

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**BIOMINERALIZACIÓN DE UN MEDIO POROSO EN UN MODELO
DE ACUÍFERO UTILIZANDO UN CONSORCIO MICROBIANO
REDUCTOR DE SULFATO EN PRESENCIA DE AGUA DE
BARRERA HIDRÁULICA DE UN TRANQUE DE RELAVE.**

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica
área de especialización en Bioquímica Ambiental y Memoria para optar al Título de

Bioquímico por:

JORGE GONZALO GUERRA RODRÍGUEZ

Director de Tesis: Dr. Davor Cotoras Tadic

SANTIAGO – CHILE

2019

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Davor Cotoras, por guiarme paciente y activamente en el desarrollo de mi tesis, y especialmente, por incentivar me a investigar y descubrir los infinitos aportes de la microbiología a muchos problemas que aquejan a la comunidad.

A mis compañeros de laboratorio, Constanza, Franco, Jorge, Sebastián, Valeria y Don Luis, por sus innumerables y valiosas enseñanzas, el constante y cariñoso apoyo, y los inolvidables consejos y momentos de distracción.

A Pabla Viedma, por amadrinar generosamente mi labor en estos años de laboratorio.

Al Dr. Jorge Mendoza, por su cooperación y voluntad para realizar los análisis que revelaron los resultados más trascendentales de este trabajo.

A mis amigos de generación de la Universidad, Joaquín, José, Franco, Nicole y Ariel, por su cálida y cariñosa compañía, y los grandes momentos de risas y diversión compartidos durante el largo camino de nuestra formación profesional.

A mi comisión evaluadora, por su apoyo y motivación para culminar esta etapa de mi vida con una tesis a la altura que esta casa de estudios merece.

A mis hermanos, sobrinos, y especialmente a mis padres Ana María y Jorge, quienes con mucho amor me han entregado el apoyo y la formación valórica necesaria e imprescindible, que hoy me permite escribir estas líneas que definen el comienzo de nuevos desafíos y satisfacciones.

FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue desarrollada gracias a los fondos del proyecto FONDEF IT16M10002 de la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICYT).

RESUMEN

Los acuíferos son formaciones geológicas subterráneas que almacenan gran parte del agua dulce líquida del planeta, y son uno de los principales reservorios hídricos para el suministro de agua potable y la producción de alimentos a nivel mundial.

En la minería del cobre, los procesos de separación de los minerales de interés generan residuos que pueden contener elevadas concentraciones de sulfato y ciertos metales pesados, debido a la oxidación de los minerales que contienen cobre. Estos residuos, conocidos como relaves, son almacenados en estructuras llamadas “tranques de relaves”, con el fin de aislar del medioambiente los compuestos tóxicos presentes en estos residuos. Sin embargo, una de las fallas más comunes de estas estructuras corresponden a las filtraciones de su contenido acuoso, las cuales pueden percolar en el suelo y provocar la contaminación con sulfato de los acuíferos subyacentes al lugar donde se emplazan los tranques de relaves.

Con el fin de controlar las filtraciones desde los tranques de relaves, en esta tesis se desarrolló un método para disminuir la permeabilidad por biomineralización, de un medio poroso empacado en un modelo de acuífero, utilizando un consorcio microbiano reductor de sulfato proveniente desde un microbialito del Lago Sarmiento (XII región, Chile). La biomineralización consiste en la estabilización de la estructura de un medio poroso por la precipitación de minerales de carbonato de calcio (CaCO_3) inducida por microorganismos, lo que provoca la disminución de la conductividad hidráulica del medio poroso. La utilización de formiato como dador de electrones para la reducción microbiana de sulfato ha demostrado favorecer las condiciones para la precipitación de carbonatos respecto a otros dadores. Por lo tanto, el objetivo principal de esta tesis fue maximizar el alcance de la biomineralización de un medio poroso empacado en un modelo de acuífero por efecto de la

inoculación y estimulación con medio de cultivo que contiene formiato de un consorcio microbiano reductor de sulfato.

En el modelo de acuífero utilizado se logró la biomineralización de un medio poroso (arena de cuarzo) como resultado de la inoculación con un consorcio microbiano reductor de sulfato. La biomineralización fue la responsable de la reducción de la permeabilidad del medio poroso, la que produjo el aumento del tiempo de retención del trazador utilizado. Además, se encontró una concentración de formiato en el medio de cultivo suficiente para lograr el máximo alcance de la biomineralización del medio poroso en el modelo de acuífero. Esta concentración fue de 12 g/L, y provocó el enriquecimiento de las secuencias pertenecientes al género reductor de sulfato *Desulfomicrobium* en la comunidad microbiana adherida al medio poroso.

Los resultados obtenidos en esta tesis constituyen el primer acercamiento reportado para la reducción de la permeabilidad de un medio poroso debida a la precipitación de minerales de CaCO_3 inducida por microorganismos, con el fin de disminuir el desplazamiento de las aguas provenientes de las filtraciones de un tranque de relave. Además, constituyen un precedente clave para posteriores escalamientos del proceso que apunten a disminuir la permeabilidad del sedimento del subsuelo de un acuífero en un estudio de campo piloto.

SUMMARY

Aquifers are underground geological formations that store an important fraction of the fresh water of the planet, and are one of the main hydric reservoirs for worldwide drinking water supply and foodstuff production.

In copper mining, the separation processes of relevant mineral results in wastes that may contain high sulfate and heavy metals concentrations, due to oxidation of minerals that contain copper. This waste, known as mining tailings, are stored in structures called “tailings dams”, so as to isolate from the environment the toxic compounds found in this wastes. Nevertheless, one of the most common failures of this structures correspond to the leakage of their watery content, which can percolate in soil and cause sulfate contamination of aquifers underlying the site where tailings dam are placed.

In order to control leakage from tailings dams, in this thesis, a method for reduce the permeability by means of biomineralization, of a porous medium packed in a model aquifer, using a sulfate-reducing microbial consortium from a microbialite of Lago Sarmiento (XII region, Chile), was developed. Biomineralization consists in the stabilization of structure of a porous medium by calcium carbonate (CaCO_3) minerals precipitation induced by microorganisms, which decreases the hydraulic conductivity of porous medium. Utilization of formate, as electron donor by sulfate-reducing microorganisms, has proven to favor the conditions to carbonate precipitation with respect to other donors. Therefore, the main aim of this thesis was to maximize the extent of biomineralization of a porous medium packed in a model aquifer by effect of the inoculation and stimulation with culture medium containing formate of a sulfate-reducing microbial consortium.

In the model aquifer used, the biomineralization of a porous medium (quartz sand) due to the inoculation of a sulfate-reducing microbial consortium was achieved. Biomineralization was responsible of the reduction of permeability of porous medium, and this provoked the increase of the time of residence of tracer used. Moreover, a formate concentration to achieve the maximal extent of biomineralization of the porous medium in the model aquifer was found (12 g/L). This concentration allowed the enrichment of sequences belonging to the sulfate-reducing genus *Desulfomicrobium* in microbial community adhered to porous medium.

The results obtained in this thesis constitute the first reported approach for permeability reduction of a porous medium due to precipitation of CaCO_3 minerals induced by microorganisms, with the purpose of reduce the displacement of water coming from leakage of tailings dam. Moreover, they constitute a key preceding for further scaling up of the process pointed to diminish the permeability of the sediment of subsoil of an aquifer in a field pilot study.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	ii
SUMMARY	iv
NOMENCLATURA.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Acuíferos y contaminación de aguas subterráneas	1
1.2 Contaminación de aguas subterráneas por filtraciones de aguas de tranques de relave	1
1.3 Bacterias reductoras de sulfato como solución para las filtraciones de aguas de tranques de relaves hacia napas subterráneas	4
1.3.1 Disminución de la permeabilidad de un medio poroso por biocolmatación y biomineralización.....	6
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	9
Hipótesis	9
Objetivo general.....	9
Objetivos específicos	9
III. MATERIAL Y MÉTODO	11
3.1 Reactivos.....	11
3.2 Equipos	12
3.3 Obtención del consorcio microbiano reductor de sulfato y de agua de barrera hidráulica de un tranque de relave	13
3.4 Cultivos del consorcio microbiano reductor de sulfato (inóculo) en presencia del colorante azul brillante.....	13
3.5 Medio de cultivo para los ensayos con el colorante y la estimulación del consorcio microbiano reductor de sulfato en los modelos de acuífero	14
3.6 Construcción de los modelos de acuífero	15
3.6.1 Determinación de parámetros hidráulicos de los modelos de acuífero	17
3.6.1.1 Tiempo de retención	17
3.6.1.2 Flujo de efluente de los modelos	17

3.6.1.3 Seguimiento fotográfico del trazador a través de los modelos	18
3.7 Inoculación de los modelos de acuífero con el consorcio microbiano reductor de sulfato.....	18
3.7.1 Monitoreo de parámetros de reducción microbiana de sulfato, fisicoquímicos, colonización microbiana y utilización de formiato en los modelos de acuífero.....	19
3.7.1.1 Sulfato (SO_4^{2-}).....	20
3.7.1.2 Ácido sulfhídrico (H_2S)	20
3.7.2 Parámetros de colonización microbiana en los modelos de acuífero	20
3.7.2.1 Determinación de ATP intracelular microbiano en el efluente de los modelos de acuífero	20
3.7.2.2 Determinación de ATP intracelular microbiano de los microorganismos fijados en el medio poroso.....	21
3.7.2.3 Recuento microbiano en efluente	21
3.7.3 Cuantificación de formiato en efluente.....	22
3.8 Análisis del medio poroso de los modelos de acuífero.....	22
3.8.1 Determinación de pH en el agua de poro.....	22
3.8.2 Determinación de carbonatos totales en muestras de arena.....	22
3.8.3 Difracción de rayos X.....	23
3.8.4 Observación por microscopía de barrido electrónico (MBE) de la superficie de la arena de cuarzo	23
3.8.5 Análisis de la comunidad microbiana adherida a la arena de los modelos de acuífero por secuenciación masiva del gen del ARNr 16S.....	23
3.9 Análisis de imágenes utilizando el programa ImageJ.....	24
3.10 Análisis estadísticos.....	24
IV RESULTADOS	25
4.1 Evaluación del efecto de erio Glaucina (azul brillante) sobre la capacidad reductora de sulfato del inóculo microbiano	25
4.2 Construcción y determinación de los parámetros hidráulicos de los modelos de acuífero previos al experimento.....	30
4.3 Evaluación del efecto de la velocidad de inoculación sobre la actividad reductora de sulfato y la biomineralización en un modelo de acuífero	32
4.3.1 Monitoreo de los parámetros de reducción microbiana de sulfato en los modelos de acuífero	32

4.3.2 Monitoreo de parámetros de colonización microbiana de los modelos de acuífero	35
4.3.3 Monitoreo de los parámetros hidráulicos de los modelos de acuífero.....	37
4.3.4 Análisis de la arena de cuarzo de los modelos de acuífero al final del experimento	39
4.3.5 Análisis de la comunidad microbiana establecida en la arena de los modelos de acuífero inoculados con distintas velocidades mediante secuenciación del ARNr 16S	46
4.4 Evaluación del efecto de la concentración de formiato sobre la actividad reductora de sulfato y la biomineralización en un modelo de acuífero	48
4.4.1 Monitoreo de los parámetros de reducción microbiana de sulfato en los modelos de acuífero	49
4.4.2 Utilización de formiato en los modelos de acuífero	51
4.4.3 Monitoreo de los parámetros hidráulicos de los modelos de acuífero.....	52
4.4.4 Análisis de la arena de cuarzo de los modelos de acuífero al final del experimento	53
4.4.5 Análisis de la comunidad microbiana establecida en la arena de los modelos de acuífero estimulados con distintas concentraciones de formiato mediante secuenciación del ARNr 16S.....	59
V. DISCUSIÓN	61
VI. CONCLUSIONES	69
VII. ANEXOS	70
VIII. REFERENCIAS	82

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Contaminación de acuíferos producto de las filtraciones desde los tranques de relave	3
Figura 2. Ejemplo de modelo de acuífero construido en base a cámaras de acrílico	16
Figura 3. Cultivos del consorcio microbiano en presencia de azul brillante luego de 27 días	26
Figura 4. Parámetros de reducción microbiana de sulfato (H_2S y SO_4^{2-} reducido) y fisicoquímicos (pH y ORP) en la evaluación del efecto del compuesto azul brillante	29
Figura 5. Parámetros de reducción microbiana de sulfato (SO_4^{2-} y H_2S) y fisicoquímicos (pH y ORP) en los modelos de acuífero inoculados a dos velocidades (pulso lento y rápido de inóculo).....	34
Figura 6. Parámetros de colonización microbiana de los modelos de acuífero.....	36
Figura 7. Tiempos de retención relativos de los modelos de acuífero durante del tiempo de experimentación.....	37
Figura 8. Desvío del trazador alrededor de una zona de menor permeabilidad en el medio poroso de los modelos de acuífero	39
Figura 9. Mapas de pH en la arena de los modelos de acuífero inoculados con ambas velocidades al finalizar el experimento (60 días)	41
Figura 10. Arena de cuarzo biomineralizada en el punto de inoculación de los modelos de acuífero	40
Figura 11. Porcentaje de carbonatos totales determinados por titulación ácido base en la arena de los modelos inoculados con ambas velocidades al finalizar el experimento	42
Figura 12. Imágenes obtenidas por microscopía de barrido electrónico de la arena de cuarzo al final del experimento de evaluación de las velocidades de inoculación	44

Figura 13. Mapas de ATP microbiano en la arena de los modelos de acuífero al final del experimento de evaluación de las velocidades de inoculación.....	45
Figura 14. Abundancia relativa de las secuencias del gen del ARNr 16S en los extractos de ADN de los microorganismos adheridos a la arena de los modelos de acuífero al final del experimento de evaluación de las velocidades de inoculación.....	47
Figura 15. Parámetros de reducción microbiana de sulfato (SO_4^{2-} y H_2S) y fisicoquímicos (pH y ORP) en los modelos de acuífero estimulados con las distintas concentraciones de formiato	50
Figura 16. Formiato remanente en los modelos de acuífero estimulados con las distintas concentraciones del dador de electrones	51
Figura 17. Tiempos de retención relativos al tiempo inicial en los modelos de acuífero estimulados con las distintas concentraciones de formiato	52
Figura 18. Mapas de pH en la arena de los modelos de acuífero estimulados con las distintas concentraciones de formiato al finalizar el experimento (60 días).....	54
Figura 19. Área de la superficie de arena biomineralizada en los modelos de acuífero en función de la concentración de formiato en el medio de cultivo.....	55
Figura 20. Porcentaje de carbonatos totales determinados por titulación ácido base en el medio poroso de los modelos de acuífero estimulados con las distintas concentraciones de formiato en el punto de inoculación y río abajo al finalizar el experimento	56
Figura 21. Imágenes obtenidas por microscopía de barrido electrónico de la arena de cuarzo de los modelos de acuífero estimulados con la menor y mayor concentración de formiato (3 y 18 g/L) al final del experimento	57
Figura 22. Mapas de ATP microbiano en la arena de los modelos de acuífero estimulados con las distintas concentraciones de formiato al finalizar el experimento	58
Figura 23. Abundancia relativa de las secuencias del gen del ARNr 16S en los extractos de ADN de los microorganismos adheridos a la arena de los modelos de acuífero al final del experimento de evaluación de las concentraciones de formiato.....	60

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis químico del agua de barrera hidráulica del tranque de relaves	15
Tabla 2. Parámetros hidráulicos previos a la inoculación de los modelos de acuífero	31
Tabla 3. Cantidad de CaCO ₃ (vaterita, aragonita y calcita) determinados por DRX en la arena de los modelos de acuífero en el experimento de evaluación de las velocidades de inoculación	43
Tabla 4. Cantidad de CaCO ₃ (calcita) determinados por DRX en la arena de los modelos de acuífero estimulados con las distintas concentraciones de formiato	56

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Aparición de plumas de sulfuros de hierro en los modelos de acuífero inoculados ambas velocidades	70
Anexo 2. Difractogramas de la arena de cuarzo de los modelos de acuífero inoculados con ambas velocidades	71
Anexo 3. Biopelícula microbiana sobre las partículas de arena de cuarzo observada por microscopía de barrido electrónico.....	73
Anexo 4. Biomineralización de la arena de cuarzo de los modelos de acuífero inoculados con las distintas concentraciones de formiato al final del experimento	74
Anexo 5. Difractogramas de la arena de cuarzo de los modelos de acuífero estimulados con las distintas concentraciones de formiato	75

NOMENCLATURA

AB: colorante azul brillante

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARNr 16S: gen del ácido ribonucleico ribosomal 16S

ATP: adenosín trifosfato

BRS: bacterias reductoras de sulfato

CaCO₃: carbonato de calcio

DRX: difracción de rayos X

H₂S: ácido sulfhídrico

MBE: microscopía de barrido electrónico

ORP: potencial de óxido-reducción

PCM(F): medio de cultivo Postgate C modificado, con formiato como dador de electrones

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

SPE: sustancias poliméricas extracelulares

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Acuíferos y contaminación de aguas subterráneas.

Los acuíferos son formaciones geológicas subterráneas que se encuentran saturadas de agua, la cual se mueve gracias al gradiente hidráulico determinado por diferencias en los niveles freáticos entre distintos puntos del acuífero, lo que establece la dirección de su movimiento (Ghasemizadeh et al, 2012). Si bien las aguas subterráneas representan sólo una pequeña parte del total de las aguas del planeta, corresponden al 30% del total de agua dulce líquida (Thomas et al, 2017). Esto se traduce en que el 40% de los alimentos a nivel mundial es producido con aguas subterráneas, y que aproximadamente dos mil millones de personas dependen de este recurso para el consumo de agua potable (UNEP, 2003).

Debido a la movilidad del agua en los acuíferos, la contaminación de éstos puede afectar otras fuentes hídricas, por lo que es poco predecible la extensión que pueden alcanzar los contaminantes orgánicos e inorgánicos presentes en un foco de contaminación, así como sus posibles efectos tóxicos sobre los receptores biológicos y la población humana (Piver, 1992).

1.2 Contaminación de aguas subterráneas por filtraciones de aguas de tranques de relave.

La minería corresponde a una actividad productiva muy importante en países con grandes depósitos geológicos de minerales que contienen metales de interés comercial. Sin

embargo, aun cuando los procesos de extracción y refinamiento de minerales han sido diseñados con el fin de obtener la mayor cantidad de mineral de interés, se produce una gran cantidad de material de desecho, la que en promedio corresponde a 200 veces la del mineral concentrado (Lottermoser, 2007).

El proceso de flotación de minerales tiene como objetivo separar y concentrar los minerales de interés que se encuentran en la pulpa (roca molida humedecida que proviene de la molienda) por medio de su adhesión a burbujas de aire, las cuales ascienden hacia la superficie del reactor de flotación formando una espuma. Al efluente de este proceso se le conoce como relave, y corresponde a una suspensión líquida de los sólidos finos que no son separados, y que contiene además reactivos químicos utilizados con el fin de hacer aerofílicos los minerales a flotar (Canfield, 2012).

Por sus posibles efectos adversos sobre el medio ambiente, los relaves son conducidos desde el sitio de la faena hacia “tranques o depósitos de relave”, estructuras especialmente diseñadas para la contención de este material. Según el más reciente Catastro de Depósito de Relaves realizado por el Servicio Nacional de Geología y Minería, en Chile existen 112 tranques Activos, 436 No activos y 148 Abandonados, sumando un total de 696 a nivel país (SERNAGEOMIN, 2016). Sin embargo, independiente de su estado operativo, estas estructuras están sujetas a posibles fallas que pueden liberar su contenido al medio ambiente, dentro de las cuales las filtraciones de su contenido acuoso, las cuales pueden percolar en el suelo y provocar la contaminación de las aguas subterráneas, corresponden al 20% del total de las fallas de los tranques de relaves (Azam y Li, 2010; Rico, 2008). Este problema comúnmente se subsana instalando una barrera hidráulica que recupera el agua contaminada de un acuífero desde en una zona rio abajo (según el sentido de las aguas subterráneas) al

muro del tranque, la que puede ser devuelta al tranque o procesada para su descontaminación y posterior inyección en el acuífero (Younger et al, 2002).

La minería del cobre, uno de los procesos de obtención de metales más desarrollados a nivel nacional, no está ajena al problema de la presencia de residuos potencialmente tóxicos en los efluentes de sus procesos. El material rocoso que contiene minerales de cobre azufrados, genera residuos con diversos metales pesados así como con altas concentraciones de sulfato (SO_4^{2-}), el que deriva de la oxidación del azufre contenido en estos minerales (Banks et al, 1997; Johnson, 2003). Debido a esto, en las filtraciones desde los tranques de relave, el contenido acuoso de éstos que se infiltra a través del basamento rocoso de estas estructuras, puede provocar la contaminación con sulfato de los acuíferos subyacentes al lugar donde son emplazados (Figura 1).



Figura 1. Contaminación de acuíferos producto de las filtraciones desde los tranques de relave. El relave, al llegar al lugar de su disposición final (el tranque de relave), se separa en sus fases sólida (sólidos finos sedimentados) y líquida (aguas claras). Esta última, puede infiltrarse a través del lecho donde se encuentra emplazado el tranque, alcanzando los acuíferos subyacentes. Como resultado de la oxidación de minerales sulfurados que no son separados en el proceso de flotación, el relave puede contener sulfatos que pueden alcanzar la napa subterránea.

En Chile, ha sido reportada la presencia de contaminantes derivados de la actividad minera en las aguas de los acuíferos subyacentes a los tranques de relaves Las Tórtolas (Calabrán, 2009), El Mauro (El Mostrador, 2015) y Ovejería (CODELCO, 2011). Sin embargo, el problema de las filtraciones de aguas desde tranques de relaves parece ser un tema transversal en el manejo de estos depósitos a nivel mundial, puesto que se ha evidenciado la contaminación de los acuíferos cercanos al depósito polaco Żelazny Most con componentes derivados del procesamiento de minerales (Duda, 2014).

1.3 Bacterias reductoras de sulfato como solución para las filtraciones de aguas de tranques de relaves hacia napas subterráneas.

El azufre es uno de los elementos químicos más abundantes de la Tierra. Este forma parte de un complejo ciclo biogeoquímico dentro del cual experimenta transformaciones que lo distribuyen entre sus formas orgánicas e inorgánicas. En los cuerpos de agua naturales este elemento se puede encontrar como sulfato (SO_4^{2-}), la especie inorgánica soluble del azufre en su estado más oxidado (6+) (Ksionzek et al, 2016).

Uno de los componentes biológicos más importantes que forman parte del ciclo del azufre corresponde a las bacterias reductoras de sulfato (BRS), microorganismos ampliamente encontrados en ambientes naturales anóxicos, como mares y lagos, y que se caracterizan por su capacidad de utilizar sulfato como aceptor final de electrones en las rutas de oxidación de compuestos orgánicos (dadores de electrones) tales como etanol, formiato, lactato, piruvato, malato y succinato, resultando en la producción de ácido sulfhídrico (H_2S) (Dupraz et al, 2009, Gallagher, 2012) (Ecuación 1).



Este particular grupo bacteriano es abundante en los microbialitos o tapices microbianos. Estos corresponden a formaciones órgano-minerales naturales que se pueden encontrar en mares y lagos salinos, cuya morfología particular deriva de la biomineralización de sedimentos mediada por microorganismos (Muyzer y Stams, 2008). El componente biológico de los microbialitos está compuesto por un grupo definido de microorganismos, que operan de manera concertada para llevar a cabo el ciclado de elementos como el oxígeno (O_2), nitrógeno (N_2), azufre (S) y carbono (C). El componente mineral de estas formaciones corresponde principalmente a carbonato de calcio (CaCO_3) en sus formas cristalinas y amorfas, los que precipitan y se acumulan producto de la actividad de los microorganismos (Dupraz et al, 2009).

La presencia del componente mineral en los microbialitos es directa consecuencia de la actividad de las BRS presentes en estas formaciones. El aumento de pH junto con el desplazamiento del equilibrio de carbonatos hacia la formación de iones HCO_3^- y CO_3^{2-} que son consecuencia de la reducción microbiana de sulfato, son los principales responsables del aumento del índice de saturación o potencial de precipitación del CaCO_3 hasta valores en los cuales puede precipitar espontáneamente (Dupraz et al, 2009; Gallagher et al, 2012; Solari, 2011). Sin embargo, además de que los microorganismos reductores de sulfato favorezcan el ambiente químico para que ocurra este fenómeno, se ha demostrado que estos pueden producir cantidades copiosas de sustancias poliméricas extracelulares (SPE), las que pueden actuar como sitios de nucleación para dar comienzo a la precipitación de minerales carbonatados (Braissant et al, 2007).

1.3.1 Disminución de la permeabilidad de un medio poroso por biocolmatación y biomineralización.

La biocolmatación o colmatación biológica se puede definir como la disminución del volumen de vacío de un material poroso debido a la acumulación de biomasa, precipitación de minerales y/o la producción de gas inducida por microorganismos, lo que produce la reducción de la conductividad hidráulica del material (Phanikumar et al, 2005). La biomineralización constituye un caso particular de biocolmatación, y se caracteriza por la acumulación de un alto contenido de minerales carbonatados de origen biogénico, los que pueden provocar una gran disminución de la permeabilidad de un medio poroso.

En nuestro laboratorio, como resultado de la inoculación con muestras de microbialitos, se ha logrado disminuir la permeabilidad por biocolmatación, de medios porosos empacados en columnas mantenidas en condiciones químicas similares a las de un acuífero (presión parcial de O_2 (pO_2) y concentración de sulfato) contaminado con aguas de un tranque de relave y bajo un régimen de estimulación particular con un medio de cultivo selectivo para BRS (Gutiérrez, 2017; Pontigo, 2017). Sin embargo, en este tipo de experimentos, sólo se puede obtener información respecto de los cambios en la permeabilidad de secciones de columna, gracias a piezómetros o sensores de presión ubicados a distintas alturas en estos reactores. Se ha demostrado que en este tipo de experimentos la mayor parte de la biocolmatación (biomasa microbiana y minerales) se localiza en el extremo de la columna por el cual ingresan los nutrientes, por lo que se puede sobreestimar la cantidad del material poroso que está siendo afectado por la biocolmatación cuando se utilizan columnas de gran longitud (Thullner, 2010).

Considerando la problemática anteriormente expuesta, y como el fin último es reducir la permeabilidad del material poroso de un acuífero contaminado con aguas de un tranque de relaves que contiene sulfato, en esta tesis se tratará de reducir la permeabilidad del medio poroso de un modelo de acuífero por la biomineralización producida por un consorcio microbiano reductor de sulfato. En esencia se pretende simular, en un modelo de acuífero de escala pequeña, una operación de inoculación y estimulación de los microorganismos a través de un pozo de infiltración subterráneo para la biomineralización de un acuífero. Se utilizarán microorganismos reductores de sulfato para, por efecto de la disminución de la permeabilidad de un acuífero provocada por la acumulación de minerales de CaCO_3 y biomasa microbiana, impedir o disminuir el avance del agua contaminada que se filtra desde un tranque de relave hacia un acuífero, a la vez que se reducirá biológicamente el sulfato contenido en el agua filtrada. Por lo tanto, se espera que los resultados que deriven de este trabajo sirvan para idear una estrategia de inoculación-estimulación del consorcio microbiano para maximizar el alcance de la biomineralización del material poroso de la napa subterránea.

El modelo de acuífero utilizado en esta tesis corresponde a una cámara de flujo de paredes transparentes, empacada con un material poroso, la cual representa una sección de acuífero que contiene al punto de inoculación de microorganismos. Utilizando trazadores visibles (colorantes), este tipo de modelos han sido útiles para la observación de los cambios en la permeabilidad del medio poroso que son producidos por la colmatación (Thullner, 2010). En trabajos relacionados, estas cámaras han sido utilizadas para la evaluación de la colmatación producida por microorganismos cuando son estimulados con un dador y/o aceptor de electrones particular (Kildsgaard y Engesgaard, 2001; Kildsgaard and Engesgaard, 2002; Seifert y Engesgaard, 2007; Seifert y Engesgaard, 2012; Seki et al, 2006), o para

evaluar el potencial de degradación de contaminantes mediado por microorganismos (Cirpka et al, 1999).

Actualmente, no se han reportado trabajos similares que apunten a disminuir la permeabilidad de una napa subterránea por biomineralización en un modelo de acuífero. Por lo tanto, la presente tesis se basará principalmente en buscar la forma de disminuir la permeabilidad del material poroso de un modelo de acuífero y en reducir la concentración de sulfato presente en el agua de un acuífero contaminada por un tranque de relave utilizando un consorcio microbiano reductor de sulfato.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Es posible optimizar la biomineralización del medio poroso de un modelo de acuífero a través del desarrollo de un método de inoculación y estimulación de un consorcio microbiano reductor de sulfato en presencia de agua de la barrera hidráulica de un tranque de relave.

Objetivo general

Optimizar un método de biomineralización de un medio poroso en un modelo de acuífero en presencia de agua de la barrera hidráulica de un tranque de relave utilizando un consorcio microbiano reductor de sulfato.

Objetivos específicos

1. Construir un modelo de acuífero y determinar sus parámetros hidráulicos basales utilizando el colorante Erioglaucina (azul brillante) en una concentración que no afecte la capacidad reductora de sulfato del consorcio.

Se construyó un modelo de acuífero y se determinaron sus parámetros de conducción hidráulica previos a su inoculación. También se evaluó el efecto del compuesto azul brillante (Erioglaucina) sobre la capacidad reductora de sulfato del consorcio microbiano a inocular, para posteriormente utilizarlo como trazador en el modelo de acuífero.

2. Evaluar el efecto de la velocidad de inoculación sobre la actividad reductora de sulfato y la biomineralización en un modelo de acuífero.

Se evaluó el efecto de la dispersión inicial del consorcio microbiano en el medio poroso de un modelo de acuífero sobre la capacidad reductora de sulfato y la biomineralización. Para esto, se ensayaron dos velocidades de inoculación de los modelos, en los cuales se midieron los parámetros relacionados con la actividad reductora de sulfato y la biomineralización.

3. Evaluar el efecto de la concentración de formiato sobre la actividad reductora de sulfato y la biomineralización en un modelo de acuífero.

Se evaluó un rango de concentraciones de formiato con el fin de encontrar una concentración óptima para mejorar la capacidad reductora de sulfato y la biomineralización en el modelo de acuífero.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos

- Becton, Dickinson and Company, EEUU: Extracto de levadura
- Biohídrica, Chile: LixKit
- BioMérieux, Francia: Aceite mineral
- Droguería Michelson S.A., Chile: Timol cristal
- Merck, Alemania:
 - Ácido tioglicólico
 - Anhídrido acético
 - Bicarbonato de sodio
 - Cloruro de amonio
 - Cloruro de bario dihidratado
 - Cloruro férrico hexahidratado
 - Fosfato diamónico
 - Fosfato monopotásico
 - Sulfato de magnesio heptahidratado
 - Varillas indicadoras de pH MColorpHast
 - 2-propanol
- MOBIO, EEUU: PowerSoil DNA Isolation Kit
- Perstorp, Suecia: Formiato de sodio
- Sigma Aldrich, EEUU:
 - Acetamida
 - Cloruro de calcio dihidratado
 - Erioglaucina (Azul brillante FCF)
 - Hidróxido de potasio
 - N,N-dimetil-1,4-fenilendiamina oxalato

- Winkler, Chile:
 - Ácido sulfúrico
 - Sulfato de hierro heptahidratado

3.2 Equipos

- Balanza analítica Kern, modelo ABJ-NM/ABS-N, Alemania.
- Balanza granataria Sartorius, modelo BL6100, Alemania.
- Bombas peristálticas 1-100 rpm, Cole-Palmer, modelo 7557-14, EEUU.
- Cámara fotográfica SONY DSC-W830 Zeiss-Vario-Tesssar 3,3-6,3/4,5-36, 20,1 MegaPixels, China.
- Controlador de potencia de bomba Cole-Palmer, modelo 7557-14, 1-100 rpm, EEUU.
- Equipo de difracción de rayos X D8 Advance, Bruker, Alemania.
- Espectrofotómetro Dynamica, modelo HALO RB-10, Gran Bretaña.
- Horno TV 290-176668, Memmert. Bio JSP, Alemania.
- Luminómetro Kikkoman, modelo Lumitester PD-20, Japón.
- Medidor de potencial Cole Palmer, modelo 59997-60, EEUU.
- Microscopio de barrido electrónico de alta resolución (HR-SEM), modelo INSPECT-F50, Holanda.
- Microscopio de contraste de fases Zeiss, modelo Standard 20, Alemania.
- pHmetro OrionStar ThermoScientific A21, EEUU.
- Recubridor Oro/Carbono Denton Desk V, EEUU.
- Secador de Punto Crítico Autosamdri – 815, EEUU.

3.3 Obtención del consorcio microbiano reductor de sulfato y de agua de barrera hidráulica de un tranque de relave.

El consorcio microbiano reductor de sulfato (inóculo para los modelos de acuífero) se obtuvo desde biorreactores de tipo columna de lecho fijo, los cuales fueron previamente sembrados con muestras de un microbialito obtenido desde el Lago Sarmiento, XII Región, Chile (Gutiérrez 2017), y en los cuales se llevó a cabo el enriquecimiento de las bacterias reductoras de sulfato presentes en el microbialito.

Se utilizó agua de un pozo de la barrera hidráulica del tranque de relaves Ovejería, Región Metropolitana, Chile, perteneciente a la División Andina de CODELCO, tanto para la preparación de los medios de cultivo como para su utilización en los modelos de acuífero. Las recolecciones de agua se efectuaron cada dos meses aproximadamente, de las cuales se realizó un análisis de composición química en DICTUC S.A.

3.4 Cultivos del consorcio microbiano reductor de sulfato (inóculo) en presencia del colorante azul brillante.

La evaluación del efecto del colorante sobre la actividad reductora de sulfato del consorcio microbiano se realizó en tubos de ensayo con tapa rosca de 10 mL. Para mantener condiciones anaeróbicas en los cultivos, se añadió 8 mL de medio de cultivo PCM(F) (ver composición en 3.5) caliente (80°C aproximadamente), cuya superficie se cubrió inmediatamente con aceite mineral. Una vez que se enfrió el medio de cultivo, a cada tubo se le agregó 1 mL de inóculo ($2 \cdot 10^8$ microorganismos/mL) y 1 mL de una solución estándar

del colorante alimenticio Erioglaucina o azul brillante (AB) para obtener las siguientes concentraciones finales: 0, 50, 100, 150, 200 y 250 mg/L. Como control negativo, se evaluó el efecto de timol (un inhibidor conocido para algunas especies de BRS (De Souza et al, 2017)) sobre el consorcio microbiano, utilizando el compuesto en una concentración final de 1000 mg/L en los cultivos. Finalmente, los tubos se taparon y se incubaron a 20° C por 27 días, luego de lo cual se realizó la determinación de sulfato, ácido sulfhídrico, pH y potencial. Todas las concentraciones se evaluaron en triplicado.

3.5 Medio de cultivo para los ensayos con el colorante y la estimulación del consorcio microbiano reductor de sulfato en los modelos de acuífero.

En todos los experimentos, se utilizó el medio de cultivo selectivo para BRS denominado PCM(F), el cual se basa en el medio utilizado por Postgate (1963). Las principales variaciones de este medio de cultivo de referencia que se realizaron en este trabajo fueron: 1) se utilizó formiato como dador de electrones, ya que se ha verificado que su metabolización por parte de BRS provoca la alcalinización del medio, lo que favorece la precipitación del CaCO_3 (Gallagher et al, 2012), y 2) todos los componentes están disueltos en agua de barrera hidráulica, la que se utilizó como la principal fuente de sulfato en el medio de cultivo.

La composición de un litro de este medio de cultivo fue: 0,035 g de NaHCO_3 , 0,03 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,4 g de K_2SO_4 , 0,007 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g de NH_4Cl , formiato de sodio en cantidad variable dependiendo del experimento, 0,01 g de KH_2PO_4 , 1,72 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g de extracto de levadura y 0,099 g de ácido tioglicólico.

Una vez disueltos todos los compuestos en agua de barrera hidráulica (composición química en Tabla 1) se ajustó el pH a 7,9 agregando gotas de KOH 0,1 M.

Tabla 1. Análisis químico del agua de barrera hidráulica del tranque de relaves.

Compuesto	Concentración (mg/L)	Compuesto	Concentración (mg/L)
Amonio	<0,05	Magnesio	76,6
Arsénico	<0,006	Manganeso	<0,01
Bicarbonato	217,69	Molibdeno	<0,01
Cadmio	<0,005	Plomo	<0,003
Calcio	302	Potasio	1,4
Carbonato	<0,02	Sodio	138
Cloruro	61,0	Sulfato	1800
Cobre	<0,01	Sólidos disueltos	1645
Fósforo	<0,01	Zinc	<0,01
Hierro	<0,03		

3.6 Construcción de los modelos de acuífero.

Se utilizaron cámaras de acrílico transparente (Plexiglas) de dimensiones internas de 32 x 12 x 1 cm; largo, ancho y alto respectivamente (Figura 2). Estas estaban provistas por una tapa removible, la cual contaba con orificios donde se instalaron puertos para la inoculación y estimulación de microorganismos, y un puerto de toma de muestras situado río abajo respecto a los anteriores. Para establecer un frente de flujo hidráulico homogéneo a través de toda la sección de los modelos, en uno de sus extremos se instaló una tubería interna que abarcó todo el ancho del modelo, construida con manguera de Tygon (MasterFlex) perforada cada 1 cm, que se utilizó para la entrada del agua de barrera hidráulica que simula el flujo subterráneo. En el otro extremo, se instaló una manguera de Tygon para la salida del efluente de los modelos. Luego, el volumen interno del modelo (384 mL) fue empacado con

545 g de arena de cuarzo de tamaño de partícula entre 200-800 μm , la que fue previamente lavada con HCl al 10% (v/v), enjuagada con agua destilada, y secada a 180°C por 4 horas para eliminar carbonatos y microorganismos que puedan encontrarse antes de los experimentos. Una vez armados los sistemas, se les pasó agua destilada utilizando bombas peristálticas, fijando el flujo de salida de la bomba a 0,6 mL/min, la que corresponde a la mitad del caudal promedio del acuífero del tranque de relaves en estudio. La estandarización de los parámetros hidráulicos basales de los modelos se llevó a cabo usando agua destilada, la cual fue reemplazada por agua de barrera hidráulica un día antes del comienzo de la infiltración de los microorganismos.

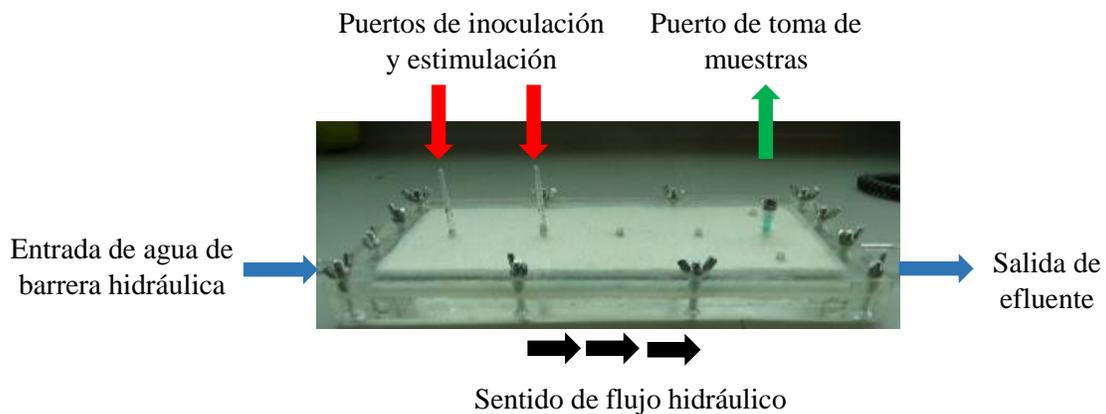


Figura 2. Ejemplo de modelo de acuífero construido en base a cámaras de acrílico. Se muestra una cámara de acrílico con tapa removible empacada con arena de cuarzo. En la figura se pueden distinguir los puertos para la inoculación y estimulación de microorganismos, y para la toma de muestras. En sus extremos, se les instaló internamente una tubería para la entrada de agua de flujo y otra para la salida de efluente.

3.6.1 Determinación de parámetros hidráulicos de los modelos de acuífero.

Una vez contruidos los modelos de acuífero, se estableció el flujo hidráulico utilizando agua destilada, a la velocidad mencionada previamente. Para alcanzar una velocidad de flujo constante en el interior de los modelos, éstos funcionaron por 48 horas sólo con agua, luego de lo cual se procedió a determinar los siguientes parámetros hidráulicos previos a la inoculación de los modelos:

3.6.1.1 Tiempo de retención.

Se hizo pasar 250 mL de una solución de AB (como trazador) a una concentración de 100 mg/L, a través de la entrada del agua de flujo de los modelos, y se tomó muestras desde el puerto de toma de muestra cada 30 minutos desde que se observó su llegada al puerto. Se realizó este procedimiento hasta que la concentración del trazador en el puerto de muestras alcanzó la mitad de la concentración en la solución inicial (es decir, 50 mg/L), y se registró aquel tiempo como el necesario para que el trazador se desplazara por esa sección de modelo (o tiempo de retención). La concentración de AB fue determinada en un espectrofotómetro a 630 nm.

3.6.1.2 Flujo de efluente de los modelos.

Para determinar la permeabilidad global de los modelos de acuífero, se recolectó el volumen de efluente durante 5 min en un tubo de ensayo previamente tarado. El valor de flujo de efluente fue informado en mL/min.

3.6.1.3 Seguimiento fotográfico del trazador a través de los modelos.

Para monitorear los cambios del patrón de flujo hidráulico en el medio poroso de los modelos de acuífero, se realizaron capturas fotográficas del avance del trazador a través de los modelos desde la cara superior de éstos. Las capturas se realizaron manteniendo constantes la luminosidad y la distancia entre el lente y el objeto.

3.7 Inoculación de los modelos de acuífero con el consorcio microbiano reductor de sulfato.

Para cumplir con lo propuesto en el objetivo 2, se construyeron 5 modelos en los cuales se evaluaron dos velocidades de infiltración del inóculo: a 2 mL/min, o pulso rápido de inóculo (n=2 modelos); y a 0,2 mL/min, o pulso lento de inóculo (n=2 modelos). En todos los experimentos, cada pulso de inóculo contenía $1 \cdot 10^9$ microorganismos según lo calculado por recuento microbiano (ver 3.7.2.3.). Además, se utilizó un modelo como control no inoculado (n=1 modelo), en el cual se infiltró un pulso rápido de agua de barrera hidráulica con el fin de simular la inoculación a 2 mL/min. Luego de las inoculaciones, se suministró continuamente medio de cultivo PCM(F) con 4,95 g/L de formiato a una velocidad de 0,2 mL/min. Del mismo modo, en el caso del control no inoculado, luego de la infiltración de agua se inyectó continuamente agua de barrera hidráulica a 0,2 mL/min. Los modelos inoculados fueron reinoculados a la misma velocidad del primer inóculo, los días 15, 30, 45, 48, 52, 55 y 58, contados a partir de la primera inoculación.

Para el objetivo 3, se construyeron 8 modelos de acuífero en los que se evaluó el efecto de cuatro concentraciones de formiato en el medio de cultivo. Las concentraciones

fueron 3, 6, 12 y 18 g/L. En este caso, los modelos fueron inoculados con la misma cantidad de microorganismos que en el experimento del objetivo 2, y re-inoculados el día 15 de funcionamiento. La velocidad de inoculación fue de 0,2 mL/min (pulso lento) en todos los modelos. Luego, en experimentos independientes (n=2 modelos), los modelos fueron estimulados con los medios de cultivo conteniendo las distintas concentraciones de formiato durante 60 días.

3.7.1 Monitoreo de parámetros de reducción microbiana de sulfato, fisicoquímicos, colonización microbiana y utilización de formiato en los modelos de acuífero.

Se obtuvo entre 20-350 μL (dependiendo del parámetro a determinar) de solución desde el puerto de toma de muestra de los modelos utilizando jeringas estériles, cuidando de no extraer el volumen rápidamente, con el fin de evitar cambios bruscos en el flujo que resultan de la disminución de presión local producto de la extracción. Estas muestras fueron utilizadas para la determinación de sulfato, ácido sulfhídrico y tiempo de retención (cuando se utilizó el trazador).

El efluente de los modelos fue utilizado para realizar las determinaciones de pH, potencial, formiato, recuento microbiano y ATP.

3.7.1.1 Sulfato (SO_4^{2-}).

Se utilizó el método estándar basado en la precipitación del sulfato contenido en las muestras como sulfato de bario (BaSO_4) que se forma al agregar la sal soluble cloruro de

bario (BaCl_2) en exceso (WEF, 1999). El sulfato de bario formado fue determinado por turbidimetría mediante un espectrofotómetro a 450 nm.

3.7.1.2 Ácido sulfhídrico (H_2S).

Se utilizó el método colorimétrico de formación de azul de metileno (WEF, 1999), el que basa en la reacción entre el ácido sulfhídrico presente en las muestras, cloruro férrico y N,N-dimetil-p-fenilendiamina. Luego de mezclar las muestras con los reactivos, se determinó la cantidad de azul de metileno formado en un espectrofotómetro a 664 nm.

3.7.2 Parámetros de colonización microbiana en los modelos de acuífero.

3.7.2.1 Determinación de ATP intracelular microbiano en el efluente de los modelos de acuífero.

La cantidad de ATP se determinó con el sistema comercial de medición de ATP LixKit® el que se basa en la reacción de oxidación de luciferina dependiente de ATP catalizada por la enzima luciferasa. La cantidad de luz producida por la reacción se determinó mediante un luminómetro. Para esto, se tomaron 5 mL de efluente de los modelos, del cual se concentraron los microorganismos por filtración en membranas de nitrocelulosa (0,22 μm). Posteriormente, los microorganismos filtrados fueron recolectados con la tórula provista en el sistema, la que se inserta en la varilla de reacción que contiene el líquido de lisis celular y los demás componentes liofilizados para la oxidación de luciferina dependiente de ATP. El valor de luminiscencia obtenido (en Unidades Relativas de Luz, URL), fue dividido por 5 para obtener el valor de URL/mL.

3.7.2.2 Determinación de ATP intracelular microbiano de los microorganismos fijados en el medio poroso.

Se utilizó un protocolo especialmente diseñado para determinar la cantidad de ATP de los microorganismos adheridos a la arena de cuarzo de los modelos de acuífero. Para esto, se tomaron 200 mg de una muestra de arena, la que fue lavada con agua destilada para remover las bacterias presentes en el volumen de poro, luego de lo cual se agregó 1 mL de la solución de lisis celular contenida en el sistema de determinación de ATP. Posteriormente, el sobrenadante de la lisis se hizo reaccionar con los demás componentes liofilizados (luciferina-luciferasa) para determinar la cantidad de ATP mediante un luminómetro. El valor de luminiscencia obtenido se expresó como URL/g de arena.

3.7.2.3 Recuento microbiano en efluente.

Se cargó un volumen de 160 μ L de efluente en una cámara de Petroff-Hausser, la cual se llevó a un microscopio de contraste de fases para obtener el número de microorganismos promedio que resulta del conteo de 10 cuadrados de 0,05 mm por lado. Este valor se multiplicó por $2 \cdot 10^7$ para obtener el número de microorganismos presentes en 1 mL de muestra.

3.7.3 Cuantificación de formiato en efluente.

Se utilizó un método colorimétrico previamente descrito por Sleat y Mah (1984), el que se basa en la formación del ácido citracínico, que resulta por reacción entre acetamida,

ácido cítrico, anhídrido acético y formiato. La reacción entre los componentes del método (1 mL) y la muestra (0,5 mL) fue incubada a temperatura ambiente por 2,5 hrs, luego de lo cual se cuantificó el producto de la reacción en un espectrofotómetro a 510 nm.

3.8 Análisis del medio poroso de los modelos de acuífero.

Una vez terminado el experimento en los modelos de acuífero, se procedió a su apertura y a la toma de muestras de arena para los siguientes análisis:

3.8.1 Determinación de pH en el agua de poro.

Una vez abiertos los modelos de acuífero, inmediatamente se determinó el pH en el agua de poro de la arena en distintas zonas de los modelos, humedeciendo tiras indicadoras de pH. Se compararon los colores de las tiras con el patrón provisto en el envase del producto. Las lecturas de pH fueron utilizadas para realizar un mapa de pH correspondiente al plano superior del medio poroso de los modelos.

3.8.2 Determinación de carbonatos totales en muestras de arena.

Se obtuvo pequeñas muestras de arena (300 mg aprox) desde distintas zonas de los modelos, las cuales se pusieron bajo una lupa y se les agregó gotas de HCl concentrado (1M) con el fin de observar burbujes que dan cuenta de la posible presencia de carbonatos. Las muestras que resultaron positivas a esta prueba, se enviaron al laboratorio de Química y Bioquímica de Suelos de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, donde se determinó los carbonatos totales por titulación ácido-base.

3.8.3 Difracción de rayos X.

Las muestras de arena fueron molidas en un mortero para obtener una muestra con granulometría adecuada para realizar la difracción de rayos X (DRX). Luego fueron analizadas utilizando un equipo de DRX. El difractograma obtenido se comparó con los correspondientes a muestras estándar de minerales de CaCO₃.

3.8.4 Observación por microscopía de barrido electrónico (MBE) de la superficie de la arena de cuarzo.

Se tomó aproximadamente 100 mg de muestra de arena de cuarzo de los modelos y se les añadió una solución fijadora de cacodilato-glutaraldehído 2,5%. Luego de esto, las muestras se prepararon según el protocolo utilizado por el Laboratorio de Nanobiomateriales de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. La preparación consistió en secar la muestra en un secador de punto crítico y en su recubrimiento con oro. Posteriormente, las muestras fueron observadas en un microscopio de barrido electrónico utilizando un voltaje variable dependiendo de la muestra.

3.8.5 Análisis de la comunidad microbiana adherida a la arena de los modelos de acuífero por secuenciación masiva del gen del ARNr 16S.

Se obtuvo muestras de arena de los modelos de acuífero de los cuales se extrajo el ADN genómico total utilizando un sistema comercial de extracción de ADN. La PCR y secuenciación de las amplificaciones de la región hipervariable V4 del gen del ARNr 16S se realizó de acuerdo al protocolo utilizado por el servicio de secuenciación del Centro de Genómica y Bioinformática de la Facultad de Ciencias de la Universidad Mayor. Las

secuencias obtenidas fueron procesadas y comparadas para su identificación con la base de datos SILVA de 2018.

3.9 Análisis de imágenes utilizando el programa ImageJ.

Para cuantificar el porcentaje de arena de cuarzo que fue biomineralizada en los modelos de acuífero al finalizar el experimento, se utilizó el programa ImageJ para calcular un área biomineralizada según la ecuación:

$$\text{Área biomineralizada} = \frac{\text{área del medio poroso biomineralizado}}{\text{área total del medio poroso}} * 100$$

donde el área del medio poroso biomineralizado y el área total del medio poroso corresponden al número de píxeles que resultaron de selecciones a mano alzada sobre las fotografías al finalizar el experimento.

3.10 Análisis estadísticos.

Se utilizó el programa SigmaPlot 12.0 para realizar análisis de varianzas (ANOVA) de una vía para determinar la existencia de diferencias significativas entre las medias de los parámetros de grupos tratamiento y un grupo control (prueba de Dunnett), utilizando un valor de significancia de $p < 0,05$. A su vez, la normalidad estadística del conjunto de datos fue evaluada utilizando el test de Shapiro-Wilk.

IV RESULTADOS

4.1 Evaluación del efecto de erio Glaucina (azul brillante) sobre la capacidad reductora de sulfato del inóculo microbiano.

Uno de los objetivos de este trabajo de tesis fue producir en los modelos de acuífero la precipitación de CaCO_3 mediada por el consorcio microbiano reductor de sulfato. Como se mencionó previamente, este fenómeno depende directamente de la actividad reductora de sulfato de los microorganismos. Por lo tanto, se verificó que el compuesto a utilizar como trazador, el aditivo alimentario erio Glaucina (azul brillante), no perjudicara la capacidad reductora de sulfato del consorcio microbiano. Con el fin de evaluar esto, se realizaron cultivos del inóculo en medio líquido en presencia de distintas concentraciones de AB (Figura 3). Luego de 27 días de incubación, los tubos fueron abiertos para la cuantificación de los parámetros relacionados con la reducción microbiana de sulfato.

Finalizado el experimento, en todos los tubos en que el consorcio fue incubado con AB, pudo observarse la presencia de un precipitado negro en el fondo de los tubos (Figura 3A), lo que también se observó en los tubos correspondientes al control positivo (Figura 3B). Por su parte, en los ensayos que contenían timol (control de inhibición) no se observó este precipitado (Figura 3B), así como tampoco en los tubos que no contenían el inóculo (control negativo).

En todas las concentraciones de AB ensayadas, se comprobó que ninguna inhibe la producción de sulfuros al nivel que lo hace el inhibidor timol. En todos estos tubos, así como

en el control positivo, la producción de sulfuros alcanzó entre 200-300 mg/L. Por su parte, el timol inhibió esta producción a niveles cercanos a los del control negativo (Figura 4A).

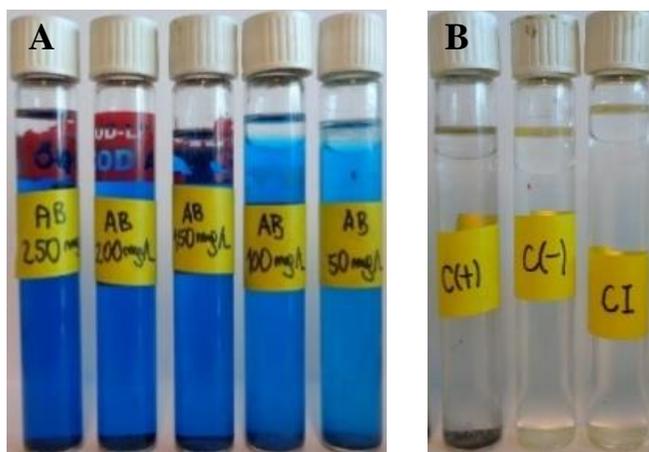


Figura 3. Cultivos del consorcio microbiano en presencia de azul brillante luego de 27 días. (A) Tubos de ensayo para la evaluación del efecto del compuesto azul brillante sobre la reducción microbiana de sulfato. Se observa un ejemplo de los ensayos en presencia del colorante en concentraciones de 250, 200, 150, 100 y 50 mg/L. Se observa la presencia de precipitado negro en el fondo de los tubos de todas las concentraciones del compuesto ensayadas. (B) Ejemplos de los tubos correspondientes al control positivo, negativo y de inhibición. En el fondo de los tubos correspondientes al control positivo, se observa la presencia de precipitado negro (sulfuros de hierro), y no así en los tubos correspondientes al control negativo (sin inocular) y de inhibición (inoculado y con adición de timol).

Con respecto a la cantidad de sulfato presente al final del experimento en los tubos que contenían AB, no se evidenciaron diferencias respecto al control positivo en todas las concentraciones del compuesto ensayadas, excepto para la concentración de 200 mg/L. En este caso, si bien el valor de reducción de sulfato fue mayor respecto al control de inhibición, la cantidad de sulfato reducido no está al nivel observado en el control positivo, como sí ocurrió con las demás concentraciones del compuesto ensayadas (Figura 4B).

Los parámetros fisicoquímicos pH y potencial (Figura 4C y 4D), que pueden verse afectados por la actividad microbiana reductora de sulfato, sufrieron cambios similares a los observados para sulfato y ácido sulfhídrico en los ensayos con el colorante. En todos los tubos que contenían el colorante y en el control positivo, los valores de este parámetro oscilaron entre los -250 y -350 mV, valores que favorecen la reducción microbiana de sulfato, así como se observó una leve acidificación del medio al final del experimento (disminución promedio de 0,15 en el valor de pH).

Todos los parámetros medidos (H_2S , SO_4^{2-} reducido, pH y ORP) en la solución de los cultivos líquidos que contenían AB no fueron estadísticamente diferentes respecto al control positivo, así como en ningún caso son similares al control con el inhibidor (prueba de Dunnett, $p < 0,05$). En el caso particular del ensayo realizado en presencia de 200 mg/L de AB, la diferencia observada en el valor de sulfato reducido respecto al control positivo, se considera como no suficiente para confirmar que el colorante en esta concentración tiene algún efecto en la capacidad de reducción de sulfato del consorcio microbiano, pues los demás resultados de los parámetros medidos en esta concentración de AB (H_2S , pH y potencial), no fueron estadísticamente diferentes al control positivo. La razón más probable que explica este fenómeno, es un error sistemático en la medición de sulfato en la solución de los cultivos que contenían el colorante a dicha concentración.

Por lo tanto, de este experimento se concluye que, en las concentraciones ensayadas, el colorante erioglaucina no tiene efecto sobre la capacidad reductora de sulfato de los microorganismos a utilizar como inóculo. Sin embargo, con el fin de evitar sesgos en las mediciones de sulfato en los experimentos realizados en los modelos de acuífero, se descartó el uso de la concentración de AB comúnmente utilizada en trabajos previos, es decir 200

mg/L, y se utilizó como trazador en la concentración de 100 mg/L. Si bien las concentraciones de 250 y 150 mg/L del colorante no produjeron diferencias significativas en la medición de sulfato respecto al control positivo, se descartó el uso de estas concentraciones con el fin de evitar posibles fenómenos de acumulación o dilución del colorante en zonas del medio poroso de los modelos en las cuales podría acercarse a la concentración de 200 mg/L, que podría tener como efecto arrojar los sesgos observados en la cuantificación de sulfato.

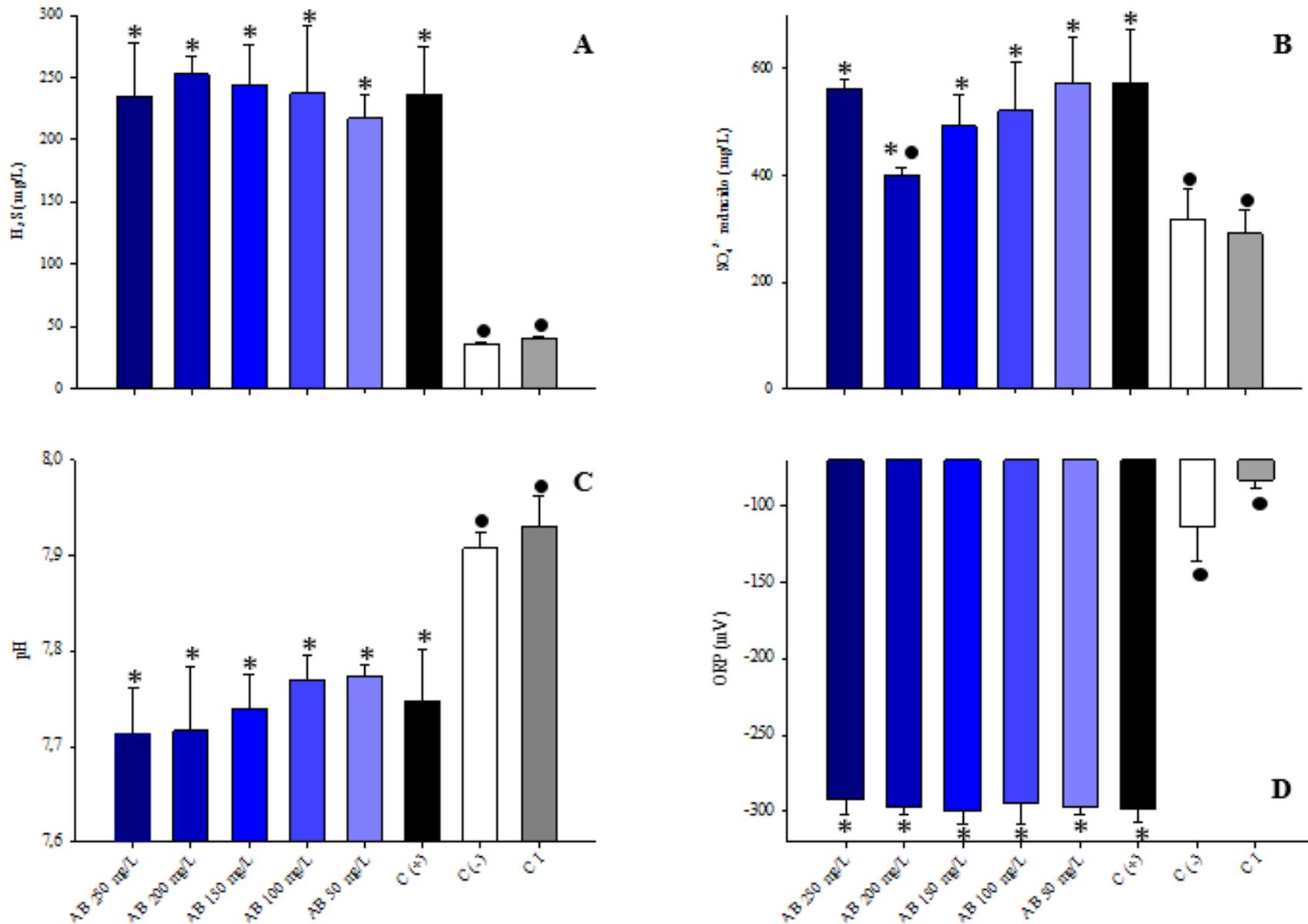


Figura 4. Parámetros de reducción microbiana de sulfato (H₂S y SO₄²⁻ reducido) y fisicoquímicos (pH y ORP) en la evaluación del efecto del compuesto azul brillante. Se muestra la concentración de ácido sulfhídrico (A), sulfato reducido (sulfato inicial – sulfato al final del experimento) (B), pH (C) y ORP (D) promedio ± D.E. de los tubos de ensayos conteniendo el colorante (AB 250, 200, 150, 100 y 50 mg/L), el control positivo (C(+)), control negativo (C(-)), y el control de inhibición con timol (CI). (*): diferencia estadísticamente significativa respecto al control de inhibición. (●): diferencia estadísticamente significativa respecto al control positivo, según análisis de varianza usando prueba de Dunnett ($p < 0,05$, $n=3$).

4.2 Construcción y determinación de los parámetros hidráulicos de los modelos de acuífero previos al experimento.

Una vez contruidos los modelos de acuífero, se utilizó el colorante AB como trazador para determinar un conjunto básico de parámetros que den cuenta de la conducción hidráulica a través de éstos. Una vez establecido esto, se pudo evaluar cómo pueden verse afectados por la eventual colmatación producida por la inoculación con microorganismos y su estimulación con medio de cultivo.

Los valores de flujo de efluente de los modelos correspondientes a 2 días previos a la inoculación con microorganismos reflejaron el valor establecido en las bombas peristálticas (cercano a 0,6 mL/min) (Tabla 2). Los tiempos de retención de todos los modelos de acuífero oscilaron entre los 195-277 min (Tabla 2). Cabe mencionar, que del total de los 13 modelos contruidos, 5 fueron utilizados para el trabajo experimental del objetivo 2 (modelos 1-5), y los 8 restantes (modelos 6-13) para el objetivo 3 de esta tesis.

Aun cuando se observaron diferencias entre los tiempos de retención de los modelos de acuífero contruidos, se consideraron como parte de la variabilidad característica de este parámetro entre los modelos, la que puede resultar del empacado de los modelos con un medio poroso (en este caso arena de cuarzo) de granulometría variable.

Tabla 2. Parámetros hidráulicos previos a la inoculación de los modelos de acuífero. En la tabla se muestran los valores de flujo de efluente y el tiempo de retención del trazador (azul brillante, 100 mg/L) medidos 2 días antes de la inoculación de los modelos.

Modelo de acuífero.	Parámetros hidráulicos previos	
	Flujo de efluente (mL/min).	Tiempo de retención del trazador (min).
1	0,59	268
2	0,59	255
3	0,59	221
4	0,53	277
5	0,58	205
6	0,60	251
7	0,56	240
8	0,66	195
9	0,59	201
10	0,65	208
11	0,62	213
12	0,66	220
13	0,66	210

4.3 Evaluación del efecto de la velocidad de inoculación sobre la actividad reductora de sulfato y la biomineralización en un modelo de acuífero.

Una vez determinados los parámetros hidráulicos de cada modelo de acuífero, se procedió a la inoculación de estos con el consorcio microbiano, según lo expuesto en la metodología. En estos experimentos, se midió periódicamente los parámetros que dan cuenta de la actividad reductora de sulfato del consorcio microbiano inoculado y se evaluaron los cambios en el flujo hidráulico del medio poroso utilizando el compuesto AB como trazador, durante el tiempo que duró el experimento (60 días).

4.3.1 Monitoreo de los parámetros de reducción microbiana de sulfato en los modelos de acuífero.

En un medio poroso, el grado de dispersión de los microorganismos debido a su inoculación puede depender de la velocidad a la cual éstos son infiltrados. Por lo tanto, para cumplir con el segundo objetivo de esta tesis, se evaluó el efecto de dos velocidades de inoculación en un modelo de acuífero; a 0,2 mL/min (o pulso lento de inóculo) y 2 mL/min (o pulso rápido de inóculo).

A partir del día 10, se detectó la presencia de ácido sulfhídrico en los modelos de acuífero inoculados a ambas velocidades (Figura 5A). Esto coincide con el tiempo en que se observó una reducción en la concentración de sulfato en el efluente de los modelos (Figura 5B). Los valores de sulfato descendieron a 1500 mg/L en promedio después del día 14, fluctuando entre 1400-2000 mg/L hasta el final del experimento, mientras que la concentración de ácido sulfhídrico aumentó a valores entre 60-80 mg/L, alcanzando entre 130-200 mg/L en los días finales del experimento en ambos casos (Figura 5A).

A su vez, se observó acidificación del efluente en los experimentos inoculados en comparación con el control no inoculado. A partir del día 20, este parámetro fluctuó en el rango 7,4-7,6 en los modelos inoculados, mientras que el control se mantuvo en el rango de 7,7-8,0 durante todo el experimento (Figura 5C). Un comportamiento similar revelaron los valores de potencial, ya que a partir del día 5 el valor de este parámetro alcanzó entre -170 a -190 mV en los modelos inoculados a ambas velocidades, disminuyendo gradualmente hasta valores menores a -250 mV en los días finales del experimento. El modelo control mostró un menor descenso de este parámetro, promediando un valor de -70 mV durante todo el transcurso del experimento (Figura 5D).

Estos resultados indican que ambas velocidades de inoculación no producen diferencias en la tendencia de los parámetros relacionados con la actividad microbiana reductora de sulfato (concentración de sulfato y ácido sulfhídrico) así como en los parámetros fisicoquímicos relacionados con esta actividad (pH y ORP).

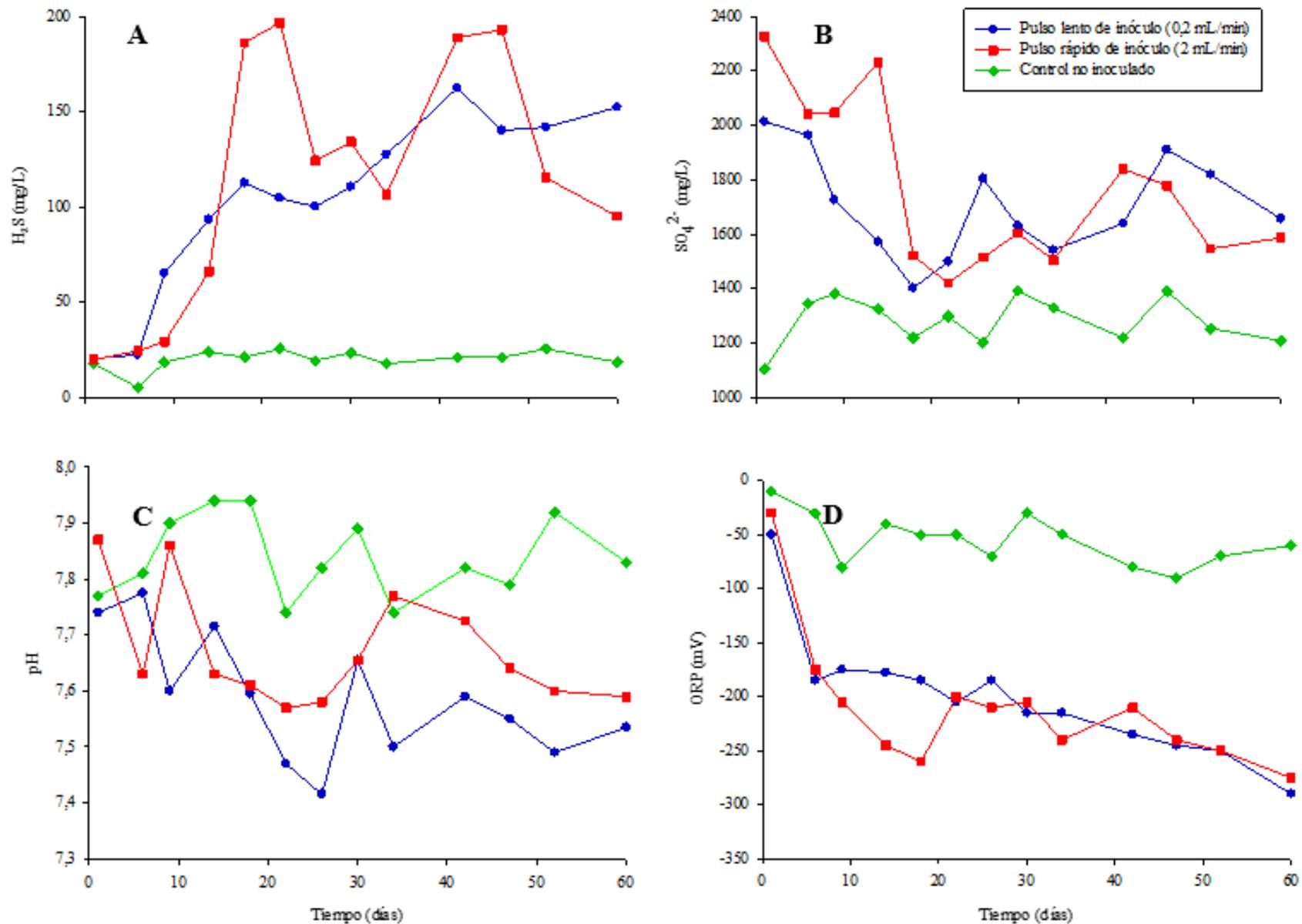


Figura 5. Parámetros de reducción microbiana de sulfato (SO₄²⁻ y H₂S) y fisicoquímicos (pH y ORP) en los modelos de acuífero inoculados a dos velocidades (pulso lento y rápido de inóculo). Se muestran las mediciones de ácido sulfhídrico (A), sulfato (B), pH (C) y ORP (D). Los valores corresponden al promedio de duplicados (n=2) para los modelos inoculados, y a un solo valor (n=1) en el caso del control no inoculado.

4.3.2 Monitoreo de parámetros de colonización microbiana de los modelos de acuífero.

En el efluente de los modelos se determinó periódicamente la cantidad de ATP intracelular y el número de microorganismos con el fin de tener indicios de una posible dinámica de colonización microbiana, que pudiese estar ocurriendo en el interior de los modelos de acuífero.

En los modelos inoculados, se encontraron valores de ATP mayores respecto al control no inoculado, los que variaron entre 800-2500 URL/mL durante todo el experimento (Figura 6A). El resultado del recuento microbiano no mostró diferencias entre los modelos inoculados a distintas velocidades, así como tampoco respecto al modelo control, a excepción de los últimos 10 días, donde en el control no inoculado se observaron menos microorganismos en comparación con los modelos inoculados (Figura 6B).

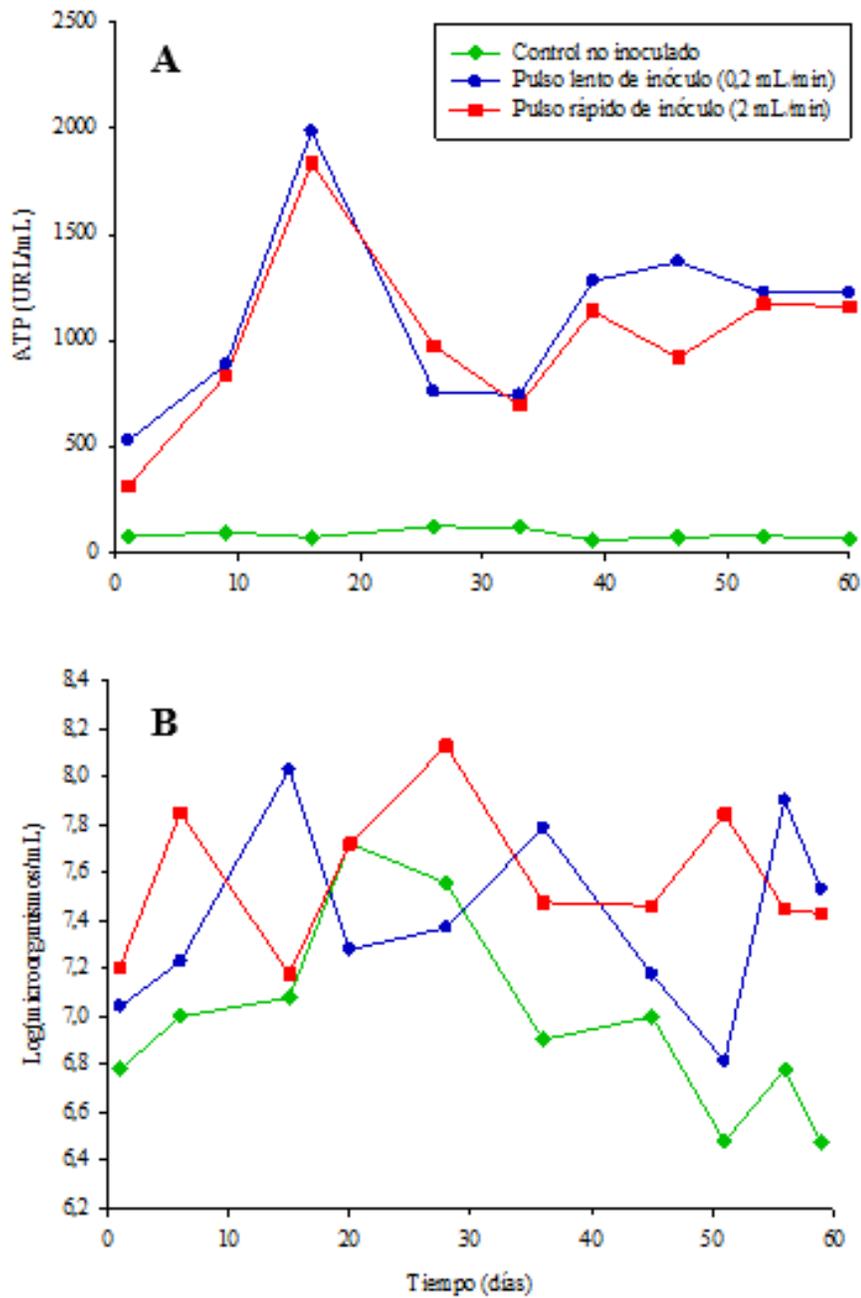


Figura 6. Parámetros de colonización microbiana de los modelos de acuífero. Valores de ATP (A) y recuento microbiano (B) en el efluente de los modelos. Los valores corresponden al promedio de duplicados (n=2) para los modelos inoculados, y a un solo valor (n=1) en el caso del control no inoculado.

4.3.3 Monitoreo de los parámetros hidráulicos de los modelos de acuífero.

En este trabajo de tesis se esperó lograr la disminución de la permeabilidad del medio poroso de los modelos de acuífero debido a la reducción del tamaño de poro debida a la presencia de biomasa microbiana y precipitación de minerales carbonatados.

Durante el período del experimento, en ninguno de los modelos inoculados con las diferentes velocidades fue posible lograr disminución del flujo de efluente (datos no mostrados). Sin embargo, a partir del día 22, se observaron aumentos en el tiempo de retención del trazador en los modelos inoculados. Si bien hubo un aumento de este parámetro en el modelo control al final del experimento, este no alcanzó los valores de los modelos inoculados.

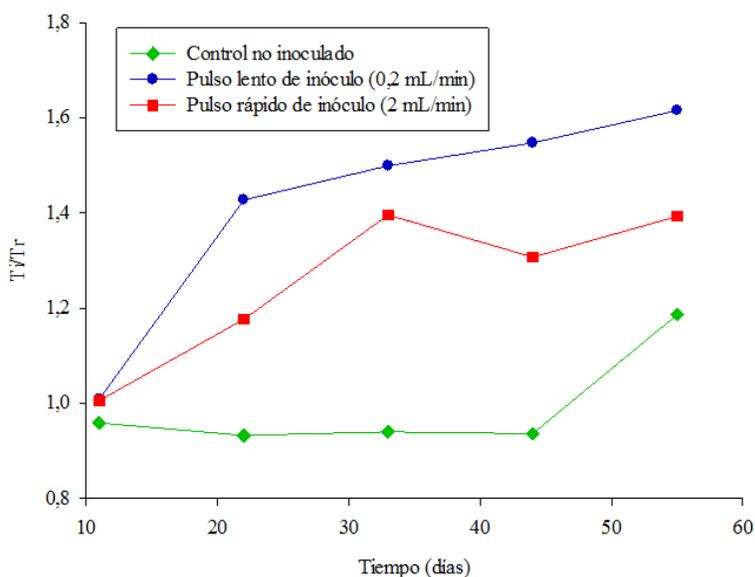


Figura 7. Tiempos de retención relativos de los modelos de acuífero durante del tiempo de experimentación. Se muestran los tiempos de retención relativos al tiempo de retención inicial de los modelos de acuífero. Los valores corresponden al promedio de duplicados (n=2) para los modelos inoculados, y a un solo valor (n=1) en el caso del control no inoculado.

La causa más probable que explica el aumento del tiempo de retención del trazador en los modelos inoculados, sin provocar la disminución de la permeabilidad global de los modelos de acuífero (flujo de efluente), es la presencia de una zona de menor permeabilidad ubicada en la zona central de los modelos de acuífero, la que ralentiza la llegada del trazador al puerto de toma de muestra. En efecto, con el transcurso del experimento, en los modelos inoculados se observa una pluma oscurecida (Anexo 1) que emerge en los puertos de inoculación y estimulación, y que se extiende hacia la salida del efluente, siguiendo la dirección del flujo del agua.

Los análisis de los experimentos con el trazador en el día 55 dan cuenta que las plumas ennegrecidas representan una zona de menor permeabilidad respecto a otras zonas del medio poroso, puesto que se observa que el colorante se desvía cuando se encuentra con esta zona, provocando que la mayor parte del flujo hidráulico ocurra por las zonas no ennegrecidas (Figura 8).

Considerando la producción de ácido sulfhídrico en los modelos y la presencia de trazas de hierro en el medio de cultivo infiltrado, probablemente una parte de esta pluma corresponde a precipitados de sulfuros de hierro, los que pueden estar contribuyendo a la obstrucción del medio poroso en los modelos inoculados.

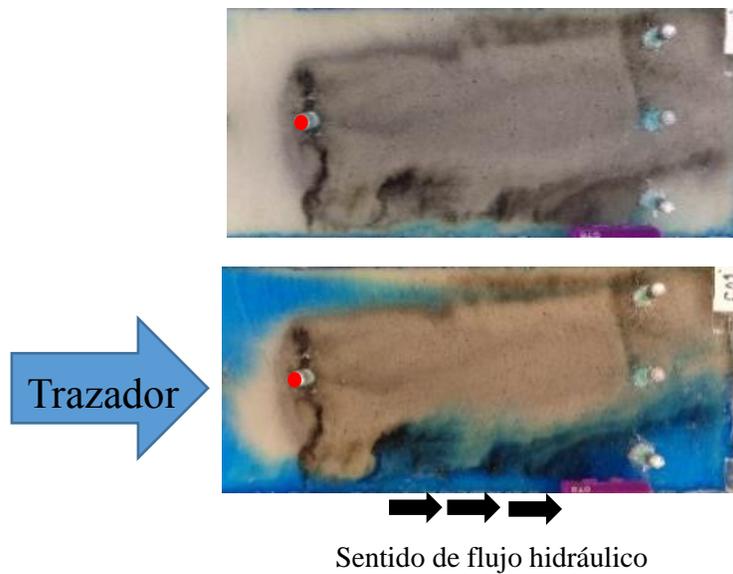


Figura 8. División del flujo del trazador alrededor de una zona de menor permeabilidad del medio poroso de los modelos de acuífero. Se muestra un ejemplo del paso del trazador en uno de los modelos de acuífero en el día 55 de funcionamiento. Se observa el desvío del trazador al encontrarse con la zona ennegrecida del medio poroso. (●): punto de inoculación.

4.3.4 Análisis de la arena de cuarzo de los modelos de acuífero al final del experimento.

Con la apertura de los modelos de acuífero al final del tiempo de experimentación (día 60), se obtuvo acceso a la arena y al agua de poro para los análisis pertinentes.

Se realizaron determinaciones con varillas indicadoras de pH en el agua de poro que permitieron hacer un mapa aproximado de este parámetro (Figura 9). Para mayor simplicidad en la discusión de este parámetro, se distinguieron tres zonas en la arena de los modelos: a) zona 1: primer tercio ubicado en las cercanías de la zona de entrada del agua de flujo, b) zona 2: segundo tercio ubicado en la zona central, y c) zona 3: tercer tercio ubicado hacia la zona de salida de efluente. En todos los modelos de acuífero inoculados, se observó una zona de pH 8 en las zonas 2 y 3. También se observaron zonas puntuales de pH 8,5 en uno de los

duplicados, los que se ubican dentro de las zonas de pH 8. Se observó un menor valor de pH (cercano a 7,5) en la zona 1. En el modelo control, en todas las zonas se detectó un pH de 7,5

Al momento de la toma de muestras de arena desde los modelos inoculados, pudo notarse una fracción de arena de cuarzo biomineralizada, cuyas partículas de arena se encontraron aglomeradas, producto de la biomineralización. Esta zona se centró en el punto de inoculación y estimulación de microorganismos, en forma de círculo irregular de unos 3 cm de diámetro y ocupando toda la sección interna del modelo (Figura 10).



Figura 10. Arena de cuarzo biomineralizada en el punto de inoculación de los modelos de acuífero. Se muestra una porción de arena de cuarzo biomineralizada que se ubicó en el punto de inoculación de los modelos inoculados. En zonas más distantes al punto de inoculación, no se observó la formación de aglomerados de arena similares al de la imagen.

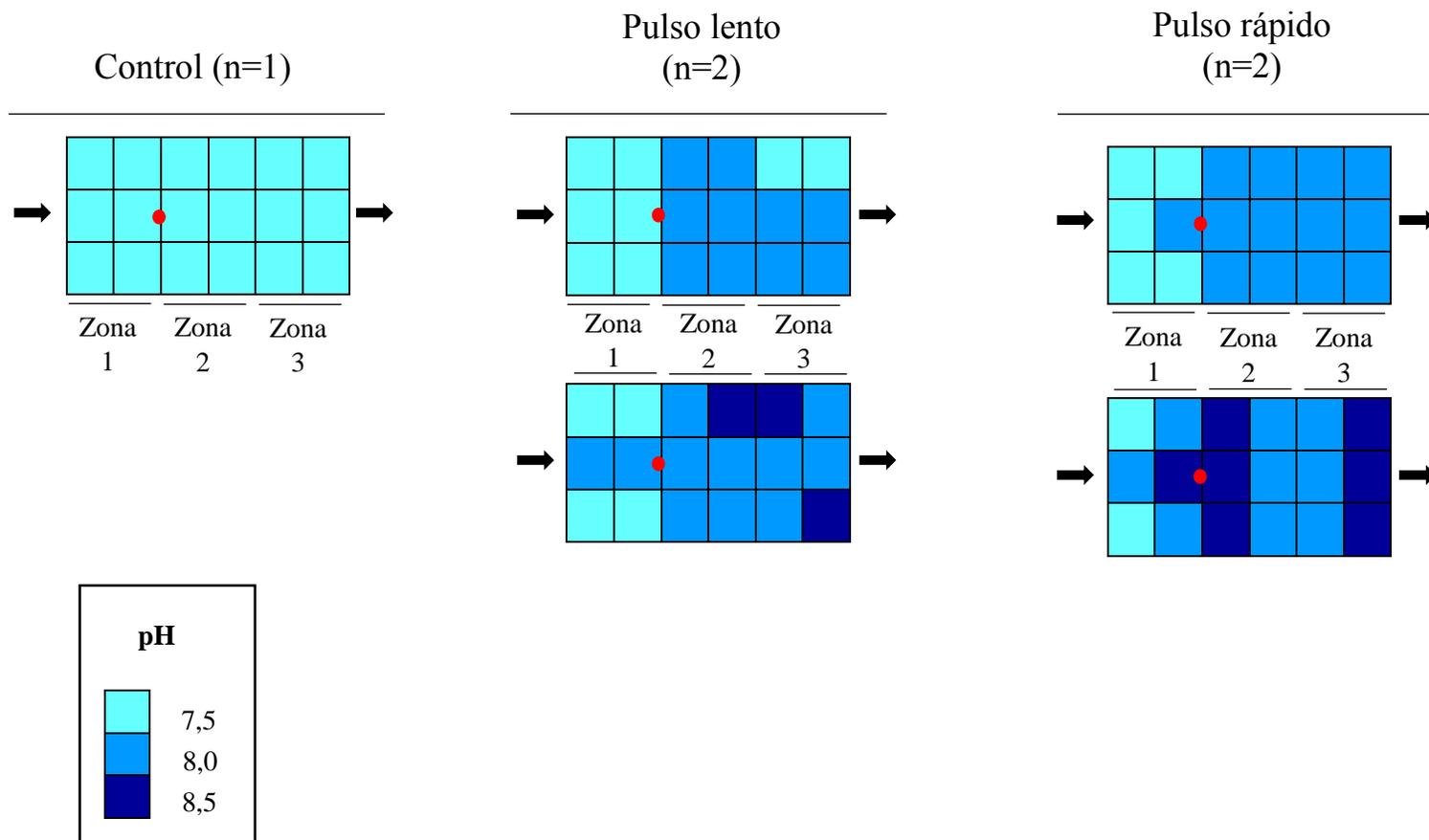


Figura 9. Mapas de pH en la arena de los modelos de acuífero inoculados con ambas velocidades al finalizar el experimento (60 días). En todos los modelos inoculados, se observa una zona de pH 8 que se distribuye a partir de la zona de inoculación y alcanza el extremo por donde sale el efluente, así como zonas puntuales de pH 8,5 en uno de los duplicados. En cambio, en el modelo control se observó un pH 7,5 en todas las zonas del modelo. El punto rojo (●) representa el punto de inoculación y estimulación con medio de cultivo.

Posteriormente, desde distintas zonas de los modelos se tomaron muestras de arena a las cuales se les agregó gotas de HCl concentrado, con el fin de observar efervescencia que revela la posible presencia de carbonatos. De los modelos cuyas muestras se generó gas, se extrajo dos muestras para la cuantificación de carbonatos totales por titulación ácido-base: a) desde la zona ubicada en el punto de inoculación, y b) desde un punto ubicado río abajo (12 cm) al punto de inoculación. En general, la mayor cantidad de carbonatos se generaron en la zona de inoculación, donde se encontraron valores hasta 7 veces mayores respecto a la zona río abajo (Figura 11). En la prueba de carbonatos con HCl de las muestras de arena del modelo control no se observó la producción de gas.

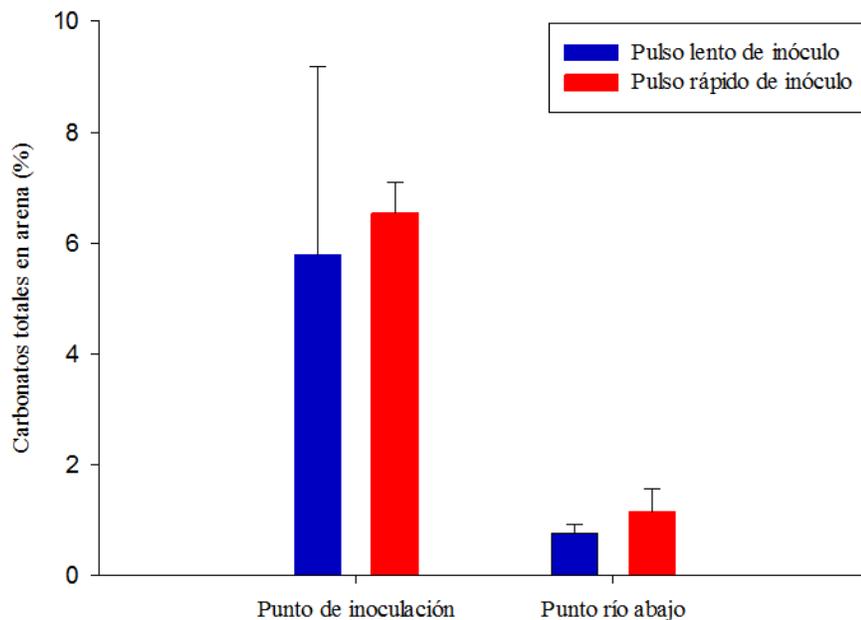


Figura 11. Porcentaje de carbonatos totales determinados por titulación ácido base en la arena de los modelos inoculados con ambas velocidades al finalizar el experimento. Se muestra el porcentaje de carbonatos totales en muestras de arena correspondientes al punto de inoculación y río abajo (12 cm) al punto de inoculación de los modelos. Las barras representan el promedio de duplicados (n=2).

Los análisis de DRX para la evaluación de la composición mineralógica de las muestras de arena de los modelos inoculados, confirmaron la presencia de los minerales calcita, vaterita y aragonita (Anexo 2) en distintas proporciones dependiendo de la muestra (Tabla 3).

Tabla 3. Cantidad de CaCO₃ (vaterita, aragonita y calcita) determinados por DRX en arena de los modelos de acuífero en el experimento de evaluación de las velocidades de inoculación.

Se muestran los porcentajes de CaCO₃ en el punto de inoculación y río abajo en uno de los duplicados de los modelos de acuífero inoculados a distintas velocidades. N.D.: no detectado.

Velocidad inoculación	Forma de CaCO ₃	Punto de inoculación (% de CaCO ₃)	Punto río abajo (% de CaCO ₃)
Pulso rápido	Vaterita	1,47	N.D.
	Aragonita	< 0,5	N.D.
	Calcita	1,7	1,38
Pulso lento	Vaterita	4,38	N.D.
	Aragonita	< 0,5	< 0,5
	Calcita	1,03	N.D.

Se tomó muestras de la arena de cuarzo en el punto de inoculación del modelo inoculado con pulso rápido para la observación por microscopía de barrido electrónico (MBE).

La arena de cuarzo no tratada presentó superficies lisas, a veces estriadas, las cuales terminan en aristas definidas (Figura 12A). Estas características probablemente resultan de un proceso de molienda de rocas de cuarzo de mayor tamaño para obtener la arena de cuarzo utilizada en estos experimentos. Sobre las partículas, no se aprecian estructuras cristalinas definidas que puedan corresponder a un mineral previamente contenido en la arena, así como tampoco se observan microorganismos. Se observó partículas sobre algunas zonas de la superficie de la arena, que probablemente corresponden al mismo material en un grado de intemperización mayor.

La observación de la arena del modelo de acuífero permitió diferenciar estructuras cristalinas que, según comparaciones con imágenes obtenidas por MBE de cristales de CaCO_3 sintetizados químicamente por Jimoh (2017), podrían corresponder a los polimorfos aragonita, calcita y carbonatos amorfos de CaCO_3 (Figura 12B, 12C y 12D respectivamente). También se observó la presencia de una capa que reviste la superficie de una partícula de arena de cuarzo y que contiene estructuras con morfología y tamaño que podrían corresponder a bacterias que se encuentran inmersas en una biopelícula (Figura 12D y anexo 3).

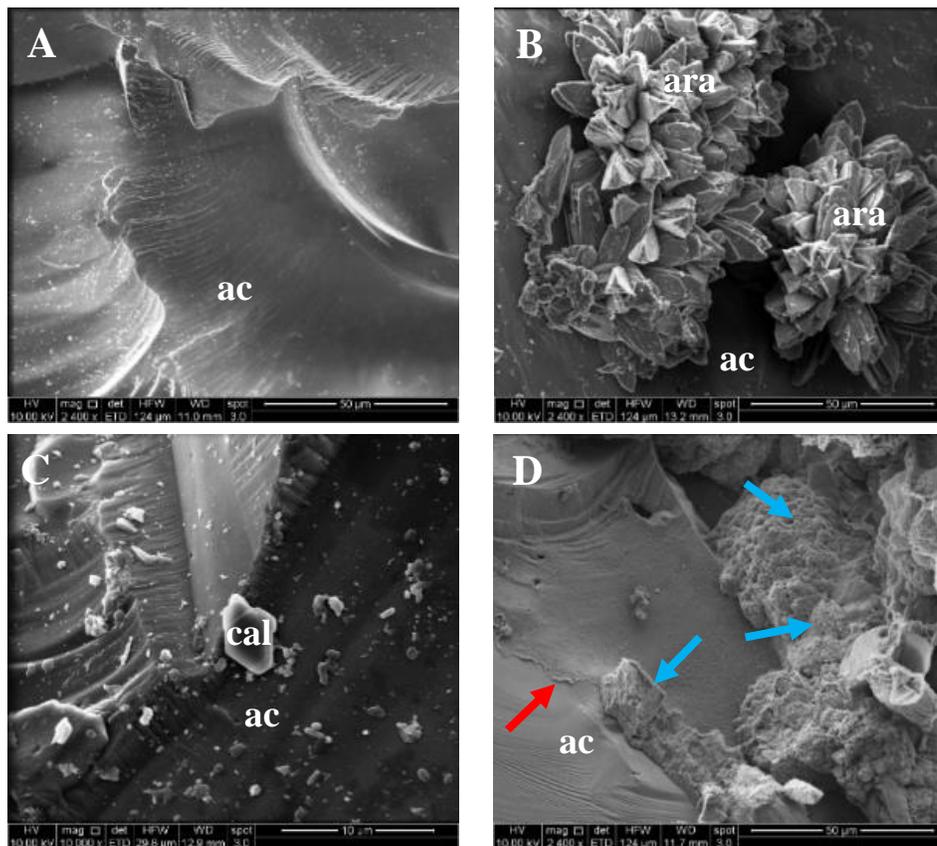


Figura 12. Imágenes obtenidas por microscopía de barrido electrónico de la arena de cuarzo al final del experimento de evaluación de las velocidades de inoculación. A: Superficie de la arena de cuarzo previa al experimento. **B:** Mineral cristalino de CaCO_3 , aragonita. **C:** Mineral cristalino de CaCO_3 : calcita. **(D):** Biopelícula (flecha roja) y matriz órgano-mineral (CaCO_3 amorfo depositado sobre material orgánico, flechas azules) sobre la partícula de arena de cuarzo. ac: arena de cuarzo. ara: aragonita. cal: calcita.

Se realizó mediciones de ATP correspondientes a los microorganismos adheridos a la arena de los modelos de acuífero. En los modelos inoculados a ambas velocidades, se observó la mayor cantidad de ATP en arena en la zona 2. Tanto en las zonas 1 y 3, se encontraron cantidades similares de ATP en ambos experimentos. El modelo control (no inoculado), mostró valores considerablemente menores en todas las zonas en comparación a los inoculados (Figura 13).

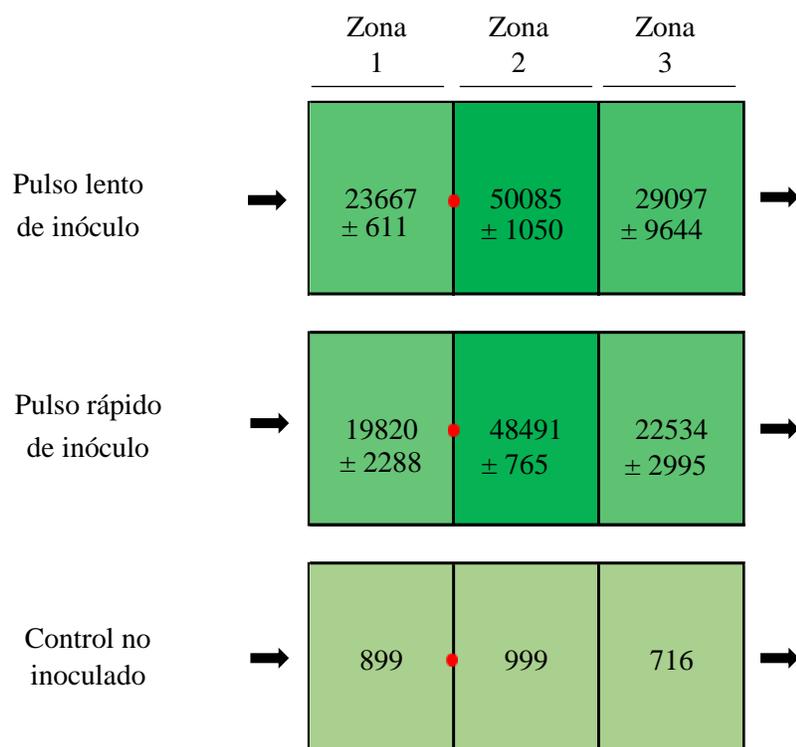


Figura 13. Mapas de ATP microbiano en la arena de los modelos de acuífero al final del experimento de evaluación de las velocidades de inoculación. Se muestra el valor de ATP (en URL/g de arena) en las tres zonas de la arena de los modelos de acuífero inoculados con pulso lento (n=2), pulso rápido (n=2) y el modelo control (n=1). Las flechas negras indican el sentido de flujo hidráulico en el interior de los modelos de acuífero. El punto rojo (●) representa el punto de inoculación y estimulación con medio de cultivo.

4.3.5 Análisis de la comunidad microbiana establecida en la arena de los modelos de acuífero inoculados con distintas velocidades mediante secuenciación del ARNr 16S.

Se tomó una muestra de arena de la zona central (zona 2) de uno de los duplicados inoculados a diferentes velocidades, a las cuales se les extrajo el ADN genómico total de los microorganismos adheridos a la arena para su posterior secuenciación masiva del gen del ARNr 16S por tecnología Illumina.

En los modelos inoculados a diferentes velocidades, se encontró una comunidad microbiana muy similar en cuanto a composición, adherida a la arena de cuarzo al final del experimento. En ambos casos, hubo un aumento de microorganismos anaeróbicos respecto al inóculo, ya que éstos totalizaron cerca del 80 y 73% en la arena de los modelos inoculados con pulso lento y rápido, respectivamente, mientras que en el inóculo estos géneros sólo alcanzaban el 50%. Las secuencias correspondientes al género reductor de sulfato *Desulfomicrobium* aumentaron considerablemente respecto al inóculo (8%), alcanzando el 58 y 45% de la composición microbiana total de los modelos inoculados con pulso lento y rápido, respectivamente (Figura 14).

Los resultados anteriores permiten demostrar que es posible establecer un consorcio microbiano reductor de sulfato activo en el medio poroso de un modelo de acuífero con flujo hidráulico continuo, el que consiste en agua de barrera hidráulica de un tranque de relave que contiene sulfato. La reducción microbiana de sulfato, que es producto de la inoculación y estimulación del consorcio microbiano, fue capaz de biomineralizar una porción de la arena de cuarzo (medio poroso), debido a la acumulación de minerales de CaCO_3 , la que según los

experimentos realizados con el trazador, corresponde a una zona de menor permeabilidad al flujo hidráulico.

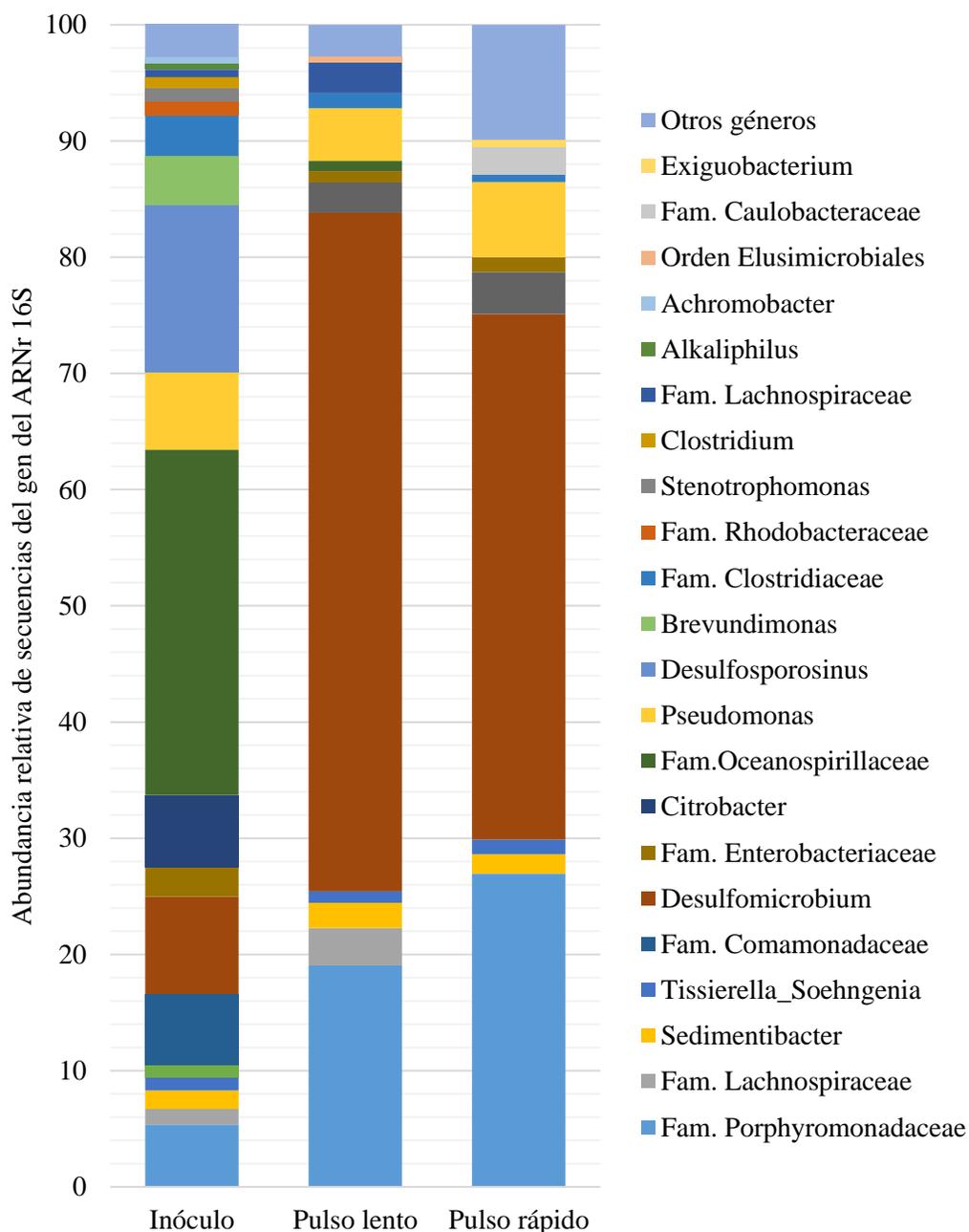


Figura 14. Abundancia relativa de las secuencias del gen del ARNr 16S en los extractos de ADN de los microorganismos adheridos a la arena de los modelos de acuífero al final del experimento de evaluación de las velocidades de inoculación. En la primera columna, se muestra también la composición microbiana del inóculo utilizado.

4.4 Evaluación del efecto de la concentración de formiato sobre la actividad reductora de sulfato y la biomineralización en un modelo de acuífero.

En los modelos de acuífero inoculados se logró la biomineralización de una porción de arena de cuarzo ubicada en las cercanías del punto de inoculación (Figura 10). Los experimentos realizados con el trazador, demostraron que corresponde a una zona de menor permeabilidad respecto a otras zonas del medio poroso del modelo (Figura 8).

El aumento de la concentración de formiato en el medio de cultivo (respecto a la ensayada en el objetivo 2) con el cual se estimula al consorcio microbiano en el modelo, podría tener como efecto aumentar la cantidad de sulfato que es reducido por los microorganismos. Esto podría favorecer la probabilidad de precipitación de CaCO_3 , debido al aumento de pH y de las formas de carbono inorgánico disuelto HCO_3^- y CO_3^{2-} que resultan de la reducción biológica de sulfato, lo que puede resultar en un aumento del alcance de la zona biomineralizada en los modelos de acuífero.

Para esto se realizó un experimento que consistió en evaluar 4 concentraciones de formiato en el medio de cultivo PCM. Estas concentraciones fueron 3, 6, 12 y 18 g/L.

4.4.1 Monitoreo de los parámetros de reducción microbiana de sulfato en los modelos de acuífero.

Durante el tiempo de experimentación (60 días), en todos los ensayos se observó reducción en la concentración de sulfato en los modelos a partir del día 15 (Figura 15A). A su vez, se verificó la producción de ácido sulfhídrico en todos los modelos. Sin embargo, puede apreciarse un retardo en el alza de este parámetro en los experimentos realizados a mayores concentraciones de formiato (12 y 18 g/L) (Figura 15B). En parte, esto podría explicarse por la variación del potencial medido en el efluente de los modelos, puesto que el valor requerido para la reducción microbiana de sulfato, es decir -150 mV, se alcanzó más rápidamente en los modelos estimulados con menor cantidad de formiato (3 y 6 g/L) (Figura 15C). También, puede apreciarse que los valores de pH en el efluente de los modelos estimulados con la menor cantidad de formiato (3 g/L) sigue una tendencia a la baja respecto a los valores de los demás experimentos (Figura 15D).

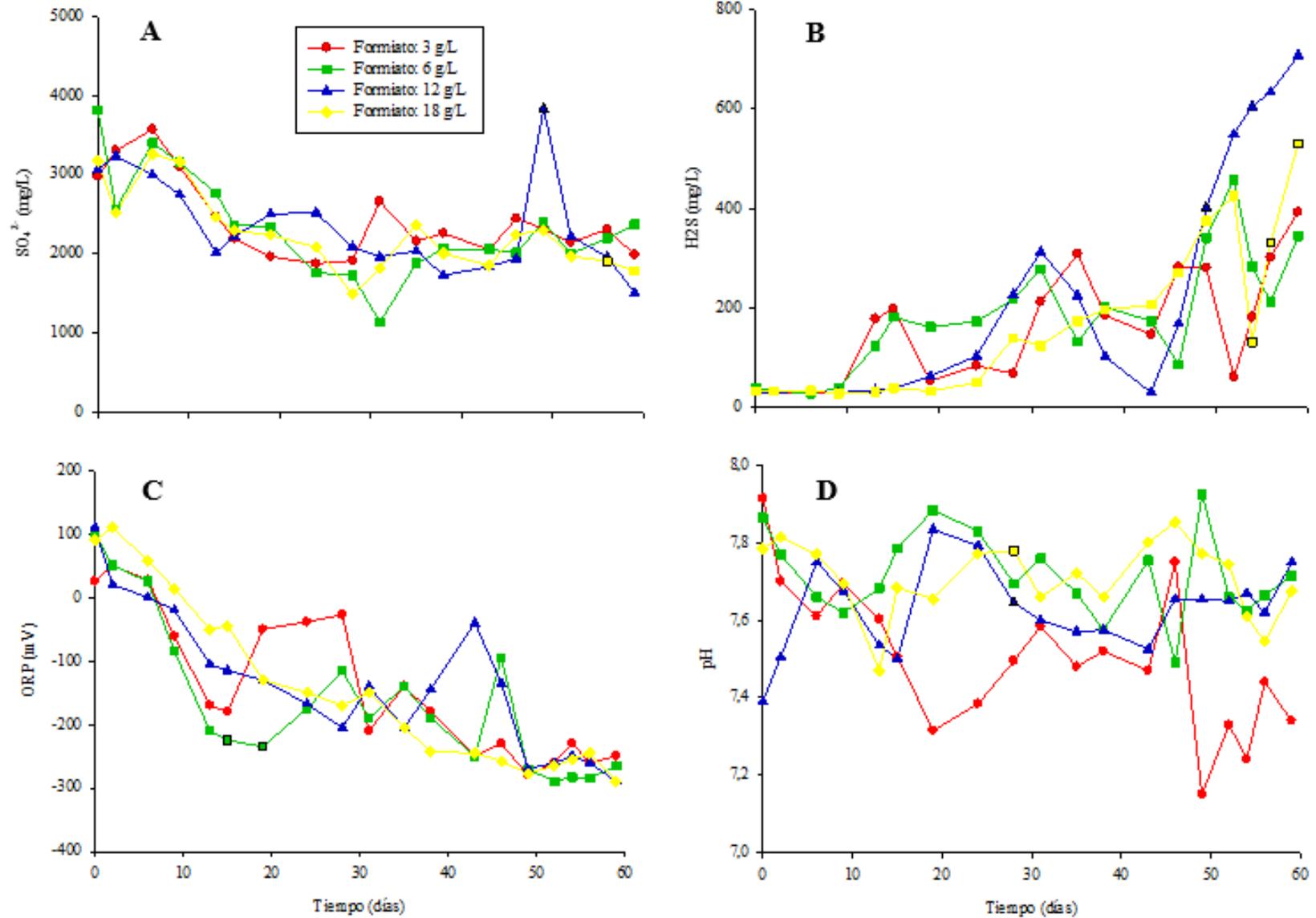


Figura 15. Parámetros de reducción microbiana de sulfato (SO_4^{2-} y H_2S) y fisicoquímicos (pH y ORP) en los modelos de acuífero estimulados con las distintas concentraciones de formiato. Se muestran las mediciones de sulfato (A), ácido sulfhídrico (B), ORP (C) y pH (D) de los modelos de acuífero estimulados con las distintas concentraciones de formiato (3, 6 12 y 18 g/L). Los valores corresponden al promedio de duplicados (n=2).

4.4.2 Utilización de formiato en los modelos de acuífero.

En el efluente de los modelos estimulados con las mayores cantidades de formiato (12 y 18 g/L) se observó una apreciable disminución de la concentración de este sustrato respecto de la concentración de formiato agregada durante el tiempo de experimentación (Figura 16). Sin embargo, en los ensayos realizados con las menores concentraciones de formiato (3 y 6 g/L), no se observó la misma tendencia de consumo de formiato.

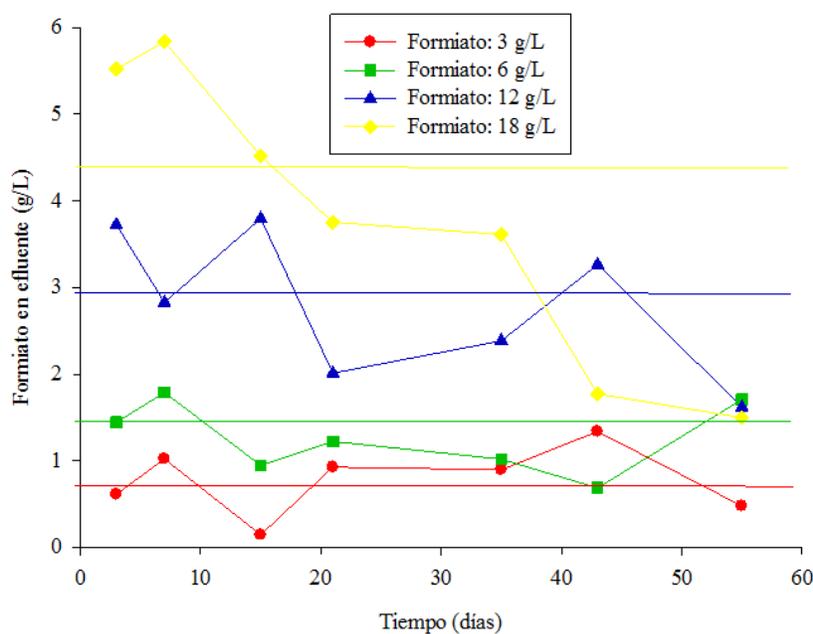


Figura 16. Formiato remanente en los modelos de acuífero estimulados con las distintas concentraciones del dador de electrones. Las líneas continuas representan la cantidad de formiato agregada en los modelos considerando la cantidad de formiato en el medio de cultivo y su dilución en los modelos. Los valores corresponden al promedio de duplicados (n=2).

4.4.3 Monitoreo de los parámetros hidráulicos de los modelos de acuífero.

En todas las concentraciones de formiato ensayadas, se logró aumentar el tiempo de retención del trazador hasta un valor similar en todos los modelos. El valor del tiempo de retención relativo al tiempo inicial aumentó hasta 1,8 veces en promedio el día 55 de experimentación, lo que indica un grado similar de disminución de la permeabilidad del medio poroso de los modelos producto de la estimulación de los microorganismos con distintas concentraciones de formiato en el medio de cultivo. No se observó un efecto dependiente de la concentración de formiato sobre el cambio del tiempo de retención de los modelos de acuífero (Figura 17).

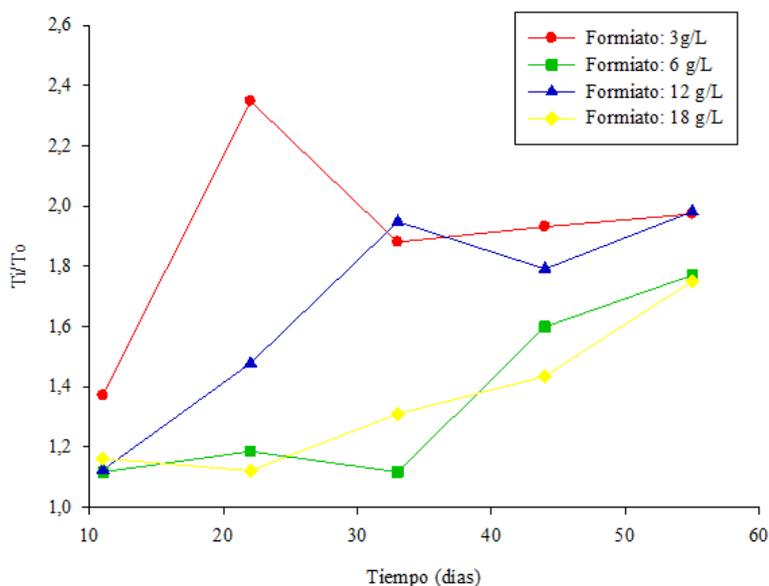


Figura 17. Tiempos de retención relativos al tiempo inicial en los modelos de acuífero estimulados con las distintas concentraciones de formiato. Los valores corresponden al promedio de duplicados (n=2).

4.4.4 Análisis de la arena de cuarzo de los modelos de acuífero al final del experimento.

Los valores de pH en arena tendieron a aumentar a medida que se aumentó la concentración de formiato en el medio de cultivo (Figura 18). En promedio, en los modelos estimulados con las mayores concentraciones de formiato (12 y 18 g/L), este parámetro alcanzó valores sobre 8 en la zona 2 y 3, mientras que se registró un valor menor a 8 en las mismas zonas de los modelos estimulados con las menores concentraciones de formiato (3 y 6 g/L).

Se comprobó la presencia de una porción de arena biomineralizada en todos los modelos de acuífero (Anexo 4). El cálculo del área comprendida por la arena biomineralizada, en base al análisis de imágenes utilizando el programa ImageJ, reveló una directa relación entre el área del arena aglomerada y la cantidad de formiato en el medio de cultivo (Figura 19). Esta relación es lineal en el rango de concentraciones de formiato comprendido entre los 3-12 g/L, luego de lo cual el área biomineralizada tiende a no aumentar a mayores concentraciones de formiato. Esto sugiere que para lograr la máxima extensión o alcance de la biomineralización del medio poroso en el modelo de acuífero utilizado en esta tesis, es necesario estimular el consorcio microbiano con medio de cultivo conteniendo 12 g/L de formiato.

El análisis cuantitativo de carbonatos totales en las zonas definidas en el experimento anterior (punto de inoculación y punto río abajo) confirman el aumento de la cantidad de carbonatos precipitados en el punto río abajo producto del aumento de la concentración de formiato (Figura 20). También, resulta interesante que la cantidad de carbonatos en el punto

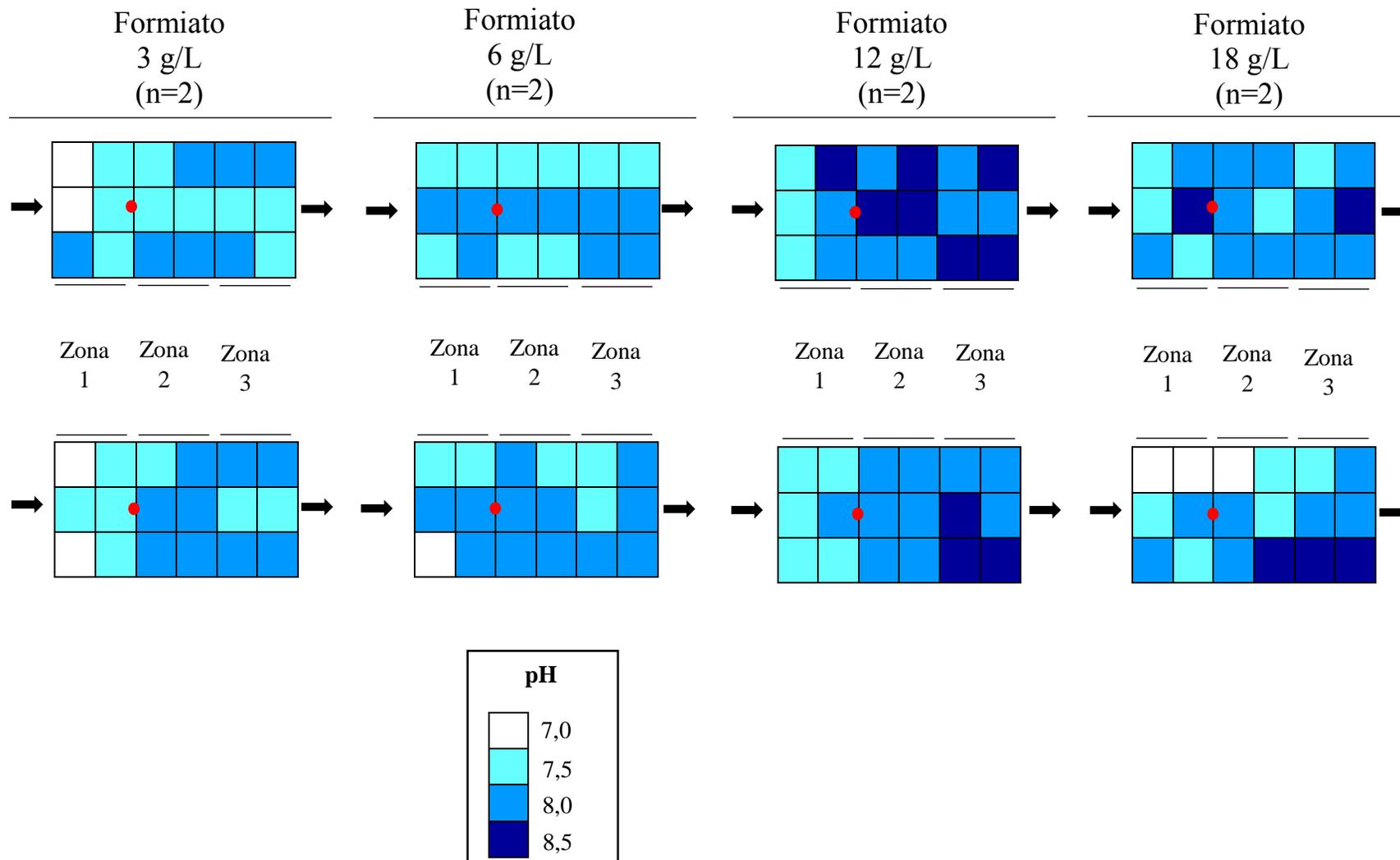


Figura 18. Mapas de pH en la arena de los modelos de acuífero estimulados con las distintas concentraciones de formiato al finalizar el experimento (60 días). En general, los valores de pH en arena tienden a aumentar a medida que se aumenta la concentración de formiato en el medio de cultivo. En los modelos estimulados con 12 y 18 g/L de formiato, se observaron zonas puntuales de pH 8,5. Las flechas negras indican el sentido de flujo hidráulico en el interior de los modelos de acuífero. El punto rojo (●) representa el punto de inoculación y estimulación con medio de cultivo.

de inoculación disminuye con el aumento del formiato en el medio de cultivo. En este caso, los análisis de DRX mostraron la presencia de calcita en uno de los duplicados de los modelos estimulados con las distintas concentraciones de formiato (Anexo 4, Tabla 4). Las determinaciones cuantitativas del contenido de calcita presentó la misma tendencia que la determinada por el análisis cuantitativo de carbonatos por titulación ácido-base, es decir, el aumento de la cantidad de carbonatos precipitados en el punto río abajo de los modelos (ver Tabla 4).

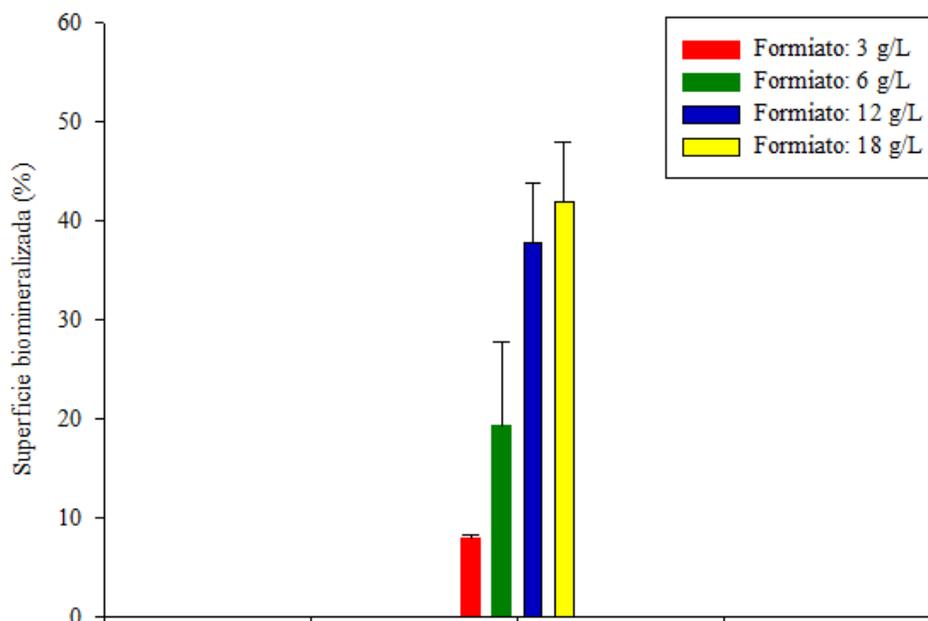


Figura 19. Área de la superficie de arena biomineralizada en los modelos de acuífero en función de la concentración de formiato en el medio de cultivo. Se observa una dependencia directa de la concentración de formiato y el área de la arena biomineralizada en los modelos de acuífero, la cual alcanza un valor máximo en las mayores concentraciones ensayadas (12 y 18g de formiato/L). Los valores corresponden al promedio de duplicados (n=2).

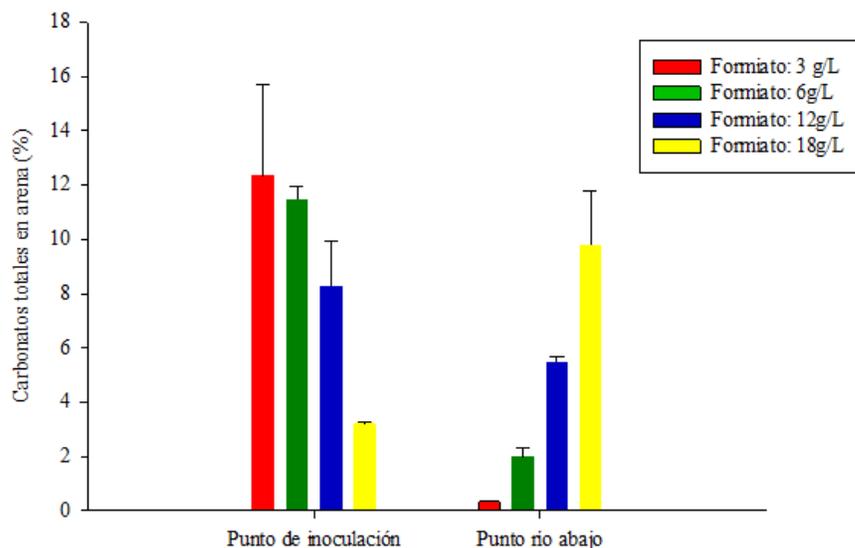


Figura 20. Porcentajes de carbonatos totales determinados por titulación ácido base en el medio poroso de los modelos de acuífero estimulados con las distintas concentraciones de formiato en el punto de inoculación y río abajo al finalizar el experimento. Las barras representan el valor promedio de duplicados (n=2).

Tabla 4. Cantidad de CaCO_3 (calcita) determinados por DRX en la arena de los modelos de acuífero estimulados con las distintas concentraciones de formiato. Se muestran los porcentajes de CaCO_3 en el punto de inoculación y río abajo de uno de los duplicados de los modelos de acuífero estimulados con distintas concentraciones de formiato.

Concentración de formiato (g/L) en medio de cultivo	Punto de inoculación (% de CaCO_3)	Punto río abajo (% de CaCO_3)
3	9,55	3,82
6	13,16	6,34
12	16,23	9,36
18	3,04	13,23

En las observaciones por MBE de la arena de cuarzo ubicada en el punto de inoculación de uno de los modelos estimulados con la menor y mayor concentración de formiato (Figura 21A y 21B respectivamente), pudo distinguirse cúmulos bacterianos compuestos en su gran mayoría por microorganismos con forma de bacilo (morfología característica de una gran parte de las bacterias reductoras de SO_4^{2-} descritas), depositadas sobre la superficie de la arena de cuarzo y adyacentes a minerales cristalinos con similitud estructural a aragonita.

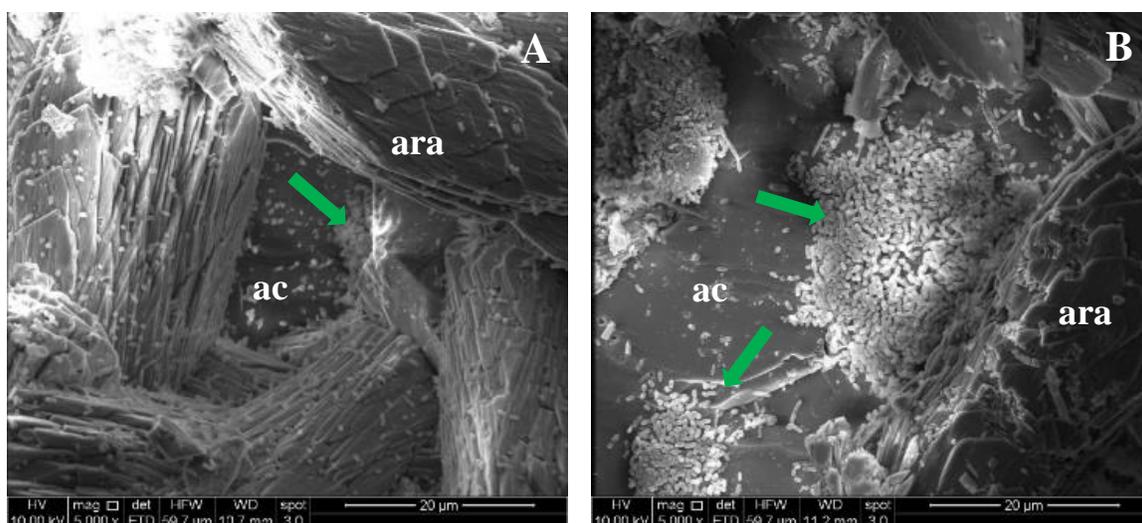


Figura 21. Imágenes obtenidas por microscopía de barrido electrónico de la arena de cuarzo de los modelos de acuífero estimulados con la menor y mayor concentración de formiato (3 y 18 g/L) al final del experimento. A: Mineral cristalino de CaCO_3 (aragonita) y cúmulos bacterianos en una muestra de arena de cuarzo de uno de los modelos estimulados con 3 g/L de formiato. B: Mineral cristalino de CaCO_3 (aragonita) y cúmulos bacterianos en una muestra de arena de cuarzo de uno de los modelos estimulados con 18 g/L de formiato. ac: arena de cuarzo. ara: aragonita. Flechas verdes: cúmulos bacterianos.

En todos los ensayos, los valores de ATP en arena fueron mayores en las zonas 2 y 3 de los modelos, mientras que la zona 1 (rio arriba al punto de inoculación) fue menor respecto a las otras zonas (Figura 22). Especialmente en las zonas 2 y 3, se observó un aumento dependiente de la concentración de formiato en el medio de cultivo de este parámetro, dentro del rango entre 3 y 12 g/L. En este último, se alcanza un valor máximo de ATP/g de arena, ya que en los modelos con la mayor cantidad de formiato (18 g/L), estos disminuyen hasta valores similares a los del ensayo realizado con 6 g/L de formiato.

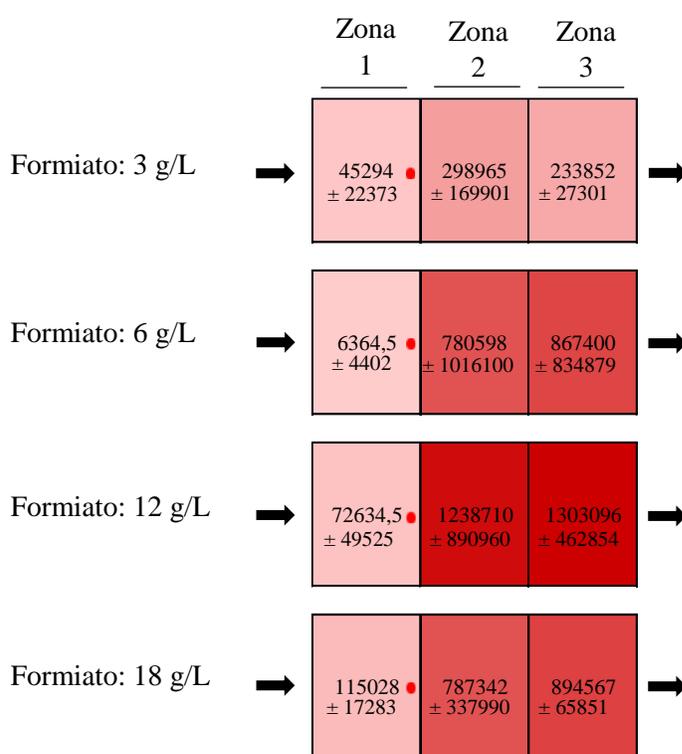


Figura 22. Mapas de ATP microbiano en la arena de los modelos de acuífero estimulados con las distintas concentraciones de formiato al finalizar el experimento. Se muestra el valor de ATP (en URL/g de arena) en las tres zonas de la arena de los modelos de acuífero estimulados con las distintas concentraciones de formiato. Las flechas negras indican el sentido de flujo hidráulico en el interior de los modelos de acuífero. El punto rojo (●) representa el punto de inoculación y estimulación con medio de cultivo. Los valores corresponden al promedio de duplicados (n=2).

4.4.5 Análisis de la comunidad microbiana establecida en la arena de los modelos de acuífero estimulados con distintas concentraciones de formiato mediante secuenciación del ARNr 16S

El aumento de la concentración de formiato en el medio de cultivo produjo un enriquecimiento de las secuencias correspondientes al género reductor de sulfato *Desulfomicrobium*, las cuales predominaron en todas las muestras, alcanzando el 35, 48, 52 y 57% en la arena de los modelos de acuífero estimulados con 3, 6, 12 y 18 g/L de formiato, respectivamente. El aumento del dador de electrones también produjo el notorio enriquecimiento de las secuencias correspondientes al género *Pseudomonas*. También se observó el efecto contrario sobre otros componentes de la comunidad microbiana, ya que se observó la disminución de las secuencias de la familia predominantemente aeróbica *Comamonadaceae* y del género anaeróbico obligado *Proteiniclasticum*.

Los resultados anteriores demuestran que existe un efecto de la concentración de formiato en el medio de cultivo sobre el alcance de la biomineralización del medio poroso en el modelo de acuífero utilizado, ya que se observó un aumento de los carbonatos totales río abajo y del área biomineralizada en los modelos en función del aumento del dador de electrones. Esto se relaciona con los valores de formiato medidos en efluente, pues el dador de electrones fue utilizado en mayor medida en los experimentos que contenían las mayores cantidades de formiato, mientras que en los modelos estimulados con las menores concentraciones de éste, no hubo utilización considerable del dador. Sin embargo, esto no se reflejó en los parámetros de actividad microbiana de sulfato (concentración de sulfato y ácido

sulfhídrico), ya que éstos fueron similares en los modelos de acuífero estimulados con todas las concentraciones del dador ensayadas.

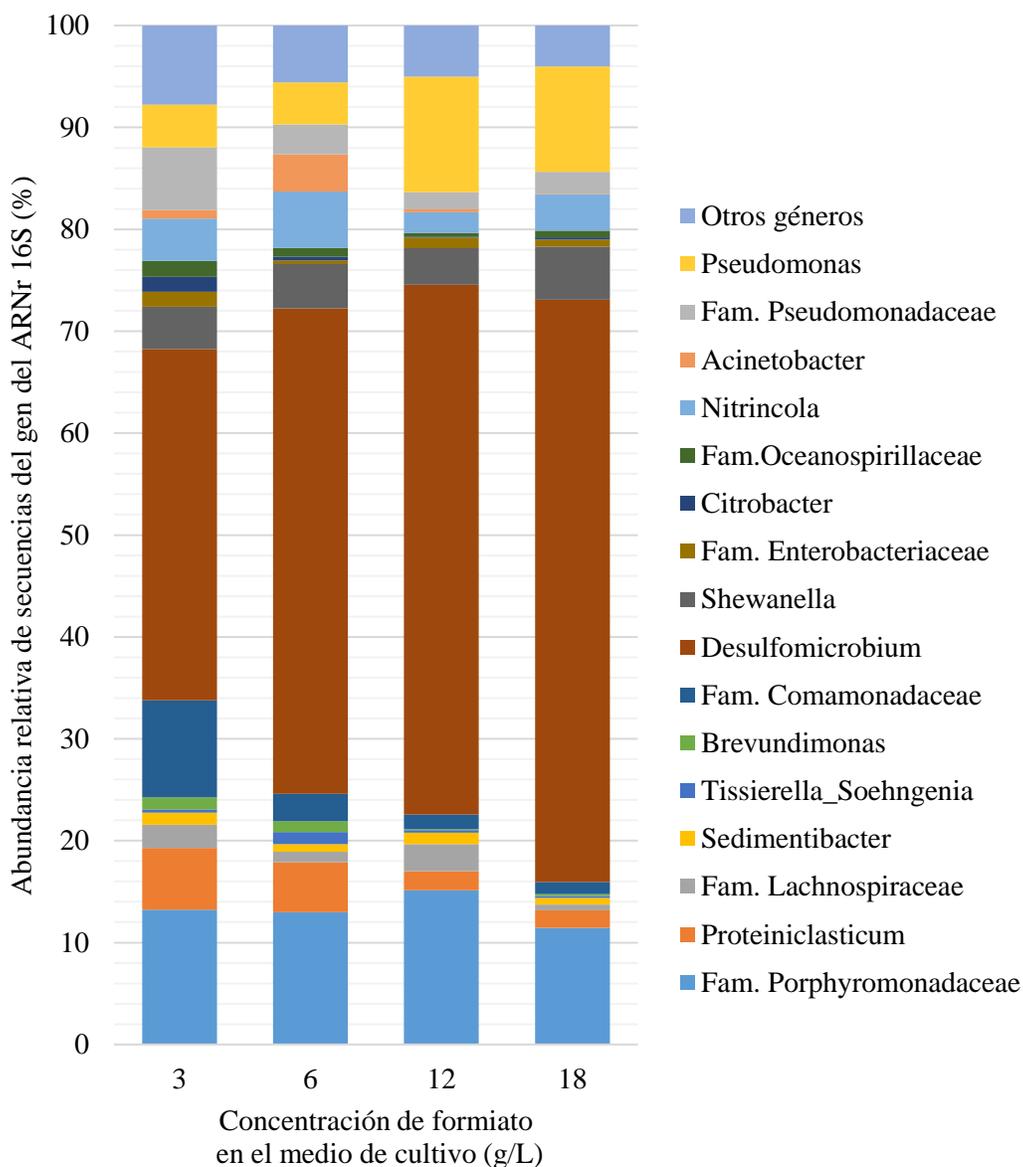


Figura 23. Abundancia relativa de las secuencias del gen del ARNr 16S en los extractos de ADN de los microorganismos adheridos a la arena de los modelos de acuífero al final del experimento de evaluación de las concentraciones de formiato.

V. DISCUSIÓN

El presente trabajo de tesis se centró en desarrollar una solución biotecnológica para impedir total o parcialmente el flujo de una pluma de aguas en un acuífero afectado por la infiltración del contenido acuoso de un tranque de relaves. Para lograr esto, se buscó desarrollar un método de biomineralización de un medio poroso (arena de cuarzo) empacado en un modelo de acuífero, basado en la inoculación y estimulación de un consorcio microbiano reductor de sulfato, previamente aislado desde un microbialito del Lago Sarmiento (XII región de Chile). Debido a la reducción del volumen de poro que es consecuencia de la acumulación de minerales y biomasa microbiana, este fenómeno provoca la disminución de la conductividad hidráulica del medio afectado por la biomineralización, lo que genera cambios en el patrón de flujo del medio poroso.

Para la evaluación en tiempo real del patrón de flujo hidráulico en un modelo de acuífero, se utilizó una solución del colorante azul brillante (100 mg/L) como trazador hidráulico. Los patrones de flujo hidráulico han sido utilizados en estudios para comparar los parámetros de flujo empíricos que resultan del paso del trazador (tiempos de retención y patrón de flujo) con aquellos predichos por el modelamiento hidrodinámico que deriva del uso de programas computacionales (Heidari y Li, 2014; Seifert y Engesgaard, 2012). En estudios que buscan revelar los cambios en el patrón de flujo que resultan de la acumulación de biomasa en un medio poroso, el colorante azul brillante parece ser el trazador estándar (Kildsgaard y Engesgaard 2002; Seifert y Engesgaard 2007, Seifert y Engesgaard, 2012; Seki et al, 2006; Thullner, 2010).

Varios estudios sugieren que la actividad de los microorganismos reductores de sulfato presentes en los microbialitos es el principal motor de la biomineralización de

sedimentos de mares y lagos salinos (Braissant et al 2007; Dupraz et al 2009; Gallagher et al 2012). Por esto fue importante descartar que la presencia de azul brillante en los modelos pudiera provocar la disminución de la precipitación de CaCO_3 como consecuencia de la inhibición de la actividad reductora de sulfato del consorcio microbiano. En estudios donde se evaluó la biocolmatación del medio poroso producida por microorganismos desnitrificantes obtenidos desde una planta de tratamiento de aguas servidas, y que fueron estimulados con acetato y nitrato como dador y aceptor de electrones respectivamente, no se consideró evaluar la posible inhibición de los microorganismos por la presencia de azul brillante utilizado como trazador (Kildsgaard y Engesgaard, 2000; Seifert y Engesgaard, 2012). En estas publicaciones, se utilizó el colorante en una concentración de 200 mg/L, principalmente por razones de visibilidad (Kildsgaard y Engesgaard, 2000). Sin embargo, dada la importancia de la capacidad reductora de sulfato del inóculo para lograr la biomineralización, y su posible inhibición por efecto del colorante azul brillante, en esta tesis se hizo un ensayo de co-incubación del consorcio microbiano y el colorante para evaluar los parámetros de reducción de sulfato al final del experimento. Los resultados mostraron que ninguna de las concentraciones ensayadas de azul brillante, produjo inhibición de la capacidad reductora de sulfato del consorcio microbiano utilizado como inóculo.

Generalmente, el efecto de un inhibidor sobre el crecimiento o alguna función bacteriana es dependiente de la concentración del inhibidor (Ali et al, 2015; Deriz et al, 2014; Nemati et al, 2001; Roymahapatra et al 2015; Trajano et al, 2010; Zhang et al, 2008). Con respecto a esto, para bacterias reductoras de sulfato se han reportado la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de extractos de aceites esenciales de vegetales sobre la actividad reductora de sulfato de *Desulfovibrio alaskensis* NCIMB 13491 (Korenblum et al, 2013; De

Souza et al, 2017), y del ion molibdato (MoO_4^-) para un consorcio microbiano enriquecido en la especie *Desulfovibrio vulgaris* (De Jesus et al, 2015). De esta manera, los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que las concentraciones de azul brillante ensayadas serían menores a la CIM de este compuesto para el consorcio microbiano utilizado. Existe poca información en la literatura al respecto, pero se puede comparar con la inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 10799, para el cual se determinó una CIM de 1250 mg/L del colorante (Kılıç et al, 2016).

El modelo de acuífero construido para este trabajo de tesis tuvo por objeto representar una sección de un acuífero real contaminado con aguas de un tranque de relave que se ve afectado por un tratamiento de inoculación y estimulación de los microorganismos infiltrados. Debido a la factibilidad técnica, esta representación se centró sólo en lograr las condiciones de saturación hídrica, concentración de sulfato y flujo hidráulico continuo; este último, representó el mayor cambio de condiciones de hábitat para los microorganismos contenidos en el inóculo, los que previamente se encontraban en un biorreactor de tipo columna sin flujo.

En los ensayos previos a la inoculación de los modelos de acuífero construidos, la mayor parte del frente de flujo hidráulico, visualizado por el trazador, ocurrió en la zona central del medio poroso de los modelos, lo que reflejó una mayor velocidad de flujo en esta zona respecto a la observada en paredes laterales. Este fenómeno es similar a lo que ocurre con el perfil de velocidades de un flujo laminar que se establece en una tubería, el que alcanza su mayor velocidad en el eje central y es mínima en las paredes del tubo (Ávila et al, 2011). Esto demuestra que fue posible construir un modelo de acuífero en condiciones de saturación hídrica y con flujo laminar, en donde el flujo hidráulico se estableció preferentemente en el

interior del medio poroso, lo que lo hizo útil como modelo de acuífero para la evaluación del objetivo propuesto en esta tesis.

La variabilidad observada en los tiempos de retención de los modelos de acuífero construidos, se debió principalmente a diferencias en el flujo interno de los modelos. Esto pudo ser consecuencia del empaque no homogéneo del medio poroso dentro de los modelos. Variaciones similares en el tiempo de retención de cámaras de flujo hidráulico empacadas con medios porosos heterogéneos en cuanto a tamaño de partícula fueron observadas por Heidari y Li (2014). Considerando que la arena de cuarzo de los modelos de acuíferos utilizados en esta tesis tenía un tamaño de partícula variable (200-800 μm), es muy probable que en el proceso de empaque se produjeron zonas de mayor y menor permeabilidad que causaron la variabilidad observada de este parámetro entre los modelos.

Se demostró que la infiltración del trazador en el puerto de inoculación de los modelos construidos, mediante dos velocidades (o pulsos de infiltración; 0,2 y 2 mL/min), produjo una mayor dispersión del colorante en el medio poroso cuando se utilizó la mayor velocidad. Por lo tanto, se podría pensar que este efecto también ocurra con la dispersión de los microorganismos durante la inoculación.

Los pulsos de inoculación ensayados produjeron la biomineralización de una pequeña zona del medio poroso centrada en el punto de inoculación de los modelos de acuífero. El área que resultó biomineralizada en el medio poroso utilizando los distintos pulsos ensayados tuvo un alcance similar en los modelos de acuífero, y se restringió a las cercanías del punto de inoculación. A diferencia de lo aquí observado, Barkouki et al (2011) ensayaron pulsos de estimulación con medio de cultivo para la bacteria ureolítica *Bacillus pasteurii*, logrando una distribución homogénea de los minerales de CaCO_3 que precipitan en el medio poroso

de columnas. Esto sugiere que además de los pulsos de inoculación, podría también requerirse la adición de medio de cultivo en forma de pulsos para lograr aumentar el alcance de la biomineralización a zonas más alejadas del punto de inoculación.

La reducción de la concentración de sulfato y el aumento de la concentración de ácido sulfhídrico en los modelos de acuífero inoculados a las distintas velocidades sugieren que hubo actividad microbiana reductora de sulfato debido a la inoculación y estimulación de los microorganismos. Los análisis de secuenciación del gen del ARNr 16S de la comunidad microbiana adherida a la arena al final del experimento revelaron que la mayor parte de estas secuencias corresponden a microorganismos pertenecientes al género reductor de sulfato *Desulfomicrobium*, en el cual se han identificado especies con metabolismo acetogénico, lo que significa que pueden oxidar dadores de electrones como propionato, butirato y lactato sólo hasta acetato (Castro et al, 2000). Considerando que se comprobó el consumo de formiato en los modelos de acuífero, probablemente se encontraban especies aún no descritas pertenecientes al género *Desulfomicrobium*, con capacidad de utilizar formiato como donador de electrones para la reducción de sulfato, en la comunidad microbiana establecida en los modelos de acuífero.

La biomineralización de una zona de arena de cuarzo localizada en el punto de inoculación de los modelos de acuífero inoculados con las distintas velocidades produjo un cambio en el patrón de flujo interno y el aumento del tiempo de retención del trazador (azul brillante). Esto fue consecuencia de la disminución de la permeabilidad de una zona del medio poroso producto de la precipitación de minerales de CaCO_3 , por efecto de la inoculación y estimulación del consorcio microbiano. En las últimas décadas, la aplicación de la precipitación de minerales de CaCO_3 inducida por microorganismos se ha enfocado

sólo en la utilización de bacterias ureolíticas para mejorar las propiedades mecánicas de los suelos (estabilización de suelos), así como la resistencia de los materiales de construcción (Canakci et al, 2015; De Muynck et al, 2010; Van Paassen et al, 2009; Van Wijngaarden et al, 2010). Aun cuando es reconocida la capacidad de los microorganismos reductores de sulfato para inducir la precipitación de CaCO_3 , no se han reportado estrategias para producir la biomineralización de medios porosos utilizando estos microorganismos. Por lo tanto, este trabajo constituye una innovación respecto a la aplicación de la precipitación de minerales mediada por microorganismos, ya que representa el primer acercamiento para disminuir la permeabilidad de un acuífero utilizando microorganismos reductores de sulfato, con el fin de interrumpir el avance de una pluma de contaminación en las aguas subterráneas, mediante la aplicación de una solución biotecnológica.

Las velocidades de inoculación ensayadas produjeron la biomineralización de una zona de la arena de cuarzo de los modelos de acuífero. Específicamente, se restringió a unos pocos centímetros alrededor del punto de inoculación, lo que pudo deberse a que la concentración efectiva de los componentes del medio de cultivo no fue suficiente para producir la precipitación de minerales de CaCO_3 en las zonas más alejadas al punto de inoculación. Considerando esto, se realizó un experimento en el cual se evaluaron cuatro concentraciones de formiato en el medio de cultivo (3, 6, 12 y 18 g/L) con el fin de aumentar el alcance de la biomineralización en el medio poroso por efecto de la inoculación y estimulación de un consorcio microbiano reductor de sulfato en un modelo de acuífero.

Los resultados demostraron una mayor utilización de formiato en los modelos estimulados con las mayores concentraciones del dador de electrones (12 y 18 g/L), respecto a los que fueron estimulados con las más menores concentraciones de éste (3 y 6 g/L). En los

procariontes, la utilización de formiato parece ser transversal cuando éste se produce por metabolismos fermentativos, el cual es oxidado a CO₂ en una reacción catalizada por la enzima formiato deshidrogenasa (FDH), la que media el transporte de electrones desde el formiato hasta aceptores de electrones distintos del O₂ (Jormakka et al, 2003). Según Gallagher et al (2012), la estequiometría para reducción microbiana de sulfato acoplada a la utilización de formiato ($4\text{CHO}_2^- + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{HCO}_3^- + \text{HS}^- + \text{OH}^-$) revela que la razón molar de formiato respecto a sulfato necesaria para esto, es 4:1. Para las concentraciones de formiato en los medios de cultivo, es decir 3, 6, 12 y 18 g/L, estas razones corresponden a 1,41:1, 2,82:1, 5,65:1 y 8,48:1 respectivamente. Esto podría explicar que en los modelos estimulados con 12 y 18 g/L se haya observado las mayores áreas de biomineralización del medio poroso, ya que aportaban la cantidad de formiato necesaria para que éste haya sido utilizado como dador de electrones para la reducción microbiana de sulfato en los modelos de acuífero.

Los análisis de las secuencias del gen del ARNr 16S de la arena de cuarzo de estos modelos revelaron un mayor enriquecimiento de las secuencias pertenecientes al género reductor de sulfato *Desulfomicrobium* a medida que aumentó la concentración de formiato en el medio de cultivo. Este resultado es coherente con lo observado por Zouch et al (2017), en el cual predominaron secuencias pertenecientes a la clase Deltaproteobacteria, la cual incluye al género *Desulfomicrobium*, en cultivos líquidos con formiato, que fueron utilizados para enriquecer las bacterias reductoras de sulfato presentes en un sedimento marino.

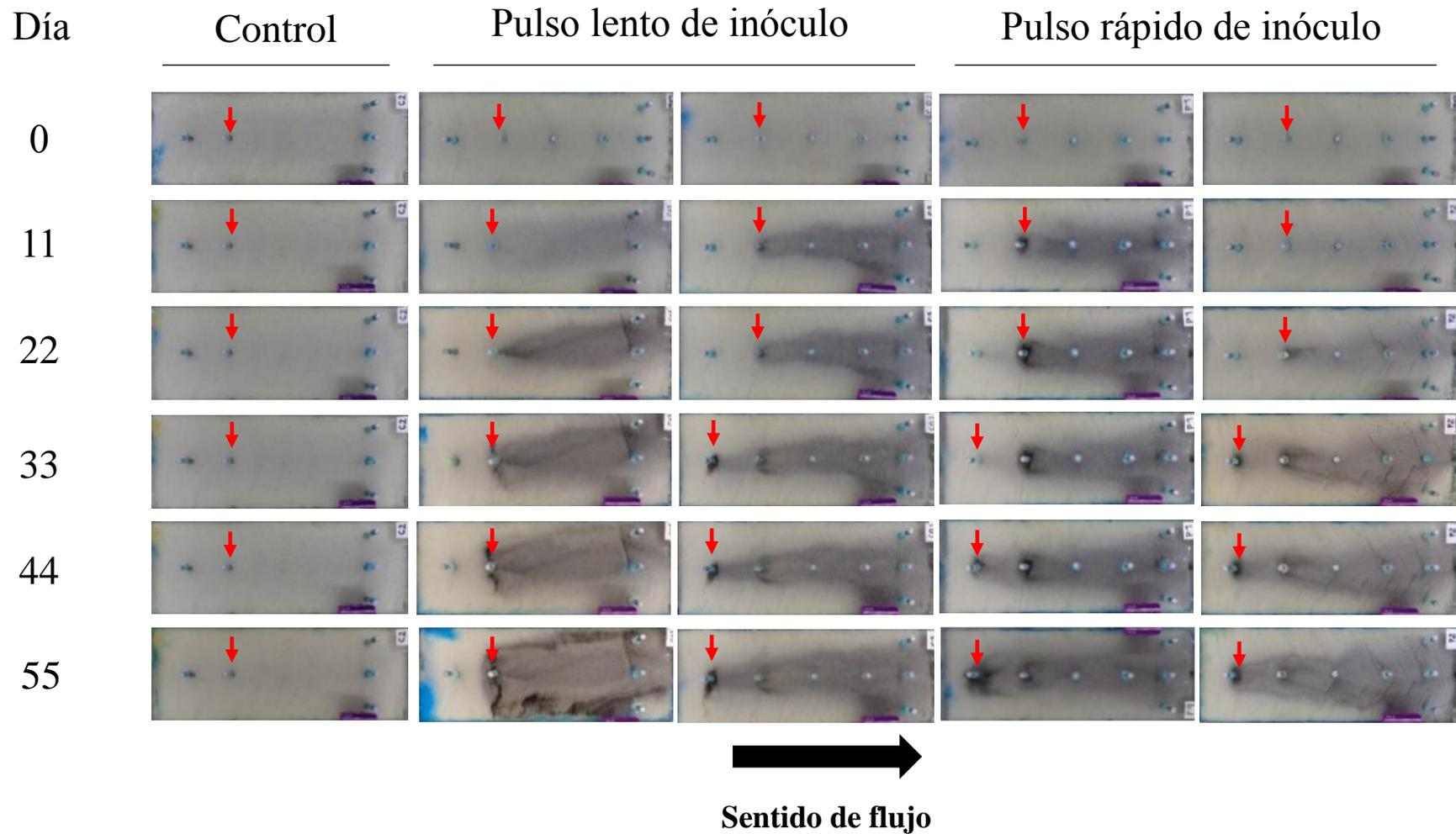
Se logró aumentar el área biomineralizada en los modelos de acuífero al final del experimento como consecuencia del aumento de la concentración de formiato en el medio de cultivo. La mayor precipitación de CaCO₃ podría deberse a una mayor disponibilidad de

iones los HCO_3^- y CO_3^{2-} que son generados por una mayor degradación del formiato. Si bien este fenómeno no se tradujo en una dependencia del aumento del tiempo de retención en función de la concentración de formiato, fue posible lograr la precipitación de minerales de CaCO_3 en zonas más alejadas del punto de inoculación, lo que indica que se disminuyó el espacio de poro del medio poroso por acumulación de estos minerales, lo que en un período de experimentación más prolongado podría llevar a la reducción total de la permeabilidad de la arena de cuarzo empacada en los modelos de acuífero.

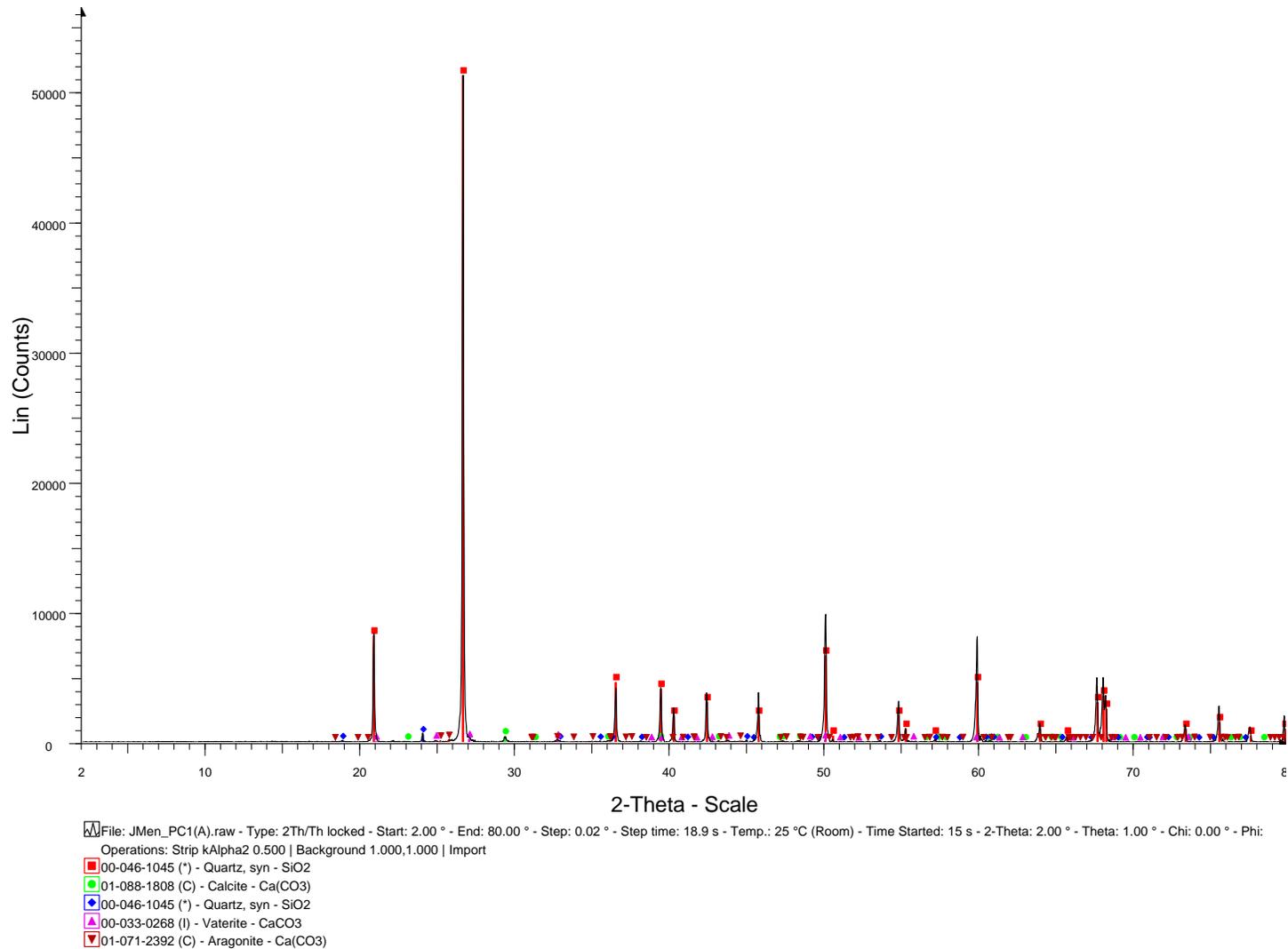
En resumen, se demostró que es posible desarrollar un método para la biomineralización de un medio poroso en un modelo de acuífero, con el fin de retardar el desplazamiento de una pluma de aguas que contiene sulfato y que proviene de un tranque de relaves. Los resultados obtenidos sirven de base para estudios posteriores que tengan como objetivo disminuir la permeabilidad de otros medios porosos o sedimentos de un acuífero por medio de la biomineralización generada por un metabolismo microbiano reductor de sulfato.

VI. CONCLUSIONES

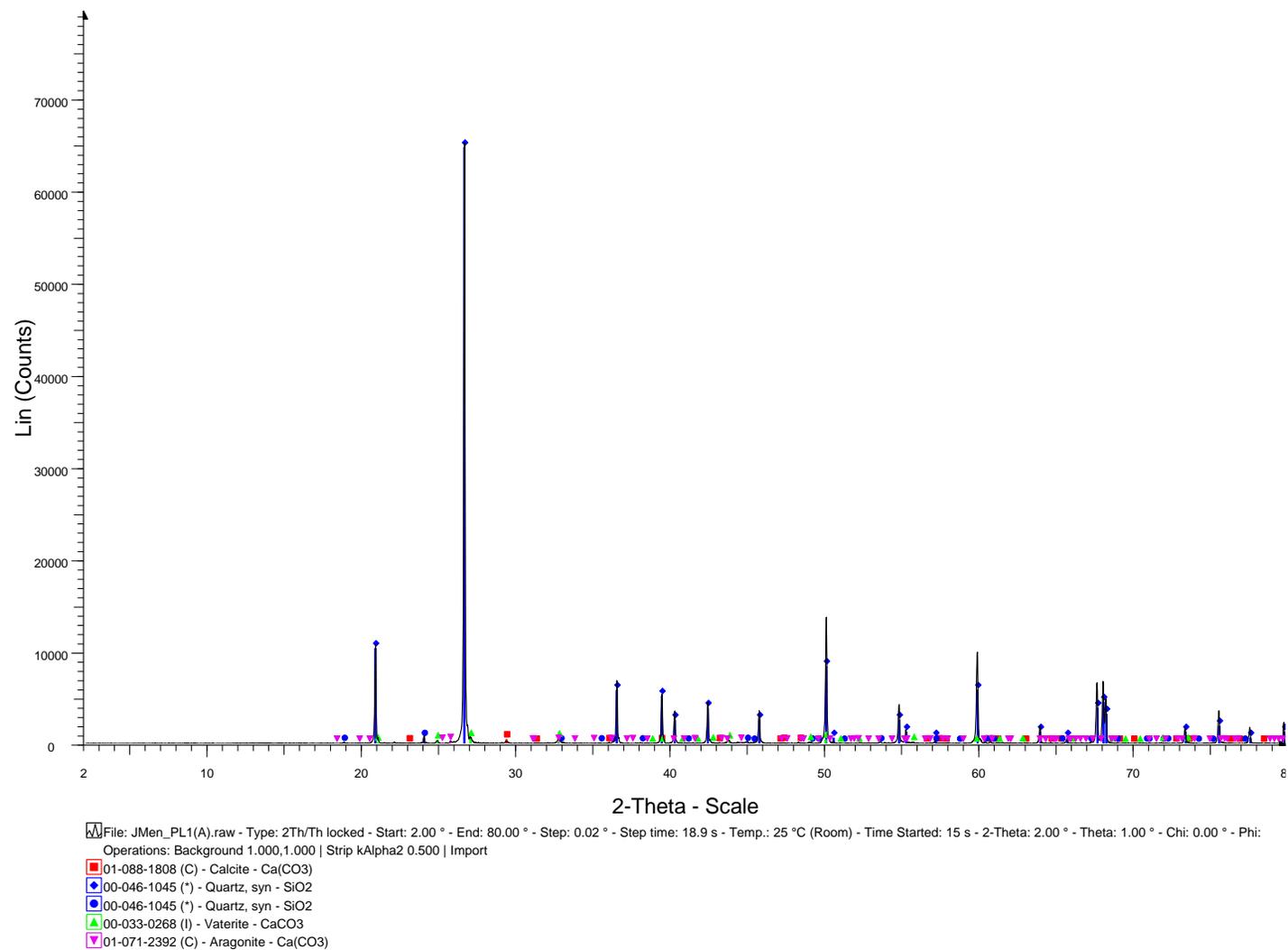
1. Se demostró que es posible establecer un metabolismo reductor de sulfato activo en el medio poroso de un modelo de acuífero como resultado de la inoculación con un consorcio microbiano reductor de sulfato y su estimulación con medio de cultivo conteniendo formiato como dador de electrones.
2. Se determinó que el máximo alcance de la biomineralización del medio poroso se obtuvo:
a) inoculando los modelos con una velocidad de 0,2 mL/min (pulso lento) y, b) estimulando el consorcio microbiano inoculado con medio de cultivo conteniendo 12 g/L de formiato.
3. La concentración de 12 g/L de formiato en el medio de cultivo produjo un enriquecimiento de las secuencias correspondientes al género reductor de sulfato *Desulfomicrobium* en la arena del modelo de acuífero, el que alcanzó un 52% de la abundancia relativa de las secuencias del gen del ARNr 16S.
4. Utilizando 12 g/L de formiato, se logró la biomineralización del medio poroso en los modelos de acuífero, la que produjo la disminución de su permeabilidad por la acumulación de minerales de CaCO₃. La biomineralización afectó hasta un 38% de la arena de cuarzo, lo que se tradujo en un aumento del tiempo de retención que correspondió al doble del tiempo inicial.



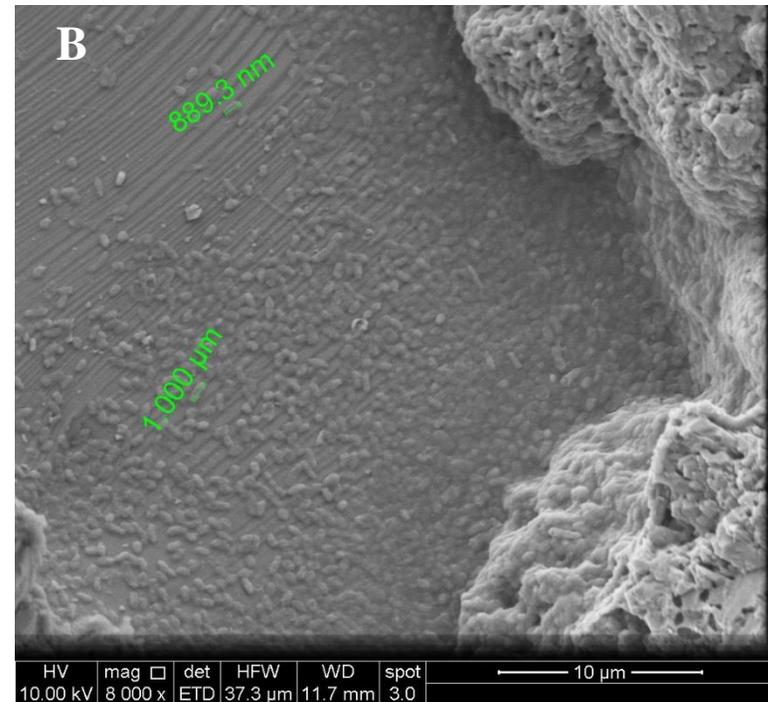
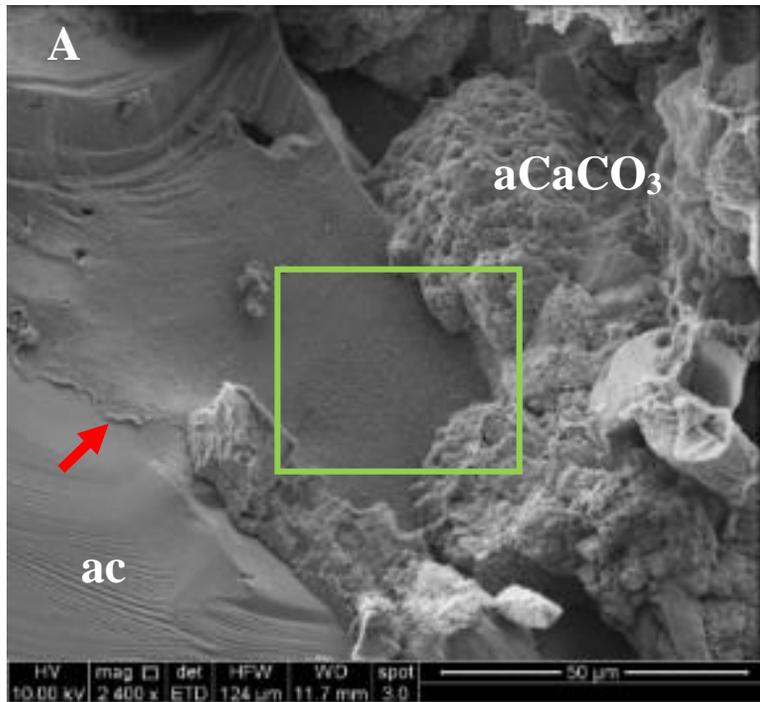
Anexo 1. Aparición de las plumas de sulfuros de hierro en los modelos de acuífero inoculados a ambas velocidades. En columnas, se muestran las fotografías de los modelos de acuífero correspondientes a los días 0, 11, 22, 33, 44 y 55 del experimento. En los modelos inoculados se observa el desarrollo de una pluma ennegrecida que corresponde a sulfuros de hierro. Las flechas rojas indican el puerto utilizado para la inoculación y la estimulación con medio de cultivo.



Anexo 2. Difractograma de muestra de arena pulverizada del punto de inoculación de uno de los modelos de acuífero inoculado con pulso rápido. La leyenda bajo la figura indica la simbología utilizada por el servicio de difracción de rayos X, con la cual se identifica el cristal de CaCO₃ (calcita, vaterita o aragonita) y el mineral de cuarzo.



Anexo 2 (continuación). Difractograma de muestra de arena pulverizada del punto de inoculación de uno de los modelos de acuífero inoculado con pulso lento. La leyenda bajo la figura indica la simbología utilizada por el servicio de difracción de rayos X, con la cual se identifica el cristal de CaCO₃ (calcita, vaterita o aragonita) y el mineral de cuarzo.



Anexo 3. Biopelícula microbiana sobre las partículas de arena de cuarzo observada por microscopía de barrido electrónico. A: biopelícula microbiana adherida a una partícula de arena de cuarzo (flecha roja). B. Microorganismos inmersos en la biopelícula microbiana. Se muestra la magnificación (x5) de la zona correspondiente al cuadrado verde de la imagen en A, donde se observan microorganismos de 1 μm de longitud en promedio. ac: arena de cuarzo. aCaCO_3 : carbonato de calcio amorfo.

[Formiato en medio de cultivo]
(g/L)

Duplicado 1

Duplicado 2

Superficie biomineralizada (%)
(Promedio de duplicados)

3



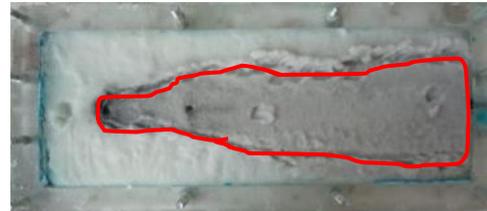
8,0

4



19,4

12



37,8

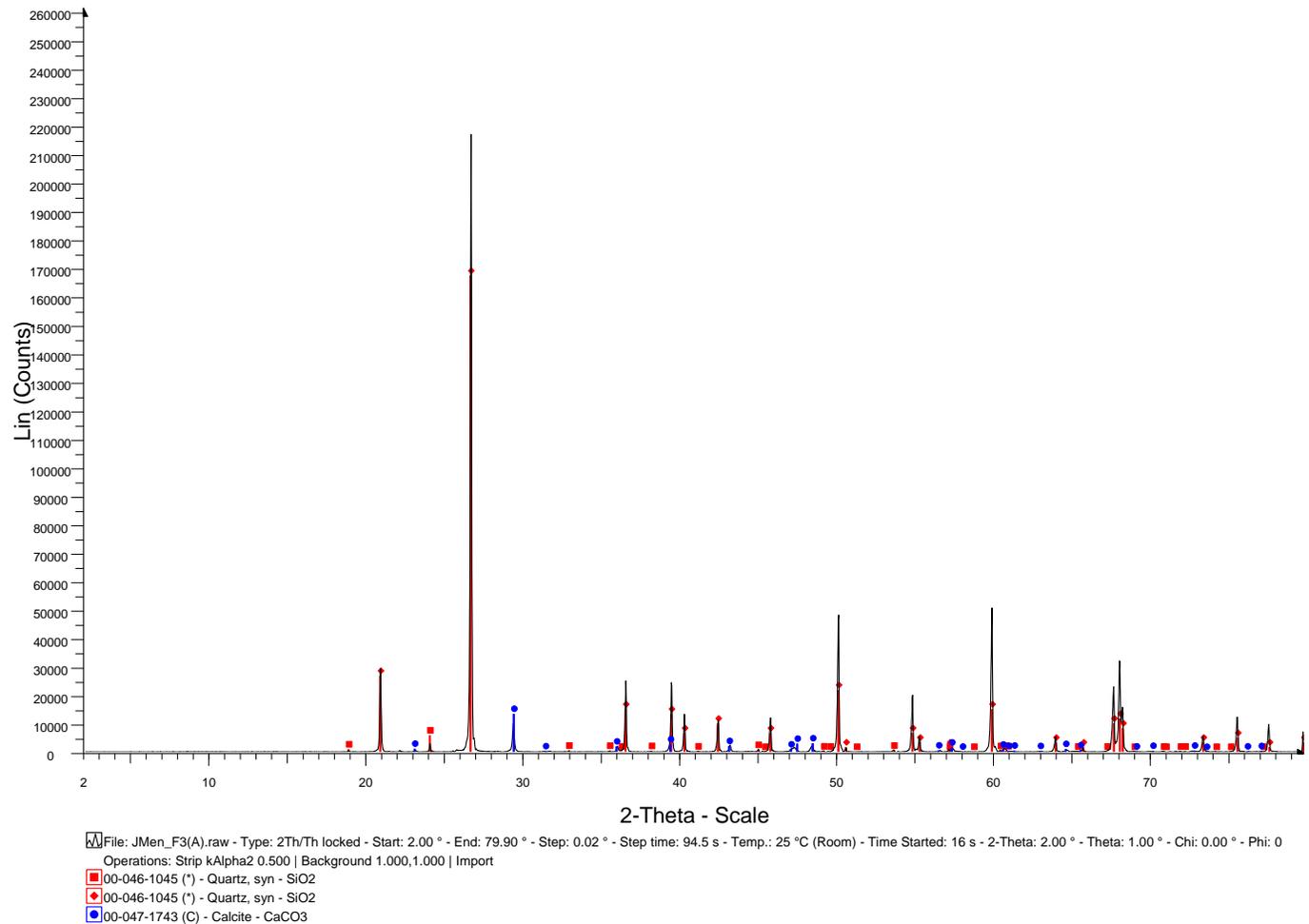
18



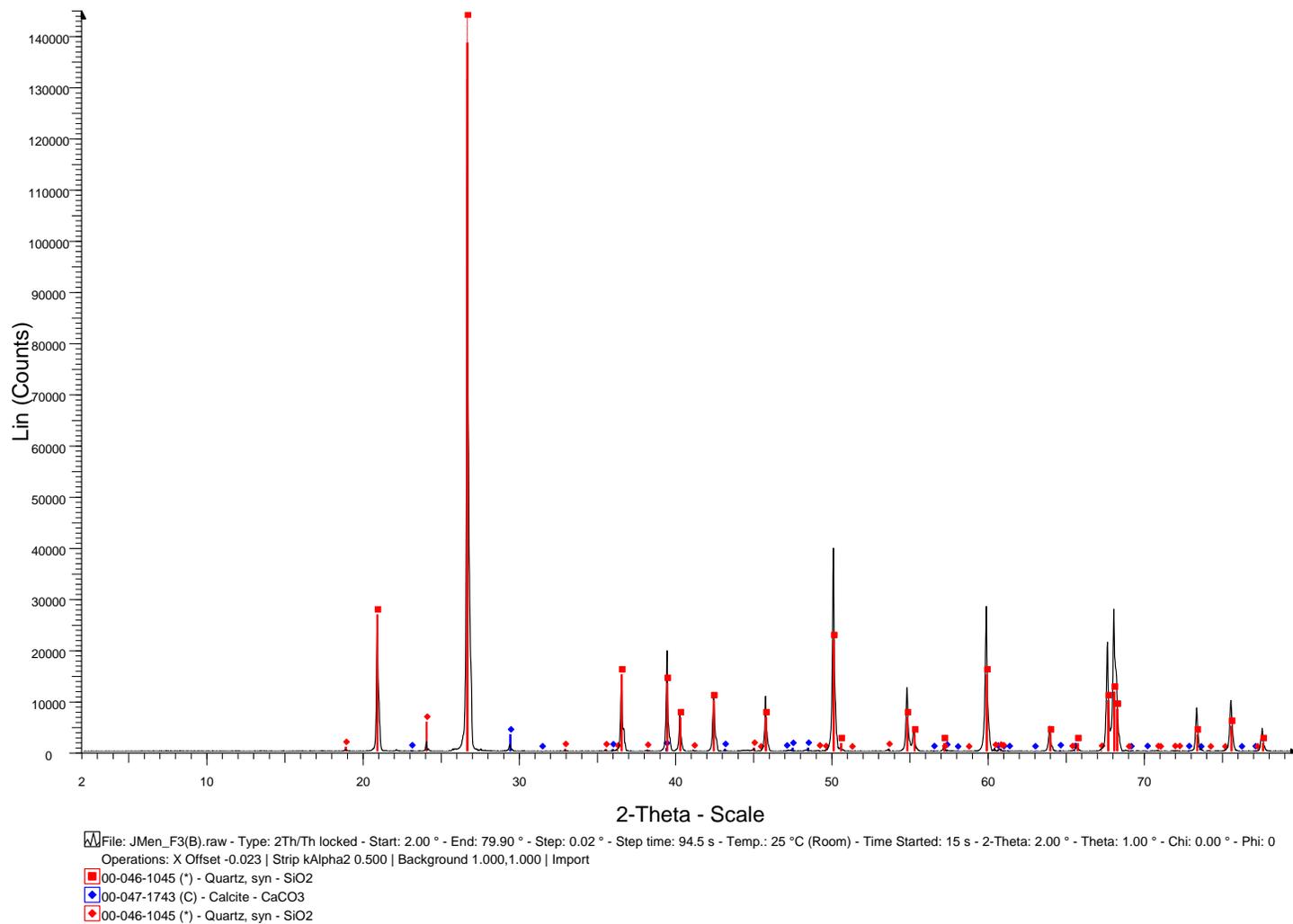
41,7


Sentido de flujo

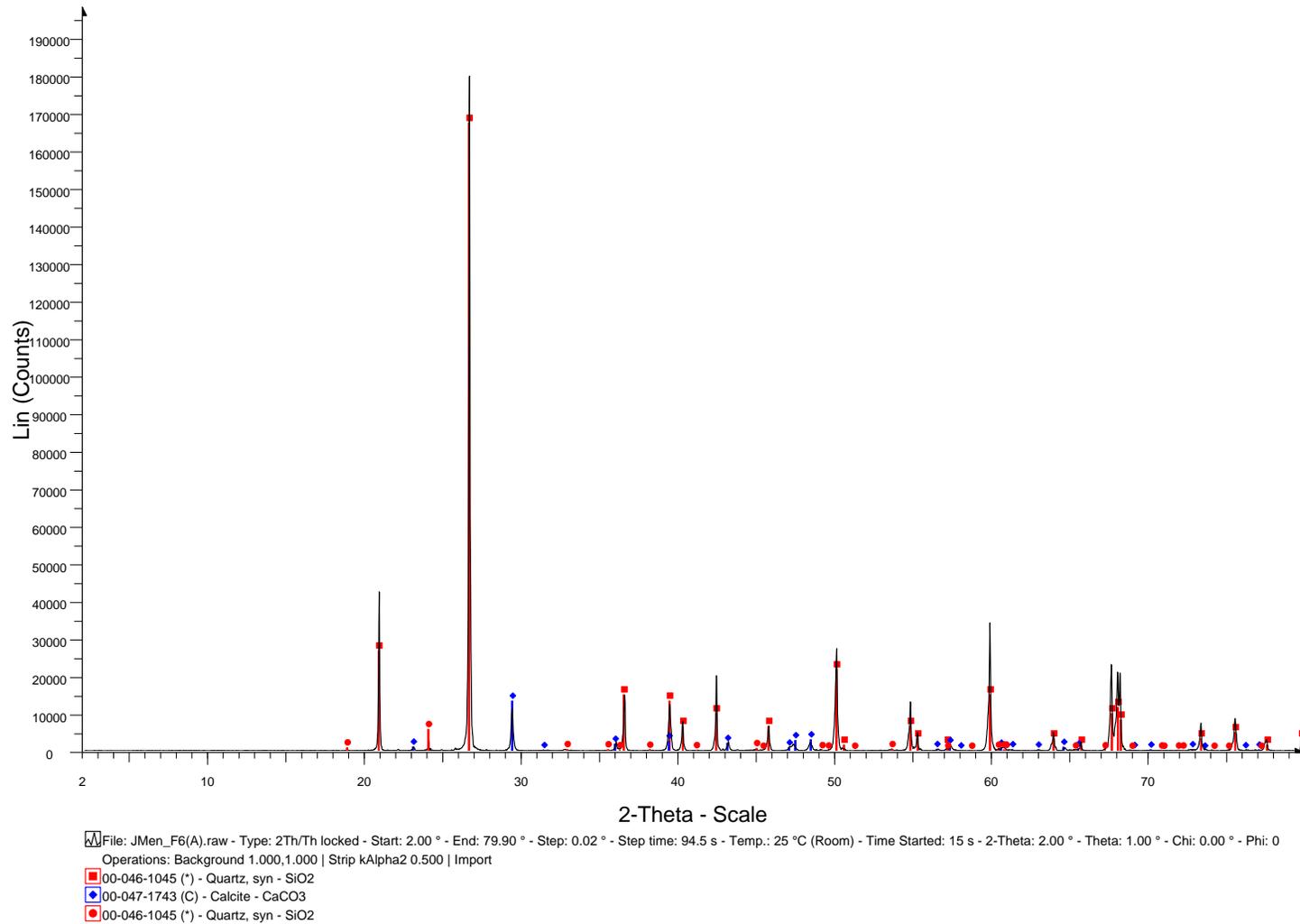
Anexo 4. Biomineralización de la arena de cuarzo de los modelos de acuífero inoculados con las distintas concentraciones de formiato al final del experimento. Se muestran los modelos de acuíferos destapados al final del experimento. La línea roja delimita la zona biomineralizada (de mayor dureza respecto a otras zonas) del medio poroso de los modelos de acuífero. Se muestra la totalidad de los modelos (duplicados) utilizados (columna central). En la columna de la derecha se muestra el porcentaje del área ocupada por la zona biomineralizada respecto a la superficie total de la cara superior de los modelos (Calculado utilizando el programa ImageJ).



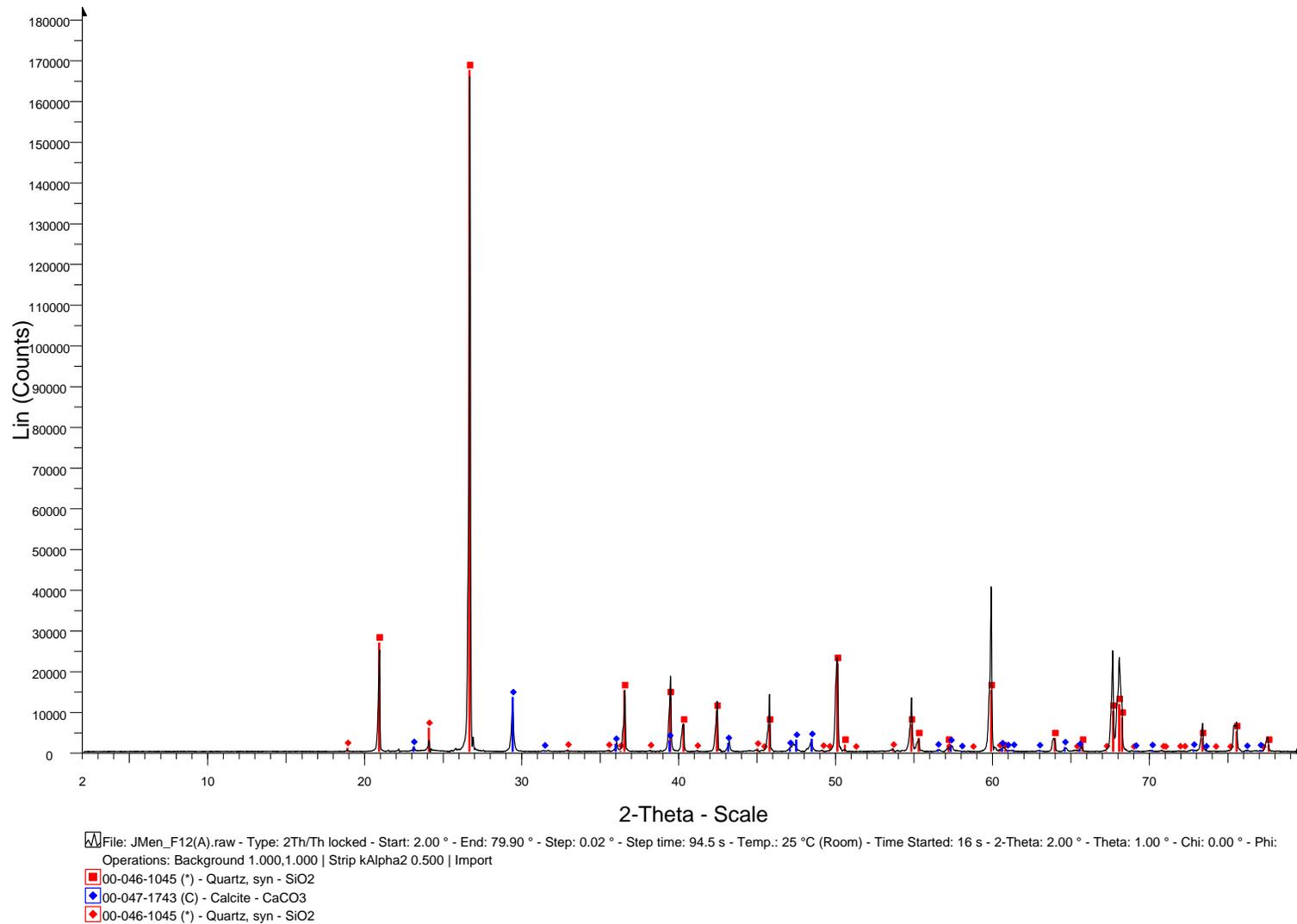
Anexo 5. Difractograma de muestra de arena pulverizada del punto de inoculación de uno de los modelos de acuífero estimulados con 3 g/L de formiato en el medio de cultivo. La leyenda bajo la figura indica la simbología utilizada por el servicio de difracción de rayos X, con la cual se identifica el cristal de CaCO₃ (calcita) y el mineral de cuarzo.



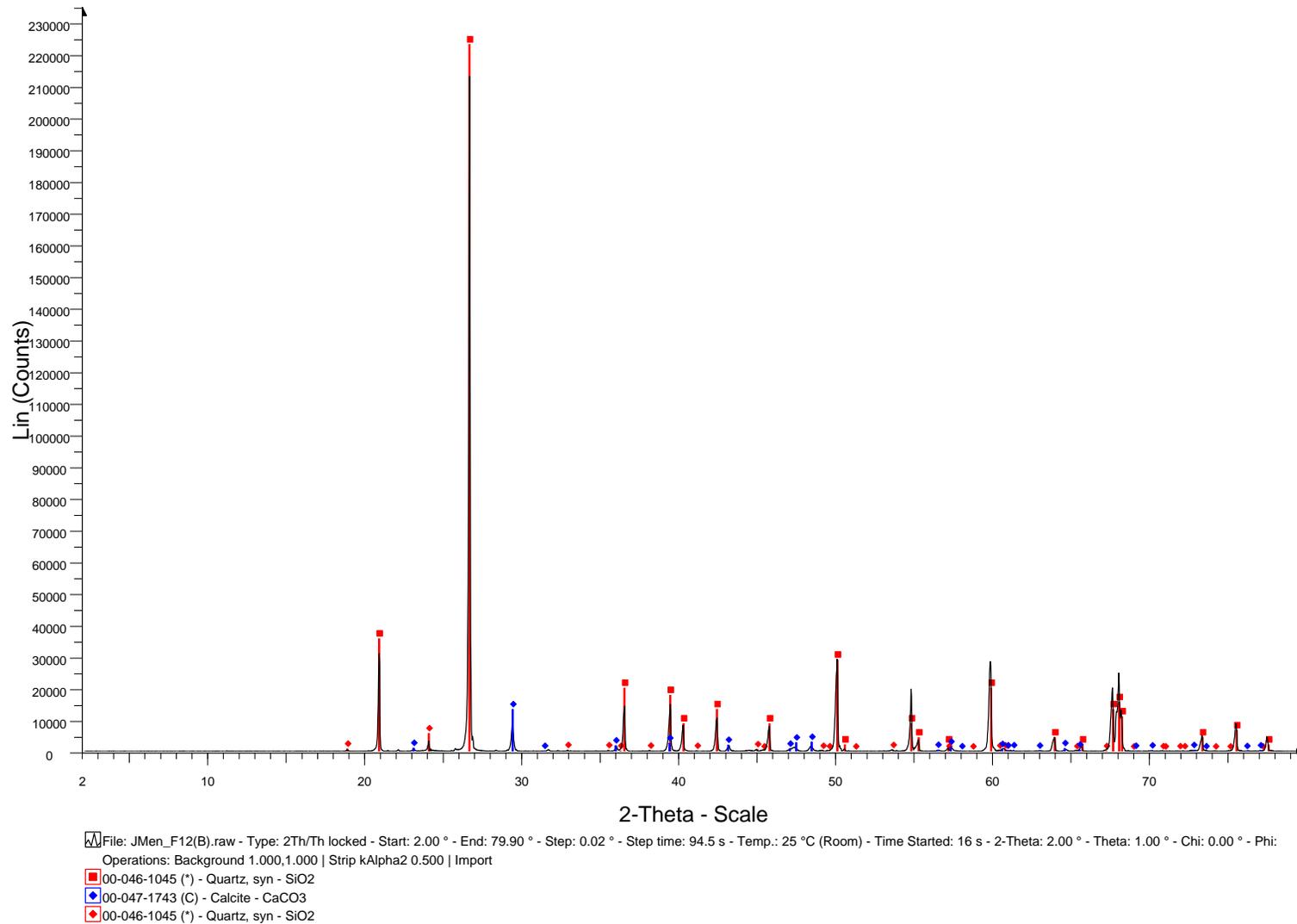
Anexo 5 (continuación). Difractograma de muestra de arena pulverizada del punto río abajo al punto de inoculación de uno de los modelos de acuífero estimulados con 3 g/L de formiato en el medio de cultivo. La leyenda bajo la figura indica la simbología utilizada por el servicio de difracción de rayos X, con la cual se identifica el cristal de CaCO₃ (calcita) y el mineral de cuarzo.



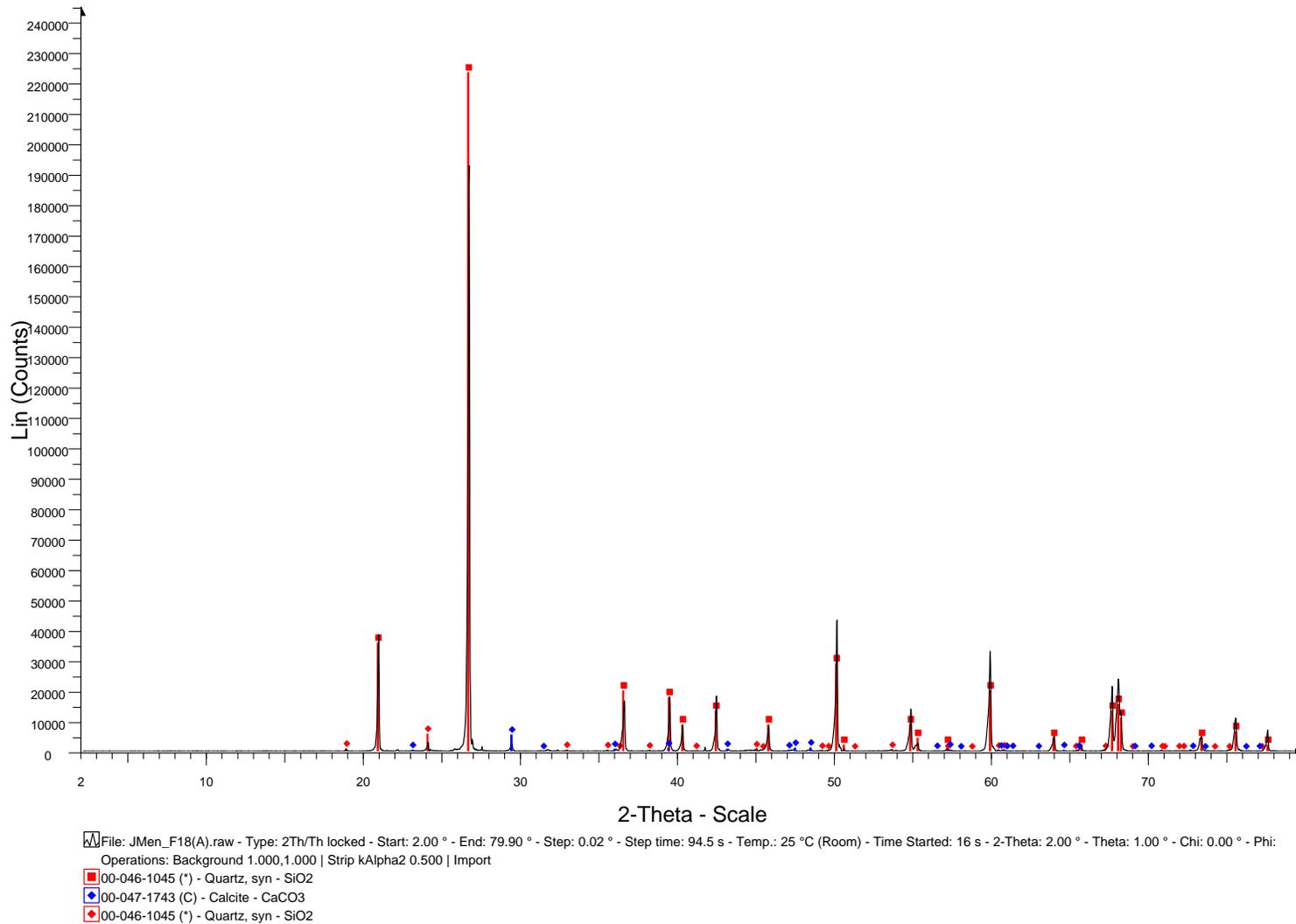
Anexo 5 (continuación). Difractograma de muestra de arena pulverizada del punto de inoculación de uno de los modelos de acuífero estimulados con 6 g/L de formiato en el medio de cultivo. La leyenda bajo la figura indica la simbología utilizada por el servicio de difracción de rayos X, con la cual se identifica el cristal de CaCO₃ (calcita) y el mineral de cuarzo.



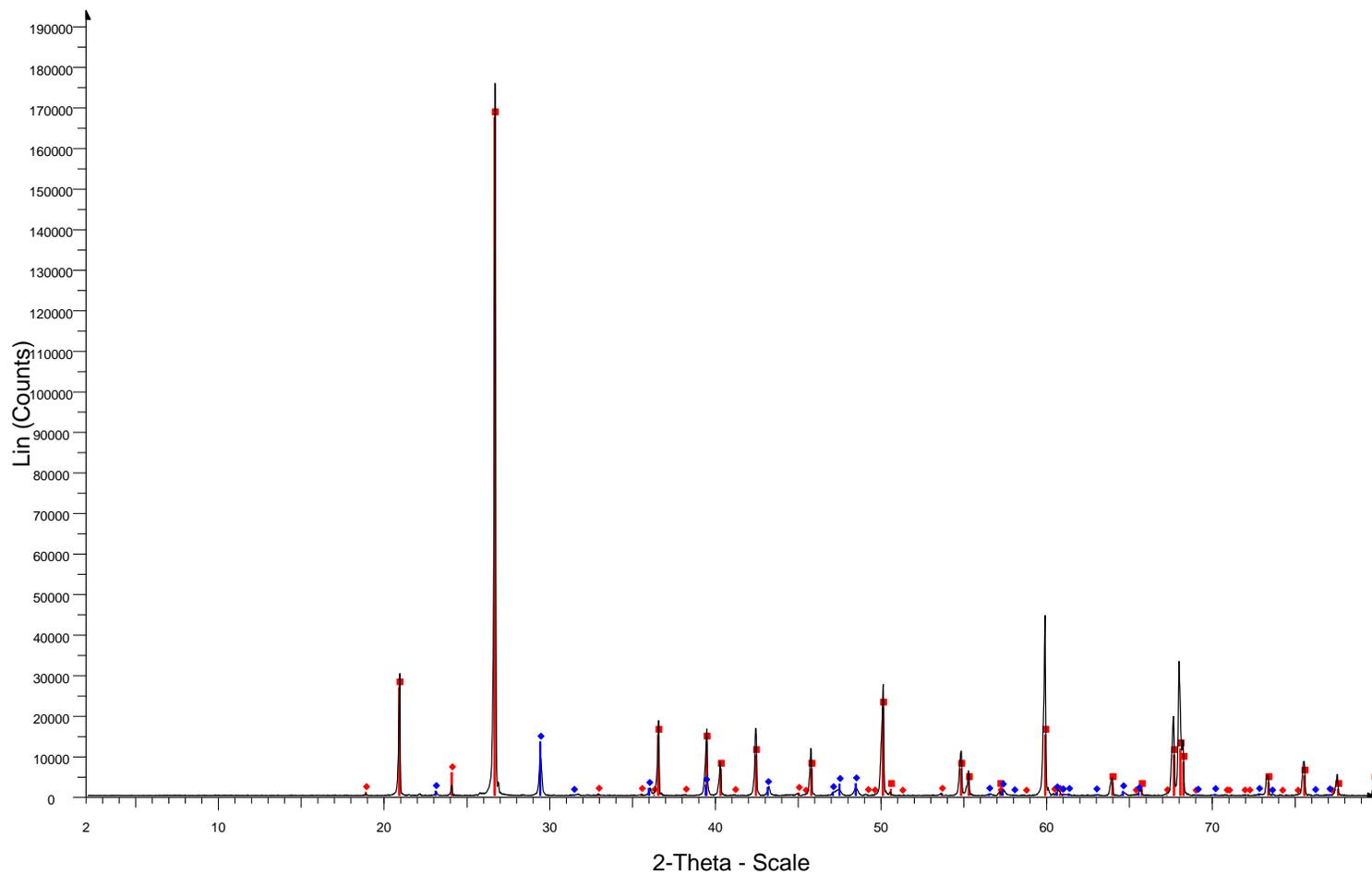
Anexo 5 (continuación). Difractograma de muestra de arena pulverizada del punto de inoculación de uno de los modelos de acuífero estimulados con 12 g/L de formiato en el medio de cultivo. La leyenda bajo la figura indica la simbología utilizada por el servicio de difracción de rayos X, con la cual se identifica el cristal de CaCO_3 (calcita) y el mineral de cuarzo.



Anexo 5 (continuación). Difractograma de muestra de arena pulverizada del punto río abajo al punto de inoculación de uno de los modelos de acuífero estimulados con 12 g/L de formiato en el medio de cultivo. La leyenda bajo la figura indica la simbología utilizada por el servicio de difracción de rayos X, con la cual se identifica el cristal de CaCO₃ (calcita) y el mineral de cuarzo.



Anexo 5 (continuación). Difractograma de muestra de arena pulverizada del punto de inoculación de uno de los modelos de acuífero estimulados con 18 g/L de formiato en el medio de cultivo La leyenda bajo la figura indica la simbología utilizada por el servicio de difracción de rayos X, con la cual se identifica el cristal de CaCO_3 (calcita) y el mineral de cuarzo.



File: JMen_F18(B).raw - Type: 2Th/Th locked - Start: 2.00 ° - End: 79.90 ° - Step: 0.02 ° - Step time: 94.5 s - Temp.: 25 °C (Room) - Time Started: 16 s - 2-Theta: 2.00 ° - Theta: 1.00 ° - Chi: 0.00 ° - Phi:

Operations: Strip kAlpha2 0.500 | Background 1.000,1.000 | Import

00-046-1045 (*) - Quartz, syn - SiO2

00-047-1743 (C) - Calcite - CaCO3

00-046-1045 (*) - Quartz, syn - SiO2

Anexo 5 (continuación). Difractograma de muestra de arena pulverizada del punto río abajo al punto de inoculación de uno de los modelos de acuífero estimulados con 18 g/L de formiato en el medio de cultivo. La leyenda bajo la figura indica la simbología utilizada por el servicio de difracción de rayos X, con la cual se identifica el cristal de CaCO₃ (calcita) y el mineral de cuarzo.

VIII. REFERENCIAS

- Ali K, Ahmed B, Dwivedi S, Saquib Q, Al-Khedhairy AA, Musarrat J (2015).** Microwave Accelerated Green Synthesis of Stable Silver Nanoparticles with *Eucalyptus globulus* Leaf Extract and Their Antibacterial and Antibiofilm Activity on Clinical Isolates. PLoS One. 1;10(7).
- Anbu P, Kang CH, Shin YJ, So JS (2016).** Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. Springerplus. 1(5):250. Review.
- Avila K, Moxey D, de Lozar A, Avila M, Barkley D, Hof B (2011).** The onset of turbulence in pipe flow. Science. 333(6039):192-196.
- Azam S y Li Q (2010).** Tailings Dam Failures: A Review of the Last One Hundred Years. Fecha de acceso: 29 de noviembre de 2016: <http://www.infomine.com/library/publications/docs/Azam2010.pdf>
- Banks D, Younger PL, Arnesen RT, Iversen ER, Banks SB (1997).** Mine-water chemistry: the good, the bad and the ugly. Environmental Geology. 32 (3): 157- 174.
- Braissant O, Decho AW, Dupraz C, Glunk C, Przekop KM, Visscher PT (2007).** Exopolymeric substances of sulfate-reducing bacteria: Interactions with calcium at alkaline pH and implication for formation of carbonate minerals. Geobiology. 5: 401–411.
- Calabrán RA (2009).** Evaluación de riesgo ambiental del tranque de relave Las Tórtolas ubicado en la comuna de Colina, Región Metropolitana de Santiago. Memoria para optar al título profesional de geógrafo, Universidad de Chile.
- Canakci H, Sidik W, Kilic IH (2015).** Effect of bacterial calcium carbonate precipitation on compressibility and shear strength of organic soil. Soils and Foundations. 55(5): 1211-1221.
- Canfield M (2012).** Etapas del Proceso Productivo de una Mina. Curso de Minería para Periodistas. SONAMI, Santiago, Chile. Fecha de acceso: 27 de enero de 2017: <http://www.sonami.cl/site/wp-content/uploads/2016/04/01.-Etapas-del-Proceso-Productivo-de-una-Mina.pdf>
- Castro HF, Williams NH, Ogram A (2000).** Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. FEMS Microbiology Ecology. 31(1):1-9.
- Cirpka OA, Windfuhr C, Bisch G, Granzow S, Scholz- Muramatsu H, Kobus H (1999).** Microbial reductive dechlorination in large-scale sandbox model. Journal of Environmental Engineering. 125 (9): 861-870.

- Cirpka OA, Olsson Å, Qingsong J, Rahman MA, Grathwohl P (2006).** Determination of transverse dispersion coefficients from reactive plume lengths. *Ground Water*. 44(2): 212-221.
- CODELCO (2011).** Estudio de impacto ambiental: Proyecto expansión Andina 244. Anexo 4.4 Modelo conceptual del tranque Ovejería.
- De Jesus EB, De Andrade Lima LRP, Bernardez LA, Almeida PF (2015).** Inhibition of microbial sulfate reduction by molybdate. *Brazilian Journal of Petroleum and Gas*. 9 (3): 095-106.
- De Muynck W, De Belie N, Verstraete W (2010).** Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review. *Ecological Engineering*. 36 (2): 118-136.
- De Souza PM, Goulart FRV, Marques JM, Bizzo HR, Blank AF, Groposo C, Sousa MP, Vólaro V, Alviano CS, Moreno DSA, Seldin L (2017).** Growth Inhibition of Sulfate-Reducing Bacteria in Produced Water from the Petroleum Industry Using Essential Oils. *Molecules*. 22: 648-658.
- Duda R (2014).** The influence of drainage wells barrier on reducing the amount of major contaminants migrating from a very large mine tailings disposal site. *Archives of environmental protection*. 40(4), 87-99.
- Dupraz C, Reid RP, Braissant O, Decho AW, Norman RS, Visscher PT (2009).** Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats. *Earth-Science Reviews*. 96: 141-162.
- El Mostrador (2015).** Vecinos de ‘Caimanes’ en picada contra minera del grupo Luksic por incumplimiento de fallo de la Corte Suprema. Fecha de acceso: 03 de abril de 2017. <http://www.elmostrador.cl/noticias/pais/2015/01/26/vecinos-de-caimanes-en-picada-contra-minera-del-grupo-luksic-por-incumplimiento-de-fallo-de-la-corte-suprema/>.
- Gallagher KL, Kading TJ, Braissant O, Dupraz C, Visscher PT (2012).** Inside the alkalinity engine: the role of electron donors in the organomineralization potential of sulfate-reducing bacteria. *Geobiology*. 10: 518–530.
- Ghasemizadeh R, Hellweger F, Butscher C, Padilla I, Vesper D, Field M, Alshawabkeh A (2012).** Review: Groundwater flow and transport modeling of karst aquifers, with particular reference to the North Coast Limestone aquifer system of Puerto Rico. *Hydrogeology Journal*. 20 (8):1441-1461.
- Gutiérrez S (2017).** Escalamiento de un proceso para biocolmatar un medio poroso expuesto a aguas de una estación de monitoreo de tranque de relaves. (Tesis de magíster). Universidad de Chile, Santiago, Chile.

- Hamdan N, Kavazanjian E Jr., Rittmann BE, Karatas I (2011).** Carbonate Mineral Precipitation for Soil Improvement Through Microbial Denitrification. Geo-Frontiers Congress 2011, ASCE. Dallas, Texas, United States.
- Heidari P y Li (2014).** Solute transport in low-heterogeneity sandboxes: The role of correlation length and permeability variance. American Geophysical Union (AGU). Water Resources Research. 8240-8264. Fecha de acceso: 19 de enero de 2017: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/2013WR014654/epdf>.
- Johnson DB (2003).** Chemical and microbiological characteristics of mineral spoils and drainage waters at abandoned coal and metal mines. Water, Air, and Soil Pollution. 3: 47–66.
- Jormakka M, Byrne B, Iwata S (2003).** Formate dehydrogenase--a versatile enzyme in changing environments. Current Opinion In Structural Biology. 13(4):418-423. Review.
- Kildsgaard J y Engesgaard P (2001).** Numerical analysis of biological clogging in two-dimensional sand box experiments. Journal of Contaminant Hydrology. 50: 261–285.
- Kildsgaard J y Engesgaard P (2002).** Tracer tests and image analysis of biological clogging in a two-dimensional sandbox experiment. Groundwater Monitoring & Remediation. 22 (2): 60-67.
- Kılıç IH, Kateeb AA, Oğuzkan SB, Erdoğan N (2016).** Investigation of Effect on *E. Coli* of Food Dyes and LacZ Gene Expression. International Journal of Recent Advances in Multidisciplinary Research. 3(11): 1987-1990.
- Korenblum E, Regina de Vasconcelos Goulart F, de Almeida Rodrigues I, Abreu F, Lins U, Alves PB, Blank AF, Valoni E, Sebastián GV, Alviano DS, Alviano CS, Seldin L (2013).** Antimicrobial action and anti-corrosion effect against sulfate reducing bacteria by lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil and its major component, the citral. AMB Express. 3(1):44.
- Ksionzek KB, Lechtenfeld OJ, McCallister SL, Schmitt-Kopplin P, Geuer JK, Geibert W, Koch BP (2016).** Dissolved organic sulfur in the ocean: Biogeochemistry of a petagram inventory. Science. 28:456-459.
- Lottermoser B (2007).** Mine Wastes: Characterization, Treatment and Environmental Impacts. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Muyzer G y Stams AJ (2008).** The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. Nature Reviews Microbiology. 6 (6): 441-454.

- Nemati M, Jenneman GE, Voordouw G (2001).** Mechanistic study of microbial control of hydrogen sulfide production in oil reservoirs. *Biotechnology and Bioengineering*. 74:424–434.
- Phanikumar MS, Hyndman DW, Zhao X, Dybas MJ (2005).** A three-dimensional model for microbial transport and biodegradation at the Schoolcraft Michigan site. *Water Resources Research* 41. Fecha de acceso: 3 de diciembre de 2016: <http://dx.doi.org/10.1029/2004WR003376>.
- Piver, WT (1992).** Contamination and restoration of groundwater aquifers. *Environmental Health Perspectives*. 100: 237-247.
- Pontigo D (2017).** Desarrollo de un método para biocolmatar un medio poroso expuesto a aguas claras de tranque de relave minero. (Tesis de magíster). Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Postgate JR (1963).** Versatile medium for the enumeration of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 11(3): 265-267.
- Rico M, Benito G, Salgueiro AR, Díez-Herrero A, Pereira HG (2008).** Reported tailings dam failures. A review of the European incidents in the worldwide context. *Journal of Hazardous Materials*. 152 (2):846-852.
- Roymahapatra G, Dinda J, Mishra A, Mahapatra A, Hwang WS, Mandal SM (2015).** Cytotoxic potency of self-assembled Ruthenium(II)-NHC complexes with pincer type 2, 6-bis(N methylimidazolylidene/benzimidazolylidene)pyrazine ligands. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 11(1):105-113.
- Seifert D y Engesgaard P (2007).** Use of tracer tests to investigate changes in flow and transport properties due to bioclogging of porous media. *Journal of Contaminant Hydrology*. 93: 58–71
- Seifert D y Engesgaard P (2012).** Sand box experiments with bioclogging of porous media: Hydraulic conductivity reductions. *Journal of Contaminant Hydrology*. 136–137: 1–9.
- Seki K, Thullner M, Hanada J, Miyazaki T (2006).** Moderate Bioclogging Leading to Preferential Flow Paths in Biobarriers. *Ground Water Monitoring & Remediation*. 26 (3): 68–76.
- SERNAGEOMIN (2016).** Catastro de depósitos de relaves. Estudio realizado por SERNAGEOMIN. Fecha de acceso: 08 de septiembre de 2018. http://sitiohistorico.sernageomin.cl/pdf/mineria/relaves/Analisis-Catastro-Depositos-de-Relaves-en-Chile2016_.pdf

- Sleat R y Mah R (1984).** Quantitative Method for Colorimetric Determination of Formate in Fermentation Media. *Applied and Environmental Microbiology*. 47 (4): 884–885.
- Soetaert K, Hofmann A, Middelburg J, Meysman F (2007).** The effect of biogeochemical processes on pH. *Marine Chemistry*. 105: 30–51.
- Solari M (2011).** Estromatolitos y trombolitos: Fósiles vivientes en Torres del Paine, Patagonia. Fecha de acceso: 25 de diciembre de 2016. <https://docplayer.es/49068752-Estromatolitos-y-trombolitos-fosiles-vivientes-en-torres-del-paine-patagonia.html>
- Thomas BF, Caineta J, Nanteza J (2017).** Global Assessment of Groundwater Sustainability Based On Storage Anomalies. *American Geophysical Union*. 44 (22): 445-455.
- Thullner M (2010).** Comparison of bioclogging effects in saturated porous media within one- and two-dimensional flow systems. *Ecological Engineering*. 36: 176–196.
- Trajano VN, Lima EO, Travassos AE, Souza EL (2010).** Inhibitory effect of the essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume leaves on some food-related bacteria. *Food Science and Technology*. 30(3): 771-775.
- UNEP (2003).** Groundwater and its susceptibility to degradation: a global assessment of the problem and options for management, early warning and assessment report series, UNEP/DEWA/RS. 03-3, joint publication from United Nations Environment Programme, Department for International Development and the Natural Environment Research Council (NERC).
- Van Paassen LA, Harkes MP, van Zwieten GA, van der Zon WH, van der Star WRL, van Loosdrecht MCM (2009).** Scale up of BioGrout: a biological ground reinforcement method. In: *Proceedings of the 17th International Conference on Soil Mechanics and Geotechnical Engineering*, Alexandria, Egypt. 2328–2333
- Van Wijngaarden WK, Vermolen FJ, Van Meurs GAM, Vuik C (2010).** Modelling biogrout: a new ground improvement method based on microbial-induced carbonate precipitation. *Transport in Porous Media*. 87: 397–420.
- WEF (1999).** Standard methods for the examination of water and wastewater. American public health association. American water works association.
- Younger PL, Banwart SA, Hedin RS (2002)** Mine Water Hydrology. In: *Mine Water. Environmental Pollution*, vol 5. Springer, Dordrecht.
- Zhang L, De Schryver P, De Gusseme B, De Muynck W, Boon N, Verstraete W (2008).** Chemical and biological technologies for hydrogen sulfide emission control in sewer systems: a review. *Water Research*. 42 (1-2):1-12.

Zouch H, Karray F, Armougom F, Chifflet S, Hirschler-Réa A, Kharrat H, Kamoun L, Ben Hania W, Ollivier B, Sayadi S, Quéméneur M (2017). Microbial Diversity in Sulfate-Reducing Marine Sediment Enrichment Cultures Associated with Anaerobic Biotransformation of Coastal Stockpiled Phosphogypsum (Sfax, Tunisia). *Frontiers in Microbiology*. 21(8):1583.