and their application to flow type immunoassays. *IEEE T. Magn.* 26, 1557–1559.
- Matsunaga, T., Togo, H., Kikuchi, T., and Tanaka, T. (2000a). Production of luciferasemagnetic particle complex by recombinant *Magnetospirillum* sp. AMB-1. *Biotechnol. Bioeng.* 70, 704–709.
- Matsunaga, T., Tsujimura, N., Okamura, Y., and Takeyama, H. (2000b). Cloning and characterization of a gene, *mpsA*, encoding a protein associated with intracellular magnetic particles from *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268, 932–937.
- McCabe, C., Sassen, R. and Saffer, B. (1987) Occurrence of secondary magnetite within biodegraded oil. *Geology* 15 (1), 7-10.
- McKay, D. S., Gibson, E. K., Jr., Thomas-Keprta, K. L., Vali, H., Romanek, C. S., Clemett, S. J., Chillier, X. D., Maechling, C. R., and Zare, R. N. (1996). Search for past life on Mars: Possible relic biogenic activity in martian meteorite ALH84001. *Science* 273, 924–930.
- McMichael, R.D. Shull, L.J. Swartzendruber, L.H. Bennett, R.E.Walson, J. (1992) Magnetocaloric effect in superparamagnets. *Magn. Magn. Mater.* 111, 29–33.
- Meisen, U. and H. Kathrein (2000). "Influence of particle size, shape and particle size distribution on properties of magnetites for the production of toners." *Journal of Imaging Science and Technology* 44(6): 508-513.
- Meldrum, F. C., Mann, S., Heywood, B. R., Frankel, R. B., and Bazylinski, D. A. (1993a). Electron-microscopy study of magnetosomes in a cultured coccoid magnetotactic bacterium. *Proc. Roy. Soc. London B* 251, 231–236.
- Meldrum, F. C., Mann, S., Heywood, B. R., Frankel, R. B., and Bazylinski, D. A. (1993b). Electron-microscopy study of magnetosomes in 2 cultured vibrioid magnetotactic bacteria. *Proc. Roy. Soc. London B* 251, 237–242.
- Michard A., Beucaire C. and Michard G. (1988) Uranium and rare earth elements in CO<sub>2</sub>-rich waters from Vals-les Bains (France). *Geochim. Cosmochim. Acta* 51, 901-909.

- Mitchell A.C. y Ferris F.G. (2006) Effect of strontium contaminants upon the size and solubility of calcite crystals precipitated by the bacterial hydrolysis of urea. *Environmental Science and Technology* 40 (3), 1008-1014.
- Mitchell A.C. y Ferris, F.G. (2005) The coprecipitation of Sr into calcite precipitates induced by bacterial ureolysis in artificial groundwater: Temperature and kinetic dependence. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 69 (17), 4199-4210.
- Moench, T. T. (1988). *Bilophococcus magnetotacticus* gen. nov. sp. nov., a motile, magnetic coccus. *Antonie van Leeuwenhoek* 54, 483-496.
- Morse, J. W., and Rickard, D. (2004). Chemical dynamics of sedimentary acid volatile sulfide. *Environ. Sci. Technol.* 38, 131A-136A.
- Moser, D. P. & Nealson, K. H. (1996). Growth of the facultative anaerobe *Shewanella putrefaciens* by elemental sulfur reduction. *Appl Environ Microbiol* 62, 2100±2105.
- Mozley P. S. and Carothers W. W. (1992) Elemental and isotopic composition of siderite in the Kupanuk Formation, Alaska: Effect of microbial activity and water/sediment interaction on early pore-water chemistry. *J. Sediment. Petrol.* 64, 681-692.
- Mullin, J.W. and Raven, K.D. (1961) Nucleation in agitated solutions. *Nature* 190 (4772), 251.
- Munch, J.e. and Ottow, J.C.G. (1983) Reductive transformation mechanism of ferric oxides in hydromorphic soils. *Environ. Biogeochem. Ecol. Bull. (Stockholm)* 35, 383-394.
- Munch, J.e. and Ottow, J.e.G. (1977) Modelluntersuchungen zum mechanismus der bakteriellen eisenreduktion in hydromorphen boden. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenkd.* 140, 549-562.
- Mura, C. V.; Becker, M. I.; Orellana, A.; Wolff, D. J. (2002) Immunopurification of Golgi vesicles by magnetic sorting. *Immuno. Methods*, 260, 263-271.
- Myers C.R. and Nealson K.H. (1988) Microbial reduction of manganese oxides: Interactions with irons and sulphur. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 52(11), 2727-2732.
- Myers, C. R. and J. M. Myers (2002). "MtrB is required for proper incorporation of the cytochromes OmcA and OmcB into the outer membrane of *Shewanella putrefaciens* MR-1." *App. Environm. Microbiol.* 68(11): 5585-5594.

- Myers, C. R. and J. M. Myers (2003). "Cell surface exposure of the outer membrane cytochromes of *Shewanella oneidensis* MR-1." *Letters in Applied Microbiology*, 37(3): 254-258.
- Myers, C. R. and J. M. Myers (2004). "*Shewanella oneidensis* MR-1 restores menaquinone synthesis to a menaquinone-negative mutant." *Applied and Environmental Microbiology* 70(9): 5415-5425.
- Myers, J. M. and C. R. Myers (2001). "Role for outer membrane cytochromes OmcA and OmcB of *Shewanella putrefaciens* MR-1 in reduction of manganese dioxide." *Applied and Environmental Microbiology* 67(1): 260-269.
- Nakamura, C., Burgess, J. G., Sode, K., and Matsunaga, T. (1995a). An iron-regulated gene, *magA*, encoding an iron transport protein of *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1. *J. Biol. Chem.* 270, 28392–28396.
- Nakamura, C., Kikuchi, T., Burgess, J. G., and Matsunaga, T. (1995b). Iron-regulated expression and membrane localization of the MagA protein in *Magnetospirillum* sp. Strain AMB-1. *J. Biochem. (Tokyo)* 118, 23–27.
- Nakamura, N., and Matsunaga, T. (1993). Highly sensitive detection of allergen using bacterial magnetic particles. *Anal. Chim. Acta* 281, 585–589.
- Nakamura, N., Burgess, J. G., Yagiuda, K., Kudo, S., Sakaguchi, T., and Matsunaga, T. (1993). Detection and removal of *Escherichia coli* using fluorescein isothiocyanate conjugated monoclonal antibody immobilized on bacterial magnetic particles. *Anal. Chem.* 65, 2036–2039.
- Nakamura, N., Hashimoto, K., and Matsunaga, T. (1991). Immunoassay method for the determination of immunoglobulin G using bacterial magnetic particles. *Anal. Chem.* 63, 268–272.
- Nakayama, H., Arakaki, A., Maruyama, K., Takeyama, H., and Matsunaga, T. (2003). Single-nucleotide polymorphism analysis using fluorescence resonance energy transfer between DNA-labeling fluorophore, fluorescein isothiocyanate, and DNA intercalator, POPO-3, on bacterial magnetic particles. *Biotechnol. Bioeng.* 84, 96–102.
- Nancollas, G.H. (1979) The growth of crystals in solution. *Advances in Colloid and Interface Science* 10 (1), 215-252.

- Nancollas, G.H. and Reddy, M.M.(1974) KINETICS OF CRYSTALLIZATION OF SCALE-FORMING MINERALS. *Soc Pet Eng AIME J* 14 (2), 117-126.
- Neal, A. L., S. N. Dublin, J. Taylor, D. J. Bates, J. L. Burns, R. Apkarian, and T. J. DiChristina (2007), Terminal electron acceptors influence the quantity and chemical composition of capsular exopolysaccharides produced by anaerobically growing *Shewanella s*, *Biomacromolecules* 8, 166.
- Nealson, K. H. and C. R. Myers (1990). "Iron reduction by bacteria: a potential role in the genesis of banded iron formations." *American Journal of Science* 290 A: 35-45.
- Nealson, K. H. and D. Saffarini (1994). "Iron and manganese in anaerobic respiration: Environmental significance, physiology, and regulation." *Annual Review of Microbiology* 48: 311-343.
- Neilands, J. B. (1995). Siderophores: Structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* 270, 26723–26726.
- Nelson, B., Struble, J. and McCarthy, G. (1991) In vitro production of struvite by *Bacillus pumilus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 37 (12), 978-983.
- Nevin and Lovley (2002) Nevin, K. P. and D. R. Lovley (2002). "Mechanisms for accessing insoluble Fe(III) oxide during dissimilatory Fe(III) reduction by *Geothrix fermentans*." *Applied and Environmental Microbiology* 68(5): 2294-2299.
- Nevin and Lovley 2000 Nevin, K. P. and D. R. Lovley (2000). "Potential for nonenzymatic reduction of Fe(III) via electron shuttling in subsurface sediments." *Environmental Science and Technology* 34(12): 2472-2478.
- Newman, D. K. and R. Kolter (2000). "A role for excreted quinones in extracellular electron transfer." *Nature* 405(6782): 94-97.)
- Nielsen A.E. (1972) Nucleation and growth. *En: Problems in Materials Science 1, Ed. H.D. Merchant. New York, Gordon and Breach*, 145-167.
- Nielsen, A.E. and Christoffersen, J. (1982) The mechanisms of crystal growth and dissolution. In: G.H. Nancollas, Editor, *Biological Mineralization and Demineralization*, Dahlem Konferenzen, Springer, Heidelberg (1982), 37–77.



- Nixon, C.A. Koval, R.D. Noble, G.S. Slaff, (1992) Preparation and characterization of novel magnetite-coated ion-exchange particles, *Chem. Of Mater.* 4, 117–121.
- Nudelman, F., Gotliv, B.A., Addadi, L. and Weiner, S. (2006) Mollusk shell formation: Mapping the distribution of organic matrix components underlying a single aragonitic tablet in nacre. *Journal of Structural Biology* 153 (2), 176-187.
- Nys, Y., Gautron, J., Garcia-Ruiz, J.M. and Hincke, M.T. (2004) Avian eggshell mineralization: Biochemical and functional characterization of matrix proteins. *Comptes Rendus - Palevol* 3 (6-7 SPEC.ISS.), 549-562.
- O'Neil, J. R. (1986), Theoretical and experimental aspects of isotopic fractionation, *Rev. Mineral.*, 16, 1-41.
- Ogino, T., Suzuki, T. and Sawada, K. (1987) The formation and transformation mechanism of calcium carbonate in water. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 51, 2757-2767.
- Ohmoto, H. (1996) Evidence in pre-2.2 Ga paleosols for the early evolution of atmospheric oxygen and terrestrial biota. *Geology*, 24, 1135-1138.
- Okamura, Y., Takeyama, H., and Matsunaga, T. (2001). A magnetosome-specific GTPase from the magnetic bacterium *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. *J. Biol. Chem.* 276, 48183–48188.
- Oldfield, F., and Wu, R. J. (2000). The magnetic properties of the recent sediments of Brothers Water, NW England. *J. Paleolimnol.* 23, 165–174.
- Omar, N.B., Gonzalez-Muñoz, Ma.T. and Peñalver, J.M.A. (1998) Struvite crystallization on *Myxococcus* cells. *Chemosphere* 36 (3), 475-481.
- Ota, H., Takeyama, H., Nakayama, H., Katoh, T., and Matsunaga, T. (2003). SNP detection in transforming growth factor-beta1 gene using bacterial magnetic particles. *Biosens. Bioelectron.* 18, 683–687.
- Ottow, J.e.G. (1970) Bacterial mechanism of gley formation in artificially submerged soil. *Nature* 225, 103.
- Ottow, J.e.G. and Glathe, H. (1971) Isolation and identification of iron-reducing bacteria from gley soils. *Soil Biol. Biochem.* 3, 43-55.

- Pace, N. R. (1991). "Origin of life - Facing up to the physical setting." *Cell* 65(4): 531-533.
- Palache, C., Berman, H., and Frondel, C. (1944). "Dana's System of Mineralogy." Wiley, New York.
- Paoletti, L. C., and Blakemore, R. P. (1986). Hydroxamate production by *Aquaspirillum magnetotacticum*. *J. Bacteriol.* 167, 73–76.
- Peikov, V. T.; Jeon, K. S.; Lane, A. M. (1999) Characterization of magnetic inks by measurements of frequency dependence of AC susceptibility. *J. Magn. Magn. Mater.* 193, 307-310.
- Pentecost, A. (1985), Association of cyanobacteria with tufa deposits: identity, enumeration and nature of the sheath material revealed by histochemistry, *Geomicrobiol. J.*, 4, 285-298, doi:10.1080/01490458509385936.
- Perez, F.J. Simeone, Y. Saeki, L. Josephson, R. Weissleder, (2003) Viral-induced self-assembly of magnetic nanoparticles allows the detection of viral particles in biological media. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 10192–10193.
- Perez-Gonzalez, T., C. Jimenez-Lopez, A. L. Neal, F. Rull-Perez, A. Rodriguez-Navarro, A. Fernandez-Vivas, and E. Iañez-Pareja (2010), Magnetite biomineralization induced by *Shewanella oneidensis*, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 74(3), 967-979.
- Perry, A., Bauer, G. B. and Dizon, A. E. (1985). Magnetoreception and biomineralization of magnetite in amphibians and reptiles. In *Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms* (ed. J. L. Kirschvink, D. S. Jones and B. J. MacFadden), 439-453. New York: Plenum Press.
- Perry, C.C. and Keeling-Tucker, T. (2003) Model studies of colloidal silica precipitation using biosilica extracts from *Equisetum telmateia*. *Colloid and Polymer Science* 281 (7), 652-664.
- Perry, K. A., Kostka, J. E., Luther, G. W., III & Neelson, K. H. (1993). Mediation of sulfur speciation by a Black Sea facultative anaerobe. *Science* 259, 801–803.
- Peters, K.E., Walters, C.C. and Moldowan, J.M. (2005) *The Biomarker Guide*, 2nd edn. (Cambridge University Press).
- Petersen, N., T. von Dobeneck, and H. Vali (1986), Fossil bacterial magnetite in deep-sea sediments from the South-Atlantic Ocean, *Nature*, 320, 611–615, doi:10.1038/320611a0.

- Petrovskis, E. A., Vogel, T. M. & Adriaens, P. (1994). Effects of electron acceptors and donors on transformation of tetrachloromethane by *Shewanella putrefaciens* MR-1. *FEMS Microbiol Lett* 121, 357±364.
- Phoenix, V.R., Konhauser, K.O. and Ferris, F.G. (2003) Experimental study of iron and silica immobilization by bacteria in mixed Fe-Si systems: Implications for microbial silicification in hot springs. *Canadian Journal of Earth Sciences* 40 (11), 1669-1678.
- Phoenix, V.R., Martinez, R.E., Konhauser, K.O. and Ferris, F.G. (2002) Characterization and implications of the cell surface reactivity of *Calothrix* sp. strain KC97. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (10), 4827-4834.
- Pinho, M. S.; Gregori, M. L.; Nunes R. C. R.; Soares, B. G. (2001) Aging effect on the reflectivity measurements of polychloroprene matrices containing carbon black and carbonyl-iron powder *Polym. Degrad. Stab.*, 73(1)1-5.
- Pósfai, M., Buseck, P. R., Bazylinski, D. A., and Frankel, R. B. (1998a). Reaction sequence of iron sulfide minerals in bacteria and their use as biomarkers. *Science* 280, 880–883.
- Pósfai, M., Buseck, P. R., Bazylinski, D. A., and Frankel, R. B. (1998b). Iron sulfides from magnetotactic bacteria: Structure, composition, and phase transitions. *Am. Mineral.* 83, 1469–1481.
- Pósfai, M., Kasama, T., and Dunin-Borkowski, R. E. (2007). Characterization of bacterial magnetic nanostructures using high-resolution transmission electron microscopy and off-axis electron holography. In “Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria” (D. Schuler, ed.), Vol. 3, 197–225. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Presti, D. E. (1985). Avian navigation, geomagnetic field sensitivity and biogenic magnetite. In *Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms* (ed. J. L. Kirschvink, D. S. Jones & B. J. MacFadden), 455-482. New York, London: Plenum Press.
- Proksch, R. B., Moskowitz, B. M., Dahlberg, E. D., Schaeffer, T., Bazylinski, D. A., and Frankel, R. B. (1995). Magnetic force microscopy of the submicron magnetic assembly in a magnetotactic bacterium. *Appl. Phys. Lett.* 66, 2582–2584.

- Prozorov, T., Mallapragada, S. K., Narasimhan, B., Wang, L., Palo, P., Nilsen-Hamilton, M., Williams, T. J., Bazylinski, D. A., Prozorov, R., and Canfield, P. C. (2007). Protein-mediated synthesis of uniform superparamagnetic magnetite nanocrystals. *Adv. Funct. Mater.* 17, 951–957.
- Ptacek C.J. (1992) Experimental determination of siderite solubility in high ionic-strength aqueous solutions. Ph. D. Thesis, Univ. Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada.
- Qu, S., H. Yang, D. Ren, S. Kan, G. Zou, D. Li, and M. Li (1999), Magnetite nanoparticles prepared by precipitation from partially reduced ferric chloride aqueous solutions, *J. Colloid Interf. Sci.*, 215, 190-192, doi:10.1006/jcis.1999.6185.
- Rajan S., Mackenzie F. T. and Glenn C. R. (1996) A thermodynamic model for water column precipitation of siderite in the Plio- Pleistocene Black Sea. *Am. J. Sci.* 296, 506-548.
- Riding R. (2000) Microbial carbonates: The geological record of calcified bacterial-algal mats and biofilms. *Sedimentology* 47 (SUPPL. 1), 179-214.
- Rivadeneira, M.A., Delgado, R., Del Moral, A., Ferrer, M.R. and Ramos-Cormenzana, A. (1993) Precipitation of calcium carbonate by *Vibrio* s from an inland saltern. *FEMS Microbiology Ecology* 13 (3), 197-204.
- Rivadeneira, M.A., Párraga, J., Delgado, R., Ramos-Cormenzana, A. and Delgado, G. (2004) Biomineralization of carbonates by *Halobacillus trueperi* in solid and liquid media with different salinities. *FEMS Microbiology Ecology* 48 (1), 39-46.
- Rizzo, A.A., Martin, G.R., Scott, D.B. and Mergenhagen, S.E. (1962) Mineralization of bacteria. *Science* 135 (3502), 439-441.
- Rodriguez-Navarro C., Rodriguez-Gallego M., Ben Chekroun K. and Gonzalez-Muñoz M.T. (2003) Conservation of Ornamental Stone by *Myxococcus xanthus*-Induced Carbonate Biomineralization *Appl. Environ. Microbiol.* 69(4), 2182-2193.
- Rodríguez-Navarro, A.B., CabraldeMelo, C., Batista, N., Morimoto, N., Alvarez-Lloret, P., Ortega-Huertas, M., Fuenzalida, V.M., Arias, J.I., Wiff, J.P. and Arias, J.L. (2006) Microstructure and crystallographic-texture of giant barnacle (*Austrorhynchus psittacus*) shell. *Journal of Structural Biology* 156 (2), 355-362.

- Rodriguez-Navarro, C., Jimenez-Lopez, C., Rodriguez-Navarro, A., Gonzalez-Muñoz, M.T. and Rodriguez-Gallego, M. (2007) Bacterially mediated mineralization of vaterite. *Geochim. et Cosmochim. Acta* 71 (5), 1197-1213.
- Rogers et al. 1990; Rodgers, F. G., Blakemore, R. P., Blakemore, N. A., Frankel, R. B., Bazylinski, D. A., Maratea, D., and Rodgers, C. (1990). Intercellular structure in a many-celled magnetotactic prokaryote. *Arch. Microbiol.* 154, 18–22.
- Roh Y., Gao H., Vali H., Kennedy D.W., Yang Z.K., Gao W., Dohnalkova A.C., Stapleton R.D., Moon J.W., Phelps T.J., Fredrickson J.K. and Zhou J. (2006) Metal Reduction and Iron Biomineralization by a Psychrotolerant Fe(III)-Reducing Bacterium, *Shewanella* sp. Strain PV-4. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(5), 3236-3244.
- Rosso, K. M., J. M. Zachara, Fredrickson, J.K.Gorby, Y.A.Smith, S.C. et al. (2003). "Nonlocal bacterial electron transfer to hematite surfaces." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67(5): 1081-1087.
- Roullin, V. G.; Deverre, J. R.; Lemaire, L.; Hindré, F.; Julienne, M. C. V.; Vienet, R.; Benoit, J. P.(2002) Anti-cancer drug diffusion within living rat brain tissue: An experimental study using [3H](6)-5-fluorouracil-loaded PLGA microspheres. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 53, 293-299.
- Royer, R.A., Burgos, W.D., Fisher, A.S., Unz, R.F. and Dempsey, B.A. (2002) Enhancement of biological reduction of hematite by electron shuttling and Fe<sup>2+</sup> complexation. *Environ. Sci. Technol.* 36 (9), 1939-1946.
- S. Baskar, R. Baskar, L. Mauclaire and J.A. McKenzie, (2006)Microbially induced calcite precipitation in culture experiments: possible origin for stalactites in Sahastradhara caves, Dehradun, India, *Curr. Sci. India* 90 (2006), 58–64
- Sakaguchi, T., Arakaki, A. and Matsunaga, T. (2002) *Desulfovibrio magneticus* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium that produces intracellular single-domain-sized magnetite particles. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52 (1), 215-221.
- Sakaguchi, T., Arakaki, A., and Matsunaga, T. (2002). *Desulfovibrio magneticus* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium that produces intracellular single-domain-sized magnetite particles. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 215–221.

- Scheffel, A., M. Gruska, D. Faivre, A. Linaroudis, J. M. Jürgen, and D. Schüler (2006), An acidic protein aligns magnetosomes along a filamentous structure in magnetotactic bacteria, *Nature*, 440, 110-114, doi:10.1038/nature04382.
- Schleifer, K. H., Schüler, D., Spring, S., Weizenegger, M., Amann, R., Ludwig, W., and Köhler, M. (1991). The genus *Magnetospirillum* gen. nov. description of *Magnetospirillum gryphiswaldense* sp. nov. and transfer of *Aquaspirillum magnetotacticum* to *Magnetospirillum magnetotacticum* comb. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 14, 379–385.
- Schüler, D. and E. Baeuerlein (1996). "Iron-limited growth and kinetics of iron uptake in *Magnetospirillum gryphiswaldense*." *Archives of Microbiology* 166(5): 301-307.
- Schüler, D. and E. Baeuerlein (1997). "Iron transport and magnetite crystal formation of the magnetic bacterium *Magnetospirillum gryphiswaldense*." *Journal De Physique. IV: JP 7(1): C1-647-C1-650.*
- Schüler, D. and E. Baeuerlein (1998). "Dynamics of iron uptake and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> biomineralization during aerobic and microaerobic growth of *Magnetospirillum gryphiswaldense*." *Journal of Bacteriology* 180(1): 159-162.
- Schultze-Lam, S., Harauz, G., Beveridge, T.J. (1992) Participation of a cyanobacterial S layer in fine-grain mineral formation. *Journal of Bacteriology* 174 (24), 7971-7981.
- Schwartz, M., S. P. Lund, D. E. Hammond, R. Schwartz, and K. Wong (1997), Early sediment diagenesis on the Blake/Bahama outer ridge, North Atlantic ocean and its effects on sediment magnetism, *J. Geophys. Res.*, 102, 7903–7914, doi:10.1029/96JB03218.
- Schwertmann, U., and E. Murad (1990), The influence of aluminum on iron oxides: XIV. Aluminum substituted magnetite synthesized at ambient temperatures, *Clay Clay Mineral.*, 38, 196-202, doi:10.1346/CCMN.1990.0380211.
- Semple, K. M. & Westlake, D. W. S. (1987). Characterization of iron reducing *Alteromonas putrefaciens* strains from oil field fluids. *Can J Microbiol* 35, 925±931.
- Sen, T., Sebastianelli, A. and Bruce, I.J. (2006). Mesoporous silica-magnetite nanocomposite: Fabrication and applications in magnetic bioseparations, *J. Am. Chem. Soc.* 128,7130–7131.

- Seoighe, C., J. Naumann, J. and Shvets, I.V. (1999). "Studies of surface structures on single crystalline magnetite (100)." *Surface Science*, 440(1-2), 116-124.
- Shengchun Q., Haibin Y., Dawei R., Shihai K., Guangtian Z., Dongmei L. and Minghui L. (1999) Magnetite Nanoparticles Prepared by Precipitation from Partially Reduced Ferric Chloride Aqueous Solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 215, 190–192.
- Shenhchuan et al,(1999)Magnetite Nanoparticles Prepared by Precipitation from Partially Reduced Ferric Chloride Aqueous Solutions, *Journal of Colloid and Interface Science* 215, 190–192
- Shewan, J. M. (1977). The bacteriology of fresh and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action. In *Proceedings of the Conference on Handling, Processing and Marketing of Tropical Fish*, 51±66. London: Tropical Products Institute.
- Shinano, H. and Sakai, M., 1975. Effect of magnesium ion concentration on the types of crystals deposited by marine bacteria in sea water. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 41, 913.
- Silyn-Roberts, H. and Sharp, R.M. (1985) Preferred orientation of calcite and aragonite in the reptilian eggshells. *Proceedings - Royal Society of London, Series B* 225 (1241), 445-455.
- Simkiss K. and Wilbur K. M. (1989), *Biomineralization. Cell Biology and Mineral Deposition*, 337 , Academic Press, Inc., San Diego.
- Simkiss, K. (1986) The p`rocesses o biomineralization in lower plants and animals- an overview. In *Biomineralization in lower plants and animals* (eds. B.S.C. Leadbeater and R.Riding), 3-25. Oliver and Boyd Ltd., Edinburgh.
- Simmons S. L., Bazylinski D. A. and Edwards K.J. (2006). "South-seeking magnetotactic bacteria in the Northern Hemisphere." *Science* 311(5759): 371-374.
- Simmons, S. L., and Edwards, K. J. (2007). Unexpected diversity in populations of the manycelled magnetotactic prokaryote. *Environ. Microbiol.* 9, 206–215.
- Simmons, S. L., Sievert, S. M., Frankel, R. B., Bazylinski, D. A., and Edwards, K. J. (2004). Spatiotemporal distribution of marine magnetotactic bacteria in a seasonally stratified coastal salt pond. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6230–6239.

- Simoneit BRT (2002) Molecular indicators (biomarkers) of past life *Anatomical Record* Volume 268, Issue 3, 1 November 2002, Pages 186-195
- Simonson B.M. and Hassler S.W. (1996) Was the deposition of large Precambrian iron formations linked to major marine transgressions? *Journal of geology* 104, 665-676.
- Sitzman, S.D., Banfield, J.F. and Valley, J.W. (2000) Microstructural characterization of metamorphic magnetite crystals with implications for oxygen isotope distribution. *American Mineralogist* 85 (1), 14-21.
- Slobodkin, A.I. (2005) Thermophilic microbial metal reduction. *Microbiology* 74 (5), 501-514.
- Snowball, I.F. (1994) Bacterial magnetite and the magnetic properties of sediments in a Swedish lake. *Earth and Planetary Science Letters* 126 (1-3), 129-142.
- Snowball, I.F., Zillen, L. and Sandgren, P. (2002). "Bacterial magnetite in Swedish varved lake-sediments: a potential bio-marker of environmental change." *Quaternary International* 88, 13-19.
- Sode, K., Kudo, S., Sakaguchi, T., Nakamura, N. and Matsunaga, T. (1993) Application of bacterial magnetic particles for highly selective mRNA recovery system. *Biotechnology Techniques* 7 (9), 688-694.
- Sokolova T., Hanel J., Onyenwoke R.U., Reysenbach A.-L., Banta A., Geyer R., González J. M., Whitman W. B. and Wiegel J. (2007) Novel chemolithotrophic, thermophilic, anaerobic bacteria *Thermolithobacter carboxydivorans* sp. nov. *Extremophiles*. 11,145-147.
- Southam G. (2000) Bacterial surface-mediated mineral formation. Environmental Microbe-Mineral Interactions. Lovley ASM Press, Washington DC.
- Sparks, N. H. C., S. Mann, D. A. Bazylinski, D. R. Lovley, H. W. Jannasch, and R. B. Frankel (1990), Structure and morphology of magnetite anaerobically-produced by a marine magnetotactic bacterium and a dissimilatory iron-reducing bacterium, *Earth Planet. Sci. Lett.*, 98, 14-22, doi:10.1016/0012-821X(90)90084-B.
- Spear, D.G. (1969) Localization of Hydrogen Ion and Chloride Ion Fluxes in *Nitella*. *J. Gen. Physiol.* 54, 397-414.



- Spring, S., Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K. H., and Petersen, N. (1992). Phylogenetic diversity and identification of nonculturable magnetotactic bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 116–122.
- Spring, S., Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Schueller, D., Poralla, K., and Petersen, N. (1995). Phylogenetic analysis of uncultured magnetotactic bacteria from the alphasubclass of Proteobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 17, 501–508.
- Spring, S., Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Vangemerden, H., and Petersen, N. (1993). Dominating role of an unusual magnetotactic bacterium in the microaerobic zone of a fresh-water sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2397–2403.
- Spring, S., and Bazylinski, D. A. (2006). Magnetotactic bacteria. In “The Prokaryotes” (M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stachbrandt, eds.), Vol. 2, 3rd ed., 842–862. Springer, New York.
- Staniland S., W. Williams, N. Telling, G. Van Der Laan, A. Harrison, and B. Ward (2008), Controlled cobalt doping of magnetosomes *in vivo*, *Nat. Nanotechnol.*, 3, 158-162, doi:10.1038/nnano.2008.35.
- Suzuki, H., T. Tanaka, T. Sasaki, N. Nakamura, T. Matsunaga, and S. Mashiko (1998), High resolution magnetic force microscope images of a magnetic particle chain extracted from magnetic bacteria AMB-1, *Jpn. J. Appl. Phys.* 2, 37, L1343-L1345.
- Suzuki, T., Okamura, Y., Calugay, R.J., Takeyama, H. and Matsunaga, T. (2006) Global gene expression analysis of iron-inducible genes in *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. *Journal of Bacteriology* 188 (6), 2275-2279.
- Tanaka, M., Y. Okamura, et al Arakaki, A. Tanaka, T. Takeyama, H. Matsunaga, T. (2006). "Origin of magnetosome membrane: Proteomic analysis of magnetosome membrane and comparison with cytoplasmic membrane." *Proteomics* 6(19): 5234-5247.
- Tanaka, T., Maruyama, K., Yoda, K., Nemoto, E., Udagawa, Y., Nakayama, H., Takeyama, H., and Matsunaga, T. (2003). Development and evaluation of an automated workstation for single nucleotide polymorphism discrimination using bacterial magnetic particles. *Biosens. Bioelectron.* 19, 325–330.

- Taylor, J.D. and Kennedy, W.J. (1969) The influence of the periostracum on the shell structure of bivalve mollusks. *Calcified Tissue Research* 3 (1), 274-283.
- Thomas-Keprta, K. L., D. A. Bazylinski, J. L. Kirschvink, S. J. Clemett, D. S. McKay, S. J. Wentworth, H. Vali, E. K. Gibson Jr., and C. S. Romanek (2000), Elongated prismatic magnetite crystals in ALH84001 carbonate globules: potential Martian magnetofossils, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 64, 4049-4081, doi:10.1016/S0016-7037(00)00481-6.
- Thomas-Keprta, K.L., Clemett, S.J., Bazylinski, D.A., Kirschvink, J.L., McKay, D.S., Wentworth, S.J., Vali, H., Gibson Jr. E.K. and Romanek, C.S.(2002) Magnetofossils from ancient Mars: A robust biosignature in the Martian meteorite ALH84001. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (8), 3663-3672.
- Thomas-Keprta, K.L., Clemett, S.J., McKay, D.S., Gibson, E.K. and Wentworth, S.J. (2009). Origins of magnetite nanocrystals in Martian meteorite ALH84001. *Geochim. Cosmochim. Acta*. 73 (21), 6631-6677.
- Thomas-Keprta, K. L., S. J. Clemett, D. A. Bazylinski, J. L. Kirschvink, D. S. McKay, S. J. Wentworth, H. Vali, E. K. Gibson Jr., M. F. McKay, and C. S. Romanek (2001), Truncated hexa-octahedral magnetite crystals in ALH84001: presumptive biosignatures, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98, 2164-2169, doi:10.1073/pnas.051500898.
- Thornhill, R. H., Burgess, J. G., Sakaguchi, T., and Matsunaga, T. (1994). A morphological classification of bacteria containing bullet-shaped magnetic particles. *FEMS Microbiol. Lett.* 115, 169-176.
- Torres de Araujo FF, Pires MA, Frankel RB, Bicudo CEM. 1986. Magnetite and magnetotaxis in algae. *Biophys J* 50:375-378.
- Towe, K. M., and T. T. Moench (1981) Electron-optical characterization of bacterial magnetite, *Earth Planet. Sci. Lett.*, 52, 213-220, doi:10.1016/0012-821X(81)90222-3.
- Tseng, J.Y., Chang, C.W. Chen, Y.H Chang C.F. and Chiang P.C.(2007), Synthesis of micro-size magnetic polymer adsorbent and its application for the removal of Cu(II) ion, *Colloid Surface A*, 295, 209-216, doi:10.1016/j.colsurfa.2006.09.001.

- Turner, E. C., and B. Jones (2005), Microscopic calcite dendrites in cold-water tufa: implications for nucleation of micrite and cement, *Sedimentology*, 52, 1043-1066, doi:10.1111/j.1365-3091.2005.00741.x.
- Urrutia, M.M., Roden, E.E. and Zachara, J.M. (1999) Influence of aqueous and solid-phase Fe<sup>2+</sup> complexants on microbial reduction of crystalline iron (III) oxides. *Environ. Sci. Technol.* 33 (22), 4022-4028.
- Vali H. and Kirschvink J. L. (1991), Observation of magnetosome organization surface structure and iron biomineralization of undescribed magnetic bacteria: Evolutionary speculations. In *Iron Biominerals* (eds. R. B. Frankel and R. P. Blakemore) 97–115. Plenum Press, New York.
- Vali H., O. Förster, G. Amarantidis, and N. Petersen (1987), Magnetotactic bacteria and their magnetofossils in sediments, *Earth Planet. Sci. Lett.*, 86, 389-400, doi:10.1016/0012-821X(87)90235-4.
- Vali, H., Weiss, B., Li, Y.-L., Sears, S.K., Soon, S.K., Kirschvink, J.L. and Zhang, C.L. (2004) Formation of tabular single-domain magnetite induced by *Geobacter metallireducens* GS-15. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (46), 16121-16126.
- Van der Zee, C., D. R. Roberts, D. G. Rancourt, and C. P. Slomp (2003), Nanogoethite is the dominant reactive oxyhydroxides phase in lake and marine sediments, *Geology*, 31, 993-996, doi:10.1130/G19924.1.
- Vargas, M., K. Kashefi, E. L. Blunt-Harris, and D.R. Lovley (1998), Microbiological evidence for Fe(III) reduction on early Earth, *Nature*, 395, 65-67, doi:10.1038/25720.
- Vayssières L., Chanèac C., Tronc E. and Jolivet J.P. (1998), Size tailoring of magnetite particles formed by aqueous precipitation: an example of thermodynamic stability of nanometric oxide particles. *Journal of Colloid and Interface Science* 205, 205–212, doi:10.1006/jcis.1998.5614.
- Venkateswaran K., Moser D.P., Dollhopf M.E., Lies D.P., Saffarini D.A., MacGregor B.J., Ringelberg D.B., White, D.C., Nishijima M., Sano H., Burghardt J., Stackebrandt E. and Nealson K.H. (1999) Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *Int. J Syst. Bacteriol.* 49, 705-724.

- Walcott, C., Gould, J.L. and Kirschvink, J.L. (1979) Pigeons have magnets. *Science* 205 (4410), 1027-1029.
- Walker, J. C. G. (1987), Was the Archaean biosphere upside down? *Nature*, 329, 710-712, doi:10.1038/329710a0.
- Ward, A. J. I., and Friberg S. (1989), Preparing narrow size distribution particles from amphiphilic association structure, *MRS Bull.*, 14, 41.
- Warren, L.A., Maurice, P.A., Parmar, N. and Ferris, G.F. (2001) Microbially mediated calcium carbonate precipitation: Implications for Interpreting calcite precipitation and for solid-phase capture of inorganic contaminants. *Geomicrobiology Journal* 18 (1), 93-115.
- Wilbur KM, Bernhardt AM (1984) Effects of amino acids, magnesium, and molluscan extrapallial fluid on crystallization of calcium carbonate: In vitro experiments. *Biol Bull* 166:251–259.
- Williams, T. J., Zhang, C. L., Scott, J. H., and Bazylinski, D. A. (2006). Evidence for autotrophy via the reverse tricarboxylic acid cycle in the marine magnetotactic coccus strain MC-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1322–1329.
- Wright, D.T. (1999) The role of sulphate-reducing bacteria and cyanobacteria in dolomite formation in distal ephemeral lakes of the Coorong region, South Australia. *Sedimentary Geology* 126 (1-4), 147-157.
- Wunderbaldinger, P.; Josephson, L.; Weissleder, R. (2002) Tat peptide directs enhanced clearance and hepatic permeability of magnetic nanoparticles. *Bioconjugate Chem.*, 13, 264.-268.
- Ye Q., Roh, Y., Carroll S.L., Blair B., Zhou J., Zhang, C.L. and Fields M.W. (2004) Alkaline Anaerobic Respiration: Isolation and Characterization of a Novel Alkaliphilic and Metal-Reducing Bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(9), 5595-5602.
- Yoshino, T., and Matsunaga, T. (2005). Development of efficient expression system for protein display on bacterial magnetic particles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 1678–1681.
- Yoshino, T., and Matsunaga, T. (2006). Efficient and stable display of functional proteins on bacterial magnetic particles using Mms13 as a novel anchor molecule. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 465–471.

- Yoshino, T., Tanaka, T., Takeyama, H., and Matsunaga, T. (2003). Single nucleotide polymorphism genotyping of aldehyde dehydrogenase 2 gene using a single bacterial magnetic particle. *Biosens. Bioelectron.* 18, 661–666.
- Yoza, B., Arakaki, A., and Matsunaga, T. (2003b). DNA extraction using bacterial magnetic particles modified with hyperbranched polyamidoamine dendrimer. *J. Biotechnol.* 101, 219–228.
- Yoza, B., Arakaki, A., Maruyama, K., Takeyama, H., and Matsunaga, T. (2003a). Fully automated DNA extraction from blood using magnetic particles modified with a hyperbranched polyamidoamine dendrimer. *J. Biosci. Bioeng.* 95, 21–26.
- Yoza, B., Matsumoto, M., and Matsunaga, T. (2002). DNA extraction using modified bacterial magnetic particles in the presence of amino silane compound. *J. Biotechnol.* 94, 217–224.
- Zachara, J. M., R. K. Kukkadapu, J. K. Fredrickson, Y. A. Gorby, and S. C. Smith (2002), Biomineralization of poorly crystalline Fe(III) oxides by dissimilatory metal reducing bacteria (DMRB), *Geomicrobiol. J.*, 19, 179-207, doi:10.1080/0149045025286427.
- Zavarzina D. G., Kolganova T. V., Boulygina E. S., Kostrikina N. A., Tourova T. P. and Zavarzin G. A. (2006) *Geoalkalibacter ferrihydriticus* gen. nov. sp. nov., the First Alkaliphilic Representative of the Family *Geobacteraceae*, Isolated from a Soda Lake. *Microbiology.* 75(6), 673-682.