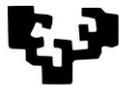


eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea  
Facultad de Ciencia y Tecnología



Gradu Amaierako Lana / Traba Fin de Grado  
Fisikako Gradua / Grado en Física

# Caracterización magnética de magnetosomas dopados con Co y Mn

Egilea/Autor/a:

David Gandia Aguado

Zuzendaria/Director/a:

María Luisa Fernández-Gubieda Ruiz

# Resumen

Las bacterias magnetotáticas(MTB) son un grupo diverso de microorganismos con la habilidad de orientarse y migrar a lo largo de las líneas geomagnéticas. Esta proeza única está basada en la síntesis de unos orgánulos intracelulares, los magnetosomas, cristales ferrimagnéticos rodeados de una membrana lipídica y organizados en cadenas en el interior de las bacterias. Las bacterias sintetizan estas nanopartículas a partir del hierro que encuentran en su ambiente. Gracias al cultivo de nuevas cepas y al desarrollo de nuevas técnicas para manipularlas, investigadores de distintos laboratorios han hecho un progreso significativo en esclarecer las bases moleculares, bioquímicas, químicas, genéticas y físicas de la formación de los magnetosomas y cómo estas nanopartículas únicas funcionan. A pesar de esto todavía queda un gran camino por recorrer. En este trabajo se ha estudiado el crecimiento de las MTB y sus magnetosomas, no solo en un medio rico en hierro, sino en un medio también suplementado con distintas concentraciones de ciertos metales de transición con el fin de modificar la estructura cristalina, el magnetismo de las partículas y ampliar el abanico de aplicaciones. Para ello, delimitaremos en primer lugar en qué medida las bacterias son capaces de soportar distintas concentraciones de dopantes y, además, se realizará una caracterización magnética completa de los magnetosomas a través de distintos instrumentos de medida. Los resultados obtenidos demuestran que las propiedades intrínsecas de los magnetosomas están influenciadas significativamente con el medio de crecimiento y que sus propiedades magnéticas, ciertamente, pueden ser modificadas a través de metales de transición como el cobalto, en base a un posterior uso en la industria tecnológica o biomédica.

# Índice

<b>1. Introducción</b>	<b>4</b>
1.1. La bacteria magnetotáctica . . . . .	4
1.1.1. <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> . . . . .	7
1.2. Propiedades ferrimagnéticas de la magnetita . . . . .	7
1.2.1. Estructura cristalina de las ferritas . . . . .	8
1.2.2. Momento magnético de la magnetita . . . . .	9
1.3. Efectos de la orientación cristalina: anisotropía magnética . .	10
1.4. La transición de Verwey . . . . .	10
1.5. Objetivos y justificación del trabajo . . . . .	12
<b>2. Desarrollo experimental</b>	<b>14</b>
2.1. MIC(Concentración Inhibitoria Mínima) y condiciones de cul- tivo . . . . .	14
2.2. TEM(Microscopio Electrónico de Transmisión) . . . . .	15
2.3. Técnicas de caracterización magnética . . . . .	16
2.3.1. VSM(Vibrating Sample Magnetometer) . . . . .	16
2.3.2. SQUID(Superconducting Quantum Interference Devices) 16	
<b>3. Resultados experimentales</b>	<b>18</b>
3.1. MIC(Minimum Inhibitory Concentration) . . . . .	18
3.2. Cultivo de los magnetosomas . . . . .	19
3.2.1. Crecimiento de las bacterias . . . . .	20
3.3. Microscopía electrónica de transmisión . . . . .	20
3.4. Medidas magnéticas . . . . .	22
3.4.1. Medidas VSM . . . . .	22
3.4.2. Medidas VSM criogénico . . . . .	25
3.4.3. Medidas SQUID . . . . .	30
<b>4. Conclusiones</b>	<b>35</b>
<b>5. Anexo: Regla de Hund</b>	<b>37</b>
<b>6. Bibliografía</b>	<b>38</b>

# 1. Introducción

## 1.1. La bacteria magnetotáctica

El término ‘bacteria magnetotáctica’ no tiene significado taxonómico[1] y representa un heterogéneo grupo de procariotas con morfologías celulares muy diversas, incluyendo cocos, bacilos, espirilos o vibrios(Figura 1). A pesar de esta diversidad morfológica, las bacterias magnetotácticas comparten algunas características comunes:

- Son gramnegativas.
- Presentan movimiento flagelar.
- Exhiben una respuesta táctica negativa frente a concentraciones atmosféricas de oxígeno.
- Todas poseen nanopartículas magnéticas.

Además tienen el potencial para participar en los ciclos bioquímicos de algunos elementos importantes tales como hierro, nitrógeno, azufre y carbono en ambientes naturales.

Las bacterias magnetotácticas son acuáticas y se establecen en zonas con baja tensión de oxígeno, lo que sugiere que este grupo de microorganismos se desarrolló durante la historia geológica temprana de la Tierra, cuando el contenido atmosférico de oxígeno era significativamente inferior al actual[2]. Estas bacterias que buscan tensiones bajas de oxígeno se denominan microaerófilas, y este metabolismo es frecuente en muchos habitantes de sistemas acuáticos poco profundos.

La característica más sorprendente de las bacterias magnetotácticas y que va a ser el objeto de estudio es que todas estas bacterias sintetizan estructuras intracelulares únicas llamadas magnetosomas, que están formadas por un material magnético rodeado de una membrana lipídica de unos 3-4 nm de grosor[3]. Estos cristales magnéticos conceden a la bacteria la propiedad conocida como magnetotaxis[1], es decir, la capacidad de alinearse y orientarse en presencia de un campo magnético terrestre gracias a la existencia de una o varias cadenas de nanopartículas magnéticas. Estas nanopartículas se disponen en forma de cadenas, consiguiendo así un momento dipolar magnético suficiente para orientar la célula en la columna de agua mediante la interacción con las líneas del campo geomagnético terrestre. Los magnetosomas, que se muestran en el interior de las bacterias en la imagen 1, son los componentes claves de las bacterias magnetotácticas. Son cristales que poseen una

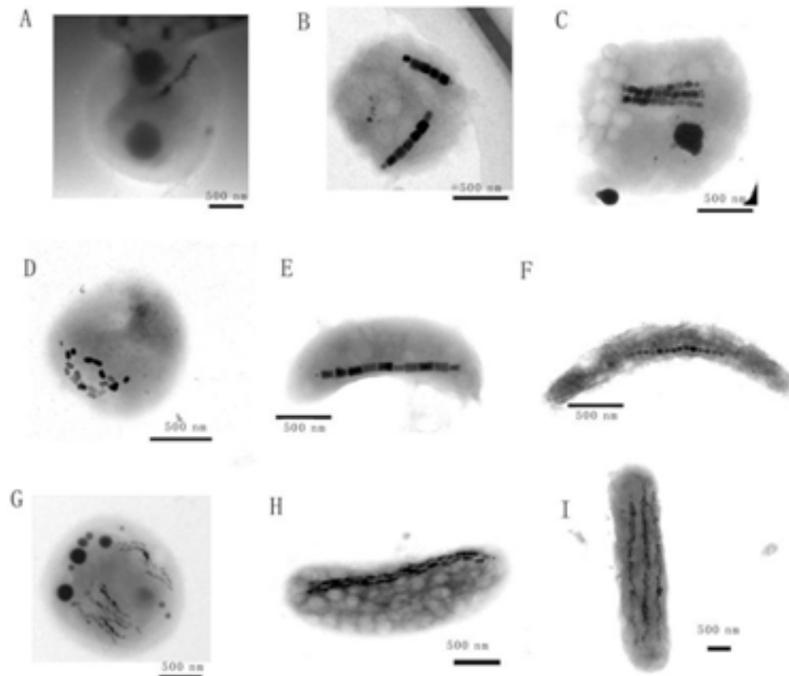


Figura 1: Imágenes de distintas especies de bacterias magnetotácticas

alta pureza química, distribución de tamaños estrechos, morfologías cristalinas específicas y se sitúan dentro de la célula con distribuciones específicas. Esta alta especificidad en la formación de los cristales indica un preciso control biológico en la síntesis de los magnetosomas mediado por un proceso de mineralización, que se conoce como mineralización controlada biológicamente (MCB). Este proceso de formación controlada de componentes inorgánicos ocurre en todos los organismos, desde las bacterias hasta los humanos, es decir, este fenómeno es equiparable al de otros procesos MCB, que originan diversos minerales, muchas veces en forma cristalina. Algunos ejemplos conocidos son la calcita ( $CO_3Ca$ ) producida por muchos organismos marinos, como los moluscos, o el dióxido de silicio ( $SiO_2$ ) presente en las espículas de los radiolarios y de algunas esponjas, la ferritina que almacena el hierro en forma de ferrihidrita en todos los seres vivos o, el más común, la magnetita,  $Fe_3O_4$ , que ha sido encontrada en vertebrados como el salmón, la trucha e incluso en el humano. El organismo ejerce un control cristalográfico sobre la nucleación y crecimiento de las partículas minerales. En la actualidad se conocen más de cincuenta minerales cuya producción está controlada por las células vivas. En el caso de la síntesis de magnetita por las bacterias magnetotácticas distintos pasos discretos toman parte en la formación de los componentes inorgánicos de la bacteria[3]:

1. Se forma la vesícula de los magnetosomas
2. El hierro es tomado del entorno
3. El hierro es transportado dentro de la vesícula del magnetosoma
4. El hierro precipita en forma de magnetita

A pesar de conocer estos pasos, no se sabe mucho acerca de este proceso de biomineralización, un buen entendimiento de este proceso puede ser la clave para superar ciertos retos que nos llevarían por ejemplo al diseño de nuevos materiales[4].

Las bacterias magnetotácticas mineralizan generalmente tanto magnetosomas de óxido de hierro, que contienen cristales de magnetita( $Fe_3O_4$ ), como de sulfuros de hierro, que contienen cristales de greigita( $Fe_3S_4$ ). También es posible y ha sido observada la mineralización de otros sulfuros de hierro como la mackinawita( $FeS$  tetragonal) y el  $FeS$  cúbico que son probablemente los precursores del  $Fe_3S_4$ [1].

Es importante entender que la composición mineral de los magnetosomas parece estar bajo estricto control químico, de hecho se ha observado que incluso cuando en el medio de crecimiento de la bacteria está presente el sulfuro de hidrógeno, células de distintos cultivos continúan sintetizando cristales de magnetita y no de greigita como cabría suponer. Más aún, los cristales de magnetita de los magnetosomas son de una alta pureza química.

Se pueden ver distintas morfologías en los cristales de magnetita y greigita producidos por la bacteria magnetotáctica. De cualquier manera, en general, la forma cristalina de la magnetita es consistente dentro de las células de una única cepa de bacterias aunque se han visto variaciones menores en cristales de algunas especies que han sido cultivadas bajo diferentes condiciones. Por otro lado, muchas más variaciones morfológicas ocurren en cristales de greigita. Por ejemplo, distintas morfologías en las partículas de greigita han sido observadas dentro de una misma célula. Tres morfologías cristalinas se observan, generalmente, en las bacterias magnetotácticas usando varias formas de microscopía electrónica(Imagen1)[2][4]:

1. Forma cubo-octahédrica.
2. Morfología hexagonal prismática alargada.
3. Morfología en forma de bala o punta de flecha.

Otro aspecto fundamental de los magnetosomas, el de sus propiedades magnéticas. El rango de tamaño de los magnetosomas de las bacterias tiene

significado físico que se refleja en su magnetismo. Los cristales de  $Fe_3O_4$  y  $Fe_3S_4$  tienen un tamaño típico de unos 35-120 nm de largo[1]. Para estos tamaños estos dos minerales, la ferrita y la greigita, tienen una estructura de monodominio magnético y son permanentemente magnéticos en régimen ferrimagnético a temperatura ambiente. Los cristales más pequeños, con un diámetro inferior a los 30 nm, son superparamagnéticos a temperatura ambiente, que quiere decir que no tienen magnetización remanente persistente y los cristales más grandes, con un tamaño superior a los 200 nm, dejan de estar conformados por un solo dominio y empiezan a formar paredes de Bloch, generando distintos dominios magnéticos. Las paredes de dominio tenderán a formar múltiples dominios magnéticos con una imanación espontánea dirigida en la dirección de fácil imanación, de manera que la imanación total sea cero. Por tanto, para ambos casos la remanencia magnética es menor que la de los cristales monodominio, hecho que nos vuelve a indicar la capacidad de las bacterias para la mineralización controlada biológicamente ya que, éstas controlando el tamaño de las partículas optimizan el momento magnético dipolar por magnetosoma[1].

### 1.1.1. *Magnetospirillum gryphiswaldense*

El tipo de bacteria magnetotáctica con el que se trabaja en el departamento de electricidad y magnetismo en colaboración con el departamento de microbiología es la *M.gryphiswaldense*[6]. Esta especie de bacteria sintetiza nanopartículas de magnetita con forma cubo-octahédrica y un diámetro medio de 45 nm con una estrecha distribución de tamaños.

## 1.2. Propiedades ferrimagnéticas de la magnetita

Las sustancias ferrimagnéticas presentan una imanación espontánea a temperatura ambiente, del mismo modo que los ferromagnéticos, consisten en dominios magnéticamente saturados, y exhiben los fenómenos de imanación de saturación e histéresis. Las sustancias ferrimagnéticas más importantes son dobles óxidos de hierro y otro metal, que reciben el nombre de ferritas. Nos van a interesar las estructuras cristalinas de estas ferritas y en nuestro caso se encuentran en el grupo de las ferritas magnéticas con estructura cristalina cúbica que tienen la fórmula general  $MO \cdot Fe_2O_3$ , donde M es un ión metálico divalente como puede ser Mn, Ni, Fe, Co o Mg[13]. Por ejemplo tenemos la ya conocida magnetita  $Fe_3O_4(FeO \cdot Fe_2O_3)$ . Por supuesto estas ferritas son componentes iónicos y, por tanto, sus propiedades magnéticas son debidas a los iones magnéticos que contienen. Es muy importante entender que estos iones en un cristal de ferrita ocupan dos tipos de posiciones cris-

talográficamente diferentes, llamadas sitios A y sitios B. La interacción de canje actuando entre un ión en un sitio A y un ión en un sitio B es negativa, tal y como se da en el antiferromagnetismo. Existen, por tanto, en nuestras ferritas, una red de iones A imanados espontáneamente en una dirección y una red de iones B imanados en la dirección opuesta. Sin embargo, las magnitudes de las imanaciones de las subredes A y B no son iguales. Los dos momentos magnéticos opuestos no se cancelarán y por tanto resultará una imanación espontánea neta.

### 1.2.1. Estructura cristalina de las ferritas

La estructura de las ferritas con las que vamos a trabajar es la estructura cristalina de las espinelas[13]. Esta estructura es compleja, en tanto, que se tienen 56 iones por celda unidad. La estructura consiste en iones de oxígeno que se encuentran empaquetados realmente cerca en un enrejado de estructura cúbica centrada en las caras, y los iones metálicos, que serán más pequeños, y ocupan los espacios entre ellos. Los espacios pueden ser de dos tipos. Uno es llamado sitio tetrahédrico o sitio A, porque se encuentra localizado en el centro de un tetrahedro cuyas esquinas están ocupadas por iones de oxígeno(Figura 1). El otro es llamado sitio octahédrico o sitio B, porque los iones de oxígeno alrededor de el ocupan las esquinas de un octahedro(Figura 2). No todos los sitios disponibles van a estar ocupados por iones metálicos. Solo un octavo de los sitios A, es decir, 8 de los 64 sitios tetrahédricos posibles están ocupados. En el caso de las posiciones octahédricas solo un medio de los sitios se encontrarán ocupados, ocupándose entonces 16 de los 32 sitios posibles B. Cabe añadir que según los sitios que ocupen los iones  $Fe^{3+}$  y los del ión divalente metálico  $M^{2+}$  de nuestra ferrita  $MO \cdot Fe_2O_3$  en los lugares intersticiales A y B podremos disponer de distintas estructuras de espinela. Si los iones  $Fe^{3+}$  se encuentran en las posiciones B y los  $M^{2+}$  se encuentran en las posiciones A tendremos la llamada estructura de espinela normal. Pero si los iones divalentes se encuentran en las posiciones B y los iones trivalentes se dividen equitativamente entre los sitios A y B tendremos la llamada estructura de espinela inversa. Las ferritas de hierro y cobalto, que nos interesan especialmente, tienen este tipo de estructura. Sin embargo, estos dos casos que se han descrito son casos extremos, habiéndose demostrado mediante difracción de rayos X y neutrones que estructuras intermedias también pueden existir. Por ejemplo, otra en la que nos encontramos interesados, la ferrita de manganeso tiene una estructura prácticamente normal, pero no del todo, ya que en vez de encontrarse todos los iones  $Mn^{2+}$  en las posiciones A, una fracción 0.8 se encuentra en las A y 0.2 en las B.

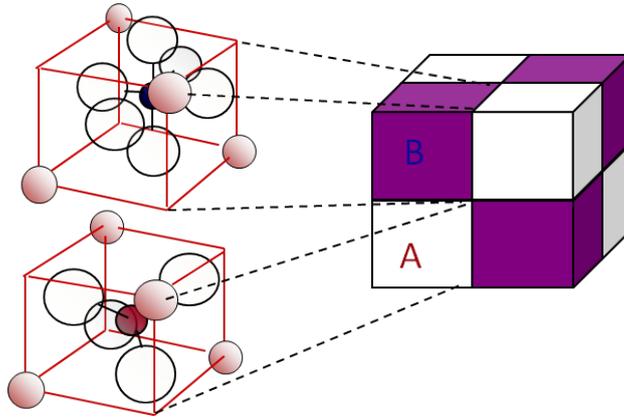


Figura 2: Sitios intersticiales de la estructura espinela. En A encontramos las posiciones tetrahédricas, en B las posiciones octahédricas

### 1.2.2. Momento magnético de la magnetita

Hemos dicho que las ferritas son componentes iónicos y por tanto sus propiedades magnéticas son debidas a los iones que contienen. Por tanto estaremos interesados en saber que momento magnético tendrá un ión metálico particular. (El ión de oxígeno  $O^{2-}$  no tiene momento magnético neto.) Esta información está dada por la regla de Hund (Anexo). Además como ya sabemos, los iones se colocan en diferentes posiciones (A y B) e interactúan de forma negativa, por tanto si queremos encontrar el momento neto de la magnetita debemos conocer su estructura cristalina. La magnetita tiene una estructura cristalina espinela inversa y al tener los sitios A y B un orden magnético antiparalelo resulta un ferrimagnetismo con un exceso de momento magnético de  $4 \mu_B$  por fórmula unidad. Hay 8 f.u. en la celda cúbica, por lo que cada celda contribuye  $32 \mu_B$ . La utilización de otras técnicas como la difracción de electrones o la espectroscopía de absorción de rayos-X (XAS) permiten confirmar que los magnetosomas son magnetita pura. Puesto que no se puede medir directamente la magnetita que hay en el interior de las bacterias, el momento magnético nos permite calcular fácilmente la masa de magnetita que tenemos en el interior de las células. Así mismo, la introducción del dopante, al no modificar demasiado el momento no dificulta el cálculo.

### 1.3. Efectos de la orientación cristalina: anisotropía magnética

El concepto de anisotropía magnética ha sido muy importante a la hora de realizar este trabajo. Si partimos de nuestra muestra cristalina, la imanación de saturación de esta será una constante  $M_s$ , pero la energía empleada en el proceso de imanación será mayor en aquellas direcciones en las que el campo requerido para lograr la saturación sea mayor. Por ejemplo, en el caso del hierro, investigadores del grupo del japonés Kotaro Honda[14], observaron que para alcanzar la saturación a lo largo de la dirección  $\langle 111 \rangle$  era preciso aplicar campos del orden de 600 Oe, mientras que la saturación según las direcciones  $\langle 100 \rangle$  se conseguía con campos del orden de 1 Oe, siendo estas últimas las direcciones de fácil imanación, es decir, las direcciones de la imanación observadas en los distintos dominios. Estos experimentos pusieron de manifiesto que la energía requerida para imanar a saturación una muestra dependía de la dirección del campo. Para ilustrar mejor este concepto, en la figura 3 se muestran las curvas de imanación para el cristal de hierro, se ve que las direcciones  $\langle 100 \rangle$  son las de fácil imanación y las  $\langle 111 \rangle$  las desfavorables[14].

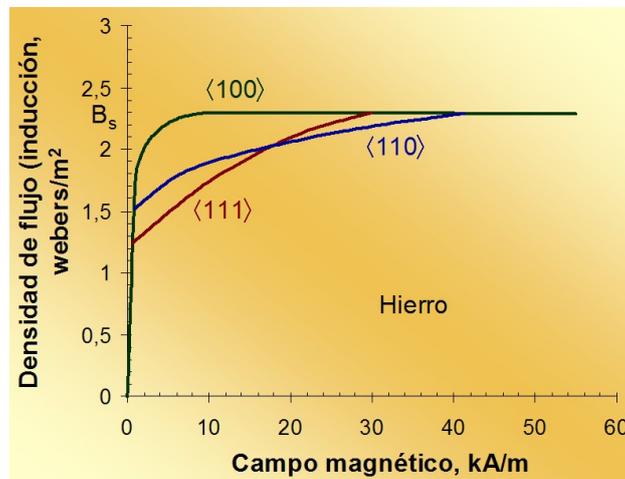


Figura 3: Proceso de imanación del hierro para diferentes ejes cristalográficos[15]

### 1.4. La transición de Verwey

La energía de anisotropía de cristales cúbicos se expresa comunmente como una función de los cosenos directores de la magnetización respecto a

los ejes cristalinos mediante la expresión[8]:

$$W_A = K_1(\alpha_1^2\alpha_2^2 + \alpha_2^2\alpha_3^2 + \alpha_3^2\alpha_1^2) + K_2(\alpha_1^2\alpha_2^2\alpha_3^2) \quad (1)$$

En las ferritas, que son los cristales de interés para nuestro trabajo,  $K_2$  es de menor importancia y  $K_1$  tiene un signo negativo indicando que la dirección de fácil imanación es la diagonal  $\langle 111 \rangle$ . La ferrita de cobalto se mantiene a parte en este rápido análisis ya que su constante de anisotropía es más grande que el de otras ferritas por al menos un orden de magnitud, de hecho, es una cantidad positiva, ya que la dirección de fácil imanación en este caso es la  $\langle 100 \rangle$ . La magnetita también muestra un comportamiento distinto a bajas temperaturas; su constante de anisotropía  $K_1$  pasa por un cero y se convierte en positiva a una temperatura de unos 120 K, es decir, en el fondo lo que está sucediendo es que su dirección de fácil imanación cambia de  $\langle 111 \rangle$  a  $\langle 100 \rangle$  y es lo que denominamos transición de Verwey[7]. Hasta el momento para nanopartículas de magnetita se ha medido una temperatura de transición de Verwey de alrededor de los 110K, mientras en bulk, como ya se ha comentado, está alrededor de los 120 K[3]. Lo que está sucediendo[7] es una transición estructural de primer orden de una fase cúbica para temperaturas mayores que la temperatura de Verwey (figura 4) a una fase monoclinica distorsionada para temperaturas menores que la Verwey. Ha sido estudiado[4] que la absorción de iones de cobalto y la incorporación de cobalto dentro de los magnetosomas ocurren predominantemente en los sitios octahédricos  $Fe^{2+}$ . La sustitución de pequeñas cantidades de cobalto va a añadir una gran contribución positiva a  $K_1$ [8], pudiendo, así, perder la transición de Verwey de nuestra estructura cristalina estudiada. Esto va a ser de gran interés a la hora de estudiar los magnetosomas dopados con cobalto para poder saber de una manera indirecta si se están realmente incorporando iones de cobalto en la estructura cristalina de nuestras nanopartículas.

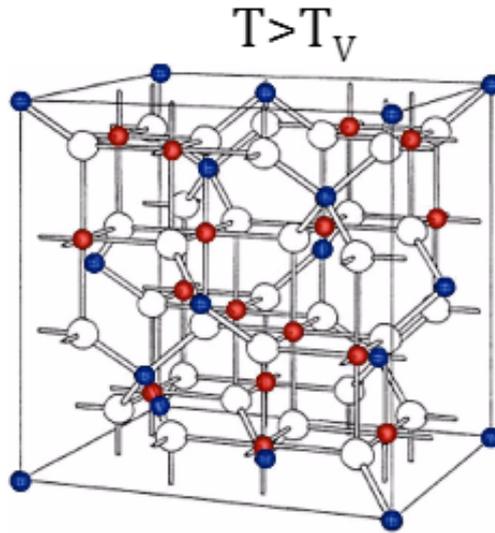


Figura 4: Estructura cúbica de la magnetita. En **azul** sitios tetrahédricos ocupados por iones  $Fe^{3+}$ , en **rojo** sitios octahédricos ocupados por iones  $Fe^{3+}$  y  $Fe^{2+}$

## 1.5. Objetivos y justificación del trabajo

Los magnetosomas sintetizados por la bacteria *M.gryphiswaldense* consisten en partículas de magnetita ( $Fe_3O_4$ ) que están rodeadas de una membrana lipídica. Estos magnetosomas tienen un potencial considerable para usar en aplicaciones biotecnológicas y nanotecnológicas por algunas de las características que ya han sido explicadas: su tamaño pequeño, su forma o su biocompatibilidad inherente. La habilidad para confeccionar las propiedades magnéticas de los magnetosomas expandirá aún más estas aplicaciones; de todos modos, el dopaje controlado de los magnetosomas no es algo fácil de conseguir y está en estudio actualmente.

Controlar el magnetismo, la forma, el tamaño y las propiedades de la superficie de las nanopartículas tendrá un importante impacto en la investigación e industria nanotecnológica, con aplicaciones varias como el almacenamiento de grandes densidades de información o electrónica de alta frecuencia entre otras. En el aspecto de la biomedicina el uso de nanopartículas magnéticas puede servir en el tratamiento del cáncer a través de la hipertermia magnética ya que el área de los ciclos de histéresis es proporcional a la energía disipada en forma de calor en el proceso irreversible de imanación y desimanación, éstas prácticas estarían relacionadas con las medidas de

SAR<sup>1</sup>[10][11]. En cuanto a la biomedicina además puede servir para tecnologías de administración dirigida de fármacos y como agentes de contacto en resonancia magnética nuclear. Todos estos avances requerirían en principio una síntesis confeccionada.

Como ya sabemos los magnetosomas contienen magnetita, que tiene la imanación de saturación más alta de los óxidos de hierro, además, resulta atractiva su biocompatibilidad y también su resistencia a la degradación debido a la membrana lipídica que los rodea. A pesar de esto, la magnetita inalterada es magnéticamente suave, y por tanto menos idónea para aplicaciones que requieren que las partículas permanezcan imanadas en ausencia de campo.

Es aquí donde interviene el dopaje; ya que, por ejemplo, el dopaje con cobalto puede incrementar la dureza de las partículas de magnetita elevando el campo coercitivo necesario para revertir su imanación, sin una reducción significativa en la imanación de saturación[4]. El mecanismo de absorción de hierro de las bacterias magnetotácticas ha sido estudiado en profundidad, mostrando que las células tienen una alta afinidad y especificidad para el hierro y son capaces de introducir hierro de concentraciones muy bajas[2]. Sin embargo, hay relativamente pocos artículos que describan la afinidad de la célula y su comportamiento incluyendo otros metales de transición en su crecimiento. Por eso es necesario avanzar en este hecho mediante el estudio de magnetosomas dopados controlados en el laboratorio.

---

<sup>1</sup>SAR(Specific Absortion Rate), la tasa de absorción específica es una medida de la absorción de energía máxima por el tejido vivo.

## 2. Desarrollo experimental

### 2.1. MIC(Concentración Inhibitoria Mínima) y condiciones de cultivo

Las bacterias magnetotácticas están suspendidas en un medio dónde encuentran los nutrientes necesarios para crecer y en algunos casos formar magnetosomas. Sabemos que para que las bacterias formen magnetosomas deben encontrar hierro en el medio en el que se suspenden. Además nosotros queremos dopar las nanopartículas y por tanto eventualmente deberemos de tratar de "engañar" a la bacteria y añadir a nuestro medio algún metal como dopante para que ésta lo incorpore en los magnetosomas formados. La MIC(minimum inhibitory concentration)[5] es una técnica experimental ideal que vamos a necesitar para encontrar la concentración mínima de sustancia dopante a la que la bacteria termina de crecer o crece de una manera deficiente, es decir, la concentración mínima a la cual el metal comienza a ser tóxico, para ello se suspenderá la bacteria a distintas concentraciones de hierro, cobalto y manganeso, se dejará evolucionar en el tiempo y finalmente se medirá la concentración de bacterias crecidas que tenemos en nuestras muestras mediante técnicas de absorción de luz.

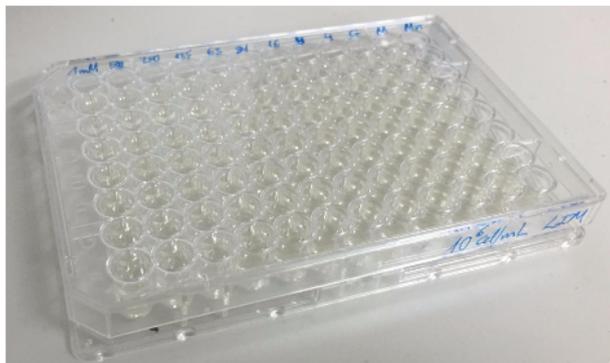


Figura 5: Placas para la realización de la MIC

A partir de los resultados de la MIC, deberemos de analizar nuestros datos. Estos datos serán un buen indicativo a la hora de dilucidar con qué concentración de dopante nos interesa trabajar, concentraciones no tóxicas donde se vean compensadas las cantidades de hierro y sustancia dopante y que nos permitan obtener bacterias que hayan desarrollado magnetosomas para su posterior estudio.

## 2.2. TEM(Microscopio Electrónico de Transmisión)

Otro dispositivo que utilizaremos para realizar nuestro trabajo es el microscopio electrónico de transmisión[12], importante a la hora de visualizar las bacterias magnetotácticas y ver los magnetosomas que las conforman, pudiendo comprobar de esta manera el número de ellos, su tamaño o la disposición de los mismos. Esta información nos será útil a la hora de determinar la distribución de tamaños de las nanopartículas pudiendo realizar unos histogramas<sup>2</sup> para comprender mejor el efecto de las sustancias dopantes en el desarrollo de las bacterias. La microscopía electrónica de transmisión está basada en el uso de los electrones para la visualización de objetos. Se utiliza un fino haz de electrones acelerados que, al impactar con la muestra, genera una serie de señales directamente relacionadas con la estructura atómica del objeto investigado. Estas señales se seleccionan por separado para generar distintos tipos de imágenes y obtener datos analíticos. Los electrones transmitidos con y sin dispersión son los que utilizamos para crear nuestras imágenes, imágenes de transmisión convencionales, de campo oscuro y alta resolución, revelando la estructura interna de las muestras, tamaño y distribución de partículas. Los rayos X(técnicas EDX) pueden ser utilizados para analizar la composición química de la muestra y podrían resultar de interés para el presente trabajo. Para emplear nuestro microscopio electrónico de transmisión se utilizan rejillas de cobre sobre las que se deposita una gota de la sustancia a observar. Se coloca una pantalla CCD detrás del objeto para registrar la imagen aumentada.

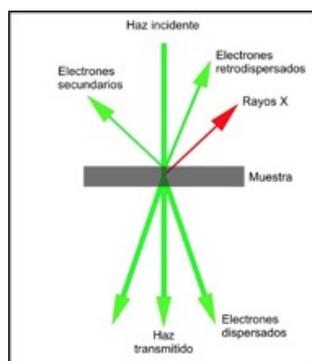


Figura 6: Esquema de la interacción de la materia con los electrones generados por el microscopio electrónico de transmisión [16]

---

<sup>2</sup>Representación gráfica en forma de barras donde se representarán el número de magnetosomas que encontramos en las células y su tamaño. Sirven para obtener una "primera vista" general, de la distribución de la muestra, respecto a una característica cuantitativa de la misma y que es de interés para el observador que en nuestro caso será la longitud.

## 2.3. Técnicas de caracterización magnética

Las técnicas de magnetometría nos van a permitir conocer ciertas propiedades de los materiales tales como:

- Imanación de saturación ( $M_s$ )
- Imanación de remanencia ( $M_r$ )
- Coercitividad ( $H_c$ )

Propiedades que son de suma importancia a la hora de caracterizar nuestras muestras. Se han utilizado distintos dispositivos experimentales que se procede a explicar.

### 2.3.1. VSM(Vibrating Sample Magnetometer)

El VSM(Figura 7) es un dispositivo experimental basado en la variación de flujo magnético en una bobina cuando una muestra imanada está vibrando cerca de él[13]. La muestra está unida al final de una barra no magnética cuyo otro final está junto a un vibrador mecánico. El campo magnético oscilante de la muestra moviéndose induce una fuerza electromotriz variable en las bobinas detectoras, cuya magnitud es proporcional al momento magnético de la muestra. Por tanto, el principio de funcionamiento del VSM es la Ley de Inducción de Faraday, la cual nos dice que un campo magnético variable producirá un campo eléctrico. Este campo eléctrico puede ser medido y por ende nos brinda información acerca de la imanación de la muestra. La pequeña señal de la fuerza electromotriz es amplificada, para evitar el ruido que pudiera producirse, mediante un amplificador lock-in que es sensible solo a señales que se encuentren a la frecuencia de vibración.

### 2.3.2. SQUID(Superconducting Quantum Interference Devices)

El dispositivo de interferencia cuántica de superconducción[13](en inglés SQUID)(Figura 8), consiste en dos superconductores separados por finas capas aislantes, que forman dos uniones Josephson<sup>3</sup> paralelas. El dispositivo se puede configurar como un magnetómetro para detectar campos magnéticos increíblemente pequeños, suficientemente pequeños para medir campos

---

<sup>3</sup>Dos superconductores separados por una delgada capa aislante, pueden experimentar un efecto túnel en los pares Cooper de electrones a través de la unión. Los pares de Cooper en cada lado de la unión pueden ser representados por una función de onda similar a la función de onda de la partícula libre. Por el efecto Josephson de DC, en la unión y en ausencia de tensión, puede fluir una corriente proporcional a la diferencia de fase de las funciones de onda.

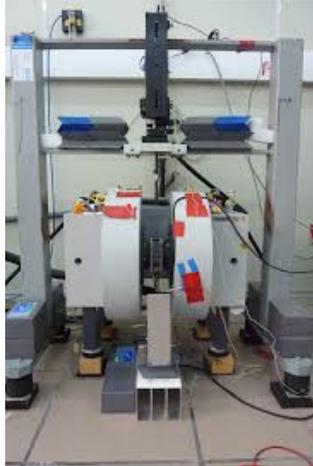


Figura 7: Fotografía Vibrating Sample Magnetometer de los servicios generales de la universidad

magnéticos de organismos vivos. Si en un dispositivo SQUID se mantiene una corriente constante de polarización, el voltaje medido oscila con los cambios de fase en las dos uniones, los cuales, dependen de la variación del flujo magnético. El conteo de las oscilaciones, permite evaluar el cambio de flujo que se ha producido. Las medidas alrededor de ciertos campos y temperaturas consumen bastante tiempo, el sistema se opera bajo control informático. La sensibilidad de un magnetómetro SQUID está generalmente alrededor de los  $10^{-7}$ emu.<sup>4</sup>



Figura 8: Fotografía Superconducting Quantum Interference Devices de los servicios generales de la universidad

---

<sup>4</sup>Emu: unidad del sistema cegesimal(CGS). Una unidad emu de fuerza de un polo magnético es la que posee un polo que colocado a una distancia de 1 cm provoca una fuerza de 1 dyna. Por tanto si un polo posee una intensidad de  $m$  emu y está sumergido en un campo  $\mathbf{H}$  entonces recibe una fuerza  $F = mH$

### 3. Resultados experimentales

#### 3.1. MIC(Minimum Inhibitory Concentration)

En el laboratorio de microbiología se practica un examen MIC a través de las placas mostradas en la figura 5. Se deja crecer la bacteria a distintas concentraciones de dopante y se revisa su crecimiento a distintos tiempos de incubación: 0h, 48 h, 72 h, 96h y 120h. La concentración de bacterias que crecen en el medio se revisa mediante técnicas de absorción de luz(OD), simplemente, a más bacterias crecidas menor luz transmitida. Los resultados obtenidos para una concentración de  $10^6$  cel/ml a tiempo final de crecimiento(120h) se muestran en la figura 9.

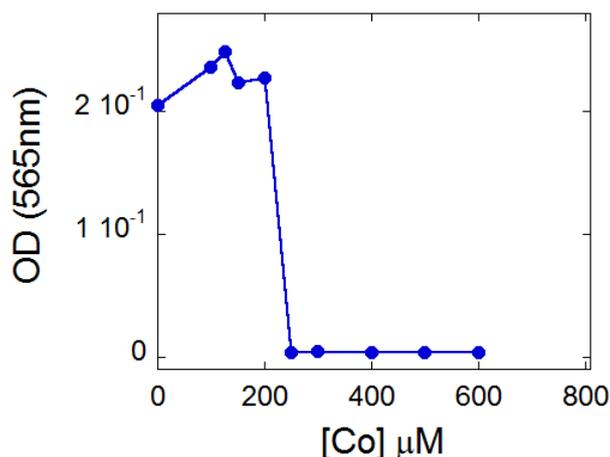


Figura 9: Absorción de luz a una longitud de onda de 565 nm frente a concentración de cobalto en el medio de cultivo de la bacteria *Magnetospirillum gryphiswaldense*

Lo que se muestra en la figura 9 nos va a permitir delimitar la concentración tóxica de cobalto, es decir, la concentración a partir de la cual las bacterias ya son incapaces de crecer que en el caso del cobalto podemos observar que está por encima de los  $200\mu\text{M}$ . Se realiza el mismo proceso para el manganeso y los resultados se muestran en la figura 10.

De este modo, la MIC nos posibilita una elección adecuada de la concentración de dopante con la que queremos trabajar, que en nuestro caso va a ser  $100\mu\text{M}$  de cobalto y manganeso. Además, la concentración de hierro utilizada será también de  $100\mu\text{M}$ . De esta manera, tendremos balanceadas las dos cantidades 1 a 1 y podremos afirmar que en esa concentración de metales, sin duda, las bacterias crecerán sin complicación.

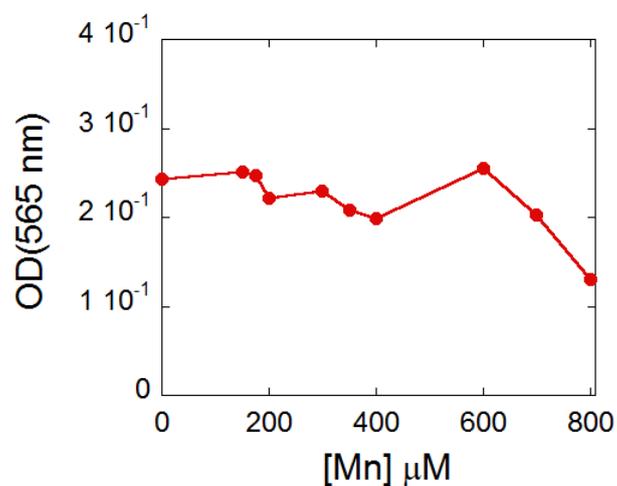


Figura 10: Absorción de luz a una longitud de onda de 565 nm frente a concentración de manganeso en el medio de cultivo de la bacteria *Magnetospirillum gryphiswaldense*

### 3.2. Cultivo de los magnetosomas

A través de los resultados de la MIC, debemos poner en marcha el proceso de crecimiento de las bacterias. Para ello se utilizarán las concentraciones de hierro, cobalto y manganeso predichas en el anterior apartado, además del medio de cultivo FSM (Flask Standard Medium). El contenido del medio FSM muestra en la figura 11.

	Soy beam peptone	3 g
	Na Pyruvate	3 g
	Yeast extract	0.1 g
	NaNO <sub>3</sub>	0.34 g
	SO <sub>4</sub> Mg.7H <sub>2</sub> O	0.15 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 g
	Hepes	2.38 g
	Ferric Citrate	100 μM (10 mL)

Figura 11: Contenido del medio de cultivo FSM por litro de agua destilada

### 3.2.1. Crecimiento de las bacterias

A continuación describimos brevemente el proceso por el cual obtenemos las bacterias y sus correspondientes magnetosomas para su posterior caracterización magnética. Nuestro objetivo es dopar con cobalto o manganeso los magnetosomas y comparar su respuesta magnética con los correspondientes no dopados, debemos tener en cuenta en todo momento los datos obtenidos de la MIC. Nuestro propósito es, por tanto, que las bacterias crezcan en un medio con hierro más cobalto o manganeso. Para ello, el punto de partida es un cultivo crecido en presencia de hierro, donde encontraremos magnetosomas, es decir, bacterias *M.gryphiswaldense* que han crecido en FSM. De este primer volumen de bacterias del que disponemos, cogemos una décima parte y lo resuspendemos en un medio con concentraciones iguales a:  $100 \mu M$  de *Fe* y  $100 \mu M$  de *Co* o  $100 \mu M$  de *Mn*, las predichas en el anterior apartado. Hacemos estos pases, cogiendo una décima parte del volumen actual y resuspendiendo varias veces, así, podremos decir que tras varios tránsitos prácticamente todas las bacterias habrán crecido en un medio FSM más dopante. Con las bacterias ya crecidas en nuestro recipiente final, fijamos éstas usando glutaraldehído para conservar su estructura. Lavamos la muestra, centrifugando a  $4^{\circ}C$  y resuspendiendo 3 veces en PBS<sup>5</sup>. Pasamos a un Eppendorf nuestras bacterias y liofilizamos quedando éstas como un polvo seco. Este polvo se mezcla para homogeneizar la muestra y, finalmente, se crea una pastilla a través de una prensa hidráulica de 2 toneladas. Es esta pastilla la que utilizaremos para poder caracterizar las propiedades magnéticas de los magnetosomas dopados a fin de su posterior interpretación y de ciertas conclusiones que se darán en los siguientes apartados.

### 3.3. Microscopía electrónica de transmisión

El TEM es una herramienta poderosa para estudiar la morfología de sistemas donde se manejan escalas nanométricas. Del dopaje de las bacterias magnetotáticas una de las cuestiones básicas a resolver es la de las imágenes que obtenemos a través del microscopio electrónico de transmisión, las cuales nos pueden servir para dilucidar qué primer efecto tienen nuestras sustancias dopantes sobre el crecimiento de las bacterias magnetotáticas y sus magnetosomas. Para ello se han tomado diversas imágenes distinguiendo bacterias crecidas con hierro, con hierro más cobalto y con hierro más manganeso. En la figura 12 se muestran fotos recogidas por el TEM para las tres variedades.

---

<sup>5</sup>Tampón fosfato salino o buffer sulfato salino: es una solución tampón, acuosa y salina que contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio. No es tóxica para las células de los mamíferos, y su pH es de 7.4

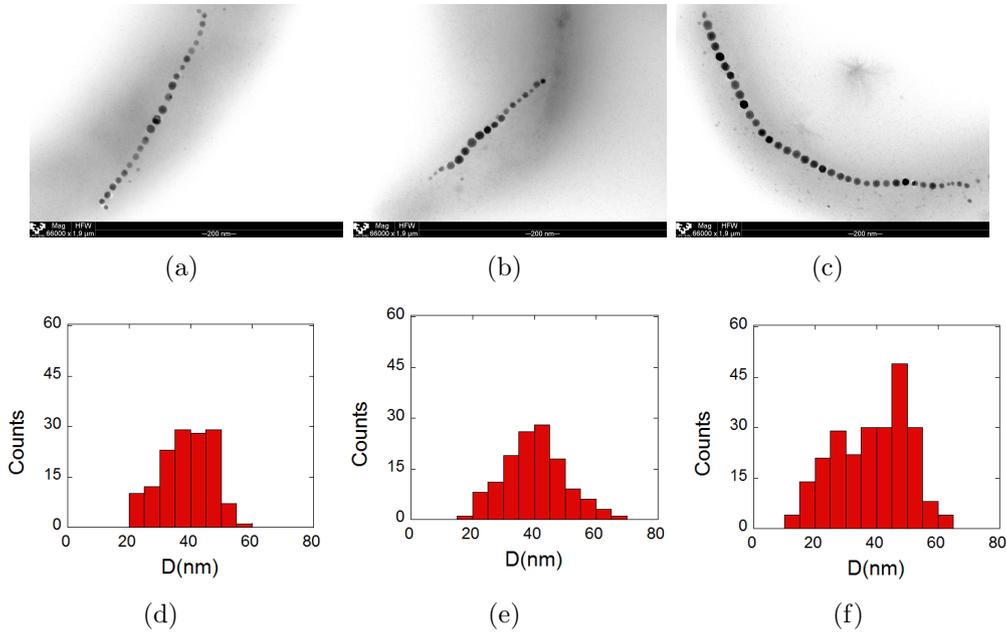


Figura 12: Imágenes TEM e histogramas para distintas bacterias magnetotácticas. Arriba: Imagen TEM bacteria crecida en un medio que contiene Fe(a), Fe-Co(b), Fe-Mn(c). Abajo: Histograma del diámetro de los magnetosomas para bacterias crecidas en Fe(d), en Fe-Co(e), en Fe-Mn(f)

A continuación, se tomaron un número considerable de fotos TEM de bacterias magnetotácticas crecidas en medio FSM(con magnetosomas). Distinguiendo las tres variedades, se realizó el tratamiento de estas imágenes a través del programa ImageJ, contando el número de magnetosomas por célula y midiendo el tamaño de cada una de las nanopartículas. Con esta técnica podemos realizar histogramas para cada cepa, nos servirán para caracterizar cuál es el efecto que producen tanto el cobalto como el manganeso sobre nuestras bacterias. De esta manera vamos a obtener una primera imagen visual de los efectos de nuestro trabajo. En la figura 12 se muestran los histogramas realizados para las 3 variedades.

Además, a partir de los histogramas realizados podemos obtener información provechosa como el tamaño medio de las nanopartículas o el número medio de éstas por cadena, información que se recoge en la tabla 1.

Medio de cultivo	D medio(nm)	Partículas por cadena	Partículas contadas
Fe	$39\pm 8$	20	138
Fe-Co	$40\pm 10$	16	129
Fe-Mn	$39\pm 12$	30	240

Tabla 1: Diámetro medio y número de partículas por cadena de la bacteria para distintos cultivos

Los datos obtenidos son muy útiles a la hora de caracterizar el crecimiento bajo dopaje de las bacterias y sus nanopartículas. Vemos que el tamaño medio de los magnetosomas prácticamente no se altera de una variedad a otra, a pesar de que el rango de crecimiento de éstos para las dos muestras crecidas en presencia de cobalto y manganeso cambia, y en su caso vemos que la desviación media crece para el caso de las muestras dopadas. Otro aspecto importante es el número medio de partículas que sintetizan por cadena las bacterias en su crecimiento. Para el caso del cobalto los datos nos muestran que las bacterias tienen, en general, una cadena de magnetosomas más corta, mientras que cuando las bacterias magnetotácticas crecen en un medio con cierta concentración de manganeso, éstas son capaces de alargar su cadena sintetizando un mayor número de magnetosomas, siempre en comparación con nuestra muestra control.

### 3.4. Medidas magnéticas

Una vez terminado el análisis morfológico y visual de los magnetosomas, pasamos a la caracterización magnética y al examen de los resultados experimentales que hemos obtenido en el laboratorio.

#### 3.4.1. Medidas VSM

El VSM va a ser el punto de partida del análisis magnético de nuestras muestras[9]. Una vez terminamos la puesta en marcha del crecimiento de las bacterias a las distintas concentraciones establecidas y su posterior preparación para llevar a cabo el examen magnético(3.2.1 Crecimiento de las bacterias), se bajaron las pastillas al laboratorio de medidas magnéticas y en el VSM colocamos con cuidado nuestras tres muestras en el extremo de la varilla oscilatoria. A través de este dispositivo vamos a ser capaces de medir los ciclos de histéresis a una temperatura fija de 300 K para cada uno de los tres tipos de magnetosomas: Fe, Fe-Co y Fe-Mn. Estas medidas nos van a permitir estudiar el comportamiento de las muestras en unas condiciones ambientales más parecidas a las que nos podamos encontrar en la práctica.

A partir de los ciclos de histéresis obtenidos determinaremos el campo coercitivo, la remanencia y por último la masa de magnetita que hay en nuestra muestra a partir de la imanación de saturación observada en el ciclo. Los ciclos de histéresis que obtuvimos en el VSM se muestran en la figura 13.

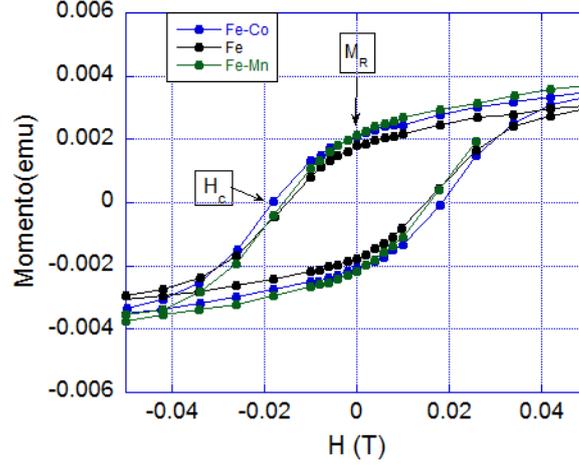


Figura 13: Ciclos de histéresis para las tres muestras obtenidas a través del magnetómetro VSM

La masa de magnetita o, simplemente masa magnética, se obtiene sabiendo que el momento magnético de la magnetita es  $4 \mu_B$  (Anexo), o lo que es lo mismo  $480 \text{ emu/cm}^3$ , entonces conociendo[13]:

$$\rho_{\text{magnetita}} = 5,2 \times 10^3 \text{ Kg/m}^3 = 5,2 \text{ g/cm}^3$$

$$M_s(\text{emu}) \times \frac{5,2 \text{ g/cm}^3}{480 \text{ emu/cm}^3} = m_{\text{Fe}_3\text{O}_4}(\text{g})$$

$$m_{\text{Fe}_3\text{O}_4}(\text{g}) = \frac{M_s(\text{emu})}{92,307 \text{ emu/g}} \quad (2)$$

El propio dispositivo VSM nos medirá los ciclos de histéresis en emu para poder obtener la masa de magnetita de las pastillas.

En la figura 14 se muestran los ciclos de histéresis normalizados.

Una comparación interesante es comprobar el aumento de la coercitividad de nuestros magnetosomas crecidos en presencia de cobalto, como se explicó para ciertas aplicaciones poder ajustar la dureza de las nanopartículas puede resultar realmente atractivo. Para ver esta característica ampliamos y comparamos los ciclos de histéresis normalizados para magnetosomas crecidos

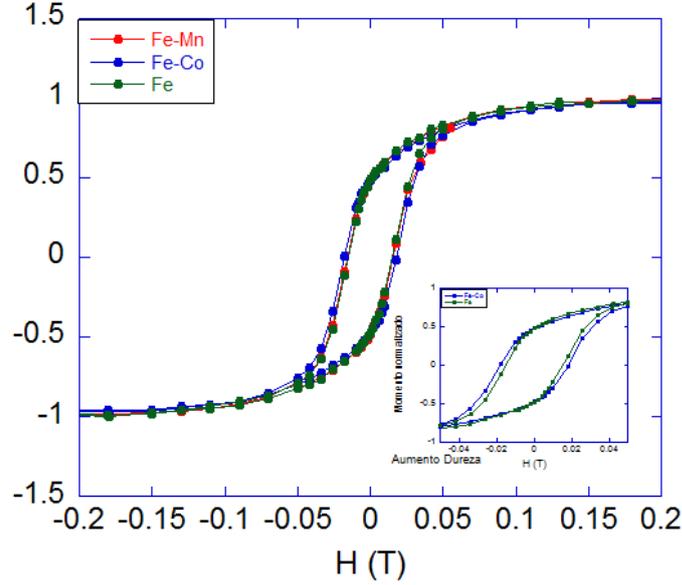


Figura 14: Ciclos de histéresis normalizados a 300 K para las tres muestras. Detalle en el interior: Aumento de la coercitividad para la muestra crecida en Fe-Co en comparación muestra crecida en Fe

en Fe y magnetosomas crecidos en Fe-Co. El resultado lo encontramos en la figura 14. No se nota demasiado el aumento de la dureza por la elevada temperatura a la que tenemos las muestras, la agitación térmica desluce los resultados, más adelante se hará una comparación a una temperatura inferior, a pesar de esto, de alguna manera son primeros datos indicativos de un buen camino a seguir.

Como ya se ha comentado, a través de los ciclos de histéresis podemos determinar características importantes tales como: la remanencia ( $M_r$ ), el campo coercitivo ( $H_c$ ) y la masa magnética ( $m_{Fe_3O_4}$ ) de las distintas muestras utilizadas obteniendo los valores mostrados en la tabla 2.

Medio de cultivo	$H_c(Oe)$	$M_r/M_s$	$m_{Fe_3O_4}(mg)$
Fe	$148 \pm 1$	$0.48 \pm 0,01$	$(3.9 \pm 0,1) \times 10^{-3}$
Fe y Co	$186 \pm 1$	$0.47 \pm 0,01$	$(4.6 \pm 0,1) \times 10^{-3}$
Fe y Mn	$150 \pm 1$	$0.47 \pm 0,01$	$(4.7 \pm 0,1) \times 10^{-3}$

Tabla 2: Valores campo coercitivo, remanencia y masa magnética de las distintas muestras

Los datos resultan interesantes, nos muestran que al dopar con cobalto el

campo coercitivo aumenta, lo cual ya esperábamos porque el material se hace más duro y por ende el ciclo de histéresis gana anchura. El campo coercitivo de la muestra con manganeso prácticamente no cambia con respecto a la muestra control, el manganeso es un elemento más blando y por tanto los ciclos de histéresis deberían mostrar una reducción de la coercitividad al dopar con este elemento[5], algo que no vemos y por tanto es posible, desde luego, todavía no definitivo, que no se estén incorporando iones  $Mn^{2+}$  en la estructura de espinela inversa de la magnetita.

### 3.4.2. Medidas VSM criogénico

Para obtener medidas más precisas se utiliza un VSM con capacidad para el control de la temperatura de la muestra. Esto nos será muy útil porque nos va a permitir obtener los ciclos de histéresis a distintas temperaturas, pudiendo comprobar la variación con la temperatura de distintas características elementales de los materiales ferrimagnéticos con los que estamos trabajando como lo son la remanencia o el campo coercitivo. Este será un paso más para continuar con la caracterización magnética de los magnetosomas. En la figura 15 se muestran los ciclos de histéresis a distintas temperaturas, desde 10K a 300K, para nuestra muestra de magnetosomas control.

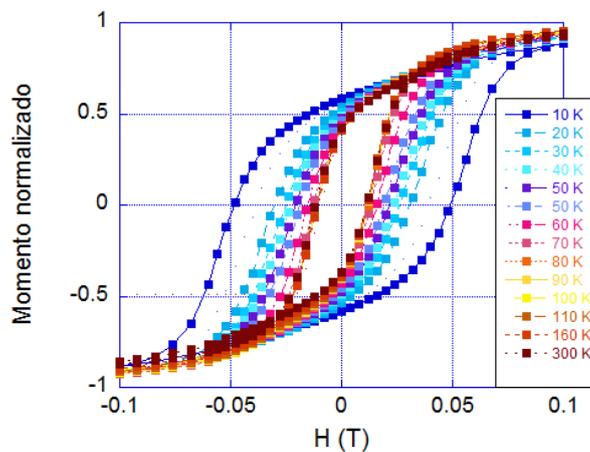


Figura 15: Ciclos de histéresis medidos a diferentes temperaturas para la muestra crecida en Fe

Vemos la variación de la histéresis con la temperatura. En la figura 16 se realizan las mismas medidas para los magnetosomas dopados.

Ahora, podemos comparar los ciclos de histéresis a una temperatura de por ejemplo 10K para los magnetosomas control y los dopados con cobalto, así, podemos dilucidar si se está incorporando cobalto con mayor claridad

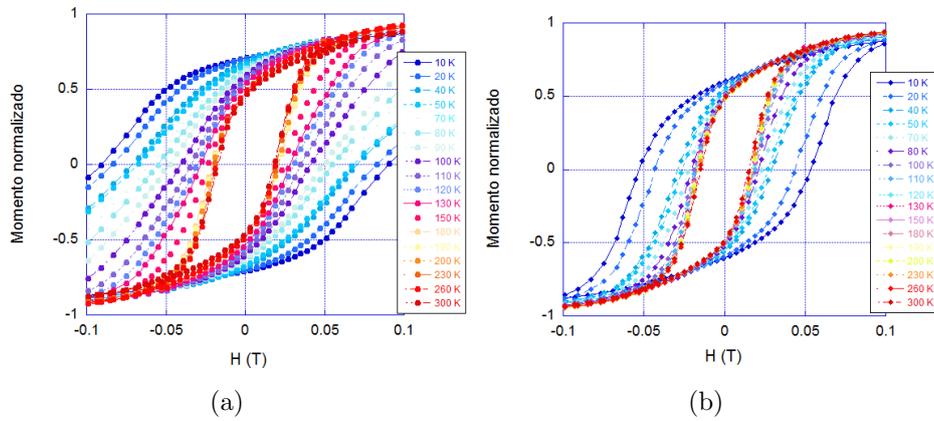


Figura 16: Ciclos de histéresis medidos a diferentes temperaturas para muestras crecidas en Fe-Co(a), Fe-Mn(b)

sin la influencia térmica con la que dibujábamos la figura 14. Vemos la comparación en la figura 17.

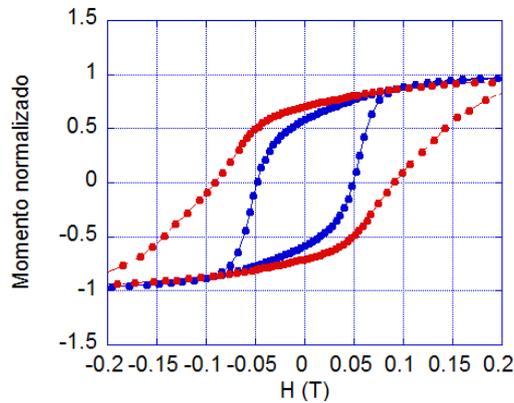


Figura 17: Gráfica comparativa ciclos de histéresis a 10 K, en **azul** muestra crecida en Fe, en **rojo** muestra crecida en Fe-Co

Todo apunta a que se está incorporando cobalto, la dureza de la muestra ha aumentado, el campo coercitivo para la muestra crecida en un medio con hierro y cobalto es de 905,2 Oe mientras que para el control es de 483,2 Oe, prácticamente aumenta el doble al introducir cobalto.

Seguidamente en nuestro empeño en la caracterización magnética, a través de los ciclos obtenidos en el VSM, podemos determinar la remanencia y el campo coercitivo de cada uno de ellos y representarlos en función de la temperatura.

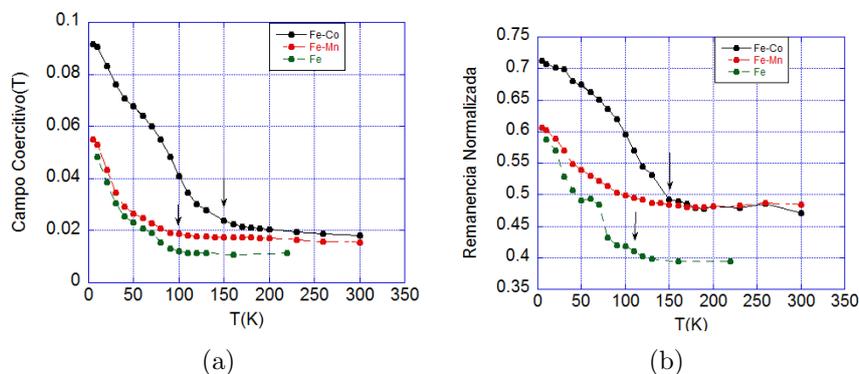


Figura 18: Evolución del campo coercitivo(a) y la remanencia normalizada(b) en función de la temperatura para las tres muestras

Lo que muestra la figura 18 es que el dopaje con Co y Mn causa un incremento en la remanencia y en la coercitividad. En el caso del Co, éste como ya hemos comentado es un material más duro, lo cual implica un ciclo de histéresis más ancho. Este efecto se puede ver en nuestros datos, respaldando el hecho de que las células toman cobalto del medio para la formación de los magnetosomas.

La coercitividad es muy superior para el caso de la muestra crecida en un medio Fe-Co, sobre todo en el rango de temperaturas de 0 a 150 K, para después ver que a medida que sigue aumentando la temperatura las diferencias se van reduciendo.

Para el caso del Mn, vemos también un aumento en la coercitividad y la remanencia. El Mn es un material magnéticamente blando, por tanto, nuestros datos no apoyan, en principio, un posible dopaje de los magnetosomas. A pesar de esto, hay que tener en cuenta que factores como un incremento en el tamaño o en el número medio de nanopartículas pueden acrecentar la coercitividad[4], por eso se realizó un análisis de la distribución de tamaños de ellos(3.3. Microscopía electrónica de transmisión) demostrando que en el caso del manganeso la cadena es ostensiblemente más larga comparada con la de la muestra control. Este factor es posible que esté incrementando la coercitividad.

Además de este rápido análisis, con los datos de la remanencia y la coercitividad en función de la temperatura se puede buscar una transición de Verwey, hecho experimental fundamental para comprobar la incorporación de dopantes. Obviamente en la muestra control, al poder considerar los magnetosomas de magnetita pura, según aumentamos la temperatura, las nanopartículas deberán sufrir un cambio de fase estructural de primer orden de

la fase monoclinica a la fase cúbica(1.4 Transición de Verwey).

A temperaturas bajas, la anisotropía del sistema es mayor, los momentos magnéticos tienen mayor dificultad para girar y por tanto el campo coercitivo crece, es decir, se necesita un mayor campo para saturar el material. Según va subiendo la temperatura cada vez resulta más fácil girar los momentos y el campo coercitivo se va reduciendo progresivamente, esto es lo que estamos viendo en la figura 18. Cuando llegamos a la temperatura de Verwey, la anisotropía decrece repentinamente, en ese punto tiene muy poco coste imanar y el campo coercitivo se reduce aún más, para después debido a que ya podemos considerar las temperaturas relativamente altas, mantenerse constante.

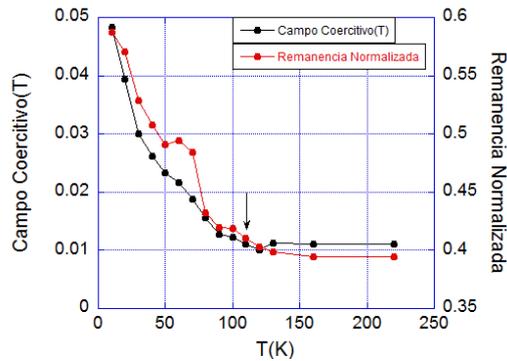


Figura 19: Remanencia normalizada y campo coercitivo para los distintos ciclos de la muestra control representados frente a la temperatura

En la figura 19 se representan juntos la remanencia y el campo coercitivo para la muestra control. Se ve a unos 110 K que la coercitividad deja de crecer, esto no resulta sorprendente, ya que estamos en el caso de la muestra crecida en un medio con hierro, formada exclusivamente por magnetita. Tal y como habíamos predicho en la teoría, para nanopartículas de magnetita la temperatura de transición de Verwey está alrededor de los 110 K[7], el cambio en la anisotropía podría estar relacionado con esta variación de la coercitividad. Además, también se observa un cambio a unos 50 K, el cual podría estar relacionado con otro tipo de transición.

Pasamos ahora a nuestras sustancias con manganeso y cobalto; y representamos al igual que para el hierro, la remanencia y el campo coercitivo frente a la temperatura(Figuras 20 y 21)

De las gráficas se sigue intuyendo un salto indicativo de la transición de Verwey, ciertamente, para una temperatura mayor en el caso del Fe-Co y una temperatura inferior en el caso del Fe-Mn. Esto nos lleva en primera instancia antes del posterior análisis en el SQUID a no poder asegurar que las muestras

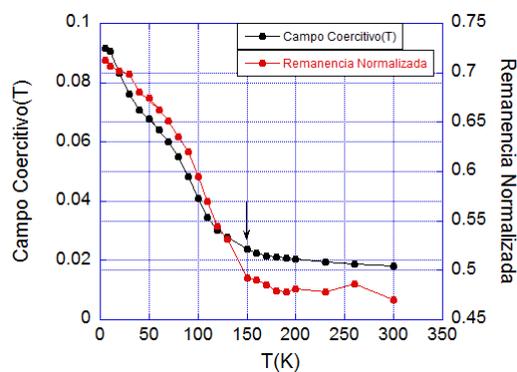


Figura 20: Remanencia normalizada y campo coercitivo para los distintos ciclos de la muestra dopada con cobalto representados frente a la temperatura

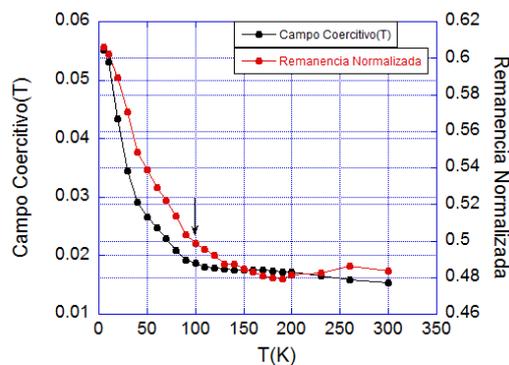


Figura 21: Remanencia normalizada y campo coercitivo para los distintos ciclos de la muestra dopada con manganeso representados frente a la temperatura

están incorporando iones de cobalto y manganeso. Desde luego, estas medidas pueden resultar indicativas pero no son en absoluto concluyentes a la hora de delimitar una posible transición de Verwey. A pesar de esto sí que nos sirven para comprobar cambios en la coercitividad o la remanencia para nuestros magnetosomas dopados.

Es necesario un último examen de los magnetosomas en el magnetómetro SQUID.

### 3.4.3. Medidas SQUID

El último ejercicio en nuestro apartado de medidas magnéticas será medir la respuesta magnética en modo ZFC (Zero Field Cooled) a través del magnetómetro SQUID que encontramos en el laboratorio de medidas magnéticas. Introducimos la muestra en la varilla y nos preparamos para medir. En este caso la muestra es primero enfriada a campo aplicado cero ( $H=0$ ) hasta la temperatura menor de medida. Después de estabilizar la temperatura, se aplica un campo de 50 Oe y se recogen los datos mientras la muestra es calentada hasta temperatura ambiente [5]. Mediremos, entonces, la imanación frente a la temperatura. De esta manera podemos intentar ver datos experimentales indicativos de una transición de Verwey, determinando si nuestras muestras han incorporado dopantes o siguen estando formadas por magnetita pura. En primer lugar presentamos los datos de la muestra control (Figura 22).

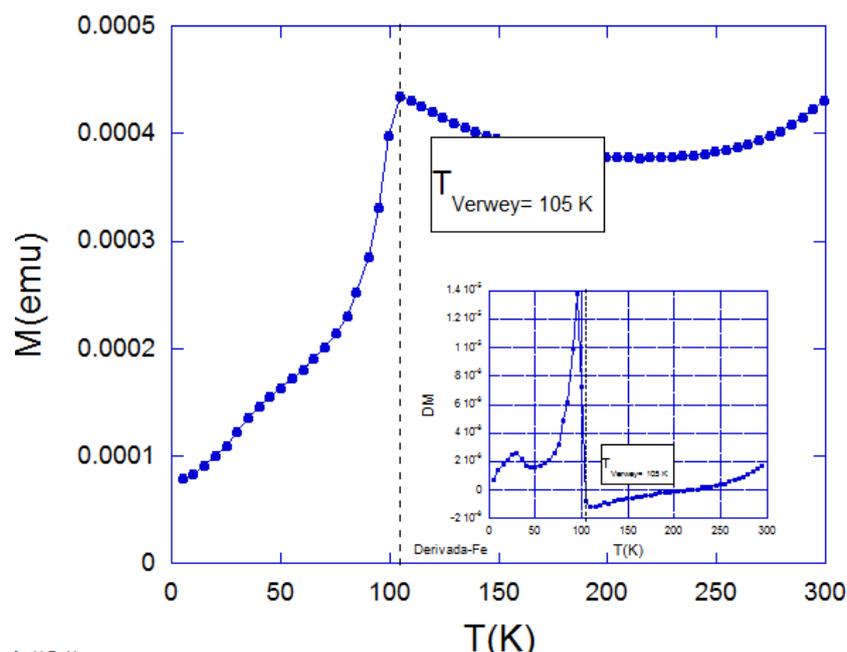


Figura 22: Imanación a 50 Oe frente a la temperatura para la muestra crecida en Fe. Detalle en el interior: Derivada de la imanación frente a la temperatura

Vemos en la gráfica que a medida que aumentamos la temperatura va aumentando la imanación, se ve un pequeño cambio de nuevo alrededor de los 50 K, desconocemos su origen y sigue creciendo la imanación hasta llegar a un punto en el que se frena esta progresión. Este cambio brusco se debe precisamente al cambio de anisotropía.

Como cabía esperar vemos alrededor de los 100-110 K una transición de Verwey, esto no es una sorpresa, estamos trabajando con magnetita pura. Por si fuera necesario una mayor aclaración podemos representar los datos de la derivada(Figura 22) que confirman de nuevo nuestra idea.

Pasando a la muestra con cobalto, efectuamos las mismas medidas y elaboramos como para el caso anterior las gráficas de la imanación y su derivada(Figura 23).

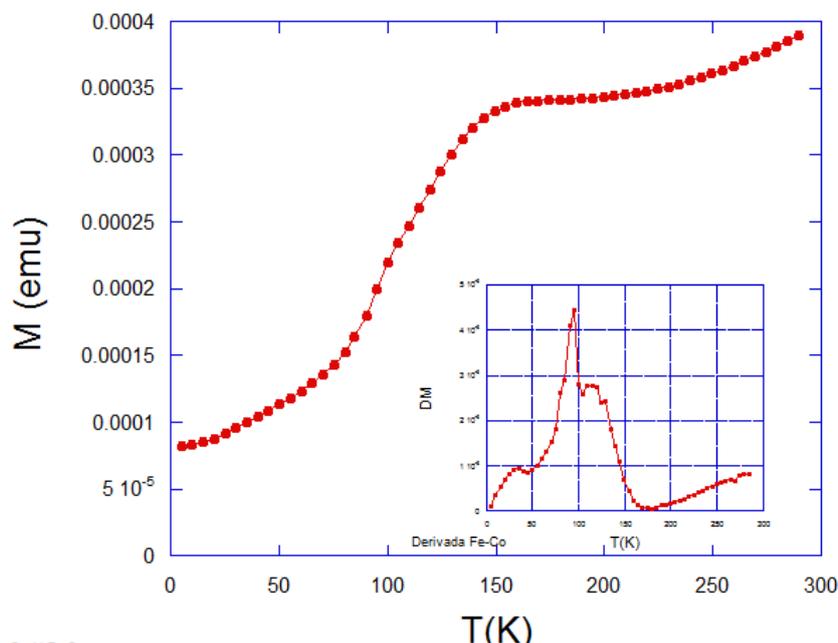


Figura 23: Imanación a 50 Oe frente a la temperatura para la muestra crecida en Fe-Co. Detalle en el interior: Derivada de la imanación frente a la temperatura

Vemos que en este caso, la transición de Verwey no está marcada, la gráfica si que exhibe un cambio en la anisotropía alrededor de 150 K pero la imanación aumenta continuamente con la temperatura y su derivada no llega a pasar por ningún cero. Esto nos podría indicar que nuestra muestra está incorporando cobalto, ya no tenemos magnetita pura y, en principio, iones de cobalto están sustituyendo los iones  $Fe^{2+}$  localizados en las posiciones octahédricas(B) de la estructura de espinela inversa, que es donde tiene lugar habitualmente la incorporación de cobalto[8], haciendo estas posiciones B previamente ocupadas por iones indistinguibles de hierro( $Fe^{3+}, Fe^{2+}$ ), ahora distinguibles y como consecuencia desapareciendo la transición de Verwey característica de la magnetita[4].

Por último, las muestras dopadas con manganeso. Como se explicó en el apartado anterior, las medidas en el VSM no han sido consideradas resolutivas a la hora de delimitar una posible transición de Verwey. Las medidas a partir del SQUID son medidas más directas sin necesidad de determinar a partir de los ciclos de histéresis obtenidos en el VSM criogénico, por ejemplo, la remanencia o el campo coercitivo. Por ello, el magnetómetro SQUID es una técnica experimental de mayor fiabilidad para seguir una posible transición de Verwey. Los datos de la imanación en función de la temperatura para la muestra crecida en un medio con Mn se muestran en la figura 24.

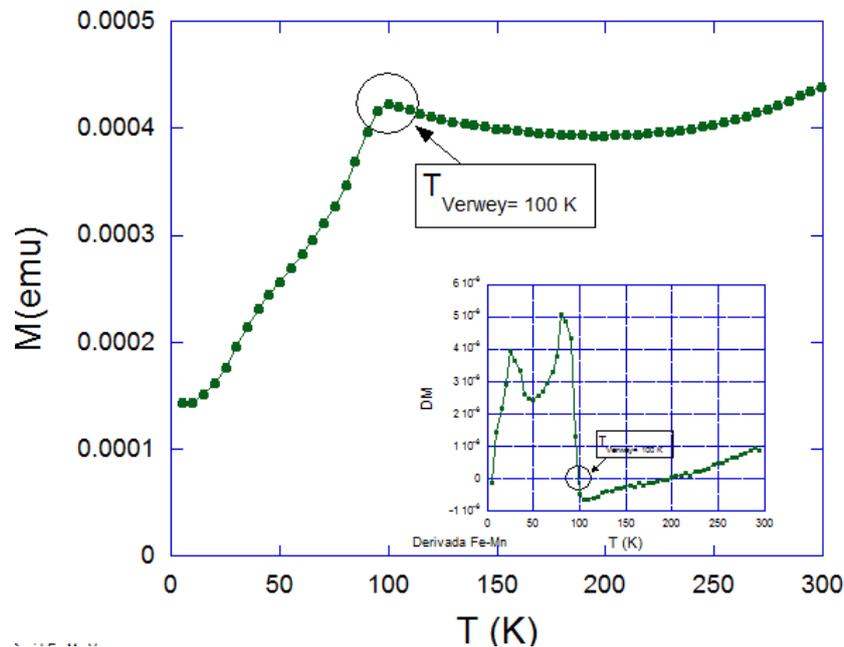


Figura 24: Imanación a 50 Oe frente a la temperatura para la muestra crecida en Fe-Mn. Detalle en el interior: Derivada de la imanación frente a la temperatura

Vemos en la gráfica, al igual que en el caso de la muestra crecida únicamente en presencia de hierro, una marcada transición de Verwey. Estamos ante una transición de Verwey a una temperatura ciertamente inferior (100 K) a la del caso de la muestra control. Además, se observa que el pico queda un poco más suavizado. La definición y la posición de la transición son indicativas de la estequiometría. La temperatura de Verwey se reduce con la adición de un dopante porque añade desorden[5]. De hecho, una reducción de la temperatura de Verwey al dopar magnetosomas ya ha sido relatada en otras ocasiones[4] como resultado de imperfecciones cristalinas. A pesar de

esta diferencia, parece que los iones  $Mn^{2+}$  no se están incorporando en este caso en las posiciones intersticiales octahédricas de la estructura espinela inversa de las nanopartículas magnéticas o lo que es lo mismo, el dopaje con manganeso para las concentraciones utilizadas, en principio, es ineficiente. Es posible que el manganeso cristalice en el tejido de la bacteria o que se quede cerca de la superficie del cristal de magnetita pero no penetre en su interior. Una posible explicación de este fenómeno podría venir de la rapidez con la que tiene lugar el proceso de crecimiento de los magnetosomas en las bacterias magnetotácticas. De cualquier manera, este análisis magnético no es suficiente para concluir fielmente que los iones de los metales de transición estén incorporándose en la estructura, ni para asegurar lo contrario. Sería necesario un análisis de difracción de rayos-X para comprobar la sustitución de los iones  $Fe^{2+}$  que no se ha realizado en el presente trabajo por la poca masa con la que trabajamos. Debido al carácter nanométrico de las partículas no se llega a medir un patrón de difracción. Lamentablemente no se ha podido comprobar, pero, la difracción de rayos-X sería la técnica perfecta para delimitar adecuadamente la transición de Verwey.

Por último, lo que si está en nuestras manos, es comprobar la variación de la imanación a distintas temperaturas para las muestras con las que trabajamos. Para ello se normalizan las distintas gráficas de la imanación frente a la temperatura y se presentan los datos en la figura 25.

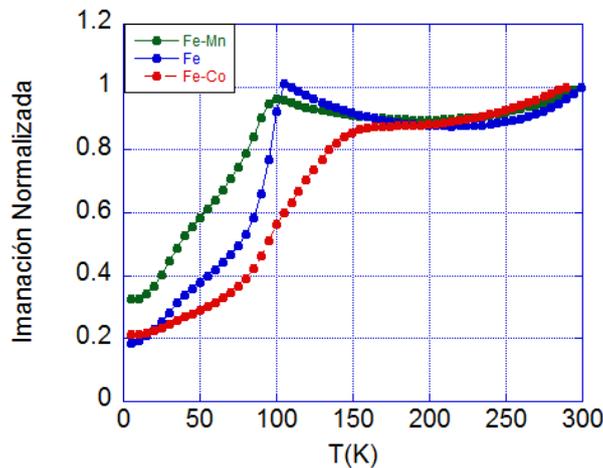


Figura 25: Imanación normalizada frente a la temperatura para las tres muestras: Fe, Fe-Co y Fe-Mn

Vemos que para temperaturas inferiores a los 100 K la imanación de la muestra dopada con cobalto es la menor, mientras que la crecida en un medio con manganeso es la más alta de todas. A temperaturas superiores a los 150

K las imanaciones de las tres muestras prácticamente coinciden y se solapan. Por último, como ya veníamos comentando, comparando las tres gráficas, vemos que el cambio de anisotropía resulta muy marcado para el caso de la muestra crecida únicamente con hierro. Para la crecida en presencia de manganeso resulta algo más suavizado y retrasado. Finalmente para la muestra con cobalto el pico queda considerablemente suavizado y a una temperatura cercana a los 150K.

## 4. Conclusiones

En este trabajo se ha realizado en primer lugar un repaso completo de las características de las bacterias magnetotácticas y las de sus orgánulos, los magnetosomas. La magnetita, es el mineral sintetizado por las bacterias, por tanto, se han presentado las características de la estructura cristalina en forma de ferrita de este mineral, realizando un análisis completo de las propiedades ferrimagnéticas del mismo, además del estudio de una característica propia y fundamental de la magnetita que es la de la transición de Verwey. Se han presentado las condiciones de cultivo utilizadas en el laboratorio para el crecimiento de la bacteria *Magnetospirillum gryphiswaldense*, mostrando un análisis sistemático del dopaje con Co y Mn bajo condiciones controladas en el laboratorio, que ha sido conseguido a través de los perfiles MIC y del número de cristales de magnetita sintetizados, exhibiendo los histogramas propios de cada muestra.

Los perfiles MIC han mostrado una resistencia de la bacteria a los dopantes, en nuestro caso Co y Mn, hasta una concentración alrededor de los 200  $\mu M$ . Para el crecimiento de las bacterias se ha utilizado una concentración de hierro y dopante 1 a 1, 100 $\mu M$  de Fe y 100 $\mu M$  de Co o Mn. Las conclusiones alcanzadas a través de los histogramas son las de un cambio en el número de partículas por cadena medio, sintetizando menos partículas en el caso de las bacterias crecidas en presencia de cobalto y más en la presencia de manganeso.

Se muestra en el trabajo la preparación de las muestras con magnetosomas para su posterior medida en los distintos dispositivos experimentales. Dopar la magnetita del interior de los magnetosomas con Mn y Co resulta en un cambio en sus propiedades magnéticas.

Se ha realizado una caracterización magnética completa de las distintas muestras, para entender en primer lugar el nuevo comportamiento de las nanopartículas y para comprobar en segundo lugar si las muestras están realmente incorporando el dopante. Para ello se muestran tres técnicas de laboratorio que posibilitan medir las características magnéticas de los magnetosomas.

De las medidas a temperatura ambiente del VSM, observamos un aumento en el campo coercitivo de la muestra con Co, mientras que para el Mn se conserva un campo coercitivo similar al de la muestra control.

A través de las medidas con el VSM criogénico se comprueba con mayor agudeza el aumento de la dureza de las muestras con cobalto pudiendo verificar en una situación de menor agitación térmica el aumento de la anchura del ciclo de histéresis. Para el caso del Mn, a pesar de ser éste un material más blando, lo que se observa es un aumento de la coercitividad. Los datos indicadores de la transición de Verwey obtenidos a partir de esta medida

experimental no se consideran definitivos, mostrando nuestras medidas en este caso, una transición poco marcada para las tres muestras.

Por último, a través de los resultados obtenidos en el trabajo, podemos calificar las medidas en el SQUID como las más útiles para la caracterización magnética de los magnetosomas por la alta sensibilidad de la técnica. Se han realizado las gráficas de la magnetización frente a la temperatura en condiciones ZFC (Zero Field Cooled), mostrando la transición de Verwey para la magnetita pura a una temperatura de 105 K, temperatura propia para nanopartículas de magnetita. Para las muestras dopadas, en el caso de las muestras con cobalto, se observa una posible desaparición de la transición de Verwey, siendo esto un resultado que junto con las medidas en el VSM, permite asegurar que hemos logrado la incorporación de cobalto en nuestros magnetosomas. Para el caso del manganeso, se sigue observando una transición de Verwey marcada a una temperatura de 100 K, este resultado junto a las medidas en el VSM nos permite concluir casi con toda seguridad que no hemos tenido éxito a la hora de intentar dopar con manganeso nuestras nanopartículas.

Todavía sería necesario un análisis de difracción de rayos-X para asentar estas conclusiones.

Estos descubrimientos y esta metodología puede ser desarrollada para la producción de nuevos materiales de alta calidad a partir de nanopartículas de magnetita dopada con propiedades magnéticas ajustables para un rango grande de aplicaciones nanotecnológicas.

Como futuros cometidos en esta investigación quedarían, por ejemplo, el empleo de magnetosomas extraídos (aislados) para su uso en aplicaciones biomédicas como la hipertermia magnética o la utilización de otras técnicas más sensibles para poder determinar el porcentaje de metal que incorporan nuestros magnetosomas dopados (EDX, EELS, XANES).

## 5. Anexo: Regla de Hund

La regla de Hund establece que los spines en un estado parcialmente lleno se organizan de manera que tengan el máximo valor de spin total(S) compatible con el principio de exclusión de Pauli[13]. La regla es propuesta en nuestro caso en términos solo de spin, porque la contribución orbital no tiene prácticamente importancia en ferritas. Podemos aplicar la regla a iones de la primera serie de transición de la siguiente manera. El estado extremo es el 3d, y puede contener cinco electrones con spin hacia arriba y cinco con spin hacia abajo. Los primeros cinco electrones entran con spin 1/2, de esta manera maximizan el momento. El sexto electrón, debido al principio de exclusión, debe tener spin  $-1/2$ . Un ion con seis electrones 3d, como el  $Fe^{2+}$ , debe tener por tanto un momento de spin de  $5-1=4\mu_B$ . En la figura 26 se adjuntan los momentos de otros iones.

Ions		Number of 3d Electrons	Spin-Only Moment in $\mu_B$
Sc <sup>3+</sup>	Ti <sup>4+</sup>	0	0
	Ti <sup>3+</sup>	1	1
	Ti <sup>2+</sup>	2	2
	V <sup>4+</sup>	3	3
	V <sup>3+</sup>	4	4
	V <sup>2+</sup>	5	5
	Cr <sup>4+</sup>	6	4
	Cr <sup>3+</sup>	7	3
	Cr <sup>2+</sup>	8	2
	Mn <sup>4+</sup>	9	1
	Mn <sup>3+</sup>	10	0
	Mn <sup>2+</sup>		
	Fe <sup>4+</sup>		
	Fe <sup>3+</sup>		
	Fe <sup>2+</sup>		
	Co <sup>4+</sup>		
	Co <sup>3+</sup>		
	Co <sup>2+</sup>		
	Ni <sup>4+</sup>		
	Ni <sup>3+</sup>		
	Ni <sup>2+</sup>		
	Cu <sup>2+</sup>		
	Cu <sup>+</sup>		
	Zn <sup>2+</sup>		

Figura 26: Momentos de spin de iones de la primera serie de transición[13]

## 6. Bibliografía

- [1] Bazylinski, D. A. Frankel, R. B. Magnetosome formation in prokaryotes. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 217-230 (2004).
- [2] Yan, L. et al. Magnetotactic bacteria, magnetosomes and their application. *Microbiol. Res.* **167**, 507-519 (2012).
- [3] Fdez-Gubieda, M. L. et al. Magnetite biomineralization in *magnetospirillum gryphiswaldense*: Time-resolved magnetic and structural studies. *ACS Nano* **7**, 3297-3305 (2013).
- [4] Staniland, S. et al. Controlled cobalt doping of magnetosomes in vivo. *Nat. Nanotechnol.* **3**, 158-162 (2008).
- [5] Tanaka, M. et al. Highest levels of Cu, Mn and Co doped into nanomagnetic magnetosomes through optimized biomineralisation. *J. Mater. Chem.* **22**, 11919 (2012).
- [6] Schleifer, K. H. et al. 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 (1991).
- [7] Walz, F. The Verwey transition - a topical review. *J. Phys. Condens. Matter* **14**, R285-R340 (2002).
- [8] Syono, Y. Magnetocrystalline anisotropy in cobalt-substituted magnetic single crystals. *Jpn. J. Geophys.* **4**, 71-143 (1965).
- [9] Fischer, H. et al. Ferromagnetic resonance and magnetic characteristics of intact magnetosome chains in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Earth Planet. Sci. Lett.* **270**, 200-208 (2008).
- [10] Alphan ery, E. Applications of magnetosomes synthesized by magnetotactic bacteria in medicine. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2**, 5 (2014).
- [11] Alphan ery, E., Chebbi, I., Guyot, F. Durand-Dubief, M. Use of bacterial magnetosomes in the magnetic hyperthermia treatment of tumours: a review. *Int. J. Hyperth.* **29**, 801-9 (2013).
- [12] Heidenreich, Robert D, Fundamentals of Transmission Electron Microscopy, New York, Wiley, 1964

- [13] B.D. Cullity, Introduction to Magnetic Materials, Addison-Wesley Publishing Company, Reading, Mass, 2009
- [14] Antonio Hernando y Juan M. Rojo, Física de los materiales magnéticos, Editorial Síntesis, Madrid, 2001
- [15] URL: [upv.es/materiales/Fcm/Fcm10/pfcm1033.html](http://upv.es/materiales/Fcm/Fcm10/pfcm1033.html)
- [16] URL: [scai.uma.es/servicios/areamicroscopia/tem/tem.html](http://scai.uma.es/servicios/areamicroscopia/tem/tem.html)