



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

**ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA CINÉTICA DE CORROSIÓN DEL
HORMIGÓN MEDIANTE *ACIDITHIOBACILLUS THIOOXIDANS***

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL QUÍMICA E
INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA**

MARÍA LORETO RODRÍGUEZ GUZMÁN

**PROFESOR GUÍA:
BLANCA ESCOBAR MIGUEL**

**MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
LEANDRO HERRERA ZEPPELIN
FRANCISCO GRACIA CAROCA**

**SANTIAGO DE CHILE
2017**

**RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL
TÍTULO DE:** Ingeniera Civil Química e Ingeniera Civil en
Biotecnología
POR: María Loreto de las Mercedes Rodríguez Guzmán
FECHA: Abril 2017
PROFESOR GUÍA: Blanca Escobar M.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biohidrometalurgia del Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile.

El objetivo principal de este estudio experimental fue determinar el efecto del metabolismo de bacterias azufre-oxidantes en la corrosión del hormigón influenciada por microorganismos (MIC).

La motivación se enmarca en la disminución del impacto ambiental de los proyectos de infraestructura, al aumentar la durabilidad de las estructuras de hormigón, previniendo la componente bacteriana de la corrosión.

El hormigón es el sistema constructivo más utilizado y extendido en la actualidad, por lo que el impacto de la corrosión de éste es importante en los análisis de costos de distintos proyectos, principalmente en cañerías de hormigón, represas hidroeléctricas y plantas de tratamiento de aguas servidas.

En la literatura se encuentran estudios que muestran la presencia de *Acidithiobacillus thiooxidans* en hormigón corroído sin embargo no existen estudios experimentales que busquen estimar la influencia de la actividad bacteriana en el proceso de corrosión.

En la primera etapa, se aislaron e identificaron bacterias desde hormigón corroído, utilizando técnicas de cultivo bacteriano y CARD-FISH, encontrándose presencia de las bacterias azufre oxidantes *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans*

En la segunda etapa, se realizaron cultivos *A. thiooxidans* con azufre y cemento endurecido como sustratos, midiendo la concentración en el medio de cultivo de sulfatos por turbidimetría y de ion calcio por absorción atómica, pudiendo concluir que existe una componente bacteriana de la corrosión que acelera el proceso puramente electroquímico, cuya cuantificación no fue parte de este estudio.

A mi papito lindo pechocho <3

AGRADECIMIENTOS

Cada una de las personas que aquí nombradas, participaron de manera directa con su ayuda en el desarrollo de este trabajo, sin su aporte, no se tendrían los resultados acá descritos:

- **Emma Fonseca**
- **Jacqueline Hidalgo**
- Hans Allendes
- Becky Rodríguez
- Carlos Rivera
- Ricardo Bascuñan
- Loreto Bravo
- Consuelo Sepúlveda
- Daniela Peñaililo
- **Marcela Vizcay**
- Ángela Denis
- **Natalia Martínez**
- **Marcela Campos**
- Susana Cabello
- Paz Cortés
- **Claudia Araya**
- **Daniela Robledo**
- Sebastián Ubilla
- Sebastián Prado
- Igor Saavedra
- **Ciro Solar**
- Milena Bonacic

Agradecimientos especiales a mis profesores Blanca Escobar, Leandro Herrera y Francisco Gracia, que nunca perdieron la esperanza en que este trabajo llegaría a su fin y a Gina Madariaga por hacer posible que llegara a puerto finalmente.

También agradezco a mis mamá, mi papá, mi madrina, mis tíos y primos, en especial a los que fueron hijos de bello antes que yo y me guiaron con su ejemplo <3.

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 ASPECTOS ECONÓMICOS.....	1
1.2 MARCO TEÓRICO.....	2
1.2.1 El Hormigón.....	2
1.2.2 La Corrosión.....	4
1.2.3 La Corrosión Inducida por Microorganismos (MIC).....	5
1.2.4 Etapas de la Corrosión Mediada por Microorganismos del Hormigón.....	6
I. Producción de H ₂ S.....	7
II. Generación biológica de H ₂ SO ₄	9
III. Decrecimiento del pH.....	9
IV. Mecanismo de corrosión y pérdida de masa.....	10
1.2.5 <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	11
1.2.6 Oxidación de Azufre elemental por <i>A. thiooxidans</i>	12
1.2.7 Fundamentos de la Identificación de Microorganismos mediante CARD-FISH.....	15
1.3 MOTIVACIÓN.....	19
1.4 DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....	19
1.5 JUSTIFICACIÓN.....	19
2. OBJETIVOS.....	21
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
2.3 LIMITACIONES Y ALCANCE.....	21
3. METODOLOGÍA.....	22
3.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DESDE HORMIGÓN CORROÍDO.....	22
3.1.1 Aislamiento de bacterias desde hormigón corroído.....	22
3.1.2 Recuento directo de células planctónicas.....	24
3.1.3 Identificación de las Bacterias por CARD-FISH.....	24
3.1.4 Protocolo para el tratamiento de células en suspensión.....	25
3.2 CULTIVO DE <i>A. THIOOXIDANS</i> EN MEDIO DE CULTIVO CON CEMENTO ENDURECIDO.....	28
3.2.1 Preparación Inóculo.....	28
3.2.2 Obtención de perlas de azufre.....	28
3.2.3 Esterilización de las perlas de azufre.....	29
3.2.4 Cultivo de inóculos en matraces sobre perlas de azufre.....	30
3.2.5 Colonización de perlas de azufre con <i>A. thiooxidans</i>	31
3.2.6 Preparación de probetas de mortero de cemento Portland.....	33
3.2.7 Esterilización de muestras de cemento.....	33
3.2.8 Medición de Sulfatos en solución por turbidimetría.....	34
3.2.9 Medición de ion calcio por espectrofotometría absorción atómica.....	34

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
4.1 AISLAMIENTO DE BACTERIAS DESDE HORMIGÓN CORROÍDO	36
4.2 CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS PLANCTÓNICAS	41
4.3 IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS POR CARD-FISH.....	44
4.3.1 Microfotografías de tinciones DAPI y CARD-FISH a una muestra de Central Termoeléctrica Norte Grande – Granulometría Baja (Matraz M1)	45
4.3.2 Microfotografías de tinciones DAPI y CARD-FISH a una muestra de Central Termoeléctrica Norte Grande – Granulometría Alta (Matraz M1’)	46
4.3.3 Microfotografías de tinciones DAPI y CARD.FISH a una muestra Pavimento yacimiento minero Zona Central – Granulometría baja (Matraz M2)	47
4.3.4 Microfotografía de tinciones DAPI y CARD-FISH a una muestra de Pavimento yacimiento minero Zona Central – Sin moler (Matraz M2’)	47
4.4 CULTIVO DE <i>A. THIOOXIDANS</i> EN CEMENTO ENDURECIDO PARA EL ESTUDIO DEL EFECTO DE SU METABOLISMO SOBRE EL HORMIGÓN.	49
4.4.1 Preparación de Inóculo de <i>A. thiooxidans</i>	49
4.4.2 Determinación de pH en cultivo de <i>A. thiooxidans</i> con cemento endurecido.	50
4.4.3 Determinación de concentración de sulfatos en cultivo de <i>A. thiooxidans</i> con cemento endurecido.	51
4.4.4 Determinación de la concentración de Ca^{2+} en cultivo de <i>A. thiooxidans</i> con cemento endurecido.	55
5. CONCLUSIONES.....	57
6. RECOMENDACIONES	58
6.1 PARA EL AISLAMIENTO DE BACTERIAS DESDE HORMIGÓN CORROÍDO	58
6.2 PARA EL DESARROLLO DE <i>A. THIOOXIDANS</i> EN MEDIO DE CULTIVO CON CEMENTO ENDURECIDO ..	58
7. BIBLIOGRAFÍA.....	60
8. ANEXOS	68
8.1 ANEXO 1: pH CULTIVOS DE MUESTRAS DE HORMIGÓN CORROÍDO	68
8.2 ANEXO 2: ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA OXIDACIÓN DE AZUFRE EN.....	68
<i>A. THIOOXIDANS</i>	68
8.3 ANEXO3: CARACTERIZACIÓN QUÍMICA CEMENTO	69
8.4 ANEXO 4: pH PREPARACIÓN DE INÓCULO DE <i>A. THIOOXIDANS</i>	70
8.5 ANEXO 5: COLONIZACIÓN DE PERLAS DE AZUFRE CON <i>A. THIOOXIDANS</i>	70
8.6 ANEXO 6: CONFIGURACIÓN EXPERIMENTAL CULTIVO DE <i>A. THIOOXIDANS</i> EN CEMENTO ENDURECIDO	71
8.7 ANEXO 7: CONFIGURACIÓN DE MATRACES CURVA DE CALIBRACIÓN DE $[Ca^{2+}]$	72
8.8 ANEXO 8: DATOS EXPERIMENTALES CULTIVO DE <i>A. THIOOXIDANS</i> EN CEMENTO ENDURECIDO	73

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ASPECTOS ECONÓMICOS

El hormigón es el sistema constructivo más extendido y utilizado en Chile y el mundo. En 2013, la producción mundial del cemento subió cerca del 3% en comparación con el año previo, con un total de $3,6 \cdot 10^9$ Ton en total (Federación Interamericana del Cemento, 2013), a pesar de la desaceleración económica mundial.

Según datos del Instituto del Cemento y Hormigón de Chile (ICH), se produjeron durante el año 2013 ⁽¹⁾, $7,4 \cdot 10^6$ m³ de hormigón en Chile (Instituto del Cemento y del Hormigón de Chile, 2013), siendo el país de Sudamérica con mayor producción per cápita 556 [kg/persona] (Asociación de Productores de Cemento, 2015).

Acumulado a marzo de 2015, el consumo aparente de cemento aumentó 2,2% en Chile. Este volumen está destinado a cubrir las necesidades de crecimiento de la industria nacional y los distintos sectores que la conforman, siendo aquellos que utilizan más intensivamente el hormigón, la industria de la construcción de viviendas y *retail*, la minería y las obras civiles en general: marítimas y portuarias, viales y sanitarias. Todas estas industrias presentan un crecimiento del consumo per cápita de hormigón de un 25% desde 2010, por lo que se espera que la demanda de hormigón se mantenga al alza (Instituto del Cemento y del Hormigón de Chile, 2013). Por ejemplo, el presupuesto nacional para obras públicas aumentó un 11,8% para el año 2015. Estas obras representan la principal fuente de consumo del hormigón producido en Chile (Dirección de Vialidad, 2014).

Como se observa en la Figura 1.1 Gráfico del Producto Interno Bruto versus demanda de cemento la demanda por cemento y, por consiguiente, de hormigón, aumenta en forma acoplada al crecimiento del producto interno bruto del país. Esto se debe a que, a medida que aumenta el PIB, se generan mayores necesidades de industrias, transporte e infraestructura. Al mismo tiempo, en la vivienda se empiezan a dejar de lado sistemas constructivos rudimentarios como la madera y otras poco eficientes como la albañilería (por el uso intensivo en mano de obra) para actualizarlos, priorizando y haciendo esfuerzos en mejorar su productividad, que en el caso de construir con hormigón, se obtiene con la disminución en reparaciones y restauraciones, la optimización del uso de mano de obra y el aumento de la velocidad constructiva.

¹ Último dato disponible, previo a la discontinuidad permanente de la publicación del indicador

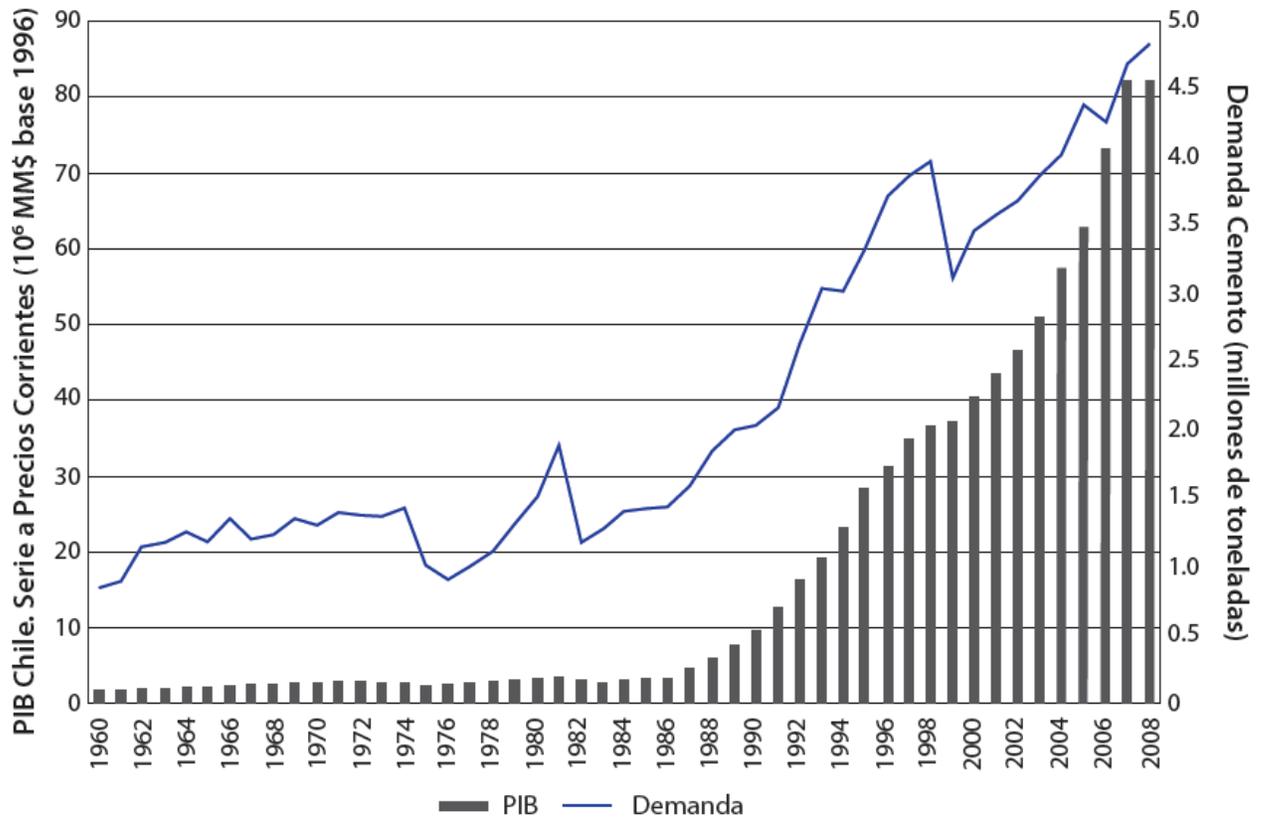


Figura 1.1 Gráfico del Producto Interno Bruto versus demanda de cemento (ICH, 2011)

1.2 MARCO TEÓRICO

1.2.1 El Hormigón

El hormigón es actualmente el material de construcción más sustentable que existe, si se le compara a los otros métodos constructivos disponibles, como la madera o la albañilería, debido a su larga vida útil (80 años), lo que compensa el gasto energético y las emisiones de CO₂ asociados a su fabricación (Ochsendorf, y otros, 2011). Estas características lo promueven como el sistema constructivo más eficiente y durable, sin embargo, puede presentar fallas debido a la degradación de su matriz producida por corrosión bacteriana (Microbiologically Influenced Corrosion, MIC).

En Chile, el hormigón se introduce como método constructivo a comienzos del siglo XX. Debido a la bonanza económica producida por los réditos que habían dejado la guerra del salitre y la expansión territorial, las salitreras por el norte y la ocupación de la Araucanía y Patagonia por el sur, el estado impulsa grandes inversiones en obras públicas.

El puente Quillota es la primera obra de hormigón armado hecha en Chile (Rojas, 2006), construida por la Compañía Holandesa de Obras de Concreto Armado, empresa pionera en Chile en la utilización de esta técnica. El puente, inaugurado en 1908, se encuentra sobre el estero Marga Marga, en la ciudad de Viña del Mar y continúa operativo hasta el día de hoy, como se observa en la Figura 1.2



Figura 1.2 Fotografías del Puente Quillota, a comienzos de siglo XX y en la actualidad (Basulto, 2013)

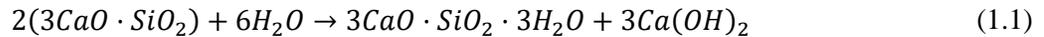
El hormigón consiste básicamente en una mezcla de dos componentes: agregados y pasta aglomerante. La pasta aglomerante está compuesta de cemento y agua, la que se une a los agregados, normalmente arena y grava (piedra triturada, piedra machacada, piedras) creando, al endurecerse, una masa similar a una roca. Este endurecimiento ocurre debido a un conjunto de reacciones químicas llamadas de hidratación, por la intervención de H_2O , las que se describen más adelante.

El cemento, componente principal del hormigón, se obtiene a partir de la molienda conjunta de clínker y yeso. El clínker es un mineral artificial que está principalmente compuesto por silicatos de calcio, algunos aluminatos de calcio y ferroaluminatos de calcio, los cuales poseen características hidráulicas, es decir, reaccionan al estar en contacto con el agua. Las fases mineralógicas del clínker son (Taylor, 1990):

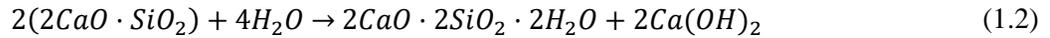
- C_3S : $3CaO \cdot SiO_2$: silicato tricálcico: Alita (50-70%)
- C_2S : $2CaO \cdot SiO_2$: silicato dicálcico: Belita (15-30%)
- C_3A : $3CaO \cdot AlO_2$: aluminato tricálcico(5- 10%)
- C_4AF : $4CaO \cdot AlO_2 \cdot Fe_2O_2$: ferroaluminatotetracálcico (5-15%)

Cada una de estas fases mineralógicas presentan las siguientes reacciones químicas al entrar en contacto con agua, en el proceso de fragüe o endurecimiento (Taylor, 1990):

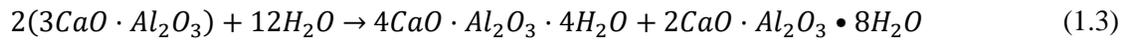
Para el silicato tricálcico:



Para el silicato dicálcico:



Para el aluminato tricálcico:



Para el ferroaluminatotetracálcico:



Las estructuras de hormigón presentan estos compuestos mineralógicos hidratados, los que le confieren sus propiedades de dureza y resistencia.

1.2.2 La Corrosión

La corrosión es un fenómeno natural que se define como el deterioro de una sustancia, ya sea por pérdida de masa o por pérdida de sus propiedades, producto de la interacción con su entorno (Koch et al., 2010). En el caso del hormigón, la pérdida de masa y las reacciones asociadas a la corrosión provocan la pérdida de su resistencia y durabilidad, pudiendo llegar a presentar daños estructurales con altos costos en infraestructura.

La formación de compuestos producto de la actividad bacteriana en la superficie del hormigón, genera aumentos de volumen que producen tensiones internas que a su vez pueden provocar fracturas e inciden en la pérdida de resistencia y fallas estructurales en la edificación con hormigón. Por ejemplo, la formación de $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ conduce a un aumento de volumen de aproximadamente 124% (Parande, 2006) que debilita la estructura de cemento. Y más destructiva aún, es la producción de etringita $3CaO \cdot Al_2O_3 \cdot CaSO_4 \cdot 12H_2O$ o $3CaO \cdot Al_2O_3 \cdot 3CaSO_4 \cdot 31H_2O$, la cual genera una expansión de volumen significativamente mayor con estimaciones que van desde 227% (Parande, 2006) a 700% (Monteny J, 2000).

La formación de estas fases mineralógicas conduce al agrietamiento interno y picaduras del hormigón, lo cual aumenta el área de superficie de reacción y facilita una mejor penetración de la humedad, ácido y microorganismos en la estructura de hormigón, profundizando el daño.

1.2.3 La Corrosión Inducida por Microorganismos (MIC)

La corrosión influenciada por microorganismos o MIC (del inglés *Microbiologically Influenced Corrosion*) es el término utilizado para el fenómeno en el que se inicia y/o acelera la corrosión por las actividades de los microorganismos (Javaherdashti, 2008). Es un tipo de corrosión que puede ser muy perjudicial para casi todos los materiales de ingeniería. Este término puede inducir a error, dando la impresión de que son sólo microorganismos los capaces de influir en la corrosión. De hecho, la contaminación biológica, un término más general, puede ser utilizada para estudiar tanto los crecimientos microbiológicos como macrobiológicos que suceden en las superficies que presentan corrosión, teniendo efectos promotores o inhibidores de la corrosión.

Teniendo en cuenta que el término “microorganismo” en realidad se refiere a bacterias, cianobacterias, algas, líquenes y hongos, algunas de las definiciones para MIC son las siguientes (Javaherdashti, 2008):

- MIC es un proceso electroquímico por el cual los microorganismos pueden ser capaces de iniciar, facilitar o acelerar reacciones de corrosión a través de la interacción de los tres componentes que conforman este sistema: metal, solución y microorganismos.
- MIC se refiere a la influencia de los microorganismos que se adhieren a la interfaz material/acuoso (biofilm) en la cinética de la corrosión.

La presencia de microorganismos no es el único requisito para el desarrollo de MIC. Son necesarios además los siguientes elementos:

1. Una fuente de energía,
2. una fuente de carbono,
3. un donante de electrones,
4. un aceptor de electrones, y
5. agua

Lo que se puede deducir de las definiciones antes mencionadas es:

1. MIC es un proceso electroquímico.
2. Los microorganismos son capaces de afectar el alcance, la gravedad, y el curso de la corrosión.
3. Además de la presencia de microorganismos, para la aparición del MIC se requiere una fuente de energía, una fuente de carbono, un donador de electrones, un aceptor de electrones, y agua.

En este trabajo nos centraremos en el estudio de la corrosión producida indirectamente por la actividad bacteriana a través de la producción de ácido sulfúrico y su posterior reacción con el cemento endurecido.

1.2.4 Etapas de la Corrosión Mediada por Microorganismos del Hormigón

La corrosión mediada por microorganismos del hormigón se puede dividir en 5 etapas, las que se diferencian entre sí por las bacterias involucradas, los sustratos utilizados y el producto resultante de la actividad bacteriana (Wells, 2009), como se esquematiza en la Figura 1.3:

Proceso de corrosión influenciado por microorganismo (MIC)

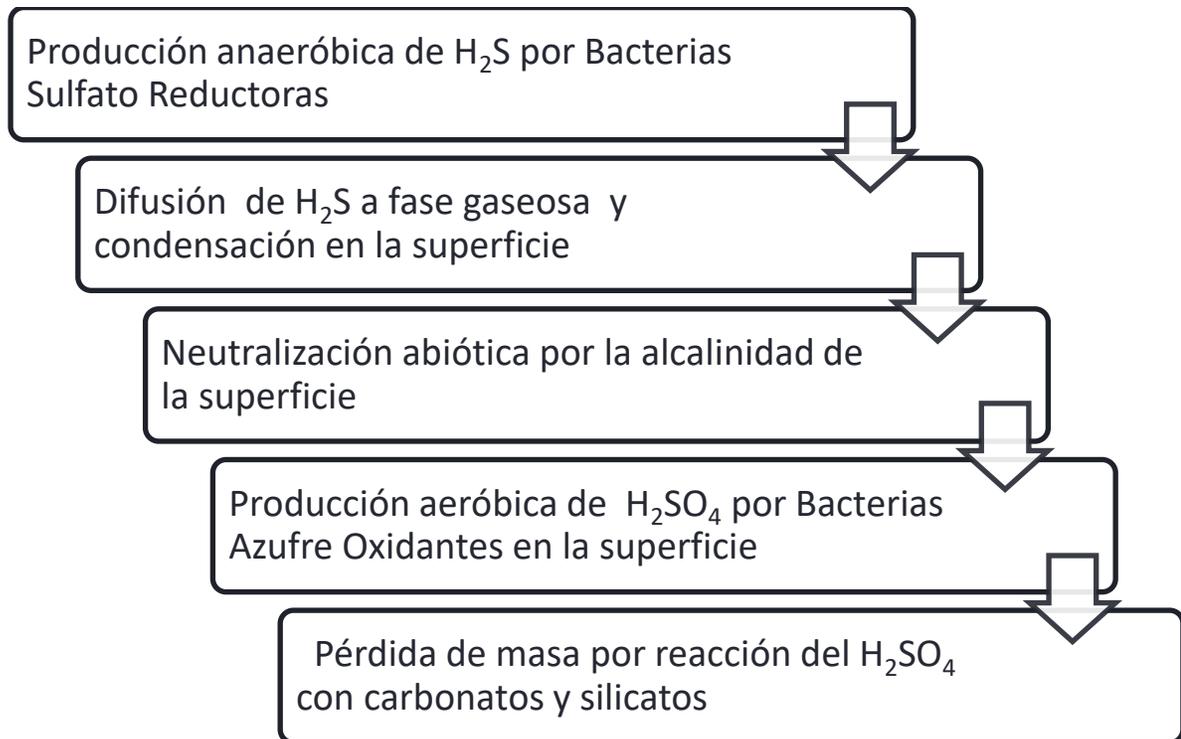
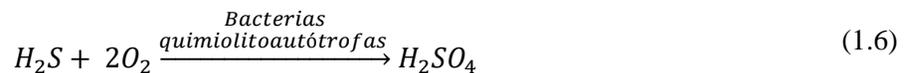


Figura 1.3 Esquema de las etapas de Corrosión Mediada por Microorganismos

El hormigón es un material alcalino, en donde el H_2S es más soluble que en agua. El H_2S se disuelve sobre la superficie del hormigón expuesto. Allí será convertido en H_2SO_4 por bacterias quimiolitotrofas sulfoxidantes neutrófilas y posteriormente acidófilas.



Este ácido sulfúrico (H₂SO₄) acidifica progresivamente el hormigón y lo disuelve formando yeso (CaSO₄·2H₂O) y etringita (3CaO·Al₂O₃·CaSO₄·12H₂O o 3CaO·Al₂O₃·3CaSO₄·31H₂O) los que se expanden provocando la formación de fisuras y picaduras hasta debilitar la integridad estructural del hormigón y conducir a eventuales fallas y posible colapso (Biczok, 1981).

Esta interacción se muestra en la Figura 1.4, donde se presentan dichas reacciones:

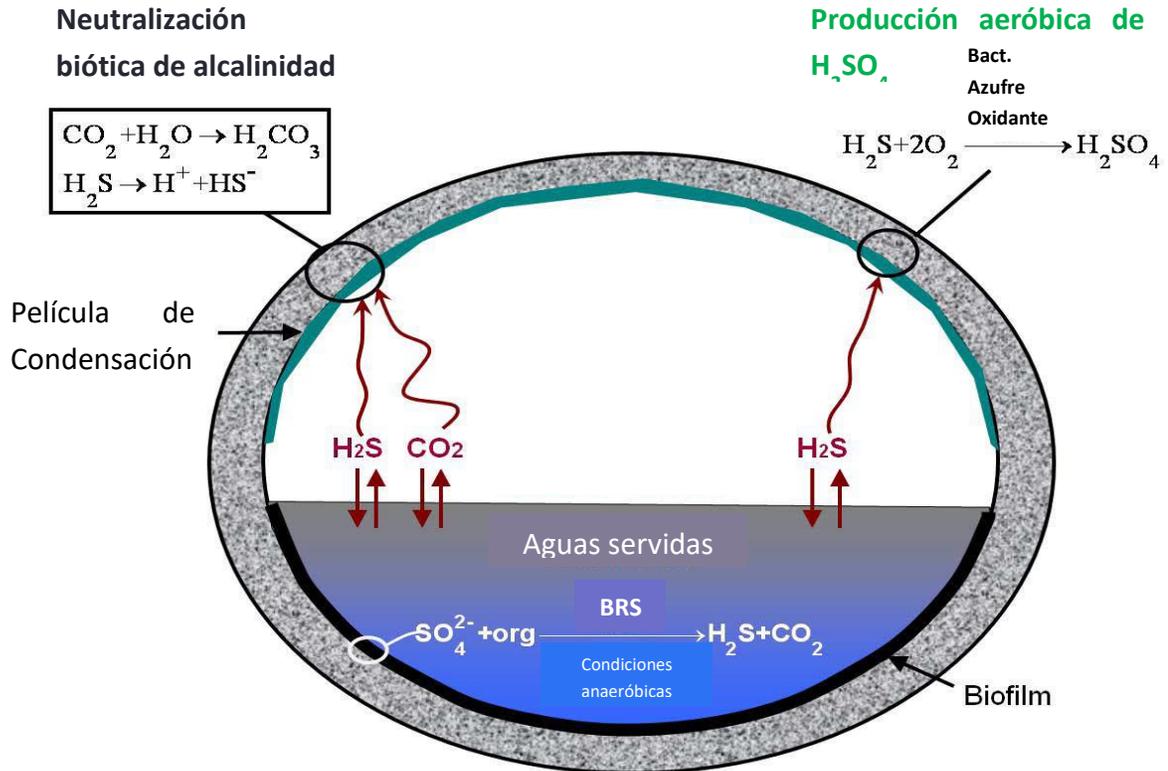
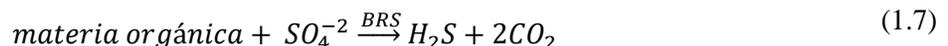


Figura 1.4 Representación de las reacciones químicas producidas por bacterias sulfatoreductoras BRS y azufreoxidantes en una cañería de alcantarillado de hormigón (Espinosa J., 2010).

I. Producción de H₂S

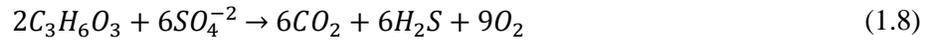
El hormigón recién instalado presenta un pH alto de entre 12 y 13, el cual es mayor al pH apto para el desarrollo de bacterias, por lo que el proceso de corrosión no se inicia directamente en este, sino en el agua que está en contacto con él. Es aquí donde el biofilm formado por las bacterias sulfato reductoras (BRs), a partir del SO₄²⁻ presente tanto en cemento como en solución, forma H₂S producto de la descomposición de la materia orgánica disuelta en el acuoso, en condiciones anaeróbicas. En estas películas las BRS reducen sulfatos y oxidan el carbono orgánico biodegradable y, al hacerlo, producen sulfuro de hidrógeno y dióxido de carbono. La reducción anaeróbica del Sulfato (Van Hille, Oyekola, & Harrison, 2009) se expone en la ecuación (1.6).

Reducción anaeróbica del Sulfato (Van Hille, Oyekola, & Harrison, 2009):

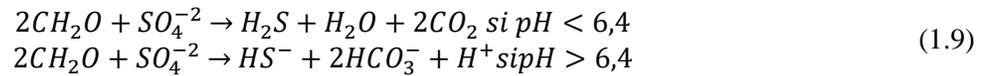


A partir de una molécula orgánica como fuente de carbono y donante de electrones, las bacterias sulfato reductoras producen ácido sulfhídrico, según se describe en las siguientes ecuaciones:

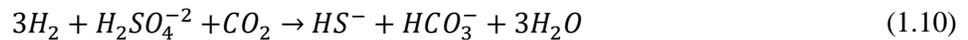
A partir de lactato,



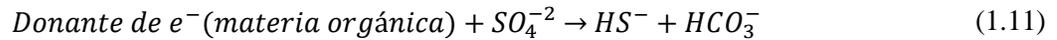
A partir de formaldehído,



También autotróficamente,



Genéricamente,



El H_2S generado por las bacterias sulfatoreductoras puede existir en solución, ya sea como molécula o como iones disociados, en un equilibrio que se describe en la Ecuación (1.12)



La posición de equilibrio en la ecuación (1.12) es fuertemente dependiente del pH de la solución, como se muestra en la Figura 1.5. En aguas residuales de pH bajo (entre 5 y 6), aumenta la concentración de H_2S molecular, el cual es poco soluble y por lo tanto se volatiliza a la fase gaseosa aledaña. Luego se condensa en las paredes de hormigón de la estructura, en un condensado de pH 12-13, donde vuelve a disolverse, y se presenta una mayor concentración de los iones disociados como H^+ y HS^- .

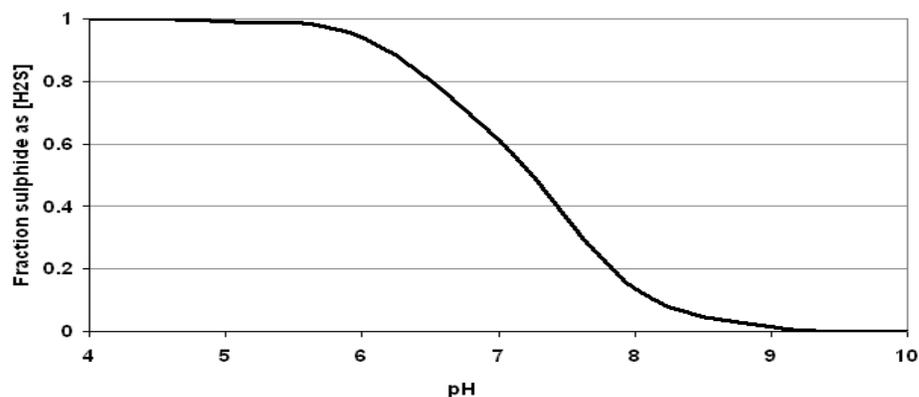


Figura 1.5 Fracción de sulfuro de hidrógeno que existe como molécula en solución, con respecto a su forma disociada, en función del pH.

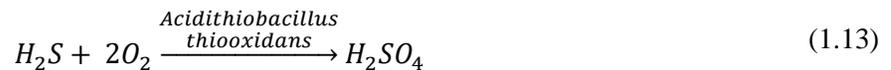
El dióxido de carbono también se transporta desde la fase líquida a la fase gaseosa, para luego condensarse en la pared de hormigón, donde se disuelve una porción en forma de iones de carbonato y bicarbonato (ácidos débiles).

Los ácidos débiles que se forman en la capa de condensado reaccionan con las especies alcalinas en el hormigón, tales como hidróxido de calcio, disminuyendo el pH de la superficie de hormigón en el tiempo. La duración de este proceso esencialmente abiótico no está bien definida. Las estimaciones van desde unos pocos meses hasta varios años (Wells, 2009).i

II. Generación biológica de H_2SO_4

En presencia de oxígeno, nutrientes y humedad, las bacterias azufre oxidantes como *A. thiooxidans* pueden colonizar la superficie del hormigón cuando el pH es inferior a 6 ((Javaherdashti, 2008). Durante esta etapa del proceso de corrosión, estos organismos producen H_2SO_4 a través de la oxidación de H_2S , el cual se difunde en la película de condensado. El ácido producido reacciona con la superficie de hormigón para reducir aún más el pH.

Oxidación aeróbica del Sulfuro



III. Decrecimiento del pH

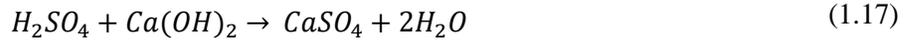
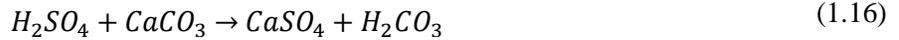
El proceso de disminución de pH sobre la superficie del hormigón tiene 2 componentes: primero es un proceso químico (abiótico), el cual a medida que comienza a bajar el pH, da paso a la acción bacteriana. Cuando el pH de la superficie del hormigón cae a alrededor de 5 o 4, las bacterias azufre oxidantes acidófilas pueden comenzar la colonización de la superficie del hormigón. Estas bacterias oxidarán el H_2S a ácido sulfúrico, pero también pueden oxidar el azufre elemental y el tiosulfato, producto de los residuos orgánicos depositados en la superficie del hormigón. Simultáneamente, el H_2S gaseoso es oxidado directamente por el oxígeno presente. Esto provoca una caída del pH superficial a menos de 4 (Wells T. M., 2012).

Oxidación abiótica del Sulfuro

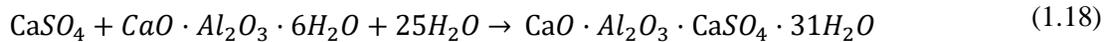


IV. Mecanismo de corrosión y pérdida de masa

El ácido sulfúrico producido por las bacterias azufreoxidantes reacciona con los compuestos de silicato y carbonato presentes en el cemento del hormigón para formar yeso (CaSO_4) a través de las siguientes reacciones (Wells, 2009):



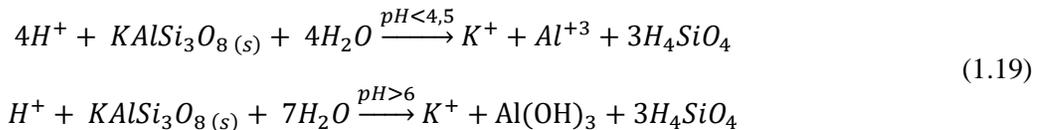
Como se indicó anteriormente, la formación de yeso conduce a un aumento de volumen que debilita la estructura de cemento y posteriormente, se produce una reacción entre el yeso formado y el aluminato tricálcico dentro de la matriz de cemento para formar etringita mineral ($\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{CaSO}_4 \cdot 31\text{H}_2\text{O}$).



La formación de etringita produce una expansión de volumen significativamente mayor que la producida por el yeso.

Por otro lado, el ácido sulfúrico reacciona con silicatos y aluminatos, disolviéndolo con la consiguiente pérdida de masa del cemento. Los aluminosilicatos reaccionarán, consumiendo iones hidrógeno, liberando Al^{+3} , K^+ y ácido silícico (H_4SiO_4) (Escobar B. , 2008).

Esta reacción se presenta en la siguiente ecuación:



Estas reacciones conducen al agrietamiento interno y picaduras del hormigón, aumentando la superficie de reacción y facilitando la penetración de la humedad, ácido y microorganismos en la estructura de hormigón.

Durante todo el proceso de corrosión se observa la formación de una capa blanca y suave (principalmente yeso) en la superficie del hormigón, la cual se espesa gradualmente con el tiempo. Se ha sugerido que el efecto de esta capa es proporcionar un medio excelente para el crecimiento bacteriano y por lo tanto acelera el proceso de corrosión (Verstraete, Vincke, & Boon, 2001).

1.2.5 *Acidithiobacillus thiooxidans*

Una de las especies más citadas en los estudios de la corrosión mediada por microorganismo del hormigón es *Acidithiobacillus thiooxidans* (Parker, 1945) (Kelly & Wood, 2000) (Milde, Sand, & Wolff, 1983), la cual es una bacteria Gramnegativa con forma de bacilo, y tamaño de 0,5 x 1,2 [µm] aproximadamente, perteneciente a la familia de las γ-proteobacterias, es quimiolitótrofa y su rango de temperatura de crecimiento va entre los 10°C y los 40°C, por lo que se clasifica como mesófila. Se puede desarrollar en ambientes de hasta pH 0,5, por lo que es una bacteria acidófila (Rawlings, 1997). Sus rangos óptimos de crecimiento son entre 30-35°C y pH de 2-3,5.

Este microorganismo es capaz de oxidar compuestos de azufre reducido y azufre elemental a sulfato, lo cual se muestra en la Ecuación (1.20) (Konishi, Noriaki, & Asai, 1995).



Esta bacteria azufre-oxidante juega un importante papel en el ciclo del azufre en la biosfera. La capacidad de los microorganismos para oxidar azufre inorgánico se aplica en la industria para la biolixiviación de sulfuros de metales básicos y preciosos de varios minerales y para la eliminación del azufre de piritita (FeS₂) presente en el carbón (desulfuración).

En la Figura 1.6, se observa una imagen de *A. thiooxidans* obtenido mediante microscopía electrónica.



Figura 1.6 Imagen de *Acidithiobacillus thiooxidans* captada con un microscopio electrónico (Vergara, 2014)

1.2.6 Oxidación de Azufre elemental por *A. thiooxidans*

Actualmente, el trabajo de la bioinformática sobre el genoma codificado de la *A. thiooxidans*, ha permitido construir un modelo aproximado de las vías metabólicas involucradas en la oxidación del azufre que lleva a cabo la bacteria. Mediante esta técnica se puede inferir el carácter y la constitución de estas vías, identificando enzimas, complejos enzimáticos y componentes de cadenas transportadores de electrones ubicadas en distintos compartimentos celulares (Yin, Zhang, Li, He, & Liang, 2014).

Cómo se observa en Figura 1.7, el proceso de oxidación del azufre en *A. thiooxidans* se iniciaría a partir de la oxidación de azufre elemental extracelular (de estructura cristalina ortorrómbica S_8), que ingresaría al espacio periplasmático por transporte activo de una proteína especial ubicada en la membrana periplasmática, la cual activaría el compuesto mediante la ruptura de la configuración ortorrómbica por grupos tiol de residuos de cisteína, formando un complejo Tiol-Sulfano-átomo de azufre. Este complejo sería transportado al espacio periplasmático, donde lo oxidaría la enzima dioxigenasa de azufre (SDO), para producir sulfito (SO_3^{2-}) y H_2S . Posteriormente, el ácido sulfhídrico podría ser convertido a azufre elemental por la enzima quinona sulfuro reductasa (SQR), ubicada en la membrana citoplasmática, la que utilizaría sus quinonas como receptoras de electrones (Sand T. R., 2003).

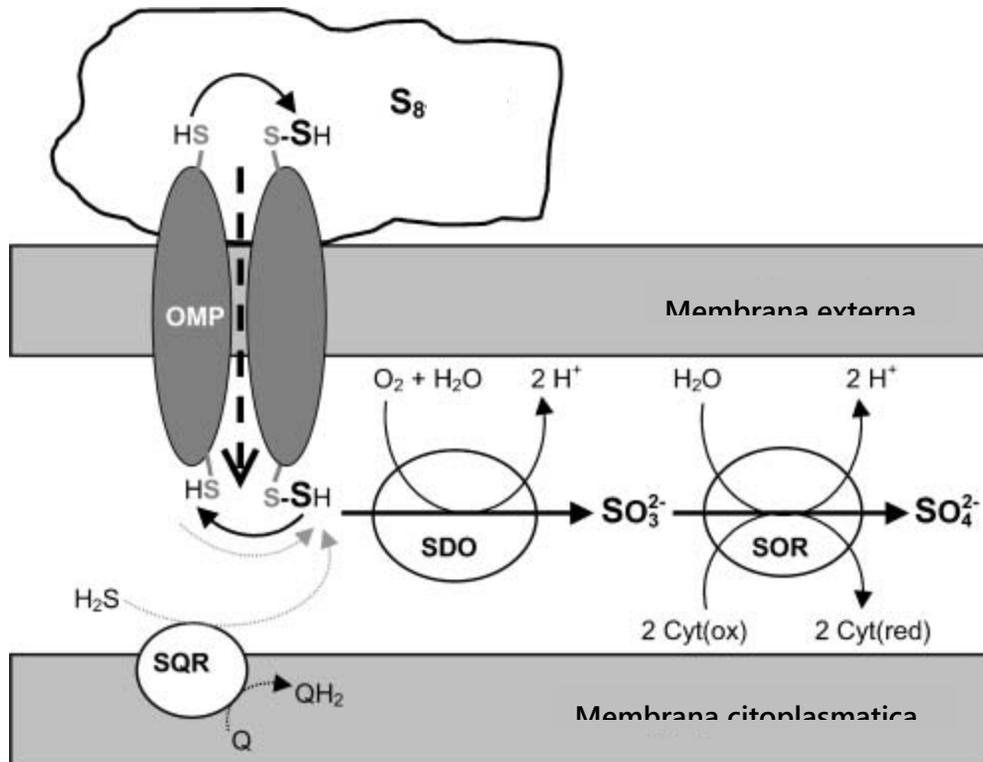


Figura 1.7 Modelo bioquímico para la oxidación de azufre en *Acidithiobacillus* (Sand T. R., 2003)

Los átomos de azufre elemental acumulados en el periplasma serían transferidos al citoplasma, en donde la enzima azufre oxígeno reductasa (SOR) los oxidaría, probablemente utilizando citocromos como receptores de electrones.

En la Figura 1.8, se presenta un modelo de la oxidación de Azufre en *A. thiooxidans* basado en análisis bioinformáticos de una selección del genoma y se observa que los posibles productos de la reacción de dismutación ⁽²⁾ realizada por la enzima SOR son ion sulfuro, tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$) y sulfito (Yin, Zhang, Li, He, & Liang, 2014).

El sulfuro podría ser convertido a ácido sulfhídrico y luego oxidado por la enzima SQR produciendo S^0 , mientras que el tiosulfato sería utilizado como sustrato de la enzima tiosulfato sulfotransferasa (TST o Rhodanasa) para producir un átomo de sulfito y uno de azufre elemental. Posteriormente, la proteína tiolcitoplasmática (RSH) actuaría como aceptora de un átomo de azufre para formar el complejo RSSH sulfato-sulfuro, el cual sería catalizado por el complejo enzimático heterodisulfuroreductasa (HDR), regenerando la RSH, lo que produciría una molécula de sulfito.

Luego, el sulfito sería transformado en sulfato (SO_4^{2-}), por enzimas que no han sido bien identificadas. Algunas de las enzimas que posiblemente estén involucradas en este proceso son la Fosfo adenosin fosfo sulfato reductasa (PAPS reductasa) y la Adenilil-sulfato quinasa (APS),

Otra posible vía para la oxidación del azufre, propone que el sulfito periplasmático reaccionaría espontáneamente con un átomo de azufre para formar tiosulfato, sin la mediación de enzimas que catalicen esta reacción.

La enzima Tiosulfatooxidoreductasaquinona (TQO), ubicada en la membrana citoplasmática sería la responsable de la catálisis de tiosulfato a tetrionato, donde la quinona actuaría como receptora de electrones. La enzima periplasmática tetrionato hidrolasa (TetH) estaría capacitada para catalizar la hidrólisis del tetrionato, generando tiosulfato, sulfato y átomos de azufre elemental.

En cuanto al Tiosulfato, este podría ser catalizado directamente por el complejo de enzimas azufre oxidante (SOX), para producir sulfato.

El modelo planteado para el sistema enzimático Sox poseería tres complejos enzimáticos periplasmáticos: SoxXA, SoxYZ, SoxB, los cuales oxidan el $S_2O_3^{2-}$ según el siguiente mecanismo que se describe a continuación: (Espinosa J., 2010)

Inicialmente, las proteínas SoxXA catalizarían la transferencia oxidativa y covalente del azufre sulfano del tiosulfato $S_2O_3^{2-}$ ($S-SO_3^{2-}$) a la cisteína de una proteína del complejo enzimático SoxYZ, formando Soxy-tiocisteína-S-sulfato ($SoxYZ-SS-SO_3^-$). Posteriormente, el grupo sulfona terminal ($-SO_3^-$) es hidrolizado por el SoxB para producir S-tiocisteína ($SoxYZ-S-S^-$) y sulfato SO_4^{2-} .

²Es un tipo específico de reacción redox en la que una misma especie se reduce y oxida a la vez para formar dos productos con diferentes estados de oxidación de forma simultánea.

Luego, el átomo de azufre del sulfano intermediario (SoxYZ-S-S^-) sería oxidado por la dioxigenasa azufre (SDO) para generar SoxYZ-cisteína-S-sulfato (SoxYZ-S-SO_3^-). Eventualmente, el sulfano terminal de SoxYZ-S-SO_3^- se hidroliza de nuevo por SoxB, regenerando SoxYZ en el proceso.

Finalmente, se postula una vía hipotética de electrones en la cual los electrones generados por las enzimas SQR, TQO, complejo Sox y HDR, a través de un consorcio de hidroquinonas QH₂ se transfieren a las oxidasas terminales (bd y bo₃) para producir gradiente de protones o al complejo NADH para generar poder reductivo.

Un resumen de las enzimas involucradas en el proceso de oxidación bacteriana del azufre se muestra en el Anexo 2 (Tabla 8.2).

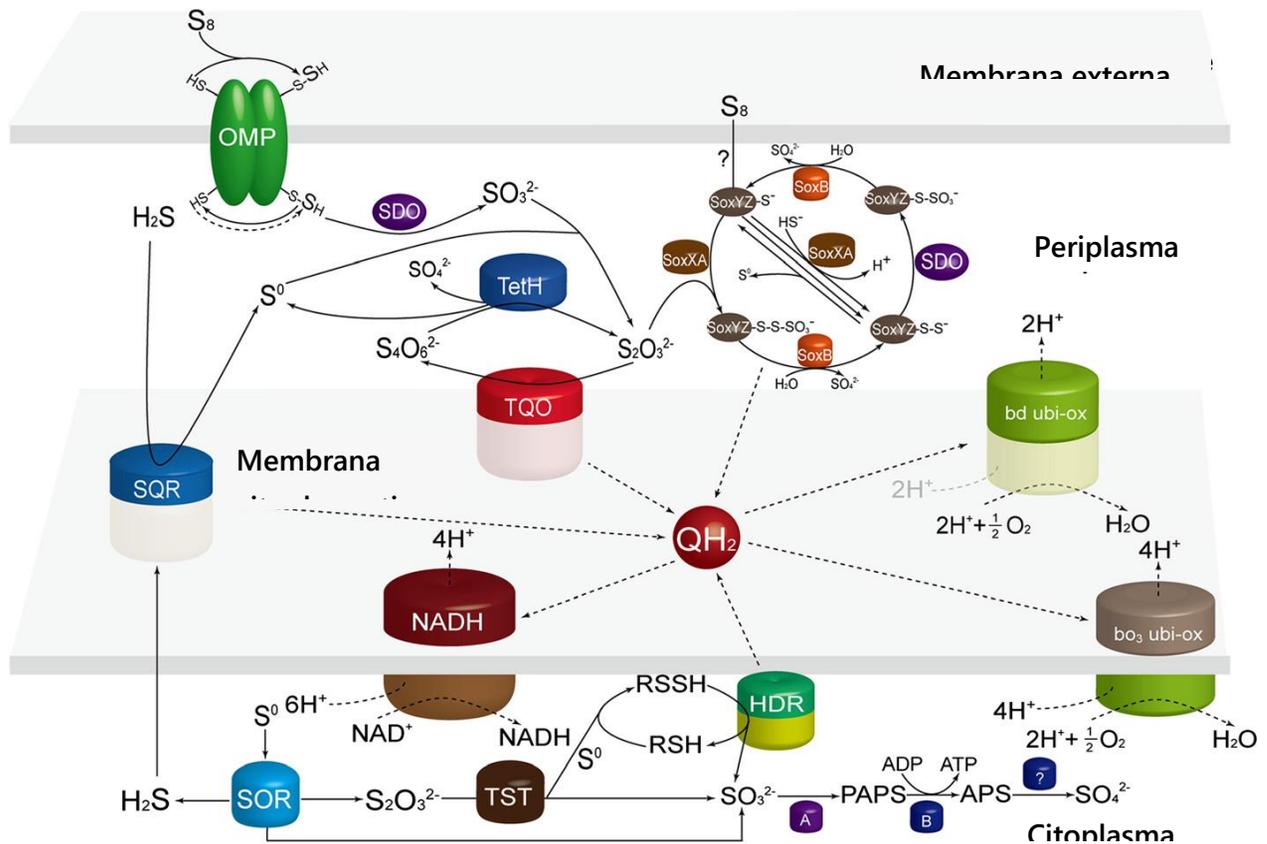


Figura 1.8 Modelo de la oxidación de Azufre en *A. thiooxidans* basado en análisis bioinformáticos de una selección del genoma (Yin, Zhang, Li, He, & Liang, 2014).

1.2.7 Fundamentos de la Identificación de Microorganismos mediante CARD-FISH

Existen varios métodos que han sido usados para estudiar la diversidad de los microorganismos que intervienen en un determinado fenómeno, en particular en la corrosión inducida por microorganismos. Desde la década de los 60s y 70s, la inmunología nos ha entregado herramientas para identificar ciertas secuencias diana entre el material genético del microorganismo, a través de la hibridación de DNA, mRNA o anticuerpos específicos. Algunos de los métodos moleculares que se han utilizado para estudiar la diversidad de bacterias azufreoxidantes son hibridación DNA/DNA, secuenciamiento de 16S rRNA, PCR utilizando partidores derivados de la técnica anterior (Pradhan, 2008), e identificación por medio de T-RFLP (Morales, 2006).

Una de las técnicas moleculares que se ha aplicado con más frecuencia en el último tiempo es la de CARD-FISH, la cual consiste en la combinación de la técnica de CARD (Catalyzed Reporter Deposition), con la técnica FISH (Fluorescence In Situ Hybridization). La utilización de CARD-FISH ha permitido estudiar la ecología de las comunidades microbianas (plantónicas en particular), pues permite distinguir un microorganismo de entre varios en el mismo cultivo, tal como se hace en este estudio.

En la técnica de CARD se polimeriza una molécula de tiramida marcada con un fluoróforo lo que es catalizado por la enzima HRP (horseradishperoxidase) aumentando la intensidad de la señal fluorescente, mientras que en la técnica FISH se identifican determinadas secuencias de DNA por medio de una hibridación específica de una molécula de rRNA marcada (Pernthaler, 2002).

La hibridación fluorescente in situ, FISH, se ha convertido en una técnica estándar en microbiología ambiental. Más de 20 años han pasado desde que esta técnica fue descrita por primera vez (Kubota, 2013).

Como se muestra en la Figura 1.9, la técnica de Hibridación Fluorescente In Situ se basa en la hibridación entre material genético de la célula diana, previamente desnaturalizado (por calor o pH) y una sonda (de DNA o mRNA) marcada con fluorescencia, la cual permite identificar la existencia de la secuencia buscada. El ingreso de las sondas a la célula diana es posible gracias a la permeabilización previa de la pared o membrana, la cual debe ser cuidadosamente controlada para no provocar la muerte de las células diana.

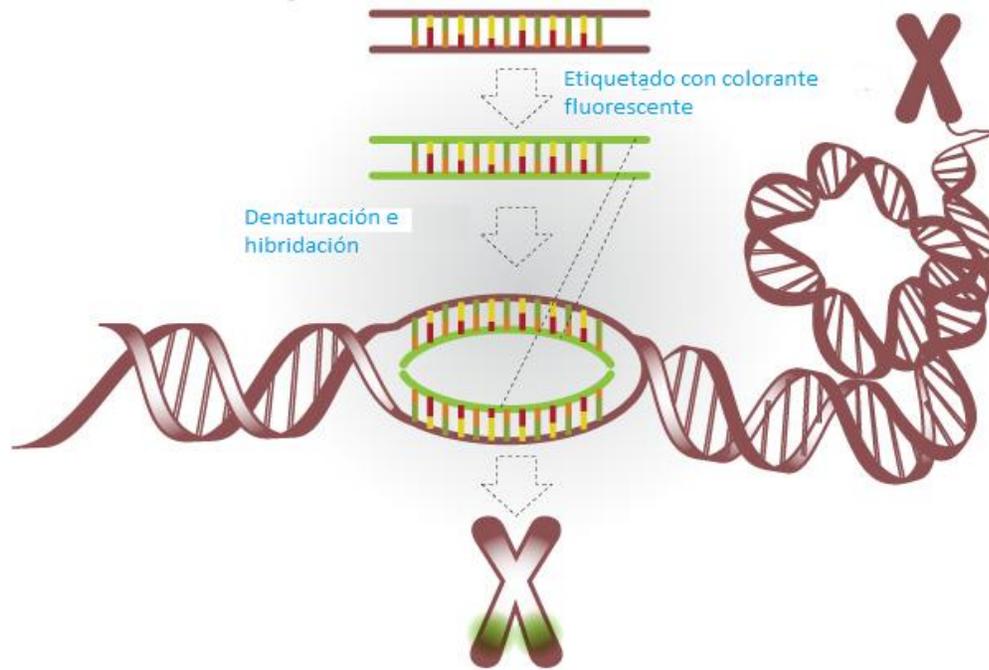
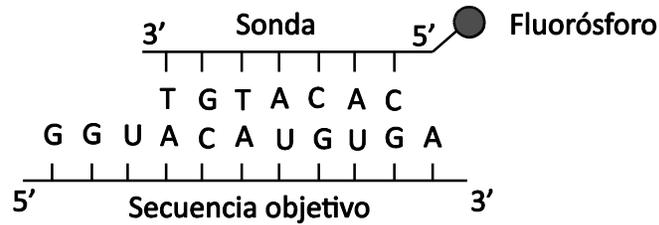


Figura 1.9 Técnica de Hibridación Fluorescente In Situ (CMG UZ Brussels, Belgium, 2011)

Una de las desventajas de esta técnica radica en la dificultad de detectar material genético en muy bajas concentraciones, lo cual se logró disminuir hace aproximadamente 15 años, con la adición de la técnica de deposición por catalizador de una molécula reportera o CARD (por sus siglas en inglés Catalyzed Reporter Deposition) también conocida como Amplificación de la Señal de Tiramida.

La técnica CARD consiste en catalizar la fijación de una molécula etiquetada a la sonda de hibridación, mejorando la detección o cuantificación de una determinada secuencia dentro de una muestra mediante la amplificación de la señal de hibridación. Como se muestra en la Figura 1.10, la enzima HRP (peroxidasa de rábano picante) adicionada a la hebra-sonda, al momento de hibridar deja expuesto su sitio activo, reaccionando con las moléculas de tiramida marcadas con fluoróforo que están en sus cercanías, activándolas mediante la pérdida de un electrón. Para volver a la estabilidad, se une covalentemente a un compuesto aromático (tirosina por ejemplo), activando su fluoróforo (como se muestra en la Figura 1.11. Esta reacción produce una fijación y acumulación de tiramidas fluorescentes en las zonas donde hubo hibridación, aumentando la señal (Mark N. Bobrow, 1989).

FISH



CARD -FISH

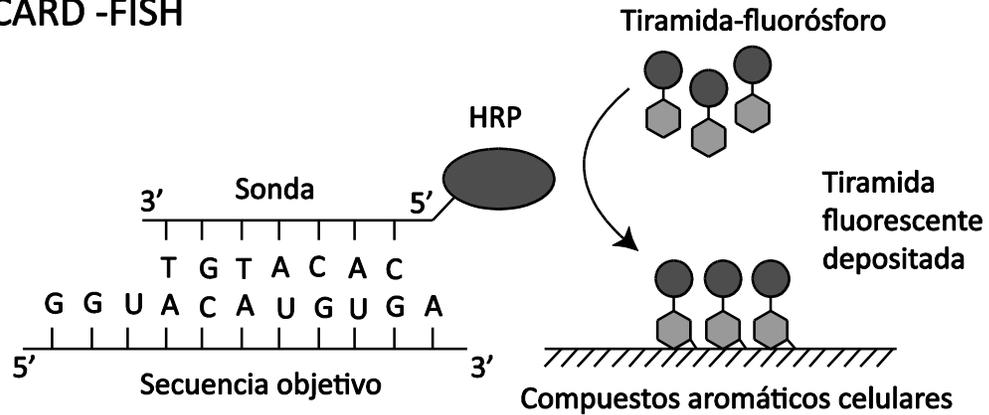


Figura 1.10 Esquema comparativo FISH v/s CARD FISH (Kubota, 2013)

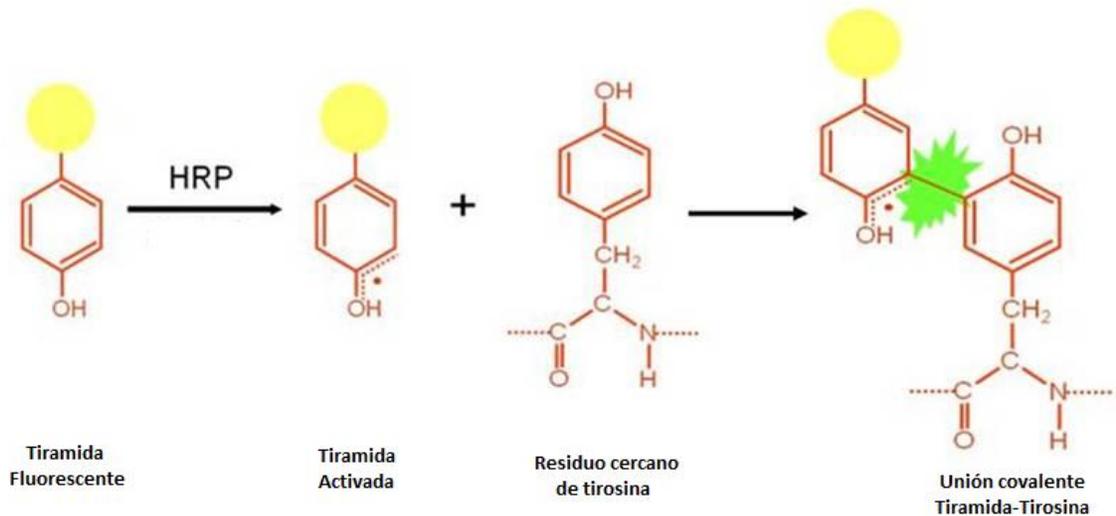


Figura 1.11 Esquema de funcionamiento de la Tiramida y la HRP en la técnica de CARD (Perkin Elmer, 2015)

En resumen, tal como se ve en la Figura 1.12, en la técnica CARD-FISH se utilizan sondas de rRNA específicas para un determinado microorganismo marcadas con la enzima HRP. Posteriormente se introduce a la célula moléculas de tiramida marcada con un fluoróforo, de modo tal que al ser polimerizadas por la enzima HRP; estas emiten luz en una determinada frecuencia de onda. Con esto, se produce una amplificación de la señal, obteniéndose así una sensibilidad mucho mayor que la obtenida al utilizar solo FISH (Pernthaler, 2002).

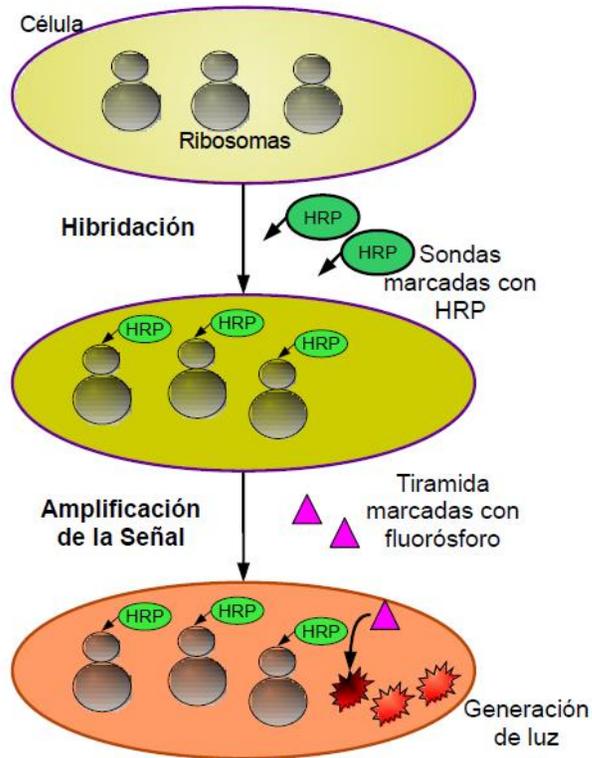


Figura 1.12 Esquema del método de identificación de CARD-FISH (Mora, 2010)

Para poder determinar la abundancia relativa de una determinada cepa se realiza una tinción con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), el cual es un fluoróforo que se une al DNA, permitiendo contar las bacterias totales de una muestra. Un esquema de la tinción con DAPI y con CARD-FISH se muestra en la Figura 1.13:

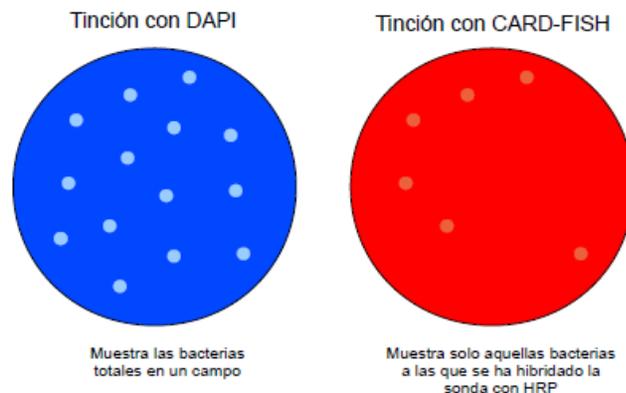


Figura 1.13 Esquema de la diferencia de la tinción de una muestra con DAPI y con tiramida posterior a la hibridación con sondas de DNA marcadas con HRP (CARD-FISH) (Mora, 2010)

1.3 MOTIVACIÓN

El envejecimiento de la infraestructura urbana, vial e industrial, es uno de los problemas más graves que enfrenta la sociedad de hoy. En las últimas décadas, la investigación y el trabajo de profesionales sobre corrosión se ha centrado principalmente en nuevas especificaciones técnicas de materiales para la construcción, en el diseño de protección y control contra la corrosión para las construcciones, ya sean edificios, puentes, carreteras, plantas, tuberías, tanques, y otros elementos claves de infraestructura (Koch et al., 2010).

Hoy en día, a más de 100 años de la revolución industrial, gran parte de las primeras infraestructuras construidas de hormigón alcanza el final de su vida útil de diseño, por lo que se hace hincapié en mantener y extender la vida de estos valiosos activos. Es por ello que resulta de vital importancia prevenir la corrosión bacteriana asociada a la pérdida de resistencia y durabilidad en ambientes ácidos y/o húmedos, (hidroeléctricas, desagües, minería).

La motivación de este estudio se enmarca en la disminución del impacto ambiental de los proyectos de infraestructura, al aumentar la durabilidad de las estructuras de hormigón, previniendo la componente bacteriana de la corrosión y durabilidad en ambientes ácidos y/o húmedos (hidroeléctricas, desagües, minería), comenzando por el conocimiento de las dinámicas bacterianas asociadas a este fenómeno.

1.4 DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

El proyecto consiste en el estudio de la dinámica de las bacterias azufre-oxidantes en procesos de corrosión del hormigón. Este estudio se realiza en su primera etapa, a partir del aislamiento e identificación de las bacterias presentes en hormigón extraído de estructuras con señales de corrosión. En una segunda etapa, se realiza el análisis de la relación entre el desarrollo bacteriano, producción de ácido y el avance de la corrosión en cemento endurecido.

1.5 JUSTIFICACIÓN

La infraestructura vial y de obras públicas, así como alcantarillados y redes de suministro sanitario en las ciudades, requiere a nivel mundial una alta inversión en estructuras de hormigón, cuyas expectativas de durabilidad y resistencia obligan a un continuo recambio de estas. Por dar un ejemplo, solo en los Estados Unidos se ha estimado que se requieren entre US\$ 20 mil millones y US\$ 21 mil millones anuales, solamente para proporcionar una adecuada infraestructura para agua potable y aguas residuales, sin considerar otras obras urbanas construidas de hormigón (NACE International National Association of Corrosion Engineers, 2001). También se ha estimado que los costos asociados a la operación y mantenimiento anual de esta infraestructura de agua potable y alcantarillado exceden los US\$ 31 mil millones y US\$ 25 millones, respectivamente (Koch, 2002).

En este contexto, no es sorprendente observar que la corrosión de estas infraestructuras ha sido un tema de debate durante décadas en el extranjero, con poco consenso sobre los métodos para el diseño y especificaciones que permitan satisfacer de manera óptima su durabilidad y resistencia en los distintos y exigentes medios ambientales a los cuales están sometidas.

Por otro lado, se estima que los costos directos anuales asociados a reparación de estructura vial que ha sido dañada por corrosión en Estados Unidos alcanza un total de US\$8,3 mil millones, en los que incluyen US\$3.8 millones de dólares para reemplazar los puentes que presentan deficiencias estructurales (fracturas, falta de resistencia), US\$ 2 mil millones para el mantenimiento y los costos de capital de inversión para el hormigón de puentes nuevos y US\$ 2 mil millones para sus subestructuras de hormigón (obras más pequeñas asociadas a grandes infraestructuras como plantas de agua potable o terminales de buses, aeropuertos o puertos) (NACE International National Association of Corrosion Engineers, 2001). A nivel mundial, se estima que el costo de reparar los daños producidos por la corrosión inducida por microorganismo (MIC) es equivalente a 1 billion de dólares al año (Wells T. M., 2012)

La falta de mantención o el mal estado de esta infraestructura produce, además de los costos ya mencionados, altos costos indirectos para los usuarios, tales como congestión vehicular, retrasos en desplazamiento, dificultades de tráfico y pérdida de productividad, los cuales se estimaron tan altos como 10 veces los costos directos indicados anteriormente producidos por la corrosión.

Se considera también que los ahorros en la producción de hormigón tienen un alto impacto en el medio ambiente, debido al alto costo energético y a las grandes cantidades de CO₂ emitidas por cada tonelada de hormigón. Se calcula que la razón peso CO₂ emitido/Peso cemento producido es cercana a 1 (NRMCA, 2012), por lo que aumentar la durabilidad y resistencias de las infraestructuras de hormigón es hoy también una necesidad para el cuidado del planeta.

A pesar de estas aparentes desventajas, el hormigón sigue siendo el material constructivo más utilizado en el mundo, debido a su accesibilidad en diversos lugares del planeta, a los bajos costos de operación asociados a sus estructuras y a su larga vida útil, que recientemente fue calculada en más de 80 años por el Instituto Tecnológico de Massachusetts (Ochsendorf, y otros, 2011).

Se estima, por ejemplo, que la velocidad de corrosión del concreto en ductos de drenaje puede ser de 1 a 10 mm por año, lo cual puede reducir el tiempo de vida de estos sistemas a menos de 30 años en lugar de los 80-100 años de vida útil proyectada (RILEM TC 183-MIB, 2005).

2. Objetivos

2.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de la presencia de bacterias azufreoxidantes en la degradación del hormigón.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar bacterias desde hormigón con signos de corrosión.
- Identificar las bacterias aisladas
- Estudiar el efecto del H_2SO_4 producido por *Acidithiobacillus thiooxidans*, sobre el hormigón.

2.3 LIMITACIONES Y ALCANCE

Para la realización de este estudio, se consideró como un indicador del desarrollo bacteriano la producción de ácido, la cual fue medida a través de las variaciones de pH de las soluciones y medios de cultivos. Durante el desarrollo de los cultivos en particular, se consideró la hipótesis que señala que el crecimiento bacteriano es directamente proporcional a la producción de ácido y la consiguiente disminución del pH, estimándose así el desarrollo bacteriano positivo.

Debido a las limitaciones que implica medir con exactitud los cambios de masa en los materiales corroídos, en este estudio, se decidió medir la corrosión de forma indirecta, mediante la cuantificación de iones que se producen en el proceso de corrosión, estos son el ión Calcio Ca^{2+} y el ion sulfato SO_4^{2-} , asumiendo que el aumento de estos iones en disolución dan cuenta del avance de la corrosión.

3. Metodología

La metodología descrita a continuación se divide en varias secciones que representan las etapas necesarias para obtener resultados en cada uno de los objetivos específicos señalados. Estos son aislamiento de bacterias y su identificación a partir de muestras corroídas y cultivo de *A. thiooxidans* con sustrato de cemento endurecido o mortero (³).

3.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DESDE HORMIGÓN CORROÍDO

Para el desarrollo de esta etapa, se realizaron los siguientes experimentos:

3.1.1 Aislamiento de bacterias desde hormigón corroído

Para obtener una población de bacterias factible de ser identificada posteriormente mediante el método de CARD-FISH, se procedió al cultivo de muestras obtenidas desde testigos de hormigón extraídos de estructuras que presentaban señales evidentes de corrosión. Las características de las muestras utilizadas se detallan en la Tabla 3.1:

Tabla 3.1. Características de las muestras de hormigón con signos de corrosión

Muestra	Procedencia	Granulometría	Peso [g]
M1	Central Termoeléctrica Norte Grande	Baja (0,25 mm promedio aproximadamente)	19,98
M1'	Central Termoeléctrica Norte Grande	Alta (0,5 mm promedio aproximadamente)	19,84
M2	Pavimento yacimiento minero Zona Central	Baja (0,25 mm promedio aproximadamente)	20,07
M2'	Pavimento yacimiento minero Zona Central	Alta (0,5 mm promedio aproximadamente)	65,39

a) Materiales y Equipos

- 4 matraces Erlenmeyer de 250 [mL]
- 90 [ml] de Medio basal estéril por cada matraz (de composición 6 [g/L] de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 [g/L] de KCl, 1 [g/L] de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 1 [g/L] $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, pH ajustado a 4.0 con H_2SO_4 concentrado)
- 10 [ml] tetrionato potásico ($\text{K}_2\text{S}_4\text{O}_6$) 0,1M estéril (mediante filtración por membrana 0,22 [μm]) por cada matraz

³ Mortero: Material obtenido de la mezcla de arena, cemento y agua.

- 10 [g] de muestra por cada matraz
- Agua destilada estéril
- Probeta de 100 [ml]
- Pipeta de 10 [ml]
- Micropipeta de 500 [μ l]
- Puntas plásticas para micropipeta de 500 [μ l]
- Tubos Falcon de 10 [mL]
- pH-metro Jenco modelo 1671, con electrodo de vidrio
- Balanza PRECISA1620C
- Balanza PRECISA XB22A
- Shaker ambiental a 30°C y 100 RPM

b) Diseño del experimento

El experimento se realizó utilizando 4 matraces esterilizados previamente de 250 [ml], dos de los cuales tenían boca ancha para poder introducir los trozos sin moler de hormigón. En cada matraz se introdujeron 90 [ml] de Medio basal (pH 4.0 ajustado con H₂SO₄ concentrado), 10 [ml] de Tetratiónato 0,1M y 10 gramos de muestra (excepto aquellos matraces con trozos de hormigón). El contenido, peso y pH inicial de cada matraz se muestra en la Tabla 3.2

Tabla 3.2. Condiciones iniciales matraces de cultivo

Matraz	Muestra	Peso [g]	pH inicial
M1	Central Termoeléctrica Norte Grande– Granulometría baja	229,22	7,70
M1'	Central Termoeléctrica Norte Grande– Granulometría alta	275,10	6,56
M2	Pavimento yacimiento minero Zona Central – Granulometría baja	236,88	7,91
M2'	Pavimento yacimiento minero Zona Central – Granulometría alta	307,79	7,51

Los matraces fueron incubados en shaker ambiental a 100 RPM (R=40[cm]) y 30°C; se repuso el agua y se controló el pH cada 7 días durante 7 semanas.

El procedimiento de reposición de agua y toma de pH consistió en pesar los matraces a T° ambiente, calcular el agua evaporada, adicionar agua estéril, agitar y dejar reposar. Luego se extrajeron 5[ml] de medio con micropipeta a un tubo Falcon de 10 ml, en el cual se determinó el pH de la solución.

Al estar en contacto con la solución del medio de cultivo, el cemento actúa como buffer subiendo el pH de la solución. Los pH registrados son mayores a los pH en que se desarrollan las bacterias azufreoxidantes y muy superiores al rango de pH óptimo, por lo que se ajustó semanalmente el pH de la solución con ácido sulfúrico concentrado, hasta llegar a un pH entre 4 y 5. Esto se realiza durante 4 semanas. Luego de este período, la producción bacteriana logra que el pH disminuya en la solución.

3.1.2 Recuento directo de células planctónicas

El número de microorganismos desarrollados durante el asilamiento de bacterias desde hormigón corroído, se determinó mediante recuento directo al microscopio.

a) *Materiales y equipos*

- Microscopio marca Nikon, modelo Labophot
- Cámara Neubauer mejorada Merientfeld, de 0,2 mm de profundidad, para recuento de células.
- Micropipetas de 20[μ L].
- Puntas para micropipeta.
- Mechero.
- Etanol.

b) *Procedimiento*

1. Limpiar con etanol la zona donde se trabaja.
2. Encender el mechero.
3. Tomar 8 [μ L] de la muestra.
4. Colocar la muestra sobre la cámara de recuento de 0,2 mm de profundidad.
5. Posicionar la cámara de recuento para ser observada en el microscopio con un aumento ocular de 10x y un objetivo de 40X.
6. Contar las células presentes en cada cuadro de la cámara, en al menos 5 cuadrados. Si hay baja densidad celular se cuenta en los cuadrados grandes y si hay alta densidad se cuenta en los cuadrados pequeños.
7. Se promedia el número de células por el número de cuadrados cuantificados y este valor se multiplica por $1,25 \times 10^6$ o $2,00 \times 10^7$ según se haya realizado el conteo en cuadrados grandes o pequeños, respectivamente.
8. El valor obtenido corresponde a la concentración aproximada de “células/mL” de la muestra.

3.1.3 Identificación de las Bacterias por CARD-FISH

a) *Materiales y Equipos*

- Acromopeptidasa 60[u/mL]
- Agarosa 0,2%
- Agua DD (destilada y desionizada)
- Citifluor 5,5 partes [v/v]
- DAPII [μ g/mL]
- Dextran sulfato 10%
- DNA de esperma de salmón 0,5 [mg/mL]
- Etanol al 96%
- Formaldehído al 37%
- tRNA de E.Coli 0,5 [mg/mL]

- Formamida 55%
- HCl 0,01 [M]
- Lisozima 10 [mg/mL]
- NaCl [mg/mL]
- SDS 0,02%
- Solución Denhardt 5%
- Sondas de rRNA marcadas con HRP 50 [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]
- Tiramida Cy3
- Tris-HCl (pH7,5) 0,1 [M]
- Triton X-100 0,05%
- tRNA de E.coli 0,5 [mg/mL]
- VectaShield 1 parte [v/v]
- Filtro policarbonato, poro de 0,2 μm
- Estufa
- Horno de hibridación marca Stuart Scientific
- Microscopio de epifluorescencia marca Zeiss, equipado con los filtros de 365nm y 546nm

b) Sondas utilizadas

Se escogieron las sondas de hibridación para las bacterias *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans*, dado que en la literatura se indica que son las dos bacterias predominantes en ecosistemas de corrosión (Okabe, Odagiri, Ito, & Satoh, 2006) (Sand W. , 1987)

- (*A. ferrooxidans*):GGA CTT AAC CCA ACA TCT CA (Bustos, 2005)
- (*A. thiooxidans*):AAG AGG AGC CTA CGT CTG A (Bustos, 2005)

3.1.4 Protocolo para el tratamiento de células en suspensión

Este protocolo se basa en otro descrito hace catorce años (Pernthaler, 2002), al cual se le realizaron algunas modificaciones, principalmente en cuanto a los volúmenes que se utilizaron (Escobar B. , Técnica modificada de CARD-FISH, 2010).

a) Traspaso de células desde una suspensión a un soporte

Esta etapa del protocolo permite traspasar las células suspendidas en la solución a un soporte, que en este caso es un filtro de policarbonato.

1. Centrifugación a 1000 [RPM] de 6 ml de solución de cultivo, para separación de células planctónicas de restos minerales.
2. Fijación celular de 5 ml de suspensión con al menos 10^6 cel/ml con formaldehído al 4% por 1 hora en hielo.
3. Filtrado en membrana de policarbonato.
4. Se sugiere evaluar un trozo de filtro con DAPI 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para asegurarse de la presencia de las células en la concentración deseada (10^4 a 10^5).

5. Sumergir el filtro en agarosa al 0,2% a 37°C, por ambas caras. Dejar secar sobre un vidrio de reloj a 35°C durante 10 min. El baño del filtro en agarosa protege la integridad de las células a lo largo del proceso.
6. Deshidratar el filtro en etanol al 96%, por 1 minuto a temperatura ambiente.
7. Dejar secar al aire.

b) *Permeabilización de células e inactivación de peroxidasas*

1. Incubar el filtro en una placa Petri pequeña con 1 ml de lisozima (10 mg/ml en 0,05M EDTA, 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5), por 60 min a 37°C.
2. Lavar con agua DD, por 1 min.
3. Incubar el filtro en una placa Petri pequeña con 1 ml de acromopeptidasa por 30 min a 37°C (60 U/ml en 0,01 M NaCl, 0,01 M Tris-HCl pH 8).
4. Lavar con agua DD por 1 min.
5. Incubar el filtro en una placa Petri pequeña con 1 ml de HCl 0,01 M, por 10 min.
6. Lavar el filtro con agua DD, 2 veces, por 1 min.
7. Deshidratar el filtro en etanol al 96%, por 1 minuto a temperatura ambiente.
8. Dejar secar al aire.

c) *Hibridación*

1. Cortar los filtros en secciones de 5x5 mm aproximadamente.
2. Bloquear las secciones de filtro con Solución Denhart 5x por 15 min.
3. Depositar entre 2 a 4 secciones en un tubo microcentrífuga (ependorf) de 0,2 ml.
4. Mezclar con 200 µl de buffer de hibridación (0,9 M NaCl, 20 mMTris-HCl [pH7,5], 10% dextran sulfato p/v, 0,02% p/v SDS, 55% v/v formamida, Solución Denhardt 5x, 0,5mg/ ml de DNA de esperma de salmón, 0,5mg/ ml de tRNA de E.coli) y 2µl de sonda de DNA marcada con HRP (se repite este paso para cada sonda, en este estudio: *A. thiooxidans* y *A. ferrooxidans*, según se muestra en la Tabla 3.3)

Tabla 3.3. Guía de hibridaciones

Muestra	Procedencia	Hibridado con sonda de
1	M1	<i>A. ferrooxidans</i>
1'	M1	<i>A. thiooxidans</i> ,
2	M1'	<i>A. ferrooxidans</i>
2'	M1'	<i>A. thiooxidans</i> ,
3	M2	<i>A. ferrooxidans</i>
3'	M2	<i>A. thiooxidans</i>
4	M2'	<i>A. ferrooxidans</i>
4'	M2'	<i>A. thiooxidans</i>

5. Incubar los filtros a 35°C por 2hr, en horno de hibridación.
6. Lavar filtros con agua DD a 37°C por 10 min.

d) Revelado y observación

1. Remover el exceso del líquido con papel filtro.
2. Traspasar los filtros a placas Petri.
3. Incubar filtros en 1 ml de PBS 1x con 0,05% de Triton X-100, por 15 min.
4. Incubar filtros en mezcla de sustrato de tiramida (1 parte de tiramida Cy3 en 10 partes de buffer de amplificación, solo lo necesario para cubrir la superficie brillante de la sección, aproximadamente 10 [µL] por sección), por 10 min, en la oscuridad.
5. Incubar filtros en 10 [mL] de PBS 1x con 0,05% de Triton X-100, por 15 min en la oscuridad.
6. Lavar con agua DD, por 1 min.
7. Lavar con etanol al 96% por 1 min.
8. Secar al aire.
9. Teñir con DAPI 1 [µg/mL] para evaluar al microscopio.
10. Colocar una sección del filtro sobre un portaobjeto.
11. Cubrir las secciones de filtro con Mountant (5,5 partes de Citifluor, 1 parte de VectaShield, 0,5 partes de 1x PBS con DAPI de concentración final 1 [µg/mL]).
12. Colocar un cubreobjeto sobre el filtro, y agregar una gota de aceite de cedro.

Una vez que se tienen los trozos de filtro teñidos con las distintas sondas, se procede a la evaluación del mismo, utilizando un microscopio de epifluorescencia con un aumento de 1000x (objetivo 100x y ocular 10x). Para la identificación y determinación del porcentaje de las células totales que corresponde a cada cepa se realiza lo siguiente:

- Recuento de las células totales presentes en una sección del filtro utilizado. Para esto se evalúa el filtro utilizando un filtro de luz UV con una longitud de onda 365nm, que permite ver las células que han sido teñidas con DAPI (fondo azul; las células se ven azul brillante).
- Para el recuento de células específicas la misma sección del filtro se evalúa utilizando un filtro de luz UV con una longitud de onda 546nm, por medio del cual se podrá determinar la cantidad de células que han sido teñidas con Cy3 (fondo rojo, las células se ven rojo brillante). En esta etapa es necesario fijarse que las células que se están contando estén también presentes al observar la sección del filtro para DAPI.

3.2 CULTIVO DE *A. THIOOXIDANS* EN MEDIO DE CULTIVO CON CEMENTO ENDURECIDO

3.2.1 Preparación Inóculo

El cultivo de inóculos utilizados fue realizado en dos matraces agitados a 200 [RPM] y una temperatura de 30°C, usando *A. thiooxidans* sobre azufre en perlas de diámetro entre 2,36 y 3,32 [mm].

A continuación se detallan las metodologías utilizadas para el cultivo de bacterias en matraces, basadas en una técnica estandarizada para cultivos de *A. thiooxidans* en el laboratorio de Biohidrometalurgia del Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Física y Matemáticas de la Universidad de Chile (Escobar B., 2012).

Durante el desarrollo de este experimento, se utilizó agua desionizada para las soluciones, para obtener mediciones de ion Ca^{2+} sin perturbaciones.

3.2.2 Obtención de perlas de azufre

a) *Materiales y equipos*

- Azufre p.p.a. marca Merck.
- 8 [L] de Agua desionizada.
- Estanque de vidrio de 10 [L].
- Plato agitador/calefactor marca Sybron modelo SP18420.
- Agitador vertical Janke&Kinkel modelo RW20.
- Paleta tipo hélice de 4 palas, de acero inoxidable.
- Medidor de temperatura (termocupla) marca Chy modelo (W) 502.
- Vasos de precipitado de 50 [mL].
- Manto Calefactor eléctrico con regulador de voltaje ROMI modelo TDGC-0.
- Tamices tipo Tyler marca Endecotts Ltd.
- Papel Filtro.
- Colador para filtración.
- Campana de extracción.
- Soporte metálico para el agitador.

b) *Obtención de perlas de azufre*

1. Instalar el estanque con el agitador vertical y su paleta sobre el soporte metálico.
2. Agregar agua desionizada a dicho contenedor.
3. Regular una agitación suficientemente fuerte para que exista un torbellino dentro del estanque que se extienda hasta su base.
4. Encender el manto calefactor a 100 [V] de potencial.
5. Instalar el medidor de temperatura.
6. Regular la potencia para que el manto calefactor alcance los 90°C.
7. En paralelo, pesar 15 [g] de azufre en polvo en cada vaso de precipitado de 50 [mL].
8. Al alcanzar los 90°C, introducir un vaso de precipitado por vez en el manto calefactor, cuidando que la termocupla se sitúe al centro de la masa interna de azufre.

9. Encender la campana de extracción.
10. Cambiar el voltaje del manto a 80 [V] cuando la temperatura del mismo vuelva a ser 90°C.
11. Monitorear visualmente el cambio de estado del azufre (sólido a líquido), situación que se alcanza típicamente cuando la temperatura interna se encuentre entre los 128°C y 132°C.
12. Una vez que el azufre se funde, verter rápidamente el contenido sobre el agua desionizada en agitación, obteniendo así las esferas o perlas de azufre debido al cambio repentino de temperatura. Para evitar problemas de rápida solidificación del azufre, se utiliza como respaldo el plato agitador/calefactor a alta T°.
13. Filtrar la solución para separar las perlas de azufre del agua destilada.
14. Secar el filtro con la perlas de azufre a 30°C por 24 horas.
15. Utilizar los tamices para separar por granulometría las perlas de azufre, entre los 2,36 y 3,32 [mm] de diámetro.

3.2.3 Esterilización de las perlas de azufre

Con el fin de eliminar microorganismos no deseados poblando las perlas de azufre previamente sintetizadas, se realiza el siguiente procedimiento de esterilización:

a) *Materiales*

- Matraz Erlenmeyer.
- 100 [ml] Medio de Cultivo Basal (0,4 [g/L] de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,4 [g/L] de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0,056 [g/L] de KH_2PO_4) a pH 2,3, ajustado con HCl, no estéril (para no interferir con las mediciones de ion sulfato SO_4^{2-} se utilizó ácido clorhídrico en vez de ácido sulfúrico para ajustar pH)
- 3 [g] de perlas de azufre.

b) *Esterilización de Azufre*

1. Colocar el azufre masado en el matraz, y 100 [mL] de MC 2,3 (proporción del 3% p/v).
2. Cerrar el matraz con una tapa de gasa y algodón.
3. Colocar el matraz en una olla tapada, sin presión y que contenga un litro de agua destilada, por media hora luego de haber alcanzado la ebullición del agua.
4. Para eliminar las esporas de hongos que pudiesen haber sobrevivido a la primera esterilización, se debe dejar enfriar por 24 horas, cambiar el medio de cultivo del matraz y repetir el paso 3.

3.2.4 Cultivo de inóculos en matraces sobre perlas de azufre

a) *Materiales y equipos*

- 2 matraces Erlenmeyer de 250 [ml], con tapón de algodón, esterilizados previamente
- 8 [ml] de inóculo puro de *A. thiooxidans* con una población aproximada de 10^8 [células/ml], previamente ambientada a las perlas de azufre elemental a usar en este estudio.
- 12 [g] de perlas de azufre elemental, con diámetro entre 2,36 y 3,32 [mm].
- 700 [ml] Medio de Cultivo Basal (0,4 [g/L] de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,4 [g/L] de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0,056 [g/L] de KH_2PO_4) a pH 2,3.
- Shaker giratorio ambiental, a una agitación de 200 RPM y calefaccionado a 30°C.
- pH-metro Jenco modelo 1671, con electrodo de vidrio.
- 6 tubos Falcon de 10 [mL].
- Micropipeta de 5 [mL].
- Puntas plásticas para micropipetas.
- Unidad de filtración Millipore estéril
- Filtro membrana Millipore, poro 0,22 [μm]
- Matraz Erlenmeyer de 50 [ml]

b) *Preparación de los cultivos*

1. Preparar cada matraz, en condiciones estériles, con la siguiente configuración:
 - 3 [g] de perlas de azufre.
 - 80 [mL] de Medio Basal pH 2,3
 - 20 [mL] de inóculo previo.
2. Tapar cada matraz con tapones de gasa y algodón.
3. Disponer los matraces en el agitador calefaccionado para el crecimiento de las bacterias a su temperatura óptima.

c) Seguimiento y Control

Para controlar los parámetros de seguimiento de los matraces, se deben extraer alícuotas de 5 ml, siguiendo el siguiente protocolo:

1. Pesar los matraces y reponer el agua evaporada debido al efecto de mantener los cultivos a 30°C.
2. Extraer 2 [ml] de sobrenadante a un tubo Falcon.
3. Reponer el volumen extraído con MC 2,3.
4. Pesar cada matraz y anotar dicho valor para la siguiente toma de muestra.
5. Almacenarlos nuevamente en el shaker.

Para medir pH de cada matraz, se debe seguir el siguiente procedimiento:

1. Calibrar el pH-metro a temperatura ambiente.
2. Extraer 2 [mL] de la muestra obtenida.
3. Colocar cada alícuota en un tubo Falcon.
4. Medir el pH de cada muestra, sumergiendo el electrodo del pH-metro al interior del tubo.

d) Filtración y concentración

Para ser utilizados como inóculos, se debe concentrar las bacterias presentes en el sobrenadante, siguiendo el protocolo descrito:

1. Filtrar el sobrenadante.
2. Resuspender las bacterias adheridas al filtro en 22 [ml] de MC 2,3, en un matraz de 50 [ml] previamente estéril.
3. Realizar conteo con 2 ml de la resuspensión.

3.2.5 Colonización de perlas de azufre con *A. thiooxidans*

Se prepararán los matraces en forma estéril con 3 [g] de perlas de azufre, 90 [mL] de Medio Basal y el inóculo de bacterias para los experimentos, y una solución de Timol para los controles. Se colonizarán las perlas de azufre de cada matraz con *A. thiooxidans* durante una semana, previo a la incorporación del cemento para el cultivo.

a) Materiales y equipos

- 6 matraces Erlenmeyer esterilizados previamente, de 250 [ml].
- 600 [ml] Medio de Cultivo Basal (0,4 [g/L] de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,4 [g/L] de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0,056 [g/L] de KH_2PO_4) a pH 2,3, ajustado con HCl (para no interferir con las mediciones de ion sulfato SO_4^{2-} se utilizó ácido clorhídrico en vez de ácido sulfúrico para ajustar pH)
- 60 [g] de perlas de azufre.
- 15 [ml] de inóculo concentrado.
- 10 [ml] Solución de Timol en etanol al 2% p/v.

La configuración de los matraces se muestra en la Tabla 3.4

Tabla 3.4. Configuración de matraces.

Matraz	Inóculo	Azufre [g]	Medio de Cultivo pH 2, 3 [ml]
Muestra 1	10 [ml] de inóculo concentración 3×10^7 [bacterias/ml], proveniente de T1.	3	90
Contramuestra 1	10 [ml] de inóculo concentración 3×10^7 [bacterias/ml], proveniente de T1.	3	90
Control 1	10 [ml] Solución de Timol en etanol al 2% p/v	3	90
Muestra 2	10 [ml] de inóculo concentración 3×10^6 [bacterias/ml], proveniente de T2.	1,5	95
Contramuestra 2	10 [ml] de inóculo concentración 3×10^6 [bacterias/ml], proveniente de T2.	1,5	95
Control 2	10 [ml] Solución de Timol en etanol al 2% p/v	1,5	95

Se mantuvieron los matraces en shaker a 30°C durante una semana, midiendo pH cada dos días, hasta alcanzar un valor menor a 2. Alcanzado este pH se prosiguió incorporando 10[g] de cemento molido esterilizado en cada matraz, y se comenzó a medir la actividad bacteriana a través de la toma de pH, calcio en solución y sulfatos:

b) Seguimiento y Control

Para controlar los parámetros de seguimiento de los matraces, se deben extraer alícuotas de 5 ml, siguiendo el siguiente protocolo

1. Pesar los matraces y reponer el agua evaporada debido al efecto de mantener los cultivos a 30°C.
2. Extraer 5 [ml] de sobrenadante a un tubo Falcon.
3. Reponer el volumen extraído con Medio de Cultivo Basal pH 2,3.
4. Pesar cada matraz y anotar dicho valor para la siguiente toma de muestra.
5. Almacenarlos nuevamente en el shaker.

Para medir pH de cada matraz, se debe seguir el siguiente procedimiento

1. Calibrar el pH-metro a temperatura ambiente.
2. Extraer 2 [mL] de la muestra obtenida.
3. Colocar cada alícuota en un tubo Falcon.
4. Medir el pH de cada muestra, sumergiendo el electrodo del pH-metro al interior del tubo.

3.2.6 Preparación de probetas de mortero de cemento Portland

a) *Materiales y equipos*

- 500 [g] Cemento Portland Nacional (NCh 148 Of.68 Cemento - Terminología, clasificación y especificaciones generales, 1968) (Caracterización en ANEXO3)
- 255 [g] Agua destilada
- 1.500 [g] Arena Normalizada según (NCh 157. Of 67, 1967)
- Mezcladora según (NCh 157. Of 67, 1967)
- Balanza
- Moldes según (NCh 157. Of 67, 1967)

b) *Procedimiento*

1. Mezcla de materiales según (NCh 157. Of 67, 1967)
2. Llenado de moldes y compactación según (NCh 157. Of 67, 1967)
3. Fraguado en cámara húmeda a 23°C y 90% de humedad por 24 horas
4. Desmoldado

3.2.7 Esterilización de muestras de cemento

a) *Materiales y equipos*

- 2 matraces Erlenmeyer de 250 [ml].
- 60 [g] mortero de cemento Portland endurecido y molido
- Placa Petri estéril
- Papel de aluminio
- Balanza PRECISA 1620C

Para esterilizar las muestras de cemento:

5. Preparar 6 paquetes de papel de aluminio con 10 [g] de cemento molido cada uno y cerrar cuidadosamente.
6. Colocar 3 paquetes en cada matraz.
7. Poner los matraces en una olla tapada, sin presión y que contenga un litro de agua destilada, por media hora luego de haber alcanzado la ebullición del agua.
8. Dejar enfriar por 24 horas.
9. Para eliminar totalmente los microorganismos que pudiesen estar presentes y sus esporas, se debe repetir 2 veces esta operación.

3.2.8 Medición de Sulfatos en solución por turbidimetría

a) *Materiales y equipos*

- $\text{BaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$.
- Cloruro de sodio (NaCl) de concentración 240 [g/L] en solución, con HCl al 0,3%.
- Glicerina 1:1 con agua desionizada.
- Agua desionizada.
- Espectrofotómetro UV-visible, marca Agilen, modelo 8453.
- Software computacional ChemStation UV-visible.
- Computador.
- Matraces aforados de 25 [mL].

b) *Procedimiento*

1. En un matraz aforado agregar agua des-ionizada hasta alcanzar la mitad del volumen del contenedor.
2. Agregar 1 [mL] de la solución de biooxidación a medir.
3. Agregar 2,5 [mL] de glicerina 1:1. Agitar.
4. Agregar 1,25 [mL] de NaCl 240 [g/L]. Agitar.
5. Aforar a 25 [mL] con agua desionizada. Agitar.
6. Agregar 0,075 [g] de $\text{BaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$.
7. Agitar durante un minuto.
8. Medir concentración en espectrofotómetro UV-visible a 500 [nm] contra blanco, cada un minuto hasta completar 3 mediciones. Esta medición es llevada a cabo por el software instalado en el computador.
9. Finalmente se obtiene un promedio de concentración de sulfato con 3 valores entregados por el equipo.

3.2.9 Medición de ion calcio por espectrofotometría absorción atómica

a) *Preparación solución matriz*

Para preparar 2 [L] de solución HCl 0,11M + 0,5% KCl + 0,5% LaCl_2

b) *Equipos y Materiales:*

- Equipo de absorción atómica 1100 B de Perkins Elmer, con lámpara de cátodo hueca de Na/K.
- Matraz de aforo de 2 [L]
- 10 [gr] KCl
- 10 [gr] de LaCl_2
- 16 [mL] HCl al 37% en agua desionizada.

c) Preparación de material

Ambientar 8 matraces de aforo de 100 [mL] con solución de HNO_3 0,3M y luego enjuagar 3 veces con agua desionizada.

d) Preparación de estándares

A partir de un titrisol de calcio, el cual se diluye en 1 litro de solución de HNO_3 0,3 M, en agua desionizada, para generar un patrón de 1000 ppm de Ca^{2+} .

A partir de este patrón se realizan diluciones según el esquema que se muestra en el Anexo 6, generando patrones de 1, 5, 10, 20, 50, 100 y 200 ppm.

Con estos patrones se construye una curva la cual será utilizada por el equipo para calcular la concentración de calcio en las muestras a medir.

Una vez cargada la curva, se procede a medir cada muestra, en el equipo de absorción atómica.

4. Resultados y Discusión

4.1 AISLAMIENTO DE BACTERIAS DESDE HORMIGÓN CORROÍDO

Como se indicó en la descripción metodológica, para el aislamiento de bacterias a partir de hormigón corroído, se realizó el seguimiento del desarrollo bacteriano a partir del monitoreo de la variación de pH en el medio de cultivo.

Los resultados de estas mediciones se muestran en la Figura 4.1 y Figura 4.2. Las tablas de datos con las que se construyeron estos gráficos se muestran en el Anexo 1 (Tabla 8.1. pH Cultivos de muestras de hormigón corroído).

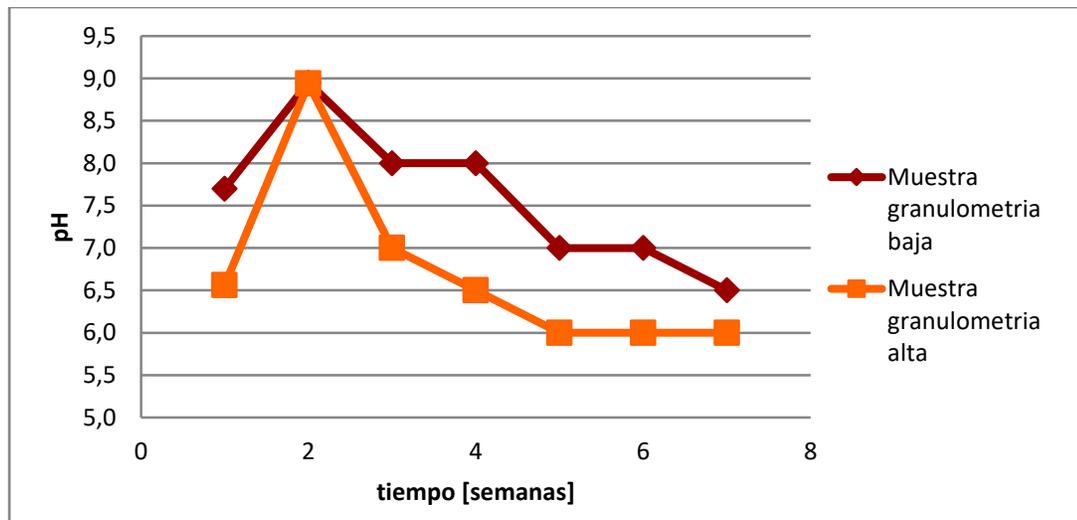


Figura 4.1 Gráfico de la evolución de pH en medio en cultivo para el aislamiento de bacterias desde hormigón corroído proveniente de testigo obtenido en una Central Termoeléctrica del Norte Grande

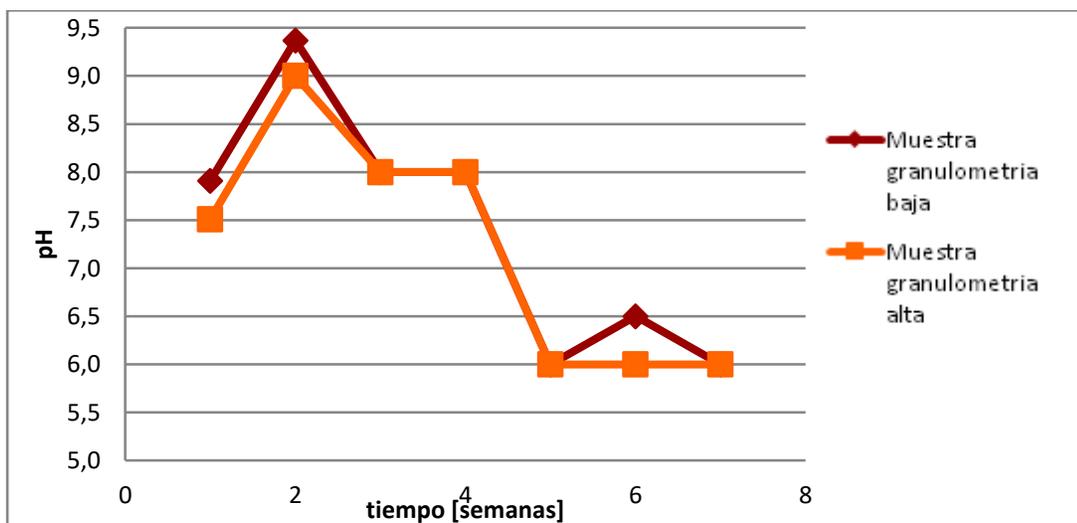
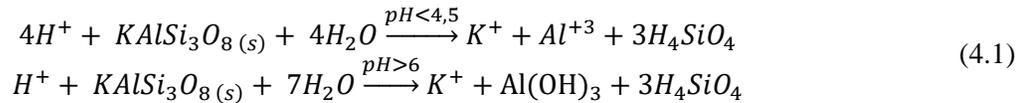


Figura 4.2 Gráfico de la evolución de pH en medio de cultivo para el aislamiento de bacterias desde hormigón corroído proveniente de testigo obtenido desde pavimento de un yacimiento minero de la zona central.

Del análisis de estas variaciones de pH se observa que durante las dos primeras semanas de cultivo, el pH tendió al alza, manteniéndose constante entre las semanas 3 y 4, para comenzar a bajar recién en la semana 5, estabilizándose hacia el final del experimento en $\text{pH} \approx 5,5 - 6$.

Las alzas de pH iniciales fueron debido al consumo de H^+ provocado por la disolución de los silicatos presentes en el cemento, según las siguientes ecuaciones:



Este aumento del pH afectó el crecimiento bacteriano, haciéndolo más lento, pues el medio de cultivo estuvo la mayor parte del tiempo a un pH superior al adecuado para el desarrollo de acidófilas, que son el tipo de bacteria que se espera identificar (Okabe, Odagiri, Ito, & Satoh, 2006) (Sand W. , 1987), por lo que semanalmente se adicionó ácido sulfúrico concentrado hasta alcanzar un pH de 4 a 5, hasta la semana 4 de cultivo.

A partir de la semana 3 aproximadamente, esta alza comienza a ser contrarrestada, una vez que las bacterias presentes en el cemento corroído dejan su estado de latencia y su metabolismo aumenta, produciendo una cantidad de ácido sulfúrico suficiente para compensar el aumento de pH producido por la disolución de silicatos.

A partir del comportamiento del pH en el tiempo, es posible identificar las etapas del crecimiento bacteriano, los cuales presentaron la misma duración para cada uno de los cultivos, como se muestra en la Figura 4.3.

Estas etapas fueron:

- i. Fase Lag: entre las semanas 1 y 2, las bacterias presentes en el hormigón se encuentran en estado de latencia, adaptándose al nuevo medio de cultivo.
- ii. Fase exponencial: entre las semana 4 y 8 se observa una baja considerable del pH debido al aumento de la producción de ácido, producto del crecimiento exponencial de las bacterias.
- iii. Fase estacionara: desde la semana 8 y hasta el fin del experimento se observa una estabilización del pH en el medio, lo que se debe a que la población bacteriana entra en su fase estacionaria de crecimiento.

En resumen, para los 4 cultivos se tienen las siguientes duraciones por cada fase de crecimiento:

Tabla 5. Duración fases de crecimiento bacteriano

Matraz	Días
Fase lag	14
Fase exponencial	21
Fase estacionaria	21

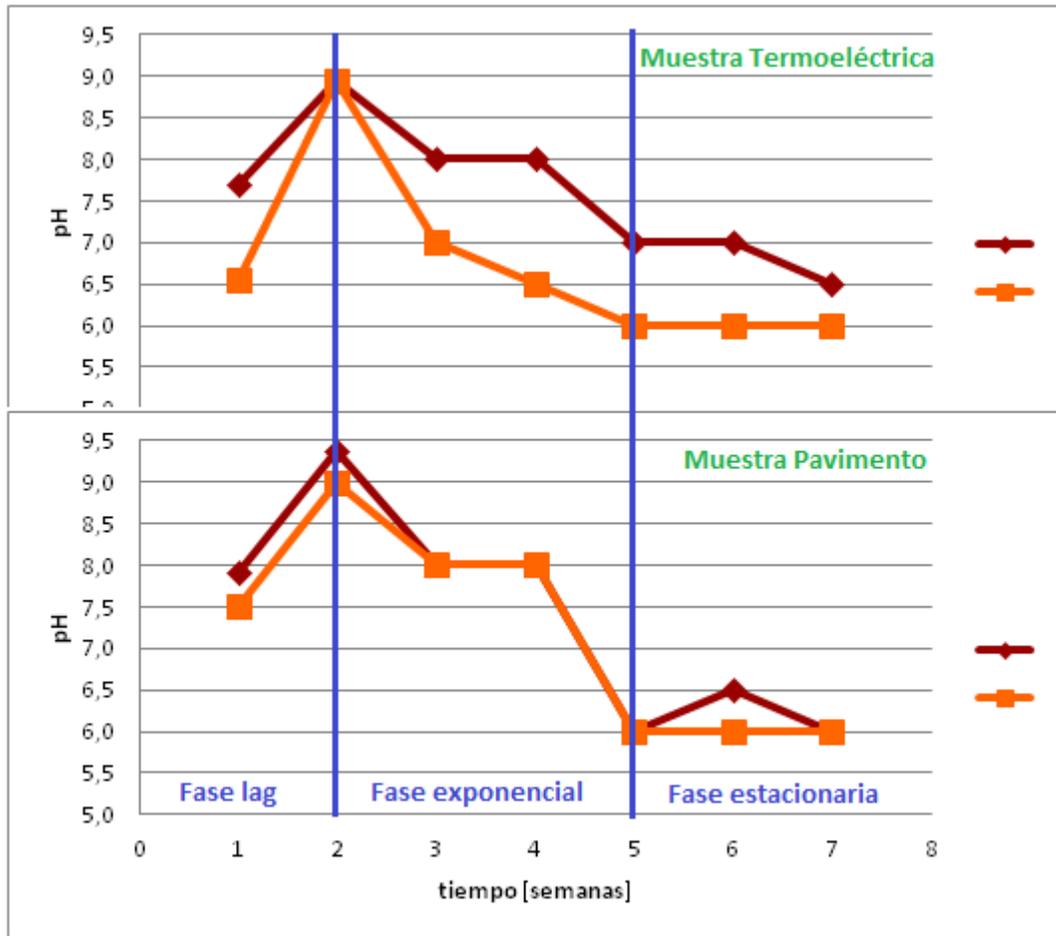


Figura 4.3 Estimación de las fases de crecimiento bacteriano en gráficos de evolución de pH en cultivos para aislamiento de bacterias desde hormigón corroído.

A partir de los datos obtenidos y debido a la similitud en el comportamiento de las curvas graficadas, es posible concluir que la granulometría no es un factor determinante en el desarrollo bacteriano, por lo que se descarta como factor determinante de éste y se postula describir los cambios de pH asociados a este crecimiento bacteriano a través de la aproximación polinomial que se muestra en la Ecuación (4.2):

$$y = -0,03x^4 + 0,55x^3 - 3,54x^2 + 8,59x + 1,89 \quad (4.2)$$

Que describe la curva que se muestra en la Figura 4.4:

Esta ecuación permite caracterizar las 3 fases del crecimiento bacteriano antes descritas, fase lag, fase exponencial y fase estacionaria. Esta relación constituye una buena aproximación del comportamiento de las bacterias desarrolladas, pues aunque no predice con exactitud el pH de las muestras en función del tiempo, permite determinar en cuál de estas fases de crecimiento se encuentra el cultivo.

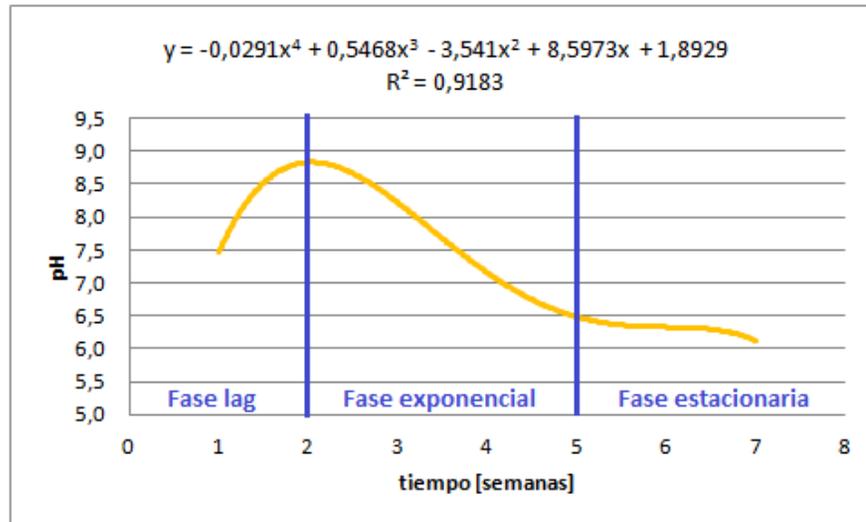


Figura 4.4 Aproximación polinomial de crecimiento bacteriano de cultivos de hormigón corroído y las fases del crecimiento bacteriano que describe.

Estos resultados son concordantes con los obtenidos en otras investigaciones sobre el efecto bacteriano en la corrosión del hormigón, como las que se describen a continuación:

1. Yousefi et al, 2014 en “Accelerated biodegradation of cured cement paste by Thiobacillus species under simulation condition”, como se muestra en la Figura 4.7, la línea continua (CATO) corresponde a los pH medidos en un cultivo de cemento con *A. thiooxidans*, experimento muy similar al planteado en estudio, cuya diferencia radica en la aceleración del proceso a través de un sistema continuo, que permitió disminuir el efecto de consumo de protones debido a la disolución de aluminosilicatos, permitiendo mantener pH menores en el medio de cultivo, propiciando el crecimiento bacteriano. Podemos observar que el comportamiento de la curva es muy similar al obtenido en los cultivos de muestras con corrosión de este trabajo, pudiendo identificar las fases del crecimiento bacteriano, con un aumento del pH inicial correspondiente a la fase lag, luego una rápida disminución en la fase exponencial y por último, y debido al sistema continuo de recambio de medio, en la fase estacionaria se vuelve a pH altos pues no se mantiene una población significativa de bacterias sobre el sustrato.

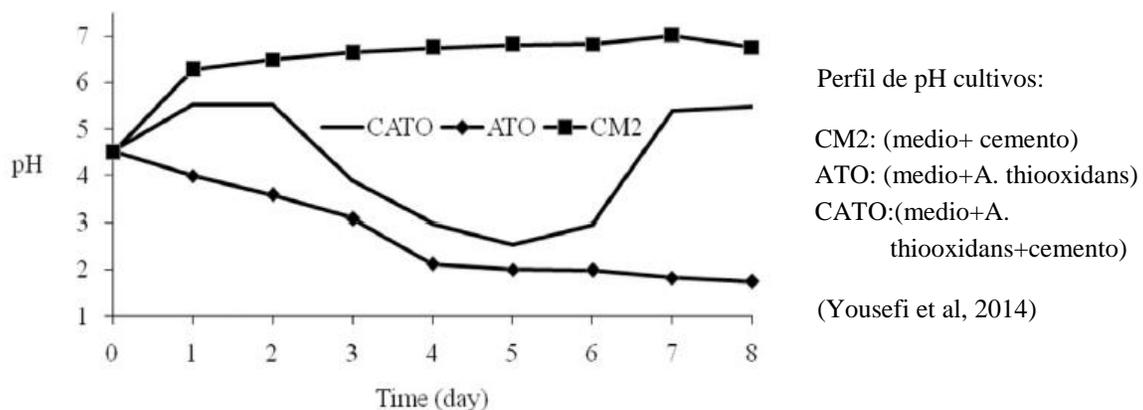


Figura 4.5 Perfil de pH en experimento de Yousefi et al, 2014

2. Okabe, Odagiri, Ito & Satoh, 2006 en “Succession of Sulfur-Oxidizing Bacteria in the Microbial Community on Corroding Concrete in Sewer Systems”. En esta investigación se analizaron los pH superficiales de muestras de hormigón de alcantarillados. tal como se puede apreciar en la Figura 4.76. Al analizarse in situ, no se observa la fase de latencia de las bacterias, pero es posible observar la baja de pH asociada a la fase exponencial y la posterior fase estacionaria a partir del día 100 del estudio, estable alrededor de pH 2.

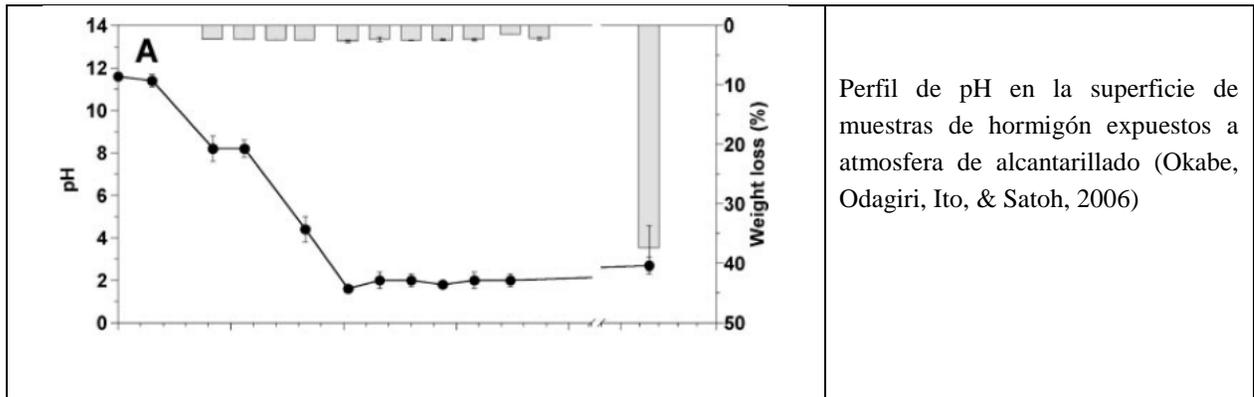


Figura 4.6 Perfil de pH en experimento de Okabe et al, 2006

3. Sand W, 1987 en “Importance of Hydrogen Sulfide, Thiosulfate, and Methylmercaptan for Growth of Thiobacilli during simulation of concrete corrosion”. En el gráfico que se observa en la Figura 4.7, se muestran las mediciones de pH del agua superficial de probetas de cemento Portland mantenidas en una cámara con condiciones de humedad y concentración de H_2S aptas para el desarrollo de una mezcla de bacterias azufre oxidantes (*T. thiooxidans*, *T. intermedius*, *T. novellus* y *T. neapolitanus*) con las que fueron inoculadas por rocío. Debido al diseño experimental, que contemplaba una preparación previa del inóculo, no se observa la fase lag dentro del experimento. Además, ya existía un fenómeno abiótico de baja del pH por la exposición al ácido sulfhídrico. Es posible observar la fase exponencial (desde pH 9 a 5 en una primera etapa), similar a lo ocurrido en la fase exponencial de el experimento de este estudio) y luego una nueva baja hasta a pH 2, donde se mantiene constante en lo que corresponde a la fase estacionaria del crecimiento bacteriano.

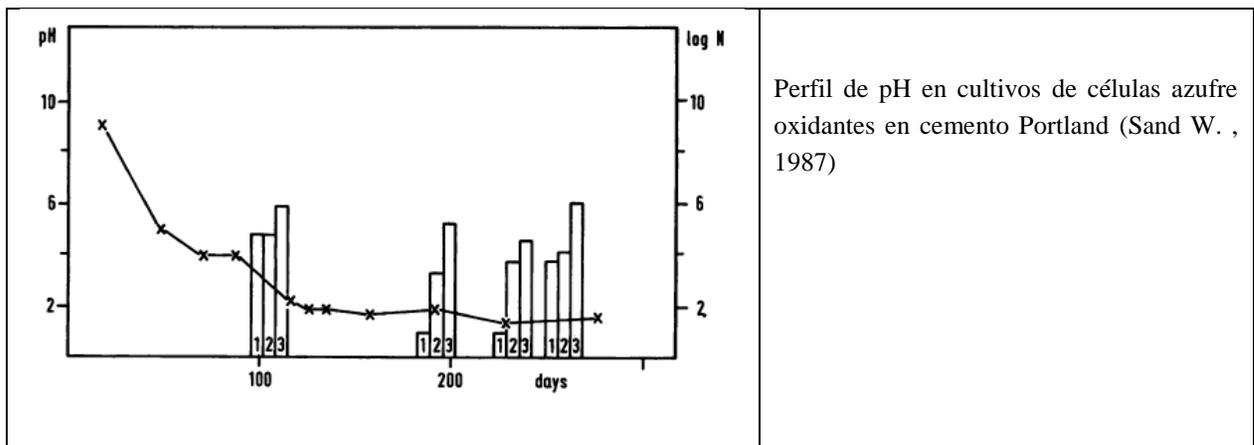


Figura 4.7 Perfil de pH en experimento de Sand, 1987

A partir de los cultivos obtenidos en este trabajo, fue posible obtener una población bacteriana que permitió la posterior identificación de las bacterias *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans* presentes en la muestra, mediante el método de CARD-FISH.

4.2 CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS PLANCTÓNICAS.

Se realizó un recuento directo de bacterias planctónicas para evaluar si la población bacteriana era suficiente para realizar las pruebas de CARD-FISH.

El efecto de la disolución de los silicatos en el aumento del pH incidió en la baja velocidad de desarrollo bacteriano, lo que tuvo un impacto en la población final.

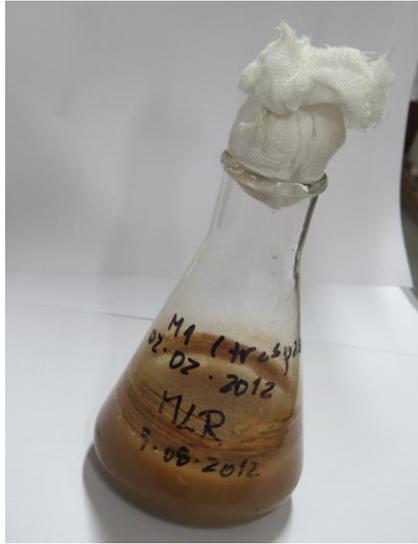
Las concentraciones obtenidas se presentan en la Tabla 4.6.

Tabla 4.6. Concentración celular en matraces

Matraz	Muestra	Concentración bacteriana [células/mL]
M1	Central Termoeléctrica Norte Grande– Granulometría baja	5×10^6
M1'	Central Termoeléctrica Norte Grande– Granulometría alta	10^6
M2	Pavimento yacimiento minero Zona Central – Granulometría baja	10^6
M2'	Pavimento yacimiento minero Zona Central – Granulometría alta	10^6

Luego de 7 semanas de cultivo, y habiendo disminuido el pH hasta $\approx 5,5$, la concentración de microorganismo en suspensión es de alrededor de 10^6 [células/mL]. Esta baja población se puede explicar por el arrastre de bacterias en los sólidos precipitados en el fondo de los matraces de cultivo (presumiblemente CaSO_4), pues es normal que los microorganismos se unan a estos sólidos y precipiten en el cultivo. Este fenómeno es común observarlo en los cultivos de *A. ferrooxidans* en Fe(II) donde las bacterias precipitan unidas a los compuestos de jarosita (Escobar B. , 2015).

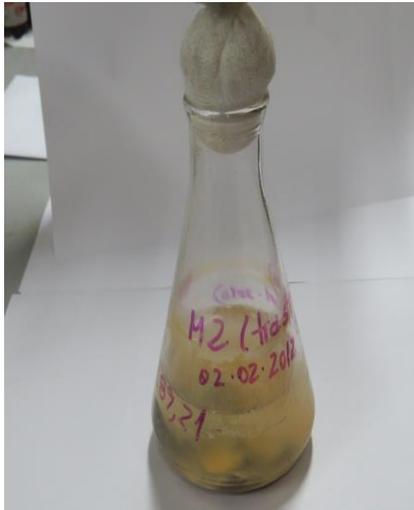
Las concentraciones presentes en cada uno de los matraces son adecuadas para la realización de los ensayos de CARD-FISH. A través de una inspección visual, el cambio de color de estos matraces daba cuenta de la acción de bacterias azufre-oxidantes (Figura 4.8)



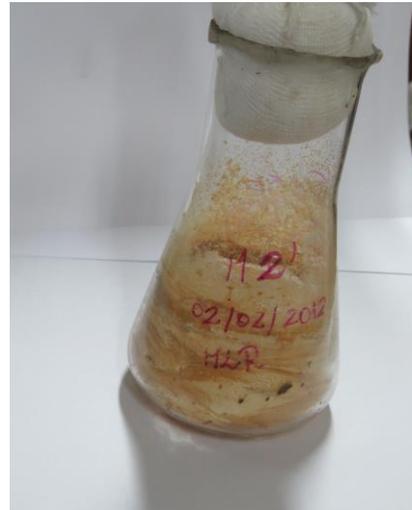
Matraz M1
Central Termoeléctrica Norte Grande –
Granulometría baja



Matraz M1'
Central Termoeléctrica Norte Grande –
Granulometría alta



Matraz M2
Pavimento yacimiento minero Zona Central –
Granulometría baja



Matraz M2'
Pavimento yacimiento minero Zona Central –
Granulometría alta

Figura 4.8. Matraces de cultivos para aislamiento de bacterias desde hormigón corroído.

En las fotografías de observación y recuento de bacterias que se muestran a continuación es posible observar que se encuentran 1 o 2 bacterias por campo, siendo la muestra de M1' (Figura 4.9(a)) la que presenta mayor población.

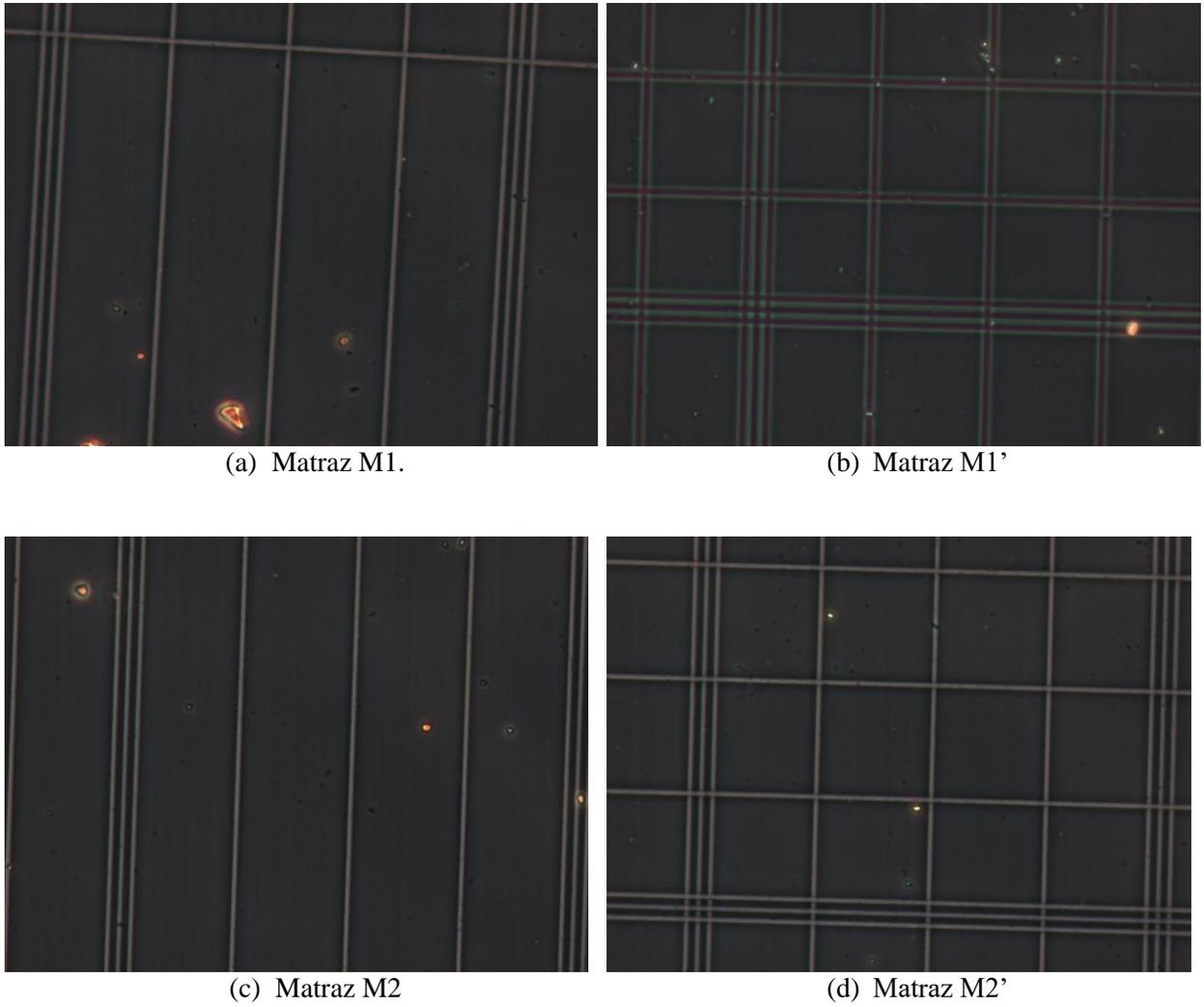


Figura 4.9 Microfotografías que muestran los microorganismos observados para recuento directo en una celda de Neubauer de las distintas muestras.

4.3 IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS POR CARD-FISH

Para la identificación de las bacterias aisladas desde los cultivos de testigos de hormigón que presentaban corrosión, se realizó la prueba de CARD-FISH con sondas para *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans*. según se muestra en la Tabla 4.7.

Se escogieron las sondas de hibridación para las bacterias *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans*, dado que en varios estudios se muestra que los principales microorganismos presentes en hormigón corroído son del tipo *Thiobacillus* (Verstraete, Vincke, & Boon, 2001) (Milde, Sand, & Wolff, 1983) (Kelly & Wood, 2000) (Okabe, Odagiri, Ito, & Satoh, 2006).

- (*A. ferrooxidans*):GGA CTT AAC CCA ACA TCT CA (Bustos, 2005)
- (*A. thiooxidans*):AAG AGG AGC CTA CGT CTG A (Bustos, 2005)

Tabla 4.7. Guía de hibridaciones

Muestra	Matraz de Procedencia	Procedencia de la muestra	Hibridado con sonda de
1	M1	Central Termoeléctrica Norte Grande	<i>A. ferrooxidans</i>
1'	M1	Central Termoeléctrica Norte Grande	<i>A. thiooxidans</i>
2	M1'	Central Termoeléctrica Norte Grande	<i>A. ferrooxidans</i>
2'	M1'	Central Termoeléctrica Norte Grande	<i>A. thiooxidans</i>
3	M2	Pavimento yacimiento minero Zona Central	<i>A. ferrooxidans</i>
3'	M2	Pavimento yacimiento minero Zona Central	<i>A. thiooxidans</i>
4	M2'	Pavimento yacimiento minero Zona Central	<i>A. ferrooxidans</i>
4'	M2'	Pavimento yacimiento minero Zona Central	<i>A. thiooxidans</i>

La técnica de CARD-FISH permite identificar y cuantificar la población de una determinada especie presente en una muestra, diferenciándola de las poblaciones de otras bacterias, cuando se utiliza la tinción con DAPI y luego la hibridación. En el caso de este estudio, debido a la baja población de microorganismos presentes en la suspensión de aislamiento, se utiliza la tinción con el marcador fluorescente DAPI para verificar previamente la presencia de bacterias en la muestra, y la técnica de CARD-FISH fue utilizada solamente para identificar a los microorganismos aislados, no siendo posible su cuantificación.

A continuación se pueden observar las imágenes obtenidas de la tinción con DAPI de los filtros y las imágenes resultantes del método de CARD-FISH correspondiente a cada una de las hibridaciones para cada una de las muestras.

Del análisis de estas imágenes se puede deducir que existía una escasa densidad de bacterias azufre-oxidantes, lo cual sería debido al bajo desarrollo bacteriano producto de alto pH que presentaron cada uno de los medios de cultivo

Adicionalmente, la identificación de las bacterias azufreoxidantes se vio dificultada por la baja densidad de bacterias en solución, al crecer éstas adheridas al material cultivado (hormigón endurecido) y a los minerales precipitados (sulfato de calcio) producto de la corrosión.

Por otro lado, no es posible concluir que la granulometría del material utilizado en el cultivo de aislamiento haya tenido una influencia importante en el crecimiento bacteriano.

4.3.1 Microfotografías de tinciones DAPI y CARD-FISH a una muestra de Central Termoeléctrica Norte Grande – Granulometría Baja (Matraz M1)

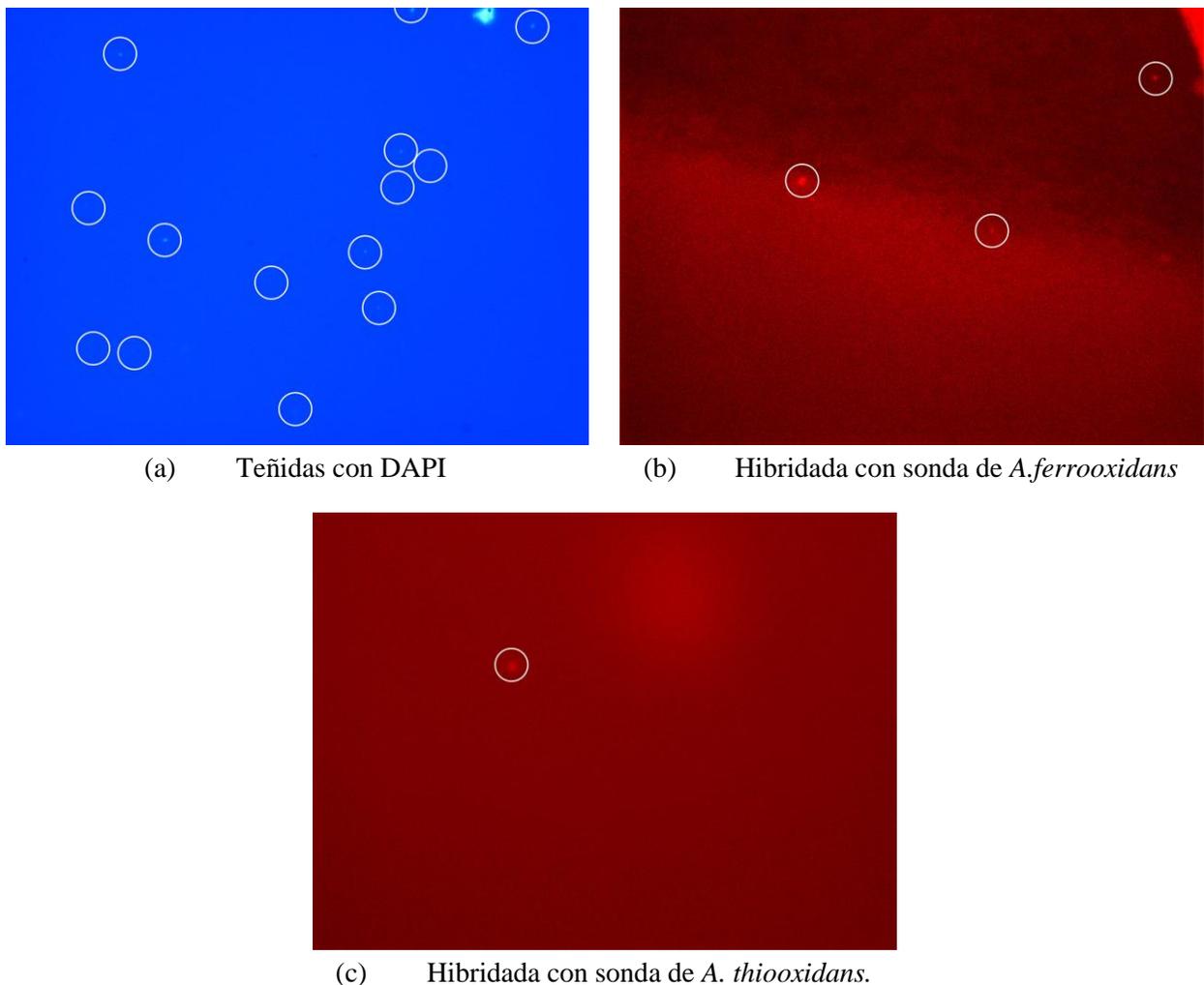


Figura 4.10 Microfotografía que presenta las bacterias de la muestra del matraz M1

En estas imágenes correspondientes al CARD-FISH realizado a las muestras provenientes del Matraz M1 del cultivo de asilamiento, el cual corresponde a una muestra de hormigón corroído extraído desde una Central Termoeléctrica del Norte Grande, es posible apreciar la presencia tanto de bacterias *A. thiooxidans* como de *A. ferrooxidans*, siendo más numerosa la presencia de este último. (3 *A. thiooxidans* en la Figura 4.10 (c) versus 4 *T. ferrooxidans* encontrados en la Figura 4.10 (b)).

4.3.2 Microfotografías de tinciones DAPI y CARD-FISH a una muestra de Central Termoeléctrica Norte Grande – Granulometría Alta (Matraz M1')

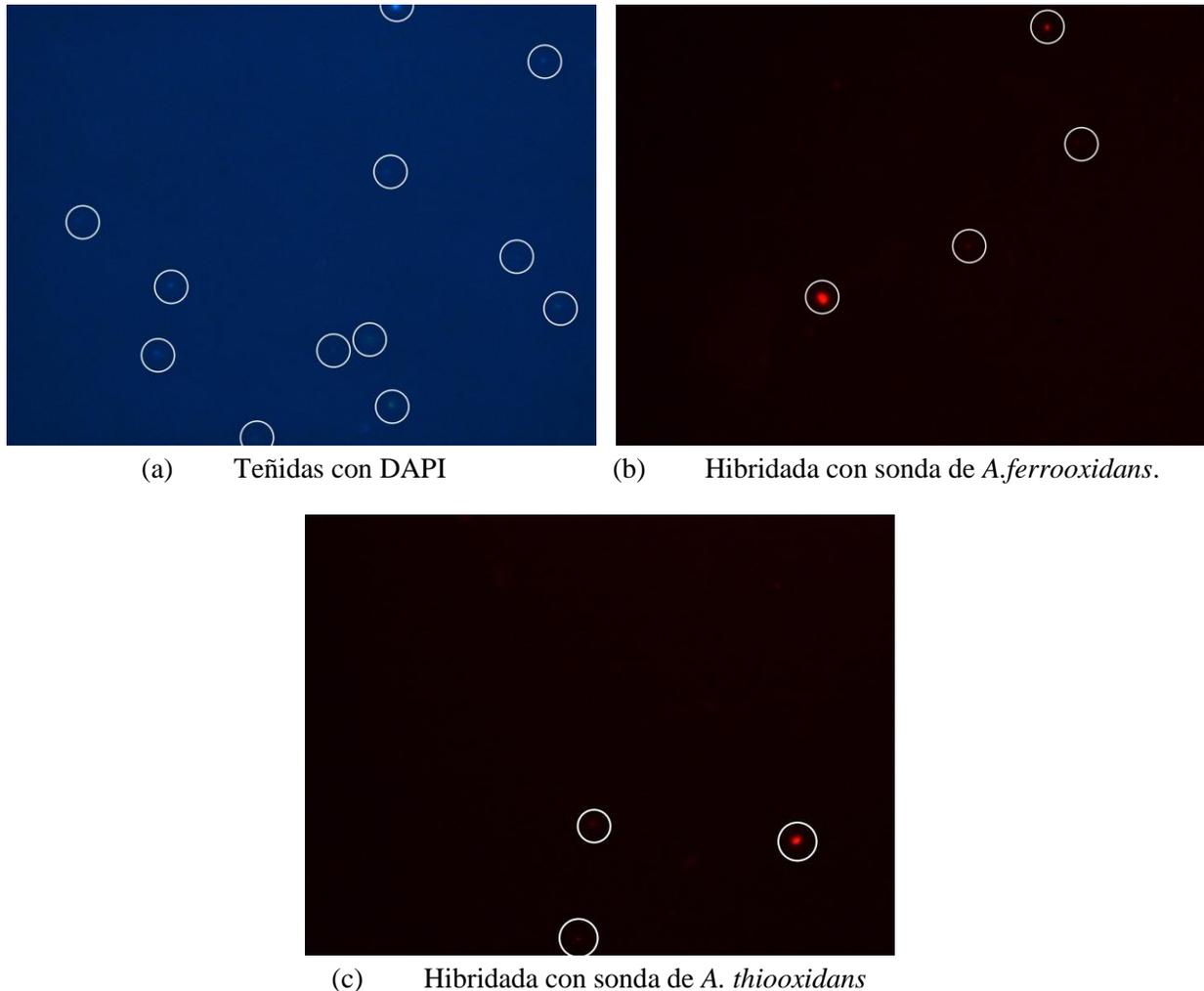


Figura 4.11 Microfotografía que presenta las bacterias de la muestra del matraz M1'

Estas imágenes corresponden a las microfotografías obtenidas de la tinción DAPI y el CARD-FISH realizado a la muestra proveniente del matraz del cultivo de aislamiento M1', que también contenía muestra extraído desde el mismo testigo de hormigón con signos de corrosión obtenido de la Central Termoeléctrica del Norte Grande, pero con una granulometría mayor. Se observan señales de hibridación *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans*, con una frecuencia similar en ambas imágenes (Figura 4.11 (b) y (c))

4.3.3 Microfotografías de tinciones DAPI y CARD.FISH a una muestra Pavimento yacimiento minero Zona Central – Granulometría baja (Matraz M2)

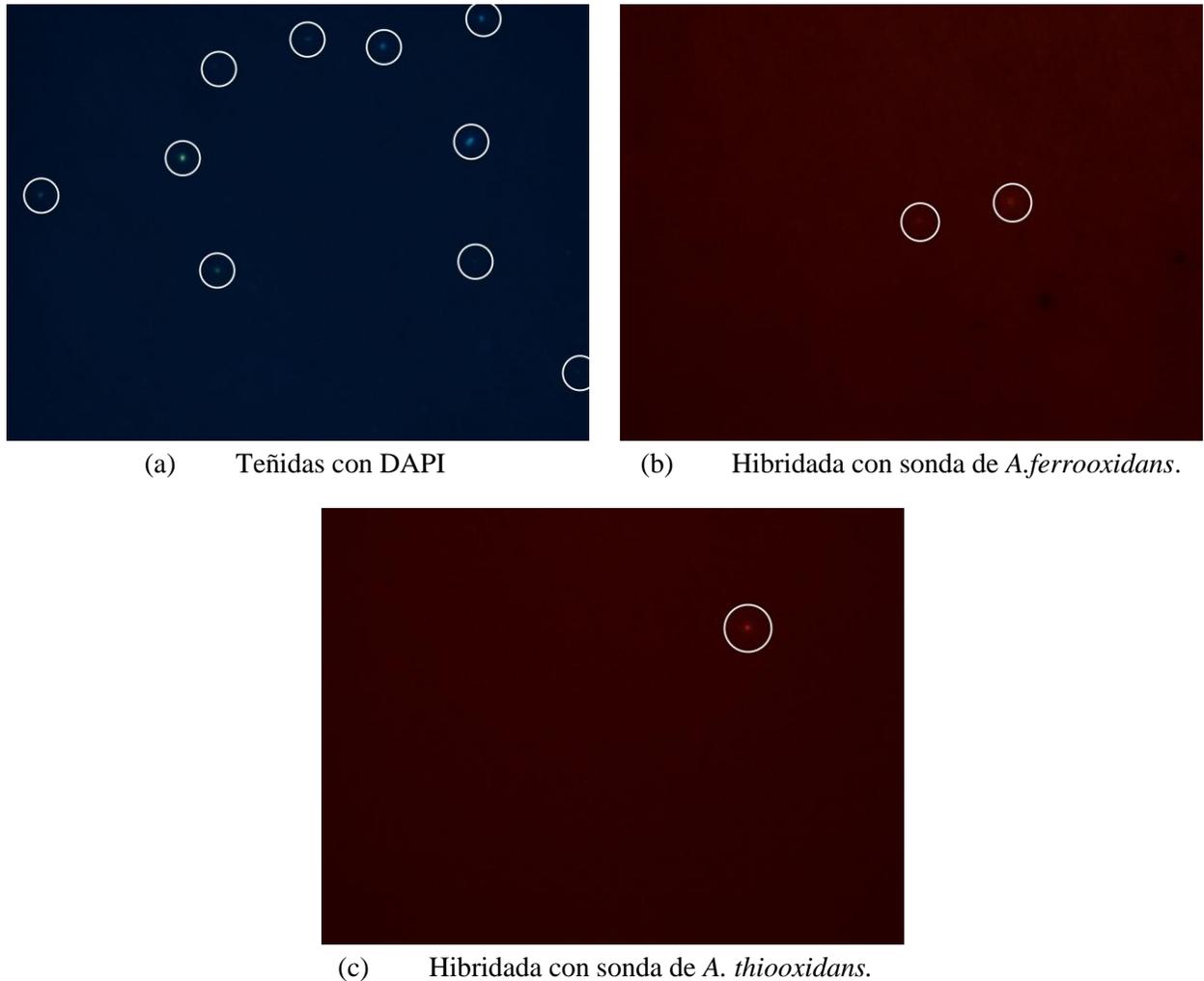


Figura 4.12 Microfotografía que presenta las bacterias de la muestra del matraz M2

Las imágenes de la Figura 4.12 corresponden a la tinción con DAPI y al CARD FISH de la muestra del matraz del cultivo de aislamiento M2, con hormigón corroído obtenido desde el pavimento de un yacimiento minero de la zona central del país. De la tinción con DAPI se observa una escasa presencia de bacterias Figura 4.12 (a) y baja hibridación del CARD-FISH, con señales difusas de *A. ferrooxidans* Figura 4.12(b) y sólo una señal de *A. thiooxidans* Figura 4.12(c).

4.3.4 Microfotografía de tinciones DAPI y CARD-FISH a una muestra de Pavimento yacimiento minero Zona Central – Sin moler (Matraz M2')

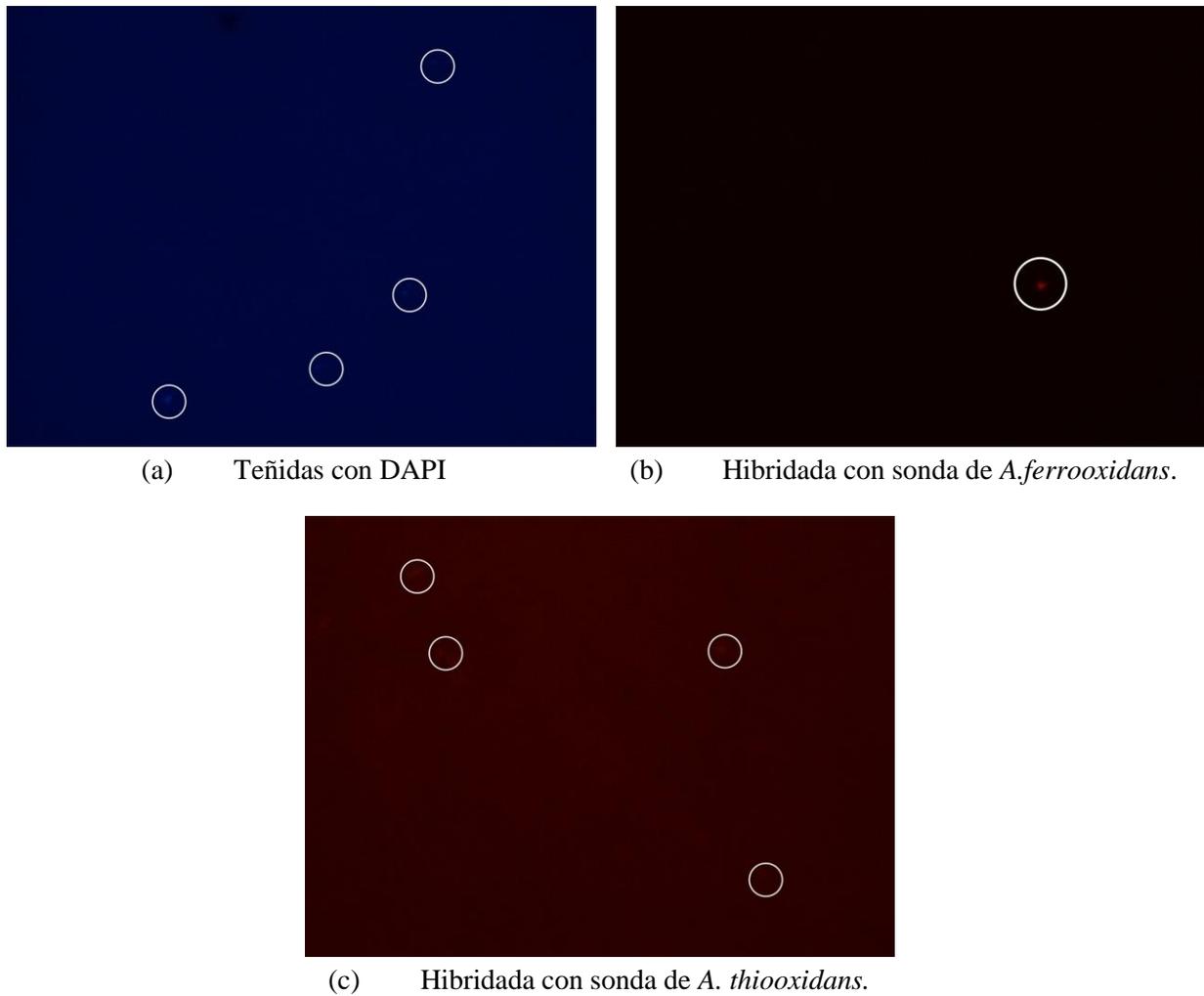


Figura 4.13 Microfotografía que presenta las bacterias de la muestra del matraz M2'

Finalmente, estas microfotografías corresponden al análisis de las muestras provenientes del matraz del cultivo de aislamiento M2', del mismo origen que M2 (con hormigón corroído obtenido desde el pavimento de un yacimiento minero de la zona central del país), pero que se cultivó sin moler. En ellas se observan 4 bacterias de la microfotografía de la tinción con DAPI Figura 4.13 (a) y sólo una *A. ferrooxidans* Figura 4.13 (b). Además se aprecia una señal difusa de *A. thiooxidans* Figura 4.13 (c).

4.4 CULTIVO DE *A. THIOOXIDANS* EN CEMENTO ENDURECIDO PARA EL ESTUDIO DEL EFECTO DE SU METABOLISMO SOBRE EL HORMIGÓN.

4.4.1 Preparación de Inóculo de *A. thiooxidans*

Previamente, a objeto de generar una población bacteriana de una concentración adecuada para el cultivo experimental sobre cemento endurecido (Mortero), se generó un inóculo de *A. thiooxidans* a partir de cultivos permanentes que se mantienen en el Laboratorio de Biohidrometalurgia.

Para hacer seguimiento al crecimiento bacteriano se utilizó el descenso del pH como indicador. Las mediciones obtenidas en los matraces de crecimiento de inóculo se muestran en el Anexo 4

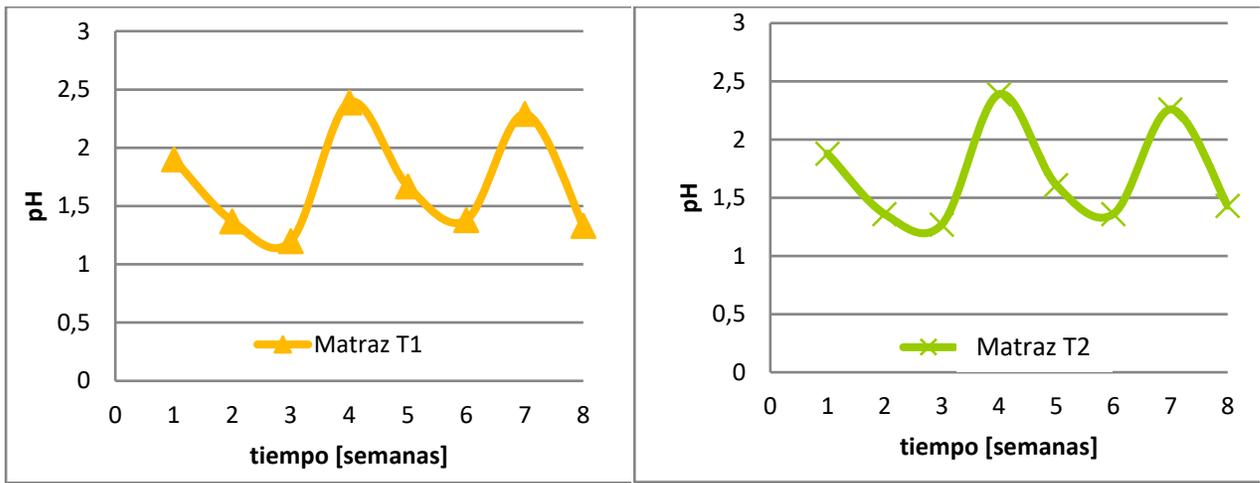


Figura 4.14. Evolución de pH en la preparación de inóculo de *A. thiooxidans*

En estos gráficos de la Figura 4.14 se observan las fluctuaciones de pH en el tiempo producto del crecimiento bacteriano, las bajas de pH se deben a la oxidación de azufre elemental en ácido sulfúrico por el metabolismo bacteriano y las subidas se deben al recambio del medio de cultivo que se realizó periódicamente para no inhibir el crecimiento bacteriano por baja de pH inferior al pH apto para *A. thiooxidans*. En forma global esta reacción se representa por la siguiente ecuación estequiométrica (Konishi, Noriaki, & Asai, 1995):



Luego de 7 semanas, fue posible obtener 100 [mL] de inóculo en cada matraz, con una población bacteriana de densidad 3×10^7 [bacterias/mL] para el matraz T1 y de 3×10^6 [bacterias/mL] para el matraz T2.

4.4.2 Determinación de pH en cultivo de *A. thiooxidans* con cemento endurecido.

En la Figura 4.15 se puede apreciar la evolución del pH en el medio de cultivo de cada uno de los matraces inoculados con *A. thiooxidans*. Los matraces de control contenían una solución de Timol en etanol al 2% en vez de inóculo bacteriano. Las tablas de datos con las que se construyeron estos gráficos se muestran en el Anexo 8 (Tabla 8.6).

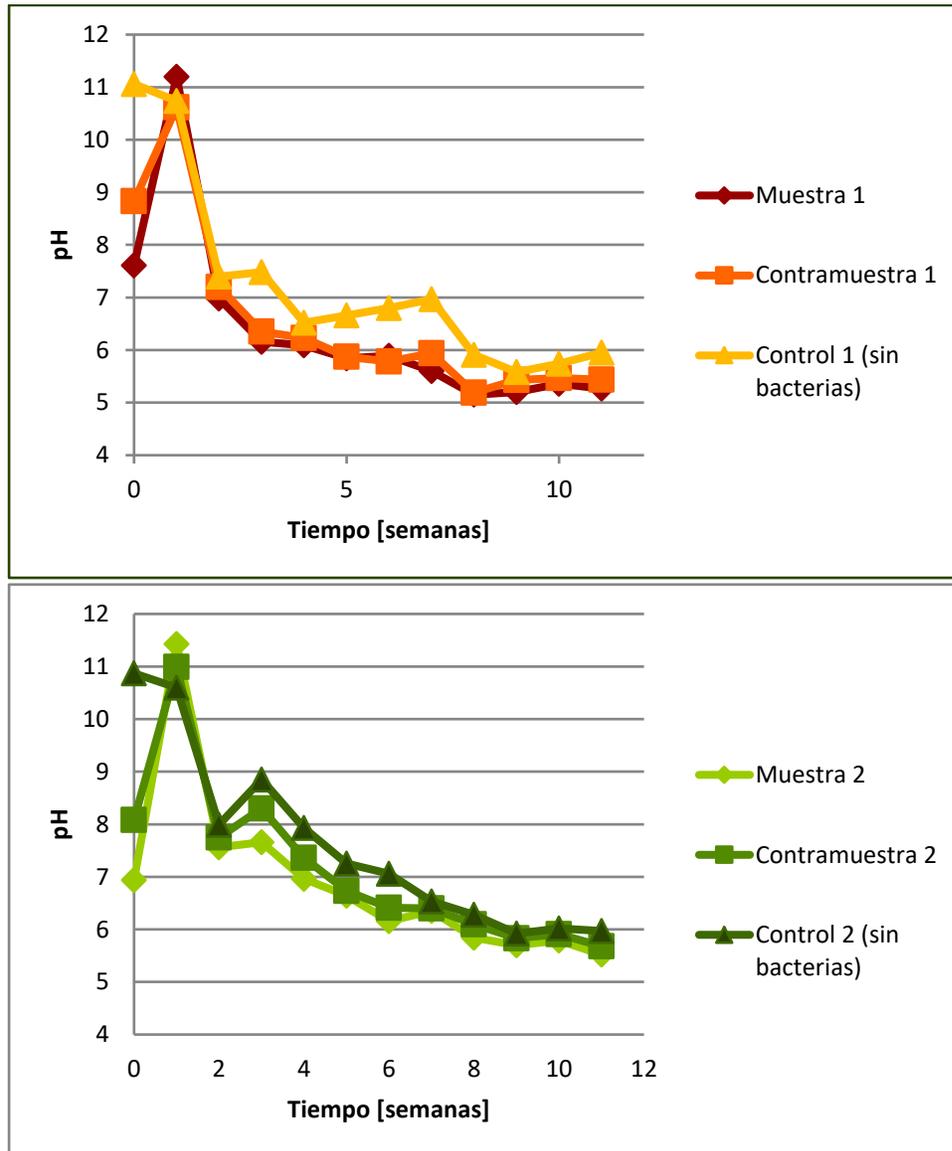
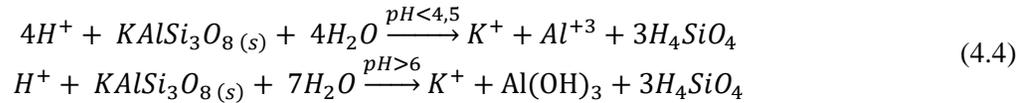


Figura 4.15 Evolución de pH en medio de cultivo de *A. thiooxidans* en cemento endurecido para las muestras 1 y 2.

Se observa que inmediatamente después de agregar el cemento endurecido al matraz con un medio de cultivo de pH < 2, se produce una disolución de silicatos, con un gasto de protones que provoca el aumento del pH.

Esta reacción de disolución sigue la siguiente estequiometría de reacción:



Esta subida de pH será contrarrestada por la producción de ácido de la oxidación bacteriana del azufre, generando fluctuaciones en el pH por la contraposición entre un fenómeno y el otro, dependiendo de la fase del crecimiento bacteriano de *A. thiooxidans* en que se encuentre el cultivo.

La diferencia inicial de pH entre los experimentos inoculados con bacterias (entre pH 7 y pH 9) y los controles (alrededor de pH 11), se debe a la diferencia de pH entre los inóculos (alrededor de pH 1,5) y la solución de timol en etanol (pH ≈ 7), los cuales al entrar en contacto el medio de cultivo con el cemento, cambian el pH de este, el que rápidamente vuelve a subir, quedando alrededor de pH 11 para todos los matraces. Entre la semana 0 y la semana 3 aproximadamente, en que la población bacteriana se encuentra en su fase de latencia, la disolución de silicatos con el consiguiente consumo de protones tiene una tasa mayor que la biogeneración de H₂SO₄, por lo que el pH de la solución aumenta. Entre la semana 4 y la 8 se observa un descenso sostenido del pH, que correspondería a la fase de crecimiento exponencial de las bacterias, donde la tasa de producción de ácido es mayor al consumo de protones por la disolución del cemento. A partir de la semana 9 se observa una estabilización del pH en el medio de cultivo, lo que se corresponde con la fase estacionaria del crecimiento bacteriano.

Cabe destacar que los pH iniciales medidos en los medios de cultivo en cada matraz, estuvieron por sobre el pH al cual se desarrollan las *A. thiooxidans* (desde pH 6 aproximadamente), lo que constituyó el principal factor de retardo del desarrollo bacteriano al comienzo del experimento.

4.4.3 Determinación de concentración de sulfatos en cultivo de *A. thiooxidans* con cemento endurecido.

En Figura 4.16 Evolución de la concentración de sulfatos y pH en solución en medio de cultivo de *A. thiooxidans* en cemento endurecido se presenta la variación en la concentración de ion sulfato y la variación de pH en el tiempo para cada experimento. Cada experimento está compuesto por un matraz de muestra y uno de contramuestra, ambos inoculados con 10 [mL] de *A. thiooxidans*, además de un control que contiene 10 [mL] de timol en metanol al 2%. Para el primer experimento se utilizó una concentración de *A. thiooxidans* de 3x10⁷[bacterias/mL] y 3x10⁶ [bacterias/mL] para el segundo.

Al comparar las concentraciones de los matraces de control con aquellos que fueron inoculados con *A. thiooxidans*, se observa que la concentración inicial de sulfatos es menor en los matraces de control y se mantiene relativamente constante hasta la semana 4, momento en el cual empieza a subir, hasta equiparar las concentraciones de los otros matraces hacia el final del experimento.

La diferencia inicial de sulfatos, se explica por la acción de las bacterias que han colonizado previamente las perlas de azufre en el nuevo matraz.

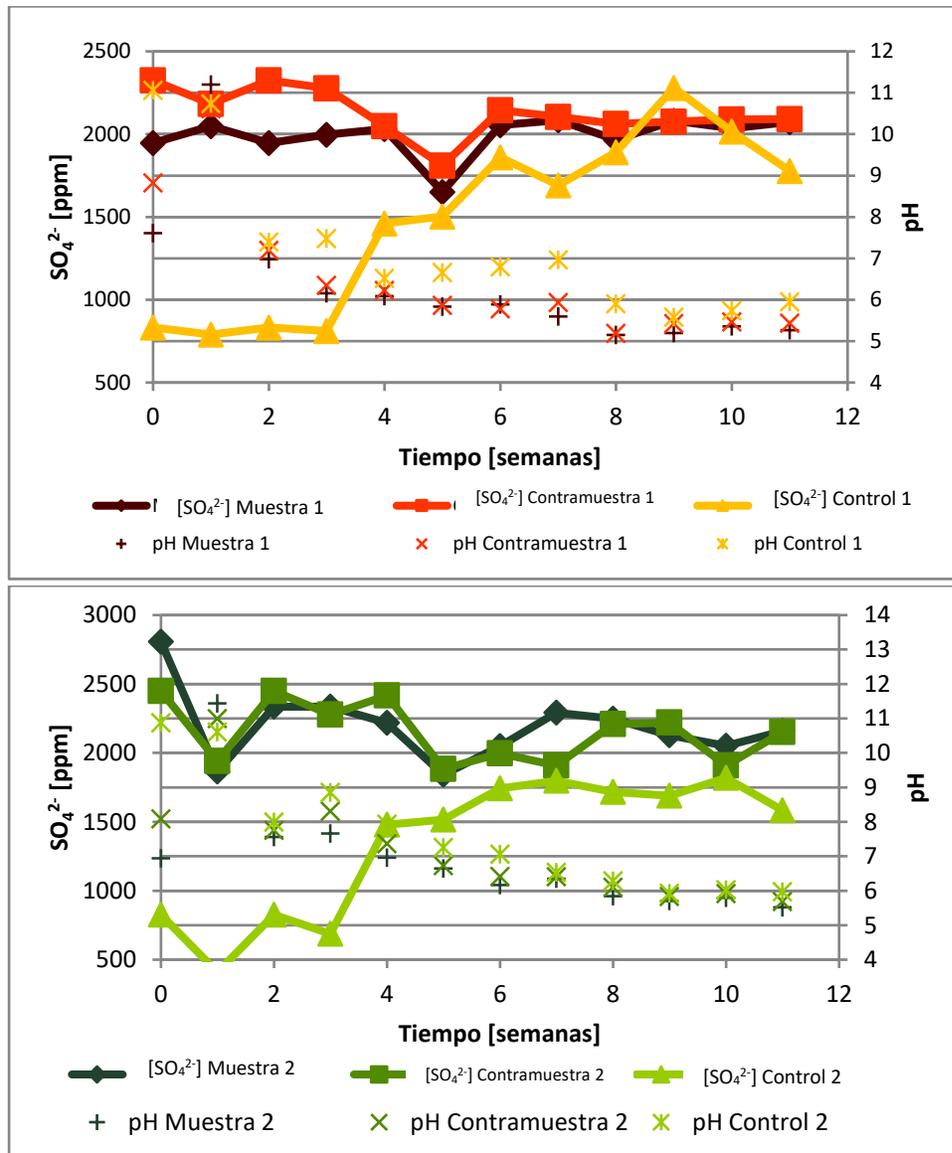


Figura 4.16 Evolución de la concentración de sulfatos y pH en solución en medio de cultivo de *A. thiooxidans* en cemento endurecido

En los matraces que fueron inoculados con bacterias, se observan oscilaciones en las concentraciones de sulfato, que luego se estabilizan alrededor de las 2000 ppm aproximadamente. A partir de la semana 6, que es cuando se alcanzan estas concentraciones, se observa que en los matraces se produce la precipitación de un polvo blanco, con características de color y textura de yeso o sulfato de calcio. En las fotografías de la Figura 4.17 se puede observar este precipitado en los matraces.



Figura 4.17. Fotografías matraces del Cultivo de *A. thiooxidans* en medio de cultivo con cemento endurecido.

La estabilización de las concentraciones de sulfato en solución, a pesar del avance de la corrosión observable en los matraces, se debe a su precipitación en forma de sulfato de calcio. Las solubilidades del CaSO_4 reportadas en la literatura para soluciones acuosas multicomponentes (que incluyen H_2SO_4 , MgSO_4 , HCl , entre otros, además de CaSO_4) a 25°C , oscilan entre las 1500 y las 2500 ppm (Azimi V., 2010) (Dutrizac, G, & V.G., 2007), según la variación de las concentraciones de las otras componentes de la solución.

En este experimento no fue posible determinar todos los otros componentes presentes en el cemento endurecido, ni sus concentraciones, por lo que no se pudo corroborar teóricamente el comportamiento de la concentración de sulfato de Calcio y su solubilidad, la que es fuertemente dependiente de las concentraciones de los otros iones presentes en la solución.

En los matraces de control se observa un aumento paulatino y lento de la concentración de SO_4^{2-} y una disminución del pH, ambos parámetros finalmente se estabiliza en los mismos niveles de los matraces con bacterias. No se descarta una posible contaminación de estos experimentos, lo que sin embargo, no fue corroborado en una inspección al microscopio. Dado el comportamiento de los sulfatos, se sostiene que estos comportamientos se deben a reacciones meramente químicas dentro de la solución, las que fueron favorecidas y aceleradas por el recambio de medio de cultivo, producto de la reposición del volumen retirada para realizar las mediciones.

Para explicar los resultados obtenidos hacia el final del experimento, se plantean que existe una componente meramente química del proceso de corrosión, provocada por el pH de la solución y la interacción con la acidez del medio de cultivo que disuelve los minerales constituyentes del cemento endurecido, liberando a la solución los sulfatos presentes en este.

La diferencia de velocidad entre la disolución de sulfatos de los matraces inoculados con el matraz de control, se explicaría porque existe una componente bacteriana que acelera este proceso.

4.4.4 Determinación de la concentración de Ca^{2+} en cultivo de *A. thiooxidans* con cemento endurecido.

En este estudio, como un parámetro que diera cuenta de la corrosión del cemento endurecido, la pérdida de masa y con la consecuente transferencia a la fase líquida, se realizó el seguimiento de la concentración de ion calcio en solución en el medio de cultivo de cada uno de los matraces para evaluar el avance de la corrosión producida por la biogeneración de H_2SO_4 a través de la oxidación de azufre mediada por *A. thiooxidans*.

En la Figura 4.18 se muestran la evolución de las concentraciones de ion Calcio en disolución, medida mediante absorción atómica, para cada uno de los matraces del experimento.

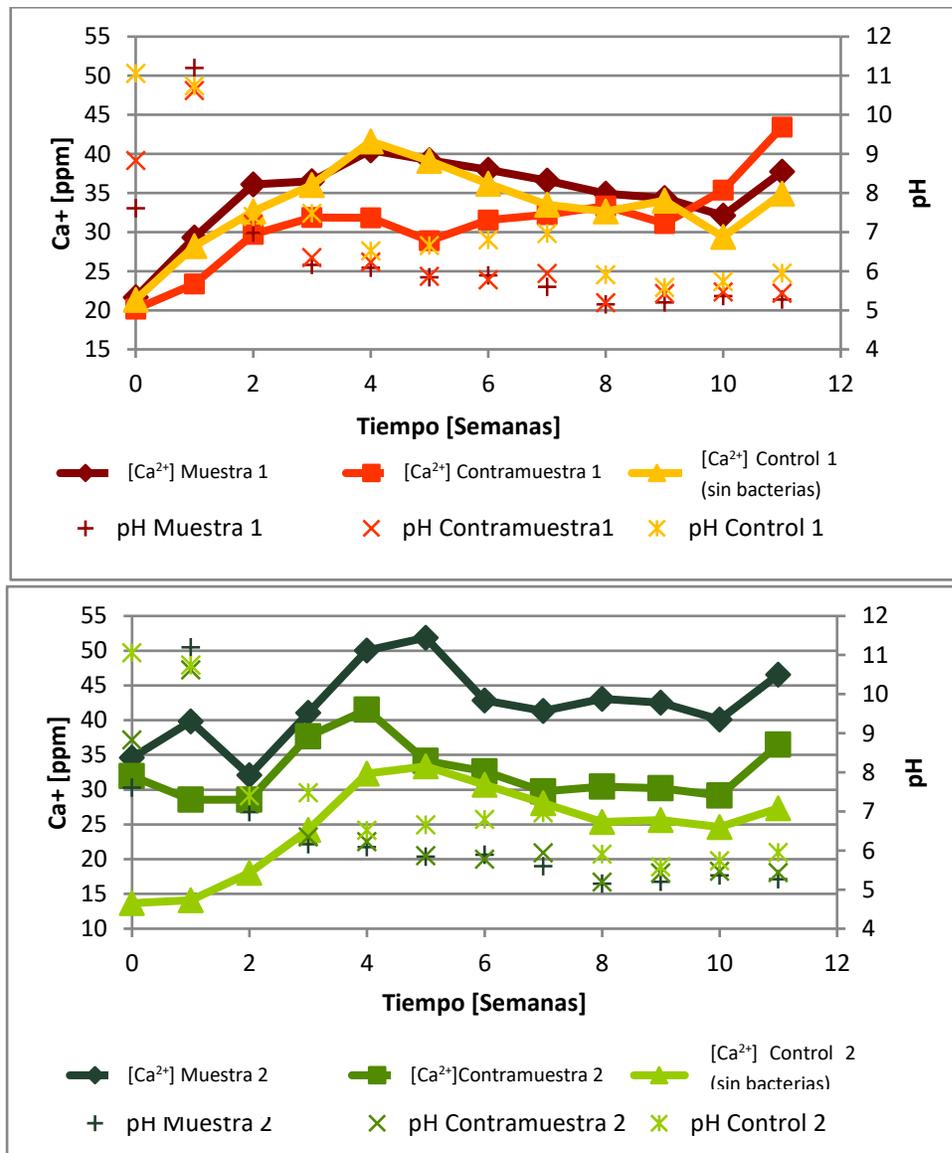
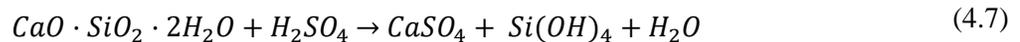
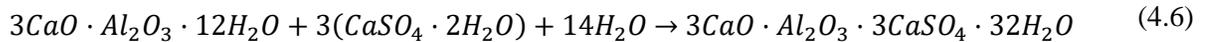


Figura 4.18 Evolución de la concentración de ion calcio en solución y pH en medio de cultivo de *A. thiooxidans* en cemento endurecido

Se observa que las concentraciones de calcio en solución son menores en los dos matraces de control, aunque la curvas en ambos gráficos tienen un comportamiento similar, que luego de una subida inicial, se mantienen relativamente estables entre las 30 y 40 [ppm], con mínimas fluctuaciones y con un leve aumento al final.

Esta estabilización de las concentraciones de calcio se explica, como se dijo anteriormente, por la precipitación en forma de sulfato de calcio de los iones sulfato y los iones calcio en solución producto del ácido producido por las bacterias y su efecto disolviendo los compuestos cálcicos presentes en el cemento.

Las reacciones involucradas en el mecanismo de corrosión del cemento por ácido sulfúrico en este proceso se muestran a continuación (Monteny J, 2000):



La evaluación del avance de la corrosión del cemento endurecido, en el desarrollo de este experimento, se vio limitada por la dificultad de medir el total de iones Ca^{2+} generados en el proceso corrosivo, debido al exceso de H_2SO_4 y a su precipitación en forma de sulfato de Calcio, pudiendo sólo establecerse la diferencia entre el tiempo que demoraron los experimentos con bacterias y los controles sin bacterias, en alcanzar las concentraciones de saturación.

Debido a que no se conocían con certeza los otros compuestos presentes en el cemento endurecido ni sus concentraciones (minerales metálicos y no metálicos), no fue posible realizar una especiación y balance de masa por elemento que permitiera conocer la cantidad total de Calcio en el sistema.

Por consiguiente, tampoco fue posible determinar teóricamente la cantidad de iones Ca^{2+} liberado al medio de cultivo producto del proceso corrosivo, a partir de las concentraciones medidas en solución, pues las solubilidades tanto del ion Ca^{2+} como del SO_4^{2-} son fuertemente dependientes, además del pH, de las concentraciones de los otros iones en la solución, por ejemplo Magnesio, Manganeso, Fierro y Níquel entre otros. (Azimi V., 2010)

5. Conclusiones

Se realizó un estudio de la cinética de la corrosión mediada por microorganismos sobre el hormigón.

En muestras de hormigón que presentaban inicialmente corrosión, se obtuvo desarrollo de bacterias azufreoxidantes luego de contactarlo con un medio de cultivo estéril a 30°C durante 7 semanas. Este desarrollo bacteriano fue constatado a través de la baja de pH del mismo medio, y luego verificado por observación al microscopio.

Las bacterias aisladas se identificaron utilizando la técnica de CARD-FISH, como *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans*, probando la hipótesis inicial de la intervención de bacterias azufreoxidantes en el proceso de corrosión.

En la segunda etapa de este estudio fue posible observar, mediante el cultivo de *A. thiooxidans* en cemento endurecido como sustrato, una aceleración del proceso de corrosión bacteriano de 4 semanas, en comparación con las muestras de control sin bacterias.

Debido a la inestabilidad de los compuestos que se escogieron como indicadores del proceso de corrosión, los iones Ca^{2+} y sulfato, sólo se pudo apreciar cualitativamente el efecto de las bacterias *A. thiooxidans* sobre la corrosión del hormigón.

Mediante este estudio fue posible determinar que en un ambiente acuoso de $\text{pH} \leq 7$ ya es posible observar el proceso de corrosión biológica en el hormigón, como resultado de la oxidación de azufre por bacterias azufre oxidantes, ya sea desde azufre elemental, como de compuestos orgánicos de azufre reducido.

Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con los últimos datos publicados en la literatura científica relativa a este tema.

Es posible concluir que para aumentar la durabilidad de las estructuras construidas de hormigón, se deben controlar los factores que favorezcan el desarrollo bacteriano, estos son:

- Disminuir el contenido de azufre tanto del cemento como de los agregados (arena, grava y piedras), ya sea oxidado como sulfato o reducido con sulfuro, limitando el sustrato de las bacterias que lo metabolizan, evitando el inicio y desarrollo del proceso de biocorrosión.
- Mantener alto el pH (≥ 9) de los efluentes que estén en contacto con las estructuras de hormigón, inhibiendo el desarrollo bacteriano.

Por último, se proponen algunos puntos a considerar para el desarrollo de un nuevo diseño experimental.

6. Recomendaciones

Se entregan a continuación una serie de recomendaciones con respecto al diseño experimental y análisis de los productos del metabolismo bacteriano resultantes de su ejecución, con el objetivo de mejorar los resultados y conclusiones obtenidas en un futuro estudio:

6.1 PARA EL AISLAMIENTO DE BACTERIAS DESDE HORMIGÓN CORROÍDO

Se recomienda:

- Considerar un medio de cultivo que sea capaz de compensar el efecto del aumento del pH producto del consumo de H^+ por la disolución del cemento durante el cultivo.
- Disminuir el tiempo de cultivo o realizar varias pruebas de CARD-FISH en distintos tiempos, para encontrar el momento de mayor presencia de bacterias
- Considerar una mayor gama de microorganismo a ser identificados y sus posibles interacciones con las bacterias acá estudiadas, por ejemplo, hongos.

6.2 PARA EL DESARROLLO DE *A. THIOOXIDANS* EN MEDIO DE CULTIVO CON CEMENTO ENDURECIDO

- Conocer y considerar en el diseño experimental las constantes de solubilidad de cada uno de los iones involucrados, tanto los que se producen por la disolución química del cemento, como aquellos productos del metabolismo bacteriano, y la interacción entre estos.
- Considerar para el diseño experimental y para el análisis de los productos presentes en el medio de cultivo, la capacidad del cemento de consumir protones, produciendo un aumento del pH que afecta el desarrollo bacteriano. Una manera de controlar esto es trabajar con tamaños de partículas mayores, disminuyendo la superficie de cemento expuestas al medio, favoreciendo la colonización de las bacterias en su superficie.
- Considerar y contabilizar la cantidad y tipo de iones que son traspasados al matraz de cultivo junto con el inóculo de bacterias, los que distorsionan las mediciones de iones posteriores.
- Considerar otro medio de medición de corrosión y pérdida de masa del cemento, que no implique la medición de iones, debido a su dificultad técnica y a sus múltiples distorsiones, las que se ven en el presente trabajo. Por ejemplo, un análisis gravimétrico de la cantidad de cemento presente en cada tiempo de medición. La complejidad de este método radica, entre otros puntos, en que se requerirá de un matraz de experimento por cada tiempo que se requiera medir, pues las muestras deben ser secadas y por lo tanto, no pueden continuar con el proceso de cultivo.

- Analizar todos los compuestos presentes una vez terminado el experimento, incluidos los compuestos del mortero (para comparar con la concentración inicial y verificar su pérdida de masa), y los sólidos precipitados.

Para ambos casos, se recomienda generar una configuración que asemeje más a las condiciones reales de las estructuras de hormigón, en las cuales hay flujos acuosos con material orgánico y bajo pH, lo que compensa la subida de pH y potencia el desarrollo bacteriano.

7. Bibliografía

A REVIEW of the structure, and fundamental mechanisms and kinetics of the leaching of chalcopyrite por Y. Li "et al". (2013). *Advances in Colloid and Interface Science*, 197-198(): 1 - 32.

ACEVEDO, F. G. (s.f.).

ACEVEDO, F. (2000). *The use of reactors in biomining processes*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 3(): 184 - 194.

ACEVEDO, F., GENTINA, J.C. (2005). *Fundamentos y Perspectivas de las Tecnologías Biomineras*. Chile, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso: Ediciones Universitarias de Valparaíso.

ANALYSIS of the elemental sulfur bio-oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* with sulfur K-edge XANES por Huan He "et al". (2011). *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 27(): 1927 - 1931.

ANTIÑOLO, A. (s.f.). *Universidad de Castilla - La Mancha, Profesorado, Química Inorgánica*. Obtenido de Tema 7: Oxígeno y Azufre: <http://www.uclm.es/profesorado/afantinolo/docencia/inorganica/Tema7/Trans_T7IQ.pdf> [consulta: 12 enero 2014]

Asociación de Productores de Cemento . (2015). *www.asocem.org.pe*. Recuperado el 31 de enero de 2016, de <http://www.asocem.org.pe/estadisticas-internacionales>

ASSESSMENT of recoverable forms of sulfur particles used in bioleaching of contaminated sediments por Shen-Yi Chen "et al". (2003). *Water Research*, 37(): 450 - 458.

Azimi V., P. V. (2010). Thermodynamic modeling and experimental measurement of calcium sulfate in complex aqueous solutions., (págs. 88-94).

BAILEY, J. O. (1986. 984p). *Biochemical Engineering Fundamentals*. New York: McGraw-Hill.

BALLESTER, Antonio. (s.f.).

Basulto, R. (2013). *75 años de Viña del Mar 1879-1954*. Viña del Mar .

BHATTI, T. YAWAR, W. (2010). *Bacterial solubilization of phosphorus from phosphate rock containing sulfur-mud*. *Hydrometallurgy*, 103(): 54 - 59.

Biczok, I. (1981). *Corrosión y Protección del Hormigón* (primera ed.). Bilbao, España: Ediciones URMO S.A.

BLANCARTE-ZURITA, M. A. (1985). *Particle size effects in the microbiological leaching of sulfide concentrates by T. ferrooxidans*. *Biotechnol. Bioeng.*, 28(): 751 - 755.

Bobrow. (1998).

- BOSECKER, Klaus. (1997). *Bioleaching: metal solubilization by microorganisms*. FEMS Microbiology Reviews, 20(): 591 - 604.
- BREED, A. W. (1999). *Modeling Continuous Bioleach Reactors*. Biotechnology and Bioengineering, 64(6): 671 - 677.
- BRIERLEY, C. (2008). *How will biomining be applied in future?* Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 18(): 1302 - 1310.
- Bustos, K. (2005). *Identificación de bacterias hierrooxidantes en procesos de biolixiviación mediante técnicas moleculares*. (D. d.-U. Chile, Ed.) Santiago de Chile: Tesis Ingeniería Civil en Biotecnología.
- Cámara Chilena de la Construcción . (2015). *Informe Macroeconomía y construcción*. Santiago : CChC.
- CASTRO, L. M. (s.f.). *Universidad de San Martín*. Obtenido de Rocas Fosfáticas: <http://www.unsam.edu.ar/institutos/centro_ceps/investigaciones/fertilizantes/capitulo3.pdf> [consulta: 12 enero 2014]
- CHANG, R. (2002. 1004p). *Química (7° ed ed.)*. México, D.F.: McGraw-Hill.
- CHILDS, P. (s.f.). *University of Limerick*. Obtenido de The discovery and production of phosphorus: <http://www3.ul.ie/~childsp/CinA/Issue60/TOC55_Urine.htm> [consulta: 12 enero 2014]
- CMG UZ Brussels, Belgium. (2011). www.brusselsgenetics.be. Recuperado el 25 de Abril de 2015, de http://www.brusselsgenetics.be/p_463.htm
- COCHILCO. (s.f.). *Dirección de Estudios y Políticas Públicas*. Obtenido de Biolixiviación: desarrollo actual y sus expectativas: <http://www.cochilco.cl/descargas/estudios/tematico/innovacion/estudio_biolixiviacion.pdf> [consulta: 12 enero 2014]
- COLMER, A. R. (1947). *The role of microorganisms in acid mine drainage: A preliminary report*. Science, 106(): 253-256.
- COPPER recovery from chalcopyrite concentrate by acidophilic thermophile *Acidianus brierleyi* in batch and continuous-flow stirred tank reactors por Yasuhiro Konishi "et al". (2001). *Hydrometallurgy*, 59(): 271 - 282.
- CRUNDWELL, F. (2003). *How do bacteria interact with minerals?* *Hydrometallurgy*, 71(): 75 - 81.
- CRUNDWELL, F. K. (2000). *Modeling, Simulation, and Optimization of Bacterial Leaching Reactors*. *Biotechnology and Bioengineering*, 71(4): 255 - 265.
- CRUNDWELL, F. K. (1995). *Progress in the mathematical modelling of leaching*. *Hydrometallurgy*, 39(): 321-335.
- DEVELOPMENT of a mathematical model for continuous tank bioleaching por L. Bircumshaw "et al". (2006). *The Journal of The South African Institute of Mining and Metallurgy*, 106(): 277-282.

Dirección de Vialidad . (6 de Octubre de 2014). “Ministro de Obras Públicas, Alberto Undurraga: Asumimos este histórico presupuesto como un tremendo desafío reactivador y de equidad”. www.vialidad.cl , pág. <http://www.vialidad.cl/noticias/Paginas/DetalledeNoticias.aspx?item=534>.

DISSOLUTION of Sulphur Particles by Thiobacillus ferrooxidans: Substrate for Unattached Cells por S. Shrihari "et al". (1993). *Biotechnol. Bioeng.* 41() : 612 - 616.

DORAN, P. (1995. 455p). *Bioprocess Engineering Principles*. Londres: London Academic Press.

Dutrizac, J., G, A., & V.G., P. (2007). Modelling of calcium sulphate solubility in concentrated multi component sulphate solutions. *Fluid Phase Equilibria* , 300-315.

EFFECT of ore solid concentration on the bioleaching of phosphorus from high-phosphorus iron ores using indigenous sulfur-oxidizing bacteria from municipal wastewater por Jincao Wang “et al”. (2010).

ESCOBAR Antoine, C. M. (2009. 141p). *Estudio de la Reducción de Azufre Elemental y Producción de Sulfuro de Hidrógeno en Biorreactores Anaeróbicos*. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias de la Ingeniería mención Química. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas .

Escobar, B. (2013). *Mantenimiento de Cultivos de Bacterias* . Santiago: Apuntes del Curso de Procesos Biohidrometalúrgicos.

Escobar, B. (2015). Comunicación personal . *Trabajo de Tesis* .

Escobar, B. (2008). Generación de Aguas Ácidas . *Curso Tecnologías Microbianas* . Santiago , Chile .

Escobar, B. (2012). Mantenimiento de Cultivos de Bacterias . *Apuntes para el curso "Procesos Biohidrometalúrgicos" FCFM Universidad de Chile* .

Escobar, B. (2013). *Mantenimiento de Cultivos de Bacterias* . Santiago: Apuntes para el curso "Procesos Biohidrometalúrgicos.

Escobar, B. (2010). Técnica modificada de CARD-FISH. *Laboratorio de Biohidrometalurgia* .

ESPEJO R., ROMERO P. (1987). *Growth of Thiobacillus ferrooxidans on elemental sulfur*. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(): 1907 - 1912.

Espinosa J., R. S. (2010). Rutas metabólicas de oxidación del azufre en bacterias quimiolitótrofas, relevancia ambiental y biotecnología. *Mensaje Bioquímico* , XXXIV, 101-128.

ETACUDE SCIENCE PARK. (s.f.). *Sulfur: History and Production*. Obtenido de <<http://www.elements.etacude.com/S.php>> [consulta: 12 enero 2014]

Federación Interamericana del Cemento. (2013). www.ficem.org. Recuperado el 26 de Octubre de 2014, de http://www.ficem.org/estadisticas/informe_estadistico_2013.pdf

GAUTIER Hill, V. L. (2009. 146p). *Estudio de las Interacciones Microorganismo-Mineral en la Biolixiviación de la Calcopirita con Sulfolobus Metallicus*. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias

de la Ingeniería mención Química. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas.

GODOY León, M. F. (2013. 157p). *Integración y Optimización del Proceso Químico y Bacteriológico para la Recuperación de Fósforo a partir de Residuos Minerales*. Tesis para optar al título de Ingeniero Civil Químico e Ingeniero Civil en Biotecnología. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas.

GOURDON, R. F. (1998). *Kinetic model of elemental sulfur oxidation by Thiobacillus thiooxidans in batch slurry reactors*. Bioprocess Engineering 18 (): 241-249.

GRANADOS, R., VILLAVERDE, M. C. (1997. 352p). *Microbiología: Tomo I*. Madrid: International Ediciones Paraninfo.

HADDADIN, J., DAGOT, C., FICK, M. (1995). *Models of bacterial leaching*. Enzyme and Microbial Technology, 17(): 290 - 305.

HANSON, J. S. (s.f.).

HERRERA, J. (2008, 63p). *La Protección Medioambiental en Minería y el Desarrollo Minero Sostenible*. Madrid: Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Minas.

Holzer, K. (2007). *Cuantificación de bacterias en procesos de biolixiviación mediante NMP-PCR*. Tesis para optar al título de Ingeniero Civil en Biotecnología, Universidad de Chile, Santiago.

HUBER, G. S. (1991). *Sulfolobus metallicus, sp. nov., a Novel Strictly Chemolithoautotrophic Thermophilic Archaeal Species of Metal-Mobilizers*. Systematic and Applied Microbiology, 14(): 372 - 378.

HYDROMETALLURGY: A sustainable technology in evolution por Marios Tsezos "et al". (s.f.).

ICH. (2011). *Producto interno Bruto versus demanda de cemento*. Recuperado el 26 de Octubre de 2014, de Instituto del Cemento y del Hormigon de Chile: http://www.ich.cl/index.php?option=com_content&view=article&id=149&Itemid=178

Instituto del Cemento y del Hormigon de Chile. (2013). *www.ich.cl*. Recuperado el 26 de Octubre de 2014, de <http://ich.cl/?p=118>

Instituto del Cemento y del Hormigon de Chile. (2013). *www.ich.cl*. Recuperado el 26 de Octubre de 2014, de <http://ich.cl/?p=118>

Instituto Nacional de Normalización . (1968). Norma Chilena 168 Of.68 . *Cemento - Terminología, clasificación y especificaciones generales* . Chile .

JAQUE Liberona, I. A. (2012. 92p). *Estudio de la Biolixiviación de Pirita por un Cultivo de Sulfoacidophilus a 45 °C*. Tesis para optar al título de Ingeniero Civil Químico e Ingeniero Civil en Biotecnología. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas.

Javaherdashti, R. (2008). *Microbiologically Influenced Corrosion An Engineering Insight* (1° ed.). Londres: Springer.

- Kelly, D. P., & Wood, A. P. (2000). Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *thermithiobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 511-516.
- Koch et al. (2010). Corrosion Cost and Preventive strategies in the United State. *www.nace.org*.
- Koch, G. H. (2002). *Corrosion cost and preventive strategies in the United States*. Washington DC, USA : The National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine.
- KONISHI, S. A. (1990). *Bacterial dissolution of pyrite by Thiobacillus ferrooxidans*. *Bioproc. Eng.*, 5(): 231 - 237.
- KONISHI, Y. A. (1995). *Growth Kinetics of Thiobacillus thiooxidans on the Surface of Elemental Sulfur*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(10): 3617 - 3622.
- KONISHI, Y. K. (1997). *Bioleaching of pyrite by Acidianus brierleyi in a continuous-flow stirred-tank reactor*. *Chemical Engineering Science*, 52(24): 4525 - 4532.
- KONISHI, Y. T. (1994). *Kinetics of Growth and Elemental Sulfur Oxidation in Batch Culture of Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnology and Bioengineering*, 44(): 667 - 673.
- Konishi, Y., Noriaki, Y., & Asai, S. (1995). Growth Kinetics of *Thiobacillus thiooxidans* on the Surface of elemental sulfur. *Applied and environmental microbiology*, 61 (10), 3617–3622.
- Kubota, K. (2013). CARD-FISH for Environmental Microorganisms: Technical Advancement. *Microbes Environmental*, 28 (1), 3-12.
- LA BIOLIXIVIACIÓN al comienzo del siglo XXI por Y. Rodriguez "et al". (2001). *Revista de Metalurgia*, 37(): 616 - 627.
- Lavigne et Al . (2015). An innovative approach to reproduce the biodeterioration of industrial cementitious products in a sewer environment. Part I: Test design. *Cement and Concrete Research*, 73, 246-256.
- LIRA Ampuero, R. E. (2013. 101p). *Estudio de la Biooxidación de Azufre Elemental por Sulfofobacillus thermosulfidooxidans a 45°C*. Tesis para optar al título de Ingeniero Civil Químico e Ingeniero Civil en Biotecnología. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas.
- LLORENTE, E. (1991. 652p). *Minería Química*. Madrid: Instituto Tecnológico Geominero.
- Mark N. Bobrow, T. D. (1989). Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification . *Journal of Immunological Methods*, (125), 279-285.
- MATERIALS and methods for the biological production of sulfuric acid por T. Young "et al". US Pat. Appl. US 2004/0086450 A1: 06 mayo 2004.
- McCABE, W. S. (1991. 1121p.). *Operaciones Unitarias en Ingeniería Química*. Madrid: McGraw-Hill.
- Milde, K., Sand, W., & Wolff, W. (1983). Thiobacilli of the Corroded Concrete Walls of the Hamburg Sewer System. *Journal of General Microbiology*, 129, 1327-1 333.

- Monteny J, V. E. (2000). Chemical, microbiological, and in situ test methods for biogenic sulfuric acid corrosion of concrete. *Cement and Concrete Research* , 4 (30), 623-634.
- Mora, A. (2010). Dinámica de poblaciones bacterianas en procesos de biolixiviación mediante CARD-FISH. *Memoria de Ingeniería Civil en Biotecnología, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile*.
- Morales, G. (2006). Estimación de la biodiversidad bacteriana presente en procesos de biolixiviación mediante análisis del DNA. *Memoria de Ingeniería Civil mención Química y Biotecnología, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile* .
- MYERSON, A. S. (1984). *Continuous bacterial coal desulfurization employing Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnol. Bioeng.*, 26() : 92 - 99.
- NACE International National Association of Corrosion Engineers. (2001). Corrosion Cost and preventive strategies in the united states. *Federal Highway Administration Research* .
- Nascimento, G. G., Locatelli, J., Freitas, P. C., & Silva, G. L. (2000). ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF PLANT EXTRACTS AND PHYTOCHEMICALS ON ANTIBIOTICRESISTANT. *Brazilian Journal of Microbiology* , 31 (ISSN 1517-8382), 247-256.
- NCh 148 Of.68 Cemento - Terminología, clasificación y especificaciones generales. (1968). Instituto Nacional de Normalización. *Norma Chilena Oficial* (168), 11.
- NCh 157. Of 67. (1967). Cementos - Ensayo de flexión y compresión de morteros de cemento . *Instituto Nacional de Normalización , Norma Oficial Chile* .
- NEMATI, M., LOWENADLER, J., HARRISON, S. T. L. (2000). *Particle size effects in bioleaching of pyrite by acidophilic thermophile Sulfolobus metallicus (BC)*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53(): 173 - 179.
- NEW ZELAND INSTITUTE OF CHEMISTRY. (s.f.). Obtenido de The Manufacture of Sulfuric Acid and Superphosphate: <<http://nzic.org.nz/ChemProcesses/production/1B.pdf>> [consulta: 12 enero 2014]
- NORRIS, P. (s.f.).
- NRMCA, N. R. (2012). Concrete CO2 Fact Sheet. *NRMCA Publication Number 2PCO2* , 13.
- Ochsendorf, J., Keith Norford, L., Brown, D., Durschlag, H., Hsu, S. L., Love, A., y otros. (2011). *Methods, Impacts, and Opportunities in the Concrete Building Life Cycle*. Department of Civil and Environmental Engineering, Concrete Sustainability Hub, Massachusetts Institute of Technology. Massachusetts: MIT.
- O'Connell, M., McNally, C., & Richardson , M. (2010). Biochemical attack on concrete in wastewater applications: A state of the art review. *Cement & Concrete Composites* , 32, 479–485.
- Okabe, S., Odagiri, M., Ito, T., & Satoh, H. (2006). Succession of Sulfur-Oxidizing Bacteria in the Microbial Community on Corroding Concrete un Sewer System. *Applied and Environmental Microbiology* , 73 (3), 971-980.

- OLSON, G., BRIERLEY, J. A. BRIERLEY, C. L. (2003). *Bioleaching review part B. Progress in Bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 63(): 249 - 257.
- OXYGEN and Carbon Dioxide Mass Transfer and the Aerobic, Autotrophic Cultivation of Moderate and Extreme Thermophiles: A Case Study Related to the Microbial Desulfurization of Coal por F.C. Boogerd "et al". (1990). Biotechnol. Bioeng. 35(): 1111 - 1119.
- PACHECO Arias, R. E. (2013. 67p). *Estudio de Oxidación de Azufre Elemental con Sulfolobus metallicus a 67°C*. Memoria para optar al título de Ingeniero Civil Químico e Ingeniero Civil en Biotecnología. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas.
- Parande, R. e. (2006). Deterioration of reinforced concrete in sewer environments. *Proceedings of the Institution of Civil Engineers - Municipal Engineer. , 1* (159), 11-20.
- Parker, C. (1945). THE FUNCTION OF THIOBACILLUS CONCRETIVORUS (NOV. SPEC.) IN THE CORROSION OF CONCRETE EXPOSED TO ATMOSPHERES CONTAINING HYDROGEN SULPHIDE. *Australian Journal of Experimental Biology Medicial Science , 23* (2), 91-98.
- PASCUAL, J. A. (s.f.). *Apuntes de Química*. Obtenido de Tema 11.6: el Azufre y sus propiedades: <<http://www.100ciaquimica.net/temas/tema11/punto6.htm>> [consulta: 12 enero 2014]
- Perkin Elmer. (2015). www.perkinelmer.com. Recuperado el 25 de Abril de 2015, de <http://www.perkinelmer.com/Resources/TechnicalResources/ApplicationSupportKnowledgebase/TSA/tsa.xhtml>
- Pernthaler, A. P. (2002). "Fluorescence In Situ Hybridization and. *Applied and , 68*, 3094–3101.
- Pradhan, N. N. (2008). "Heap bioleaching of chalcopyrite: A review". *Minerals Engineering , 21*, 355–365.
- Rawlings, D. E. (1997). *Biomining: Theory, Microbes and Industrial Processes*. Springer , 3.
- RAWLINGS, D.E., JOHNSON, B.D. (2007. 324p.). *Biomining*. Berlin: Springer-Verlag.
- RILEM TC 183-MIB. (2005). *Microbial impacts on building materials- Weathering and conservation. Microbial impact on buildings materials: an overview .*
- Rojas, L. (2006). *Estudio de la durabilidad de estructuras antiguas de hormigón armado, con énfasis en la corrosión de las armaduras*. Santiago : FCFM, Universidad de Chile .
- ROSSI, G. (2001). *The design of bioreactors*. Hydrometallurgy, 59() : 217 – 231.
- Sand, T. R. (2003). The sulfane sulfur of persulfides is the actual substrate of the sulfur-oxidizing enzymes from Acidithiobacillus and Acidiphilium spp. *Microbiology , 149*, 1699–1709.
- SAND, W. G. (2001). *(Bio) chemistry of bacterial leaching-direct vs. indirect bioleaching*. Hydrometallurgy, 59(): 159 - 175.

Sand, W. (1987). Importance of Hydrogen Sulfide, Thiosulfate and Methylmercaptan for Growth of Thiobacilli during Simulation of Concrete Corrosion. *Applied and Environmental Microbiology* , 53 (7), 1645-1648.

SUSTAINABLE Use of Phosphorus por J.J. Schröder, D. Cordell, A.L. Smit y A. Rosemarin. (s.f.). *Plant Research International Wageningenur.* Obtenido de <http://ec.europa.eu/environment/natres/pdf/sustainable_use_phosphorus.pdf> [consulta: 12 enero 2014]

Taylor, H. (1990). *Cement Chemistry* (primera ed.). (T. Telford, Ed.) Londres: Academic Press.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA. (s.f.). *Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Química.* Obtenido de Ingeniería Bioquímica I y II: Mantenimiento Celular: <http://www.uclm.es/profesorado/afantinolo/docencia/inorganica/Tema7/Trans_T7IQ.pdf> [consulta: 12 enero 2014]

VALE. (s.f.). *Business. Mining. Fertilizers.* Obtenido de <<http://www.vale.com/EN/business/mining/fertilizers/Pages/Fertilizers.aspx>> [consulta: 12 enero 2014]

Van Hille, R. P., Oyekola, O. O., & Harrison, S. T. (2009). Study of anaerobic lactate metabolism under biosulfidogenic. *Water Research* , 43, 3345-3354.

Vergara, i. (2014). *Desafíos de la Ingeniería: Acidithiobacillus thiooxidans.* Informe, Pontificia Universidad Católica de Chile , Santiago .

Verstraete, E., Vincke, N., & Boon, W. (2001). Analysis of the microbial communities. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 776-785.

Wells. (2009). Factors involved in the long term corrosion of concret sewer. En R. Freedman (Ed.), *Corrosion & Prevention* (págs. 345-356). Coffs Harbou, Australia: Australasian Corrosion Association Inc.

Wells, T. M. (2012). A collaborative investigation of Microbial Corrosion of Concrete Sewer Pipe in Australia. *OzWater-12 Australia's National Water Conference and Exhibition* , 8-10.

WICHLACZ, P. L. (1985). *Growth kinetics of attached iron-oxidizing bacteria.* Appl. Environ. Microbial., 50(): 460 - 467.

Yin, H., Zhang, X., Li, X., He, Z., & Liang, Y. (2014). Whole-genome sequencing reveals novel insights into sulfur oxidation in the extremophile *Acidithiobacillus thiooxidans*. *BMC Microbiology* (179), 14.

Yousefi et al. (2014). Accelerated iodide degradation of cured cement paste by *Thiobacillus* species under simulation condition . *International Biodeterioration & Biodegradation* (86), 317 - 326.

8. Anexos

8.1 ANEXO 1: PH CULTIVOS DE MUESTRAS DE HORMIGÓN CORROÍDO

Tabla 8.1. pH Cultivos de muestras de hormigón corroído

Matraces	Muestras	Semanas						
		1	2	3	4	5	6	7
M1	Central Termoeléctrica Norte Grande– Granulometría baja	7,7	9,0	8	8	7	7	6,5
M1'	Central Termoeléctrica Norte Grande– Granulometría alta	6,6	8,9	7	6,5	6	6	6
M1G	Central Termoeléctrica Norte Grande– Sin moler	7,0	8,5	8	8,5	7,5	8	7
M2	Pavimento yacimiento minero Zona Central – Granulometría baja	7,9	9,4	8	8	6	6,5	6
M2'	Pavimento yacimiento minero Zona Central – Sin moler	7,5	9,0	8	8	6	6	6

8.2 ANEXO 2: ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA OXIDACIÓN DE AZUFRE EN

A. THIOOXIDANS

Tabla 8.2. Enzimas involucradas en la oxidación de azufre en *A. thiooxidans* (Yin, Zhang, Li, He, & Liang, 2014)

Abreviación	Nombre enzima	Ubicación	Reacción
SDO	Azufre dioxigenasa	Periplasma	$S^0 \rightarrow SO_3^{2-}$
SQR	Sulfuro quinonareductasa	Membrana Citoplasmática	$H_2S \rightarrow S^0$
TQO	Tiosulfatoquinonaoxidoreductasa	Membrana Citoplasmática	$S_2O_3^{2-} \rightarrow S_4O_6^{2-}$
TetH	Tetrationato Hidrolasa	Periplasma	$S_4O_6^{2-} \rightarrow S_2O_3^{2-} + SO_4^{2-} + S^0$
Sox	Complejo enzimático azufreoxidante	Periplasma	$S_2O_3^{2-} \rightarrow SO_4^{2-} + S^0$
HDR	Heterosulfuroreductasa	Citoplasma	$RSSH \rightarrow RSH + SO_3^{2-}$
SOR	Azufre oxigenasareductasa	Citoplasma	$S^0 \rightarrow H_2S + SO_3^{2-} + S_2O_3^{2-}$
TST	Tiosulfato azufre transferasa o Rhodanasa	Citoplasma	$S_2O_3^{2-} \rightarrow SO_3^{2-} + S^0$
PAPS reductasa	Fosfoadenosinfosulfatoredutasa	Citoplasma	$S_2O_3^{2-} \rightarrow PAPS$
APS quinasa	Adenilil-sulfato quinasa	Citoplasma	$PAPS \rightarrow APS$

8.3 Anexo3: CARACTERIZACIÓN QUÍMICA CEMENTO

Caracterización según (NCh 148 Of.68 Cemento - Terminología, clasificación y especificaciones generales, 1968) de cemento utilizado:

Ensayos Realizados	Unidad	Resultados	Requisitos según NCh148.Of1968		
Peso Específico	g/ml	3,12	≥	3,00	g/ml
Superficie específica	cm ² /g	4100	No aplica		
Agua de consistencia normal *	%	28,50	No aplica		
Tiempos de fraguado					
Inicial	h:min	01:50	≥	00:45	h:min
Final	h:min	02:30	≤	10:00	h:min
Expansión en autoclave	%	0,03	≤	1,00	%
Resistencias mecánicas					
Flexión a 3 días	kgf/cm ²	57	No aplica		
Flexión a 7 días	kgf/cm ²	72	≥	45	kgf/cm ²
Flexión a 28 días	kgf/cm ²	82	≥	55	kgf/cm ²
Compresión a 3 días	kgf/cm ²	337	No aplica		
Compresión a 7 días	kgf/cm ²	414	≥	250	kgf/cm ²
Compresión a 28 días	kgf/cm ²	555	≥	350	kgf/cm ²
Pérdida por calcinación	%	1,7	≤	3,0	%
Contenido de SO ₃	%	2,78	≤	4,00	%
Residuo insoluble	%	0,5	≤	1,5	%
Contenido de MgO	%	2,2	≤	5,0	%
Contenido de Mn ₂ O ₃	%	-	No aplica		

8.4 ANEXO 4: PH PREPARACIÓN DE INÓCULO DE *A. THIOOXIDANS*

A continuación se presentan los pH medidos durante la generación de un inóculo de *A. thiooxidans*.

Las bruscas subidas de pH se deben al cambio de medio de cultivo sobrenadante realizado a los matraces, para evitar la inhibición del crecimiento bacteriano por estar expuestos a un pH menos a 1,5

Tabla 8.3. Mediciones de pH en la preparación de inóculo de *A. thiooxidans*

Matraces	Horas								Concentración de bacterias e inoculación de cultivo
	24	48	72	Cambio de medio	96	120	Cambio de medio	144	
T1	1,9	1,37	1,2	2,39	1,67	1,38	2,29	1,33	
T2	1,88	1,36	1,27	2,39	1,61	1,36	2,26	1,43	

8.5 ANEXO 5: COLONIZACIÓN DE PERLAS DE AZUFRE CON *A. THIOOXIDANS*

El seguimiento del crecimiento bacteriano durante la colonización de las perlas de azufre se realizó a través de la medición de pH del medio de cultivo, asumiendo que la oxidación de azufre elemental genera ácido sulfúrico, lo que provoca una baja en el pH. Estas mediciones se observan para cada uno de los matraces en la Tabla 8.4. pH Medio de Cultivo colonización de perlas de azufre.

Tabla 8.4. pH Medio de Cultivo colonización de perlas de azufre.

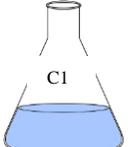
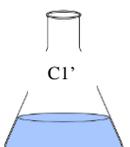
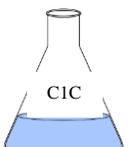
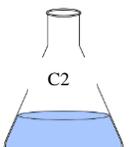
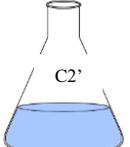
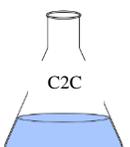
Matraz	Muestra	pH Medio de Cultivo			
		24 [h]	72 [h]	120 [h]	168 [h]
C1	Muestra 1	2,4	2,15	1,95	1,36
C1'	Contramuestra 1	2,3	2,1	1,95	1,36
C1C	Control 1	2	2	2	2
C2	Muestra 2	2,29	2,14	2,15	1,6
C2'	Contramuestra 2	2,29	2,12	2,07	1,52
C2C	Control 2	2	2	2	2

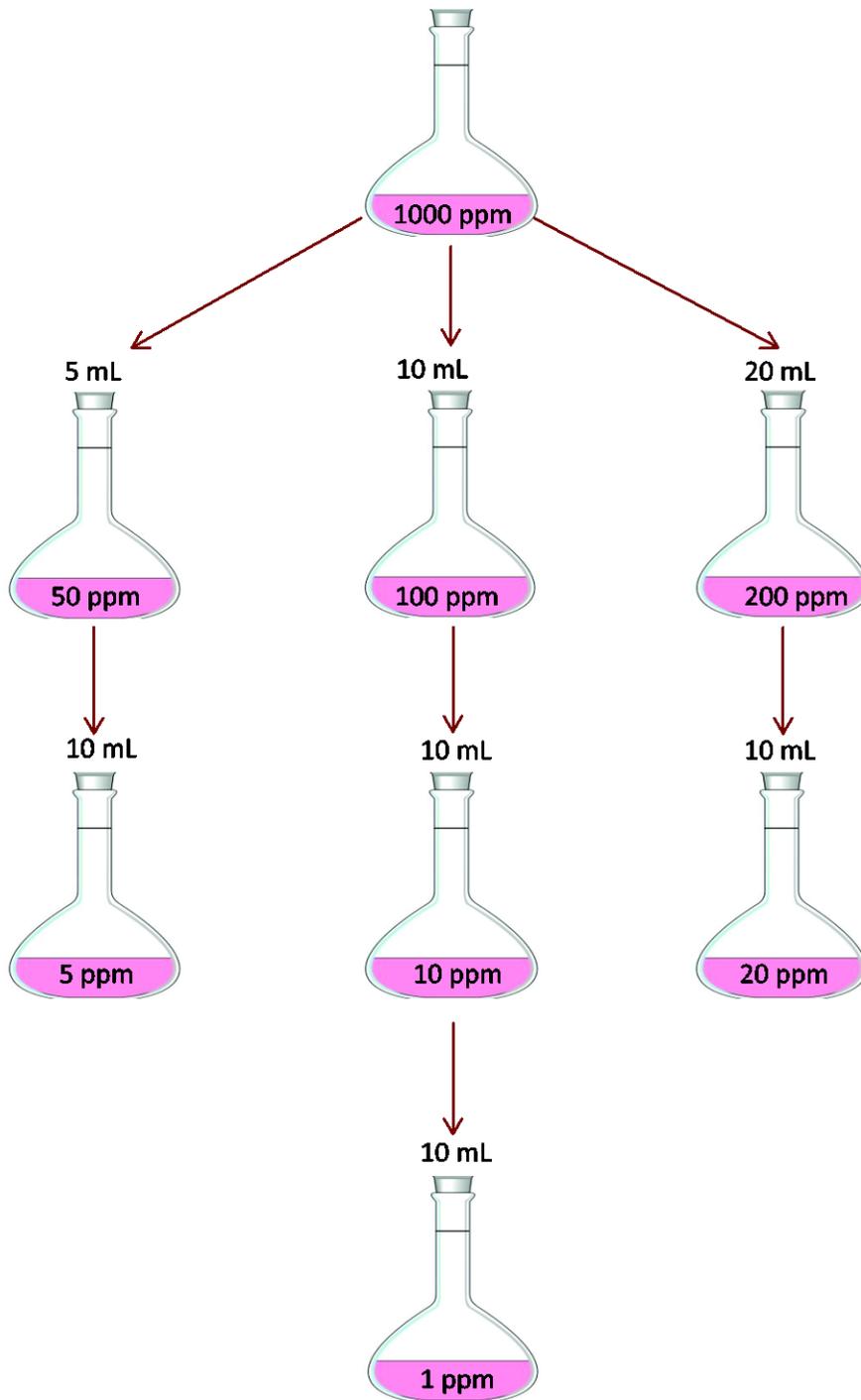
La diferencia entre la serie de matraces C1, C1' y C1C, y la serie C2, C2', C2C, es que los primeros fueron incubados en 3 gramos de azufre, mientras los segundos con 1,5 gramos solamente. Una vez que los pH en el medio de cultivo de los matraces fueron inferiores a 2, se procedió a introducir el cemento previamente molido y esterilizado para estudiar su degradación.

8.6 ANEXO 6: CONFIGURACIÓN EXPERIMENTAL CULTIVO DE *A. THIOOXIDANS* EN CEMENTO ENDURECIDO

La configuración de los matraces en el experimento de cultivo de cemento endurecido (punto 4.4) se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 8.5. Configuración de matraces

Matraz	Inóculo	pH inicial	Peso inicial
 Muestra 1	10 [ml] de inóculo concentración 3×10^7 [bacterias/ml], proveniente de T1.	2,4	232,63
 Contramuestra 1	10 [ml] de inóculo concentración 3×10^7 [bacterias/ml], proveniente de T1.	2,3	223,1
 Control 1	10 [ml] Solución de Timol en etanol al 2% p/v	2,0	230,06
 Muestra 2	10 [ml] de inóculo concentración 3×10^6 [bacterias/ml], proveniente de T2.	2,29	214,16
 Contramuestra 2	10 [ml] de inóculo concentración 3×10^6 [bacterias/ml], proveniente de T2.	2,29	218,62
 Control 2	10 [ml] Solución de Timol en etanol al 2% p/v	2,0	236,27

8.7 ANEXO 7: CONFIGURACIÓN DE MATRACES CURVA DE CALIBRACIÓN DE $[Ca^{2+}]$ Figura 8.1. Esquema de diluciones de Titrisol para patrones de Ca^{2+}

8.8 ANEXO 8: DATOS EXPERIMENTALES CULTIVO DE *A. THIOOXIDANS* EN CEMENTO ENDURECIDO

Tabla 8.6 Evolución de pH en medio de cultivo de *A. thiooxidans* en cemento endurecido.

Matraz	Días											
	1	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77
C1	7,61	11,2	6,98	6,16	6,09	5,84	5,89	5,6	5,15	5,2	5,36	5,27
C1p	8,83	10,62	7,2	6,35	6,23	5,87	5,78	5,94	5,19	5,43	5,47	5,44
C1C	6,94	10,74	7,4	7,48	6,52	6,66	6,8	6,97	5,91	5,58	5,74	5,95
C2	8,08	11,43	7,56	7,66	6,96	6,64	6,16	6,35	5,84	5,7	5,79	5,52
C2p	11,06	10,99	7,75	8,3	7,36	6,73	6,41	6,4	6,1	5,83	5,91	5,68
C2C	6,73	10,6	7,99	8,85	7,93	7,25	7,06	6,53	6,28	5,92	6,02	5,97

Tabla 8.7. Medición de la concentración de sulfatos en solución en medio de cultivo de *A. thiooxidans* en cemento endurecido

Matraz	Semanas											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
C1	1946,4	2047,8	1946,4	1997,1	2030,8	1651,8	2054,6	2084,5	1966,0	2082,3	2036,1	2074,0
C1p	2324,9	2183,0	2324,9	2277,6	2048,4	1811,2	2145,6	2103,9	2062,8	2076,3	2088,6	2091,8
C1C	833,3	789,6	833,3	811,4	1460,5	1503,5	1860,5	1691,1	1891,1	2280,2	2016,4	1778,3
C2	2807,0	1865,1	2336,0	2336,0	2217,9	1841,1	2049,8	2291,0	2247,8	2128,4	2051,5	2158,8
C2p	2448,5	1939,7	2448,5	2278,9	2415,2	1884,2	1996,3	1909,5	2208,7	2219,0	1908,8	2152,0
C2C	826,4	409,7	826,4	687,5	1101,8	1516,2	1741,2	1797,6	1716,7	1688,8	1818,2	1582,7

Tabla 8.8. Concentración de ion Calcio en solución [ppm]

Matraz	Semanas											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
C1	21,64	29,29	36,09	36,49	40,47	39,2	37,96	36,57	34,93	34,33	32,13	37,72
C1p	20,15	23,37	29,69	31,87	31,84	28,9	31,54	32,24	33,33	31,08	35,38	43,44
C1C	21,33	28,19	32,62	36,03	41,6	39,11	36,18	33,48	32,63	34,03	29,39	34,92
C2	34,62	39,81	32,07	41,05	50,03	51,88	42,83	41,35	43,08	42,53	40,08	46,55
C2p	31,97	28,56	28,57	37,69	41,51	34,17	32,66	29,75	30,46	30,22	29,15	36,48
C2C	13,68	14,08	18,06	24,24	32,34	33,36	30,72	28,05	25,34	25,63	24,65	27,32