

# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



## ***ESCALAMIENTO DE UN PROCESO PARA BIOCOLMATAR UN MEDIO POROSO EXPUESTO A AGUAS DE LA BARRERA HIDRÁULICA DE UN TRANQUE DE RELAVES***

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de especialización Bioquímica Ambiental y memoria para optar al título de Bioquímico por:

***Sebastián Nicolás Gutiérrez Ardura***

Director de Tesis:  
Dr. Davor Cotoras Tadic

Santiago- Chile

JULIO, 2017

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

**SEBASTIÁN NICOLÁS GUTIÉRREZ ARDURA**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización Bioquímica Ambiental y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día

---

**Director de Tesis:**

**Dr. Davor Cotoras T.** \_\_\_\_\_

**Comisión evaluadora de Tesis:**

**Prof. Sergio Álvarez A.** \_\_\_\_\_

**Prof. Blanca Escobar M.** \_\_\_\_\_

**Prof. Tatiana Garrido R.** \_\_\_\_\_

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer, en primer lugar a mi familia. A mis padres, María Elena y Pedro, por estar siempre conmigo y apoyarme en todas las decisiones que he tomado hasta ahora, muchísimas gracias por todo lo que han dado. A mi hermano Matías, por su preocupación e interés por lo que estaba haciendo, por las bromas y el buen humor en el poco tiempo que hemos pasado juntos desde que comencé a estudiar en la universidad. A todos mis familiares, por los consejos, los buenos ratos y su preocupación. Particularmente a mi tía Lorena, que me recibió en su casa cuando llegué a estudiar a Santiago y a mi primo Manuel Eduardo, por compartir tanto conmigo, tanto cuando éramos niños como ahora.

A los amigos y compañeros que he tenido durante todo este tiempo. Especialmente Camila, porque a pesar de no poder juntarnos tanto, cuando lo hacemos seguimos siendo igual que hace tanto tiempo. También de forma muy especial a los que he hecho acá en la universidad, especialmente a Ariel, Morgan, Bárbara, Felipe, Rodrigo, Dani, Juanjo, Jessy y Flaca, con quienes he pasado los mejores momentos de mi vida universitaria y seguiremos pasándolo bien luego más adelante.

A toda la gente con la que trabajé en el Laboratorio de Biotecnología: Rocío, Christian, Darlyng, don Luis, Pabla y ahora Valeria, Jorge Guerra, Jorge Osman y Franco, quienes hicieron que me sintiera como en casa trabajando en el laboratorio, con las bromas que hacíamos, especialmente cuando algo no salía bien en el laboratorio.

Finalmente, quiero agradecer al profesor Davor, que desde que me recibió en su laboratorio, primero haciendo una unidad de investigación, me ha enseñado a trabajar de forma sistemática, a buscar todas las posibilidades para los resultados obtenidos y verlos desde un punto de vista positivo y guiarme durante todo el desarrollo de esta tesis. A la comisión de evaluación, por sus críticas, siempre constructivas y consejos, que contribuyeron al desarrollo de esta tesis.

Esta tesis fue financiada por el proyecto FONDEF IDEA: CA 13I10019.

## RESUMEN

La aparición de filtraciones en la base impermeable de los tranques de relaves, por un mal manejo del tranque o movimientos sísmicos que afecten la distribución del material impermeable, presenta un potencial impacto medioambiental importante.

Los relaves presentan una alta concentración de sulfato, que tiene diversos efectos en el medio ambiente en el caso de la ocurrencia de filtraciones que puedan contaminar aguas subterráneas, como la producción de ácido sulfhídrico y la eutroficación, debido a la actividad de bacterias reductoras de sulfato. En el caso del consumo humano, tiene un efecto laxante, provocando diarrea y deshidratación, la que puede ser grave en el caso de niños y adultos mayores.

Se han propuesto distintas alternativas para sellar filtraciones en tranques de relave, tales como inyecciones de soluciones de cemento o polímeros. Sin embargo, ellas presentan distintas dificultades, como la posibilidad de contaminar aguas subterráneas con parte de estas soluciones y la dificultad de acceder al lugar exacto de la filtración. Por esto en esta tesis se ha propuesto la utilización de un proceso de organomineralización para producir colmatación del medio poroso, deteniendo el avance de las aguas contaminadas en zonas posteriores al muro de contención del tranque. En este sentido, una posibilidad interesante es la utilización de bacterias reductoras de sulfato para provocar organomineralización, aprovechando su capacidad de tener actividad en condiciones anaeróbicas, facilitar la organomineralización y provocar la disminución de los niveles de sulfato de las aguas contaminadas.

En esta tesis se escaló, en dos etapas, un proceso de organomineralización mediante el uso de bacterias reductoras de sulfato estudiado previamente en el Laboratorio de Biotecnología, a partir de columnas de 9 cm de alto y 2,5 cm de diámetro, a mayor escala. Primero, a una columna exploratoria de 1,10 m de alto y 11 cm de diámetro y, posteriormente, a columnas definitivas de 1,40 m de alto y 25 cm de diámetro, las que se rellenaron con arena de cuarzo. La columna exploratoria y una columna definitiva (columna L.S.) se inocularon con un consorcio de bacterias reductoras de sulfato y fueron alimentadas con medio de cultivo, además se trabajó con una columna alimentada solo con agua de la estación de monitoreo del tranque de relaves (columna control sin biocida) y una

columna con presencia de sulfato de cadmio, para evitar la actividad microbiana (columna control con biocida). Durante su funcionamiento, se determinó el consumo de sulfato, disminución de DQO y la generación de H<sub>2</sub>S para verificar el estado del metabolismo reductor de sulfato y la reducción de la conductividad hidráulica, para estudiar el proceso de colmatación, comparando con los controles. Posteriormente, se tomaron muestras desde el interior de las columnas para verificar la presencia de carbonato de calcio.

Durante el funcionamiento de la columna exploratoria se observó desarrollo de metabolismo reductor de sulfato, evidenciado por el consumo de sulfato, producción de ácido sulfhídrico y disminución del potencial de óxido-reducción. Sin embargo, el pH no alcanzó niveles óptimos para la organomineralización y los piezómetros utilizados no permitieron analizar el proceso de colmatación.

En el transcurso del funcionamiento de las columnas definitivas se observó desarrollo del metabolismo reductor del sulfato en la columna inoculada con microorganismos (columna L.S.), en relación a los controles, así como una mayor abundancia relativa de OTUs asociados a bacterias con este metabolismo. Si bien el pH obtenido no alcanzó niveles óptimos para la organomineralización, se observó el doble de colmatación en la columna L.S. y en el control sin biocida, no observándose esto en la columna control con biocida.

En cuanto a la precipitación de carbonato de calcio al interior de las columnas, se encontró tanto en la columna L.S. como en el control sin biocida en pequeñas cantidades, siendo el mineral en el primer caso identificado como calcita.

Como conclusión, se pudo escalar el proceso de organomineralización y biocolmatación mediante el uso de bacterias reductoras de sulfato, la colmatación observada pudo ser causada por la precipitación de carbonato de calcio, acumulación de biomasa o una combinación de ambos procesos.

## ABSTRACT

The occurrence of leaks in the impermeable base of tailing dams, caused by misoperation of the dam or seismic movements, represents an important potential environmental impact. Tailings have a high sulfate concentration, which has diverse effects on the environment in the occurrence of leaks that pollute underground water, like sulfide acid production and eutrophication, through sulfate reducing bacteria activity. Sulfate has a laxative effect, causing diarrhea and dehydration in the case of human consumption, which can be severe in children and elderly.

Because of technical issues to stop leaks in structures like tailing dams, like the chance of water contamination with polymers and cement and the difficulty to access the exact spot of the leaking, the use of an organomineralization process to provoke the clogging of the porous medium has been proposed. This process may stop the advance of polluted waters in zones after the tailings dam contention wall. In this sense, the use of sulfate-reducing bacteria to cause organomineralization is an interesting possibility, taking advantage of their ability to be active in anaerobic conditions, to help the organomineralization process and diminish the sulfate levels in contaminated waters.

In this thesis, an organomineralization process through the use of sulfate-reducing bacteria, previously studied in the Laboratorio de Biotecnología, was upscaled, in two phases, from 9 cm high and 2,5 cm diameter columns to a higher scale. First, to a 1,10 m high and 11 cm diameter experimental column and, later, to 1,40 m high and 25 cm diameter definitive columns, all of which were packed with quartz sand. These columns were inoculated with a sulfate-reducing bacteria consortium and fed with culture media, in the exploratory column and one definite column ("column L.S."), besides a column with the presence of the bacteria present in the tailings dam monitoring station water (control column without biocide) and one column with cadmium sulfate as biocide to avoid microbial activity (control column with biocide). During their operation, sulfate consumption, oxygen chemical demand decrease and  $H_2S$  was monitored to verify the state of the sulfate-reducing metabolism and decrease in hydraulic conductivity to study the clogging process, comparing with the controls. Later, samples from the interior of the columns were taken in order to verify the presence of calcium carbonate.

During the operation of the exploratory column development of the sulfate-reducing metabolism was observed, evidenced by sulfate consumption, sulfide acid production and oxidoreduction potential decrease. Nevertheless, pH did not reach optimal levels for organomineralization and the instrument used did not allow to analyze the clogging process.

During the operation of the definitive columns, better development of the sulfate-reducing metabolism in the microorganism inoculated column (column L.S.) was observed in relation to the controls, as well as a higher relative abundance of sulfate-reducing bacteria associated OTUs. Even though the pH levels obtained, in the "column L.S." and control column without biocide, were not optimal for organomineralization, the clogging observed was twice as much as in the column without microbial activity.

In regards to the calcium carbonate precipitation in the columns, the mineral was found in both the column L.S. and the control without a biocide in low amounts, being the mineral identified as calcite in the first case.

To conclude, the organomineralization and bioclogging process through the use of sulfate-reducing bacteria could be scaled, the clogging observed could be caused by the precipitation of calcium carbonate, biomass accumulation or a combination of both processes.

## ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>III</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE</b>	<b>VIII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>XI</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>XIII</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>XIV</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Filtraciones en estructuras de construcción</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Construcción de tranques de relave</b>	<b>1</b>
<b>1.3 Contaminación por sulfato</b>	<b>3</b>
<b>1.4 Biocolmatación y disminución de conductividad hidráulica.</b>	<b>4</b>
<b>1.5 Organomineralización</b>	<b>7</b>
<b>1.6 Bacterias inductoras de la precipitación de CaCO<sub>3</sub></b>	<b>8</b>
1.6.1. Bacterias ureolíticas	8
1.6.1. Bacterias reductoras de sulfato	9
<b>1.7 Microbialitos.</b>	<b>10</b>
<b>1.8 Investigación en Laboratorio de Biotecnología y propuesta de investigación</b>	<b>12</b>
<b>2. HIPÓTESIS</b>	<b>14</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>14</b>
<b>3.1. Objetivo General</b>	<b>14</b>
<b>3.2. Objetivos específicos</b>	<b>14</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>15</b>
<b>4.1 Materiales</b>	<b>15</b>
4.1.1 Equipos:	15
4.1.2 Reactivos y Fuente de carbono:	15
<b>4.2 Métodos</b>	<b>16</b>
4.2.1. Selección de inóculo.	16
4.2.2. Análisis de metagenómica de la región hiper-variable del rRNA 16 S microbiano de muestras de efluente de las columnas.	16



4.2.3. Construcción de las columnas.	18
4.2.4. Preparación de las columnas.	19
4.2.5. Medio de cultivo.	21
4.2.6. Obtención de agua de barrera hidráulica de tranque de relave minero.	22
4.2.7. Inoculación de las columnas.	22
4.2.8. Funcionamiento de las columnas.	22
4.2.9. Medición de pH.	23
4.2.10. Medición de potencial de óxido-reducción.	23
4.2.11. Medición de sulfato.	23
4.2.12. Medición de ácido sulfhídrico.	24
4.2.13. Medición de demanda química de oxígeno (DQO).	24
4.2.14. Recuento de Microorganismos.	25
4.2.15. Medición de calcio.	25
4.2.16. Medición de actividad microbiana.	26
4.2.17. Medición de conductividad hidráulica.	26
4.2.18. Cálculo de volumen de poro.	27
4.2.19. Determinación de carbonato de calcio en la arena.	28
4.2.20. Difracción de rayos X.	28
4.2.21. Análisis Estadístico.	28
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>29</b>
<b>5.1. Evaluación de parámetros de operación relacionados con la organomineralización en la columna exploratoria</b>	<b>29</b>
5.1.1. Evaluación de parámetros de operación en una columna exploratoria.	29
5.1.1.1. Monitoreo de parámetros metabólicos.	30
5.1.1.2. Monitoreo de parámetros hidráulicos.	36
5.1.1.3. Cambios en el medio de cultivo.	36
<b>5.2. Estudio del proceso de organomineralización en columnas escaladas de 140 centímetros de alto, aplicando parámetros evaluados en el objetivo 1.</b>	<b>37</b>
5.2.1. Escalamiento del proceso de organomineralización a columnas de 140 centímetros de alto.	37
5.2.1.1. Monitoreo de parámetros metabólicos de la columna L.S.	38

5.2.1.2. Monitoreo de parámetros metabólicos de la columna control sin biocida.	43
5.2.1.3 Monitoreo de parámetros metabólicos de la columna control con biocida.	48
5.2.1.4 Comparación de los parámetros metabólicos medidos entre las tres columnas.	52
5.2.2. Monitoreo de parámetros hidráulicos:	54
5.2.3. Mediciones realizadas durante el desarme de las columnas	57
5.2.4. Análisis de metagenómica de la región hiper-variable del rRNA 16 S microbiano de muestras de efluente de las columnas.	60
<b>5.3. Determinación de organomineralización en distintos niveles de las columnas.</b>	<b>67</b>
5.3.1. Determinación de carbonato de calcio en la arena de las columnas.	67
5.3.2. Determinación de la forma de precipitación del CaCO <sub>3</sub> .	69
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>72</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>84</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>86</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de un tranque de relaves.	3
<b>Figura 2.</b> Niveles de descarga desde las zonas de filtraciones en la represa de Greifenstein, Austria.	7
<b>Figura 3.</b> Imagen de lago Sarmiento.	11
<b>Figura 4.</b> Fotografía de la columna experimental y una columna definitiva.	19
<b>Figura 5.</b> Velocidad de alimentación, sulfato y ácido sulfhídrico en la columna exploratoria.	31
<b>Figura 6.</b> pH y potencial de óxido-reducción en la columna experimental.	32
<b>Figura 7.</b> DQO y recuento de MO en la columna experimental.	34
<b>Figura 8.</b> Calcio en la columna exploratoria.	35
<b>Figura 9.</b> Sulfato y ácido sulfhídrico en la columna L.S.	39
<b>Figura 10.</b> pH y potencial de óxido-reducción en la columna L.S.	40
<b>Figura 11.</b> DQO y actividad microbiana en la columna L.S.	41
<b>Figura 12.</b> Comparación de parámetros asociados al ácido sulfhídrico en la columna L.S.	42
<b>Figura 13.</b> Calcio y recuento de MO en la columna L.S.	43
<b>Figura 14.</b> Sulfato y ácido sulfhídrico en la columna control sin biocida.	44
<b>Figura 15.</b> pH y potencial de óxido-reducción en la columna control sin biocida.	45
<b>Figura 16.</b> DQO y actividad microbiana en la columna control sin biocida.	46
<b>Figura 17.</b> Calcio y recuento de MO en la columna control sin biocida.	47
<b>Figura 18.</b> Sulfato y ácido sulfhídrico en la columna control con biocida.	49
<b>Figura 19.</b> pH y potencial de óxido-reducción en la columna control con biocida.	49
<b>Figura 20.</b> DQO y actividad microbiana en la columna control con biocida.	50
<b>Figura 21.</b> Calcio y recuento de MO en la columna control con biocida.	51
<b>Figura 22.</b> Comparación del ácido sulfhídrico en las columnas definitivas.	52
<b>Figura 23.</b> Comparación del sulfato en las columnas definitivas.	53
<b>Figura 24.</b> Comparación del calcio en las columnas definitivas.	53
<b>Figura 25.</b> Volumen de poro.	55
<b>Figura 26.</b> Distribución por clase de distintos OTUs microbianos obtenidos del análisis de la región hiper-variable V4 del rRNA 16 S bacteriano.	62

<b>Figura 27.</b> Distribución por clase de distintos OTUs microbianos obtenidos del análisis de la región hiper-variable V4 del rRNA 16 S bacteriano, de una muestra provenientes efluente de la columna control sin biocida.	67
<b>Figura 28.</b> Espectro de difracción de rayos X de una muestra de arena de la columna L.S.	71
<b>Figura 29.</b> Espectro de difracción de rayos X de una muestra de arena de cuarzo estéril.	71
<b>Figura 30.</b> Espectro de difracción de rayos X de una muestra de arena de la columna control sin biocida.	72
<b>Figura 31.</b> Modelo del metabolismo reductor de sulfato esperado y observado durante los experimentos.	80

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Caracterización de la arena utilizada en el empaque de las columnas usadas en las columnas definitivas.	20
<b>Tabla 2.</b> Concentraciones de compuestos del medio de cultivo.	21
<b>Tabla 3.</b> Resumen de los ajustes realizados al medio de cultivo T.R.	37
<b>Tabla 4.</b> Conductividad hidráulica en columnas definitivas.	56
<b>Tabla 5.</b> Mediciones durante el desarme de las columnas.	59
<b>Tabla 6.</b> Abundancia de OTUs microbianos de interés.	65
<b>Tabla 7.</b> Porcentaje de carbonato de calcio encontrado en las distintas muestras.	68

## **ABREVIATURAS**

**BRS:** Bacterias Reductoras de Sulfato.

**DQO:** Demanda Química de Oxígeno.

**EPS:** Exopolisacáridos.

**L. S.:** Lago Sarmiento.

**MO:** Microorganismos.

**OTU:** Unidad Taxonómica Operativa (del inglés “Operative Taxonomic Unit”).

**PVC:** Policloruro de Vinilo.

**URL:** Unidades Relativas de Luz.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Filtraciones en estructuras de construcción**

La aparición de filtraciones es uno de los mayores desafíos de la ingeniería, especialmente en estructuras como represas, diques y obras subterráneas. El transporte de aguas subterráneas a través de suelos puede provocar la erosión del terreno donde estas obras se encuentren, poniendo en riesgo la estabilidad de las estructuras construidas sobre este. Por otra parte, también es un grave problema en sistemas de contención de compuestos contaminantes, permitiendo el movimiento (mediante lixiviación y percolación) de éstos a través de suelos, con el potencial de contaminar fuentes de agua cercanas (Liao *et al.*, 2007; Barkouki *et al.*, 2011).

Actualmente las técnicas utilizadas para reparar filtraciones consisten principalmente en recubrimientos con distintos compuestos, como planchas metálicas y mezclas de cemento o polímeros (Liao *et al.*, 2007). Estas opciones presentan diversas desventajas, como la necesidad de determinar el punto exacto de la filtración, su dificultad de aplicación y el elevado costo. Los tratamientos con compuestos sintéticos, presentan el riesgo de que parte de estos sean captados por el agua, contribuyendo a la contaminación de este recurso (Liao *et al.*, 2007; Barkouki *et al.*, 2011; Karol, 2003). Ejemplo de lo anterior es lo sucedido en Japón, en el año 1974, donde la inyección de acrilamidas en un terreno cercano a un pozo causó la contaminación del agua, lo que culminó con la prohibición del uso del producto en dicho país (Karol, 2003). Experiencias como esta motivan la búsqueda de nuevas soluciones a estos problemas, donde la biotecnología puede jugar un papel fundamental.

### **1.2 Construcción de tranques de relave**

Una de las formas en que la biotecnología puede aportar a encontrar una solución es en la prevención de contaminación de aguas derivada de la actividad minera.

Durante el proceso de extracción, específicamente posterior al proceso de flotación, el resto de los materiales encontrados en el yacimiento, tales como la ganga, y los que son agregados durante el proceso de extracción, denominados en su conjunto relaves, deben ser tratados. En este proceso se retiran la mayor cantidad de compuestos potencialmente contaminantes, así como ajustar su pH, para posteriormente ser depositado en tranques de relaves (Tchernitchin & Herrera, 2006).

El relave depositado en los tranques comienza a separarse con el paso del tiempo entre el material sólido, que precipita, y el agua con el que se transportó el sólido, denominado aguas claras. Las aguas claras presentan, entre otros compuestos contaminantes, altas concentraciones de sulfato (Dold, 2014).

Los tranques de relaves son estructuras diseñadas y construidas para contener los relaves y así evitar la contaminación del medio ambiente (Figura 1). Estos son diseñados para cumplir su función frente a distintos factores que pueden modificar la composición del material depositado, tales como lluvias y el viento (Decreto n° 248, 2007; Ramírez, 2007). Con todo lo mencionado aún existe el riesgo, principalmente por fenómenos naturales, de que aparezcan filtraciones por las que compuestos del relave sean transportados hacia ríos o aguas subterráneas (Tchernitchin & Herrera, 2006).

Como una forma de monitorear la aparición de filtraciones en la base de los tranques de relaves, y evitar que las aguas contaminadas alcancen aguas subterráneas, se puede optar por la construcción de una barrera hidráulica entre el muro del tranque y las fuentes de agua cercanas. La barrera hidráulica consiste en un sistema de pozos donde se puede realizar un seguimiento a la calidad del agua que es transportada a fuentes de agua potable. En el caso de que se detecten concentraciones elevadas de algún compuesto contaminante debido a una filtración en la base del tranque, se puede bombear agua desde la barrera hidráulica hasta el interior del tranque, evitando la contaminación de los acuíferos (Gestión Ambiental Consultores S.A., 2011).





**Figura 1.** Esquema de un tranque de relaves. Los relaves son transportados mediante cañerías hacia la cubeta, con el paso del tiempo los sólidos sedimentan, formando una playa y una piscina de aguas claras (SERNAGEOMIN, 2003).

### 1.3 Contaminación por sulfato

Los sulfatos son compuestos ampliamente distribuidos en la naturaleza, en el caso del agua, se encuentran en esta de forma natural por la disolución de distintas sales que pueden estar presentes en la tierra (WHO, 2003). En altas concentraciones, principalmente debido a la actividad humana el sulfato puede tener diversos efectos sobre la salud humana y el medio ambiente, esto es de vital importancia en la contaminación de aguas, ya que estas pueden transportar al contaminante por grandes distancias (WHO, 2003). Es por esto que es necesario prevenir la contaminación de aguas por sulfato, en específico la proveniente desde la actividad minera, la principal fuente de contaminación por sulfato.

El exceso de sulfato en aguas que están en contacto con el suelo están asociados a la contaminación por producción de ácido sulfhídrico debido a la actividad de bacterias reductoras de sulfato y a eutroficación, debido a la liberación de fosfatos a partir de materia orgánica del suelo que metabolizan las bacterias reductoras de sulfato (Lamers *et al.*, 2001; Soucek *et al.*, 2005; Baldwin & Mitchell, 2012). Se ha observado que altos niveles de sulfato son capaces de modificar el metabolismo de plantas en humedales; en sistemas con pocos nutrientes la producción de ácido sulfhídrico produce la mortalidad de especies

vegetales, mientras que en sistemas con altos niveles de nutrientes se observa eutroficación, la que produce un aumento en la vegetación, la que agota los nutrientes (Geurts *et al.*, 2009).

Por otra parte, se ha observado toxicidad de altos niveles de sulfato en distintas especies de invertebrados, variando la dosis letal del compuesto dependiendo de la presencia de distintos iones (magnesio, calcio, cloruro) en el agua. Se observó un aumento en la resistencia a la toxicidad causada por sulfato en presencia de estos iones por separado, debido a la utilización de estos por parte del invertebrado para su osmoregulación (Soucek *et al.*, 2005).

En humanos, el consumo de aguas contaminadas con altas concentraciones de sulfato tiene un efecto laxante, en ocasiones llegando a la diarrea y deshidratación (WHO, 2003). Se ha descrito que sobre los 250 mg/L de sulfato el agua posee un sabor desagradable, a partir de 750 mg/L se comienzan a sentir efectos laxantes, especialmente sobre los 1000 mg/L (WHO, 2003). Si bien estos datos se dan principalmente en adultos, en recién nacidos comienzan a observarse efectos a partir de los 650 mg/L de sulfato (WHO, 2003). Finalmente, la OMS recomienda un máximo de 500 mg/L de sulfato para el agua potable, el cual es el límite establecido por la normativa chilena (NCh 409/1).

#### **1.4 Biocolmatación y disminución de conductividad hidráulica.**

La acumulación de sólidos en los poros de un material, en este caso el suelo, mediante la actividad de microorganismos se denomina biocolmatación. Este proceso, al disminuir el tamaño de los poros del medio, puede provocar la disminución de la conductividad hidráulica del suelo, es decir, la capacidad del medio para transportar fluidos a través de éste, (Baveye *et al.*, 1998; Ivanov and Chu, 2008; De Jong *et al.*, 2013).

La biocolmatación es un proceso que no requiere la fabricación de compuestos sintéticos, lo que disminuye la posibilidad de contaminación de acuíferos. Además, existen técnicas que permiten su aplicación sin la necesidad de conocer el sitio exacto de la filtración, ni tener

acceso directo a ésta. Esto último, debido a que un medio de cultivo o un inóculo de bacterias que sea inyectado en la superficie del suelo, puede ser transportado hasta el sitio donde se encuentra la filtración (Baveye *et al.*, 1998; Ivanov and Chu, 2008; De Jong *et al.*, 2013).

Existen diversos mecanismos estudiados por los cuales los microorganismos pueden provocar una disminución en la conductividad hidráulica, entre estos destacan el aumento en el número de bacterias y su acumulación en los poros del suelo, la acumulación de exudados de las bacterias tales como exopolisacáridos (EPS) así como la formación de biopelículas, y la precipitación de minerales inducida por bacterias (Baveye *et al.*, 1998). El primer mecanismo se explica debido a la capacidad de ciertas bacterias para unirse a las superficies de los poros del suelo, donde se dividen formando agregados o microcolonias que ocupen el volumen del poro, modificando su geometría y disminuyendo su diámetro interno (Baveye *et al.*, 1998; Seki, K., 2013).

Existe evidencia que la formación de biopelículas podría causar colmatación mediante dos mecanismos: el aumento en la viscosidad del fluido o la acumulación de éstas en los poros que conducen fluidos a través del suelo, bloqueándolos de forma física (Baveye *et al.*, 1998; Vandevivere, P. and Baveye P., 1992a; Vandevivere, P. and Baveye P., 1992b). Cunningham *et al.* (1991) utilizando partículas de suelo de distinto diámetro y cultivos de *P. aeruginosa* determinaron que en condiciones favorables se acumulan biopelículas hasta disminuir la conductividad hidráulica del medio al mismo nivel, independiente del diámetro de las partículas de suelo. Sin embargo, este nivel de colmatación se alcanzaría más rápido en suelos más finos (Cunningham *et al.*, 1991).

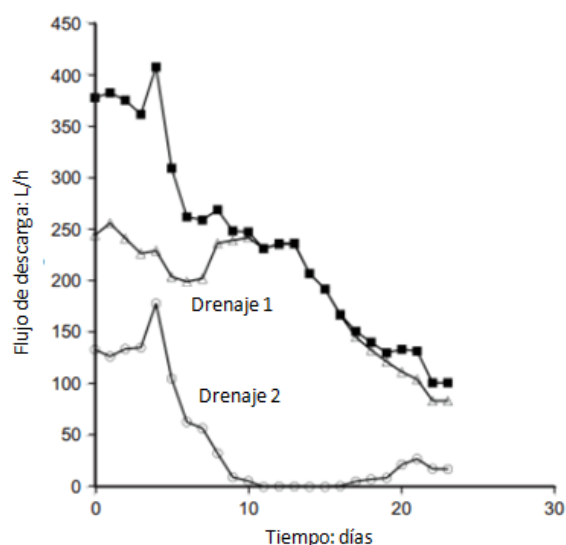
En su investigación, Zhang *et al.* (2011) concluyeron que la colmatación se produjo por la actividad de bacterias. Trabajaron con columnas de PVC de 75 centímetros de alto y 10 centímetros de diámetro, empacadas con muestras de arena provenientes de Beijing, el flujo de fluidos se realizó de forma ascendente, midiendo la presión al interior de éstas a distintos niveles. En una usaron glucosa como fuente de carbono, en la segunda una solución en base a papa molida y la tercera no contó con fuente de carbono, usándose como control.

Observaron que dentro de los nutrientes analizados el almidón de papa, específicamente sus productos de degradación, aportaban de forma considerable a la actividad de las bacterias que producían la biocolmatación, no así la glucosa.

El año 2002, Seki *et al.* investigaron la biocolmatación en columnas empacadas con esferas de vidrio de distinto diámetro, midiendo la presión al interior de la columna usando piezómetros, con los que se determinó la conductividad hidráulica en los distintos niveles de la columna. Se determinó que existió colmatación en la zona más cercana al punto de inyección de medio de cultivo, la que se presentó en tres etapas: un aumento en la colmatación provocada por organismos aeróbicos, una disminución debido a su muerte por agotamiento del oxígeno disponible, y un nuevo aumento debido al desarrollo de bacterias anaeróbicas (Seki *et al.*, 2002).

A partir de las experiencias en el laboratorio se han desarrollado algunas aplicaciones a nivel industrial de esta tecnología.

Una de ellas es BioSealing, un método para reducir filtraciones en represas mediante bioestimulación, promoviendo la acción de bacterias presentes en el suelo a tratar. BioSealing tiene como base dos etapas de inyecciones de medio de cultivo en terrenos cercanos a la fisura de una represa, los nutrientes son transportados a la zona donde se produce la filtración, los que al ser captados por bacterias promoverán su reproducción, provocando colmatación, por un proceso que no se ha dilucidado del todo (Blauw *et al.*, 2010). Este sistema fue probado con éxito en una represa en Greifenstein, Austria, observándose una disminución en los niveles de descarga de agua desde las filtraciones, posterior a la segunda inyección de medio, ilustrado en la Figura 2 (Liao *et al.*, 2007; Blauw *et al.*, 2010; De Jong *et al.*, 2013).



**Figura 2.** Niveles de descarga desde las zonas de filtraciones en la represa de Greifenstein, Austria. Mediciones tomadas luego de la segunda etapa de inyección de medio de cultivo. Los puntos marcados con cuadrados negros indican la suma del flujo de descarga de los dos puntos de drenaje (Modificado de De Jong *et al.*, 2013).

Por otra parte, si bien se han observado procesos de colmatación mediante la formación de biopelículas en el corto plazo, se ha demostrado tanto en experimentos, así como en simulaciones, que las biopelículas pueden desprenderse, perdiéndose el efecto de colmatación alcanzado previamente (Chang *et al.*, 1991; Pintelon *et al.*, 2012). Debido a la necesidad de encontrar un proceso por el que la colmatación producida se consolide en el tiempo, es necesario buscar alternativas.

### 1.5 Organomineralización

La organomineralización, precipitación de minerales inducida por bacterias, es el mecanismo más estudiado en la generación de biocolmatación, así como de otros fenómenos tales como el reforzamiento de suelos (biocementación) o la contención de metales pesados y compuestos radiactivos (Barkouki *et al.*, 2011). Existen experiencias a nivel de laboratorio y a gran escala donde se ha probado la capacidad de biocolmatación causado por bacterias mediante este método, principalmente por la precipitación de

carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ). La precipitación de carbonato de calcio mediada por bacterias puede ser inducida por diversos mecanismos, estando estos relacionados a las bacterias que habitan en el suelo (Baveye *et al.*, 1998). Estos metabolismos modifican el ambiente en el que se encuentre la bacteria, teniendo como principal efecto aumentar el pH del medio. Este aumento en el pH, en presencia de una concentración de calcio adecuada favorece la precipitación de carbonato de calcio, ya sea en forma de calcita u otros minerales (Baveye *et al.*, 1998).

Existe un creciente número de investigaciones en las que se indaga en el uso de estos mecanismos de inducción de la precipitación de carbonato de calcio para la generación de colmatación en suelos. Estas, por lo general, se realizan en columnas de vidrio o algún otro material empacadas con material de suelo, como la arena. Algunas de estas investigaciones se mencionan a continuación.

## **1.6 Bacterias inductoras de la precipitación de $\text{CaCO}_3$**

### 1.6.1. Bacterias ureolíticas

Realizando experimentos en columnas empacadas con arena se determinó que existe una mayor precipitación de  $\text{CaCO}_3$  en la zona más cercana a una filtración simulada en su interior, obstruyendo el paso de agua a través de la columna, lo que se debería a un aumento en la actividad de bacterias capaces de precipitar minerales en zonas próximas al lugar de drenaje (Guo *et al.*, 2013).

En otra investigación, se utilizó un sistema similar al mencionado anteriormente, usando como control una columna donde solo hubo flujo de agua, no de medio de cultivo. Se observó una disminución en la velocidad de salida de efluente sólo en la columna con presencia de medio de cultivo, donde, además, aumentó el número de bacterias, disminuyó el potencial de óxido-reducción, y se observaron depósitos de carbonato de calcio en el material de relleno cercano a la fisura. Además, si bien no se indica de forma explícita que tipo de actividad bacteriana es la que produce la colmatación, se menciona que existe un

aumento de biomasa a medida que se agota el oxígeno del medio, lo que indicaría actividad de bacterias aeróbicas, posiblemente ureolíticas (Guo *et al.*, 2013).

En una aplicación a gran escala de un proceso de organomineralización se utilizó bioaumentación, es decir, añadir microorganismos y nutrientes a un sistema, aumentando la estabilidad de suelos para la construcción de un ducto de gas. Se añadió 200 m<sup>3</sup> de una suspensión de bacterias, más dos inyecciones de 300 - 600 m<sup>3</sup> de medio de cultivo a un volumen de terreno de 1000 m<sup>3</sup> (De Jong *et al.*, 2013). El monitoreo de la precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias se realizó usando resistividad eléctrica, muestreo del suelo tratado y de aguas subterráneas cercanas. El tratamiento se consideró un éxito ya que se logró trabajar en el suelo de gravilla suelta sin inestabilidad (De Jong *et al.*, 2013).

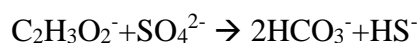
El principal mecanismo estudiado para la producción de biocolmatación, es la precipitación de CaCO<sub>3</sub> inducida por bacterias ureolíticas. En estas bacterias, el metabolismo microbiano contribuye a la alcalinización del medio debido a la formación de iones hidróxido y amonio, como resultado de la hidrólisis de la urea, esto provoca la liberación de iones carbonato por parte de la bacteria, formando carbonato de calcio con el calcio presente en el medio externo (Baveye *et al.*, 1998; Barkouki *et al.*, 2011; De Jong *et al.*, 2013).

En la literatura existe un gran número de trabajos en donde se usan bacterias ureolíticas, principalmente *Sporosarcina pasteurii* (Barkouki *et al.*, 2011; Al-Thawadi, 2011; De Muynck *et al.*, 2010; Achal *et al.*, 2009). El problema surge cuando el año 2012 se determinó que la enzima ureasa de esta bacteria es inactivada en condiciones anaeróbicas, impidiendo la aplicación de un proceso de organomineralización en dichas condiciones (Martin *et al.*, 2012). Esto hace necesario la búsqueda de otros microorganismos que tengan actividad en condiciones anóxicas.

#### 1.6.1. Bacterias reductoras de sulfato

Otras bacterias capaces de inducir la precipitación de carbonato de calcio son las bacterias reductoras de sulfato (BRS). Estas bacterias, a diferencia de las ureolíticas, tienen un

metabolismo anaeróbico. Estos organismos heterótrofos usan el sulfato como aceptor de electrones, lo que les permite oxidar materia orgánica. Como resultado de esta reacción se producirá un desplazamiento de equilibrio de bicarbonato, formando iones carbonato los que son capaces de precipitar en forma de CaCO<sub>3</sub>. Por otra parte, en estas reacciones también se genera ácido sulfhídrico. La formación de este compuesto, a pesar de ser un ácido, favorece la precipitación de minerales ya que fácilmente se puede retirar del sistema, ya sea por su volatilización o la formación de sulfuros metálicos insolubles. La siguiente ecuación de reacción, utilizando acetato como donador de electrones representa este proceso (Baumgartner *et al.*, 2006; Dupraz *et al.*, 2009; Visscher *et al.*, 2000; Gallagher *et al.* 2012):



Dentro de la materia orgánica que puede ser oxidada por las BRS se encuentran compuestos generados por otros organismos mediante fermentación, los que posteriormente son metabolizados por bacterias reductoras de sulfato, formando un motor de alcalinización. El motor de alcalinización puede favorecer la precipitación de calcita. Sin embargo, no todos los compuestos utilizados como dadores de electrones por BRS producen un aumento de pH (Gallagher *et al.*, 2012). Así, compuestos como glicolato, lactato, etanol y glioxalato producen una disminución de este parámetro, ya que su metabolización produce ácidos, no así el acetato y otros (Gallagher *et al.*, 2012; Gallagher *et al.*, 2014).

### **1.7 Microbialitos.**

Si bien existe un alto número de microorganismos capaces de inducir la precipitación de carbonato de calcio, es recomendable utilizar aquellos que posean un metabolismo que les permita realizar este proceso con mayor facilidad y rapidez para el estudio de posibles aplicaciones industriales para la precipitación de carbonato de calcio, por lo que es importante, entre otras cosas, analizar detenidamente el lugar de donde se obtendrán estas bacterias (De Jong *et al.*, 2013).



En ese sentido, nuestro país aparece como un sitio de obtención de microorganismos muy interesante, debido a la gran diversidad de ecosistemas que existen en su territorio. Ejemplo de estos son los salares del norte del país y lagunas con presencias de microbialitos en el sur, ambos con condiciones de salinidad elevadas donde las bacterias que habiten estos lugares deben presentar metabolismos que les permitan sobrevivir en estos lugares (Demergasso *et al.*, 2004; Rasuk *et al.*, 2016).

Los microbialitos son estructuras laminares elevadas, desarrolladas por tres mil millones de años y constituidas por depósitos minerales, como calcita, además de materia orgánica. El mineral se forma debido a la precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias, principalmente cianobacterias y reductoras de sulfato, las que a su vez forman la materia orgánica presente en el microbialito (Reid *et al.*, 2000). En el sur de Chile se encuentran algunos cuerpos de agua que presentan estas estructuras, como Lago Sarmiento (51°03'S 72°45'O) (Figura 3), la que se caracteriza por su alta concentración de sales y elevado pH (Solari, 2011; Airo, 2010), siendo un lugar ideal para la obtención de bacterias con el fin de estudiar fenómenos como la biocolmatación, debido a su capacidad de inducir organomineralización.



**Figura 3.** Imagen de lago Sarmiento. Las estructuras blancas presentes en la playa corresponden a microbialitos (<http://www.sociedadgeologica.cl/trombolitos-peninsula-lago-sarmiento/>).

## **1.8 Investigación en Laboratorio de Biotecnología y propuesta de investigación**

En el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Chile se llevó a cabo un proyecto para enriquecer bacterias capaces de producir biocolmatación del medio. Los microorganismos se obtuvieron desde Lago Sarmiento, ya sea desde una muestra directa de microbialito o un inóculo previamente aislado desde un microbialito, lo que se evaluó en columnas empacadas con arena y en presencia de aguas claras de relave, determinando la viabilidad de las bacterias en estas condiciones, similares a las encontradas al interior de un tranque de relaves. En la tesis titulada "Desarrollo de un método para biocolmatar un medio poroso expuesto a aguas claras de tranque de relave minero", se analizaron diversos parámetros para permitir el enriquecimiento de bacterias que induzcan biocolmatación (Pontigo, 2017).

Si bien ya hay datos sobre cómo los consorcios bacterianos utilizados afectan la permeabilidad en las columnas, la búsqueda de una posible aplicación industrial de esta tecnología requiere realizar estudios a escalas mayores. En relación a lo anterior, se propone usar el inóculo del que se obtuvo una mayor precipitación de carbonato de calcio y disminución en los niveles de sulfato, indicando una alta actividad biomineralizante y de reducción de sulfato, respectivamente, para analizar los parámetros indicados anteriormente en columnas de mayor tamaño. Esto último, con el fin de verificar el funcionamiento del proceso a una escala mayor, avanzando hacia una posible aplicación de éste a nivel industrial.

En esta tesis se propuso escalar el proceso de biocolmatación y organomineralización, inducido por bacterias reductoras de sulfato, en presencia de aguas claras del tranque de relaves Ovejería de CODELCO, obtenidas desde pozos de estaciones de monitoreo del tranque de relave. Primero se construyó una columna exploratoria, la que se empacó con aproximadamente 9000 cm<sup>3</sup> de arena, con la que se realizó un proceso de seguimiento de distintos parámetros metabólicos e hidráulicos.

Posteriormente, se usó la experiencia obtenida durante el funcionamiento de la columna exploratoria para diseñar columnas definitivas, con las que se continuó el desarrollo de los objetivos del proyecto. A continuación, se investigó los parámetros en tres columnas, realizando mediciones del efluente de las columnas para monitorear el desarrollo del metabolismo reductor de sulfato al interior de éstas. Además, se realizó mediciones de conductividad hidráulica para estudiar el proceso de colmatación y, una vez desarmadas las columnas, se determinó la presencia de carbonato de calcio en la arena de relleno de las columnas y su forma de precipitación.

Los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis permiten acercarse a una aplicación a nivel industrial de esta tecnología. Transformándose en una nueva opción para la reparación, completa o parcial, de filtraciones de fluidos a través de suelos.

## **2. HIPÓTESIS**

Es posible escalar un proceso de biocolmatación y organomineralización, producido por un consorcio microbiano que presenta bacterias reductoras de sulfato y expuesto a aguas de la barrera hidráulica de un tranque de relave, a partir de columnas de 10 centímetros de alto hasta columnas de 1,4 metros de alto.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo General**

Escalar, a columnas de 1,4 metros de alto empacadas con material poroso, un proceso de biocolmatación y organomineralización, simulando las condiciones presentes en napas subterráneas cercanas a un tranque de relaves, utilizando un consorcio de bacterias reductoras de sulfato enriquecido en biorreactores.

### **3.2. Objetivos específicos**

- 1.-** Evaluar parámetros de operación relacionados con la organomineralización en una columna exploratoria de 110 centímetros de alto.
- 2.-** Escalar a columnas de 140 centímetros de alto y estudiar el proceso de organomineralización, aplicando los parámetros evaluados en el objetivo 1.
- 3.-** Demostrar organomineralización en distintos niveles de las columnas.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Materiales

#### 4.1.1 Equipos:

- Bombas peristálticas modelo 7557-14, 1-100 rpm, Cole-Palmer Instrument Co., EEUU.
- Microscopio Zeiss Standard 20, Alemania
- Centrífuga Microcentaur MSB010.Cx2,5; Sanyo, Gran Bretaña.
- Baño termoregulado Julabo F-34, Alemania
- pHmetro ThermoScientific modelo OrionStar A211, Orion Research Inc, EEUU.
- Medidor de potencial modelo 59997-60, Cole Palmer, EEUU
- Espectrofotómetro modelo HALO RB-10, Dynamica, Gran Bretaña.
- Espectrofotómetro multiparámetro modelo C99, Hanna Instruments, EEUU.
- Espectrofotómetro de absorción atómica modelo 3110, Perkin Elmer, EEUU.
- Luminómetro modelo Lumitester PD-20, Kikkoman, Japón.
- Difractómetro de rayos X Bruker modelo D8 Advance, EEUU.
- Tamizador Erweka AR 400, Alemania (Tamices cumplen con estándar de EEUU)
- Molino Retich GmbH tipo SR-2, Alemania
- Transmisores de presión de diafragma rasante modelo C9000156, Veto, Chile
- Equipo de difracción de rayos X D8 Advance, Bruker, Alemania

#### 4.1.2 Reactivos y Fuente de carbono:

- De Merck, Alemania, se obtuvo:  $K_2SO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $NaHCO_3$ ,  $NH_4Cl$ , Citrato de sodio ( $HOC(COONa)(CH_2COONa)_2$ ),  $KH_2PO_4$ , Ácido tioglicólico ( $HSCH_2COOH$ ),  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ,  $(NH_2)_2HPO_4$ ,  $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ ,  $NaSO_4$ ,  $3CdSO_4 \cdot 8H_2O$ .
- De Sigma-Aldrich, EEUU, se obtuvo:  $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $KOH$ ,  $HClO_4$ , N,N-dimetil-1,4-fenildiamino oxalato,  $Na_2S$ .

- De Winkler, Santiago de Chile, se obtuvo:  $\text{Na}_2(\text{SiO}_3)$ , Acetato de sodio ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ),  $\text{FeSO}_4 \bullet 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{SrCl} \bullet 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HCl}$ .
- De MoBio, EEUU, se obtuvo el kit para extracción de ADN, DNeasy PowerSoil.
- De Becton, Dickinson and Company, EEUU, se obtuvo: Extracto de levadura "Bacto".
- El kit comercial Lixkit™ fue donado por la empresa Biohídrica, Santiago, Chile.

## 4.2 Métodos

### 4.2.1. Selección de inóculo.

Para el funcionamiento de las columnas del objetivo 1 y el objetivo 2 se utilizó como inóculo un efluente proveniente de una columna pequeña en funcionamiento en el Laboratorio de Biotecnología, la que a su vez fue inoculada con una muestra directa de microbialito proveniente de Lago Sarmiento ( $51^{\circ}03'S, 72^{\circ}45'O$ ), Parque Nacional Torres del Paine, Región de Magallanes y Antártica Chilena.

### 4.2.2. Análisis de metagenómica de la región hiper-variable del rRNA 16 S microbiano de muestras de efluente de las columnas.

Se agregó 6 mL de muestra proveniente del efluente de una columna, en 6 tubos Eppendorf de 1,5 mL (1 ml por tubo), los cuáles se centrifugaron a 11.600 g por 3 minutos. Luego, se descartó el sobrenadante de los tubos y se agregó 1 mL de efluente a cada uno, repitiendo el procedimiento tres veces. Posteriormente, los tubos con el pellet y 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante fueron almacenados para su mantención a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

El DNA total se extrajo utilizando el kit DNeasy Power Soil Kit de la empresa MoBio, siguiendo el protocolo indicado en el kit. De forma general, las muestras se añaden a un tubo con esferas para su homogenización, se realiza lisis celular por métodos químicos y

físicos, el DNA genómico total se captura en una membrana de gel de sílice y posteriormente este se lava y eluye de la membrana. Luego de esto el DNA está listo para realizar la PCR.

El DNA genómico extraído previamente se envió al Centro de Genómica y Bioinformática de la Universidad Mayor para secuenciación vía amplificación por PCR de la región V4 del gen rRNA 16S. Los fragmentos del gen rRNA 16S amplificados fueron secuenciados con la plataforma Illumina (Illumina). A través del proceso de secuenciación, se obtuvieron 161,033 de secuencias en formato fastq, las cuáles fueron analizadas por el mismo centro mencionado previamente.

Durante el pre-procesamiento de datos, se efectuó un control de calidad, a través del cual se descartaron aquellas secuencias de calidad <20 bp, largo <150 bp y bases ambiguas (Ns) utilizando la herramienta Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014). El tamaño de las secuencias obtenidas después de esta etapa fue cercano a lo esperado según lo descrito para la región secuenciada, 250 pb aproximadamente.

Posteriormente, el total de secuencias obtenidas fueron separadas de acuerdo al número de muestras ensambladas para secuenciación utilizando Qiime (Caporaso *et al.*, 2010). Después, se realizó una búsqueda y eliminación de secuencias químeras, utilizando la herramienta vsearch, comparándolas con la base de datos Green Genes (Flouri *et al.*, 2016; De Santis *et al.*, 2006).

Para la generación de OTUs (Unidades operacionales taxonómicas) y la asignación de taxonomía se utilizaron Qiime y la base de datos Green Genes (Caporaso *et al.*, 2010; De Santis *et al.*, 2006).

Para terminar, se realizaron análisis de abundancia y diversidad utilizando la herramienta Phylosec (McMurdie & Holmes, 2013).

Los datos obtenidos de este análisis se compararon con datos provenientes de un análisis de metagenómica realizado a una columna pequeña, de 10 cm de alto y 5 cm de diámetro (Pontigo, 2017), desde la cual se obtuvo el efluente con que se inoculó la columna exploratoria y la columna L.S. (Hurtado *et al.*, datos no publicados).

#### 4.2.3. Construcción de las columnas.

Se construyó una columna con tuberías de PVC de 1,10 metros de altura y 11 centímetros de diámetro, con tapas con salidas de estanque en ambos extremos, para el flujo de medio de cultivo. Además, la columna contó con salidas a 30 centímetros, 65 centímetros y 100 centímetros desde la base para las medidas de presión (Figura 4).

Antes del proceso de empaque se construyó un filtro con malla de polipropileno, ubicado en la zona inferior de la columna, así como otro ubicado en un costado de la zona interna de la columna, para evitar el paso de arena a las mangueras de alimentación y de medición de presión. Posteriormente se constató la ausencia de filtraciones en la columna, llenándola con agua destilada, y sellando las filtraciones encontradas con adhesivo para PVC. Esta columna se empleó como columna exploratoria

A continuación, se construyó tres columnas, por parte de la empresa Inoxclarck en acero inoxidable AISI 304, para ser utilizadas en el desarrollo del objetivo 2, las que se llamaron columnas definitivas. Estas columnas tenían 1,40 metros de altura y 25 centímetros de diámetro, con salidas laterales a los 8, 50, 90 y 130 centímetros desde la base para la instalación de instrumentos de medición de presión. Se verificó la ausencia de filtraciones en ambas columnas llenándolas con agua destilada (Figura 4).

Posteriormente, se construyó filtros de malla de PVC y malla de acero inoxidable con poros de 0,3 mm de diámetro para la base de la columna, además de filtros construidos con malla de acero inoxidable ubicados al costado de las columnas, para proteger las salidas de medición de presión.





**Figura 4.** Fotografía de la columna experimental y una columna definitiva. La imagen de la izquierda corresponde a la columna exploratoria y la de la derecha a la columna definitiva. Se observan las conexiones de mangueras transportadoras de medio de cultivo y las mangueras del baño termostático.

#### 4.2.4. Preparación de las columnas.

Se empleó arena de cuarzo como material de empaque para las columnas. Para la columna exploratoria se usó arena de cuarzo 20-35 mallas. Ésta se tamizó obteniéndose una fracción de diámetro mayor a 841 micrómetros, de la que se usó 400 gramos para empacar la base de la columna. Además, se usó arena de cuarzo 35-50 mallas, la que se volvió a tamizar obteniéndose otra fracción entre 500 y 297 micrómetros de diámetro, de la que se usó 8,8 kilogramos para terminar de empacar la columna.

Para las columnas definitivas se usó 70 kilogramos de arena de cuarzo 35-50 mallas, la que no fue tamizada nuevamente para empacar las columnas. Sin embargo, se determinó su

composición pesando una muestra de esta arena, tamizándola y posteriormente pesando la arena que quedaba en cada tamiz, obteniendo el porcentaje en relación al total de la arena. La caracterización muestra en la Tabla 1.

La arena utilizada en todas las columnas se lavó con agua, posteriormente se trató con ácido clorhídrico al 20% para remover carbonatos, se neutralizó mediante lavados con agua destilada y finalmente se secó y esterilizó en un horno Pasteur a 180 °C por dos horas.

**Tabla 1.** Caracterización de la arena utilizada en el empaque de las columnas usadas en las columnas definitivas.

Arena tamizada	
Tamaño de partícula	% arena
> 841 $\mu\text{m}$	19
841-500 $\mu\text{m}$	32
500-297 $\mu\text{m}$	30
297-105 $\mu\text{m}$	9
< 105 $\mu\text{m}$	10

Se empacó todas las columnas llenándolas con agua hasta alcanzar 30 centímetros de altura, para luego agregar la arena de forma uniforme hasta que decantara. Las columnas definitivas se empacaron sobre una malla de acero inoxidable ubicada encima de un lecho de piedras de cuarzo entre 0,64 cm y 2,5 cm de diámetro. Esto último con el fin de evitar el descenso de la arena empacada hacia las mangueras de alimentación.

Una vez que se terminó de agregar la arena a la columna exploratoria se colocó la tapa de la columna y se realizó las conexiones de mangueras usando mangueras Tygon. Luego se enrolló a lo largo de la columnas una manguera conectada a un baño termorregulado y se rodeó la estructura con fieltro asfáltico corrugado como material aislante, con el fin de mantener el interior de las columnas a 18°C. El mismo proceso posteriormente se realizó con las columnas definitivas cuando terminó de funcionar la columna exploratoria, utilizando en este caso parasoles de aluminio como material aislante.

#### 4.2.5. Medio de cultivo.

Se utilizó una versión modificada del medio Postgate C (Postgate, 1984; Ismail *et al.*, 2014). Como solvente se utilizó agua proveniente de la barrera hidráulica de un tranque de relaves, añadiendo solutos hasta alcanzar concentraciones del medio Postgate C, medio que se utilizó previamente en el laboratorio de Biotecnología. Además, también se agregó tioglicolato, compuesto reductor que le otorga al medio de cultivo un potencial de óxido reducción óptimo para el desarrollo de bacterias reductoras de sulfato. Este medio se denominará "Medio T.R." (Traque de Relave), una comparación entre ambos medios se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Concentraciones de compuestos del medio de cultivo. Comparación de las concentraciones de iones presentes en al agua proveniente de un pozo de monitoreo de tranque de relaves, concentración de iones añadidos a esta para formar el medio T.R. y la comparación con el medio Postgate C.

Compuesto	Concentración (mg/L)			
	Medio Postgate C	Agua estación de monitoreo	Añadido	Medio T.R.
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-	217,7	25,43	243,1
Ca <sup>2+</sup>	7,35	302	463,5	765,5
Mg <sup>2+</sup>	23,38	76,6	2,96	79,56
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	2505	1192,3	730,7	1923
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	337,3	n.d.	337,3	337,3
Fe <sup>2+</sup>	1,38	n.d.	2,42	2,42
SiO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	-	-	5,61	5,61
Acetato	4774*	-	1799	1799
Citrato	273,3	-	254,1	254,1
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	272,6	n.d.	27,26	27,26
Extracto de Levadura	1000	-	1000	1000
Tioglicolato	-	-	99,75	99,75

\* Corresponde a lactato

n.d.: No detectado, bajo el límite de detección del método.

Durante el funcionamiento de la columna exploratoria se efectuó modificaciones al medio T.R., las que se observan en la Tabla 3. El medio T.R. resultante se usó para los siguientes experimentos.

#### 4.2.6. Obtención de agua de barrera hidráulica de tranque de relave minero.

Las muestras de agua se obtuvieron desde un pozo de la barrera hidráulica del tranque de relaves Ovejería (33°4S, 70°48W), Región Metropolitana, Chile, perteneciente a la empresa CODELCO División Andina. Se muestreó aproximadamente cada tres meses, realizando un análisis de la composición química del agua cada vez (DICTUC S.A.).

#### 4.2.7. Inoculación de las columnas.

Para la inoculación de la columna experimental se hizo fluir a través de ésta 25 litros de medio T.R., antes de inocular con 5 mL de efluente proveniente de un biorreactor pequeño, el que a su vez fue inoculado con una muestra directa de microbialito de Lago Sarmiento.

Para la inoculación de las columnas definitivas se hizo fluir 50 litros de medio T.R. a través de cada columna de acero inoxidable, posteriormente una de ellas (columna L.S.) se inoculó con 450 mL de efluente proveniente del biorreactor pequeño con el que se inoculó la columna exploratoria. Una segunda columna no fue inoculada, funcionando como un control negativo sin biocida. La tercera columna no fue inoculada y se le agregó 920 mg/L de sulfato de cadmio al medio de cultivo que la alimentó para prevenir el desarrollo microbiano, funcionando como control negativo con biocida.

#### 4.2.8. Funcionamiento de las columnas.

Se hizo circular el medio de cultivo a través de las columnas por medio de un sistema de mangueras Tygon y el uso de bombas peristálticas. Durante los experimentos, se realizó mediciones periódicas de distintos parámetros para monitorear el funcionamiento de las columnas, particularmente en cuanto al metabolismo reductor de sulfato y a la

organomineralización. El monitoreo de la columna experimental (objetivo 1) se realizó durante 128 días, mientras que el monitoreo de las columnas definitivas del objetivo 2 fue de 172 días.

Durante el funcionamiento de las columnas definitivas los datos obtenidos de la columna L.S. fueron comparados con las columnas control, para corroborar que los resultados obtenidos hayan sido causados por el metabolismo de las bacterias con que se inoculó la columna.

#### 4.2.9. Medición de pH.

Se colectó efluente de la columna en un tubo de ensayo, luego se usó un pHmetro, previamente calibrado usando soluciones estándar de pH 2, 4 y 7, para medir el pH del efluente colectado, sumergiendo el bulbo del electrodo en la muestra hasta obtener una lectura estable.

#### 4.2.10. Medición de potencial de óxido-reducción.

Se utilizó un medidor de potencial. Se calibró con una solución estándar de 240 mV durante tres minutos. Para las mediciones se introdujo el bulbo del electrodo en la muestra durante tres minutos.

#### 4.2.11. Medición de sulfato.

Las mediciones se hicieron tomando como base lo indicado en "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" (American Public Health Association, 1998a), cuyo fundamento es la medición de la turbidimetría provocada por la formación de sulfato de bario al reaccionar cloruro de bario ( $\text{CaCl}_2$ ) con el sulfato presente en la muestra.

El protocolo utilizado para las determinaciones es el siguiente: Se tomó 1 mL de efluente el que se centrifugó por 10 minutos a 11.600 g, luego se agregó 300  $\mu\text{L}$  de sobrenadante en

4,7 mL de agua destilada en un tubo de ensayo, posteriormente se agregó al tubo de ensayo 2 g de  $\text{BaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}$ , se agitó durante 30 segundos y se dejó sedimentar por 3 minutos, posteriormente se midió la turbidez a 450 nm en un espectrofotómetro. Antes de realizar la medición de la muestra, se midió un blanco (con el mismo tratamiento mencionado pero sin agregar efluente). La relación entre la turbidez medida y la concentración de sulfato se obtuvo gracias al uso de una curva de calibración previamente preparada usando una solución estándar de sulfato.

#### 4.2.12. Medición de ácido sulfhídrico.

Las mediciones se hicieron tomando como base lo indicado en "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" (American Public Health Association, 1998b), cuyo fundamento es la medición de la absorbancia producida por la formación de azul de metileno al reaccionar el compuesto N,N-dimetil-1,4-fenildiamino oxalato y el sulfuro presente en la muestra.

El protocolo utilizado fue el siguiente: Se colectó 5 mL de efluente, los que se mezclaron con 500  $\mu\text{L}$  de una solución compuesta por N,N-dimetil-1,4-fenildiamino oxalato 0,07 M y 150  $\mu\text{L}$  de cloruroférico 9,2 M. Estos compuestos, junto al ácido sulfhídrico, forman 3,7-bis(dimetilamino)-cloruro defenazationio, también llamado azul de metileno. Después de realizar la mezcla se esperó 5 minutos, permitiendo que ocurra la reacción, y se agregó fosfato ácido de diamonio 3,8 M, el que elimina la coloración amarilla producida por el cloruro férrico. Posteriormente esperó 5 minutos y se midió la absorbancia a 664 nm en un espectrofotómetro, para luego obtener el valor de concentración de ácido sulfhídrico, que se obtiene mediante el uso de una curva de calibración.

#### 4.2.13. Medición de demanda química de oxígeno (DQO).

Se midió la DQO del efluente de las columnas para determinar de forma indirecta el consumo de la fuente de carbono presente en la muestra. Se utilizó el kit comercial HI 93754A-25 LR de Hanna Instruments para mediciones de DQO en mg/L, utilizándose el kit

de bajo rango (3 a 150 mg/L), cuyo fundamento es la medición del cambio de color producido por la reducción del ión dicromato a ión crómico provocada por compuestos oxidables presentes en la muestra.

El protocolo se realizó de acuerdo a las instrucciones del kit, resumidas a continuación: Se colectó 1 mL de efluente y se centrifugó por 10 minutos a 11.600 g, luego se agregó 300  $\mu$ L de sobrenadante en 9,7 mL de agua destilada en un tubo de ensayo, después de agitar se agregó 2 mL de la solución resultante a un tubo con tapa rosca del kit. Posteriormente se realizó una digestión a 150°C por 2 horas, el tubo se dejó enfriar por 20 minutos y se midió el cambio de color en un espectrofotómetro marca Hanna Instruments.

#### 4.2.14. Recuento de Microorganismos.

Se colocaron 160  $\mu$ L de muestra en una cámara de Petroff Hausser (Electron Microscopy Sciences, 2017), la que se llevó a un microscopio de contraste de fases, se contaron los microorganismos en 10 cuadrados de 0,05 mm por lado al azar, obteniendo finalmente el promedio de todos los recuentos, el que se multiplicó por 20 millones para obtener el número de microorganismos en un mL de muestra.

#### 4.2.15. Medición de calcio.

La medición de calcio soluble en el efluente de las columnas se realizó mediante espectrometría de absorción atómica de llama, usando el siguiente protocolo: Se centrifugó 1 mL de efluente por 10 minutos a 11.600 g y 500  $\mu$ L de sobrenadante se diluyó en agua destilada, para situar la determinación dentro del rango medible. De la solución mencionada se tomó 1 mL y se agregó a un tubo de ensayo con 8 mL de agua destilada y 1 mL de una solución de  $\text{Sr}^{+2}$  de 4.000 mg/L con  $\text{HClO}_4$  0,8 N. La determinación de calcio fue realizada por el profesor Jorge Mendoza, en el Laboratorio de Química y Bioquímica de Suelos de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, usando un espectrofotómetro de absorción atómica de llama (American Public Health Association,

1992a; American Public Health Association, 1992b). La concentración en mg/L se obtuvo mediante una curva de calibración del equipo con un rango entre 0,091 mg/L y 5 mg/L.

#### 4.2.16. Medición de actividad microbiana.

Se midió el ATP intracelular de las bacterias presentes en la muestra utilizando un kit de medición de ATP por luminiscencia, basado en la reacción de oxidación de la luciferina, catalizada por la luciferasa con consumo de ATP.

Se utilizó el kit comercial Lixkit™ de Biohídrica, realizando el siguiente protocolo: Se filtró 1 mL de muestra en un filtro con una membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 0,2 µm, concentrando las bacterias de la muestra, luego se inyectó 10 mL de agua destilada estéril dos veces a modo de lavado, posteriormente se colectó las bacterias desde la membrana usando una tórula "LuciPac Pen", la que se sumergió en una solución de lisis bacteriana y luego se mezcló con Luciferina/Luciferasa, obteniéndose una lectura de las Unidades Relativas de Luz (U.R.L) en un luminómetro, debido a la reacción del ATP presente en las bacterias con la enzima. La lectura de U.R.L. es directamente proporcional a la cantidad de microorganismos presentes en la muestra.

En el caso de la actividad microbiana en arena, se obtuvieron muestras de arena de 6 fracciones de la arena al interior de cada columna al momento de su desarme. Se tomó 2 gramos de cada muestra, se agregó 1 mL de solución extractante "LuciPac Pen" y se agitó en un vortex por un minuto, posteriormente la solución resultante se mezcló con Luciferina/Luciferasa. Se obtiene una lectura de las Unidades Relativas de Luz (U.R.L) en un luminómetro y, posterior al secado de las muestras, este valor se divide por el peso seco de la muestra, obteniéndose mediciones de U.R.L/gramo.

#### 4.2.17. Medición de conductividad hidráulica.

La conductividad hidráulica se determinó realizando mediciones de presión en los piezómetros en la columna exploratoria y transmisores de presión en las columnas



definitivas. En la columna exploratoria, las mediciones de presión se hicieron comparando la altura de la columna de agua de los piezómetros ubicados a dos estaciones de medición a lo largo de la columna, mientras que para las columnas definitivas el transmisor de presión entrega lecturas de intensidad de corriente, las que se transformaron en valores de altura de columna de agua.

La conductividad hidráulica se calculó usando la ecuación de Darcy, presentada a continuación (Vandevivere, P. and Baveye P., 1992a):

$$H_{sat} \left( \frac{L}{cm^2} \right) = \frac{Q \left( \frac{L}{min} \right) * L(cm)}{A(cm^2) * \Delta H(cm)}$$

Donde "Hsat" es la conductividad hidráulica de saturación, "Q" es el caudal (velocidad de alimentación de la columna), "L" la distancia entre las estaciones de medición, "A" el área de diámetro de la columna y "ΔH" es la diferencia entre las alturas de las columnas de agua medidas.

Posteriormente, el valor obtenido se normalizó con una medición de Hsat a tiempo cero, con lo que se obtuvo un valor adimensional, siendo ambas mediciones realizadas a la misma velocidad.

#### 4.2.18. Cálculo de volumen de poro.

En una probeta con un determinado volumen de agua se agregó la arena de la misma forma en la que se empacaron las columnas, tomándose los valores del volumen inicial, volumen final y el volumen ocupado por la arena. Se calculó el volumen de poro de acuerdo a la siguiente fórmula (Elliott *et al.*, 2008, Biosand Filters Knowledge Base, 2016):

$$Volumen\ de\ poro\ (\%) = 100 * \frac{Vol.\ Inicial(mL) - (Vol.\ Final - Vol.\ Arena)(mL)}{Vol.\ Arena\ (mL)}$$

Se compararon los resultados de la arena de las columnas luego de su desarme con los de arena estéril antes del empaque de las columnas.

#### 4.2.19. Determinación de carbonato de calcio en la arena.

Para obtener una representación de la precipitación de carbonato de calcio al interior de las columnas durante su funcionamiento, se tomaron 6 muestras de fracciones de arena: en la zona central, cercana al borde de la columna o una mezcla. Estas fueron enviadas al Laboratorio de Química y Bioquímica de suelos, donde se analizaron, previamente lavadas con agua destilada y secadas en un horno a 60°C, mediante titulación ácido base. Las mediciones se hicieron por duplicado y se expresan como porcentaje de carbonato de calcio (Petersen *et al.* 1966).

#### 4.2.20. Difracción de rayos X.

Las muestras de arena fueron molidas en un molino para obtener una muestra con una granulometría óptima para realizar la difracción de rayos X, posteriormente fueron evaluadas usando un equipo de difracción de rayos X, el que funcionó a 40 KV y 30 mA, 0,2 segundos por paso, 3° a 80° de giro y en función de barrido acoplado sin rotación. El espectro de difracción obtenido luego se compara con espectros obtenidos de muestras estándar de calcita (Liu *et al.*, 2007; Vahabi *et al.*, 2015)

#### 4.2.21. Análisis Estadístico.

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphpadPrism v6.0. El análisis de ANOVA de dos vías se utilizó para establecer diferencias significativas entre más de dos grupos utilizando un  $p < 0,05$ .

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Evaluación de parámetros de operación relacionados con la organomineralización en la columna exploratoria**

#### 5.1.1. Evaluación de parámetros de operación en una columna exploratoria.

Inicialmente se recirculó el medio de cultivo con el inóculo, proveniente de la columna pequeña en funcionamiento en el Laboratorio de Biotecnología, al interior de la columna exploratoria rellena con arena por 12 días, para favorecer la adherencia de bacterias al interior de ésta.

La columna se alimentó de forma continua con una velocidad de 230 mL/día de medio de cultivo durante 40 días, luego de lo cual se aumentó la velocidad de alimentación a 920 mL/día de medio de cultivo, lo que se observa en la Figura 5. El aumento de velocidad de alimentación se realizó en respuesta a la aparición de gas al interior de la columna, colmatando su interior de forma tal que no permitió tomar muestras de efluente de ésta, además se observó un aumento considerable de la presión a través de los piezómetros.

La aparición de gas al interior de la columna probablemente ocurrió debido a una brusca disminución en los niveles de sulfato dentro del sistema, provocando un cambio en el metabolismo dominante al interior de la columna, pasando de un metabolismo reductor de sulfato a uno metanogénico. Esto se puede deducir a partir de experiencias similares en columnas pequeñas en el laboratorio durante la realización de una tesis anterior, donde se confirmó que el gas generado en las columnas correspondió a metano (Pontigo, 2017). Para solucionar esto, se realizó un pulso de medio de cultivo de 4,6 L durante 12 horas, lo que permitió arrastrar el gas hacia el exterior de la columna y restaurar los niveles de nutrientes, especialmente de sulfato, al interior de la columna a niveles similares a los del medio de cultivo, mediante dilución.

Posteriormente, la columna siguió alimentándose a 920 mL/día durante 32 días para evitar una nueva disminución en los niveles de sulfato, luego de lo cual, la velocidad de alimentación se disminuyó a 460 mL/día y finalmente, luego de 33 días, la velocidad de alimentación se disminuyó a 262 mL/día, velocidad a la que se alimentó la columna durante 29 días antes del desarme de la columna.

En ambos casos, la disminución de velocidad de alimentación se realizó en respuesta a la disminución en la tasa de reducción de sulfato observada al comparar los niveles de sulfato de efluente con los del medio de cultivo. Esto ocurrió debido al poco tiempo de retención que sufre el medio de cultivo que ingresa al interior de la misma, con 31 días de retención a 230 mL/día y 7,7 días de retención a 920 mL/día, tiempo en el cual no se hizo evidente el consumo de nutrientes, lo que sí ocurrió luego de las disminuciones de velocidad de alimentación, con tiempos de retención de 15,5 y 27 días a 460 mL/día y 262 mL/día, respectivamente.

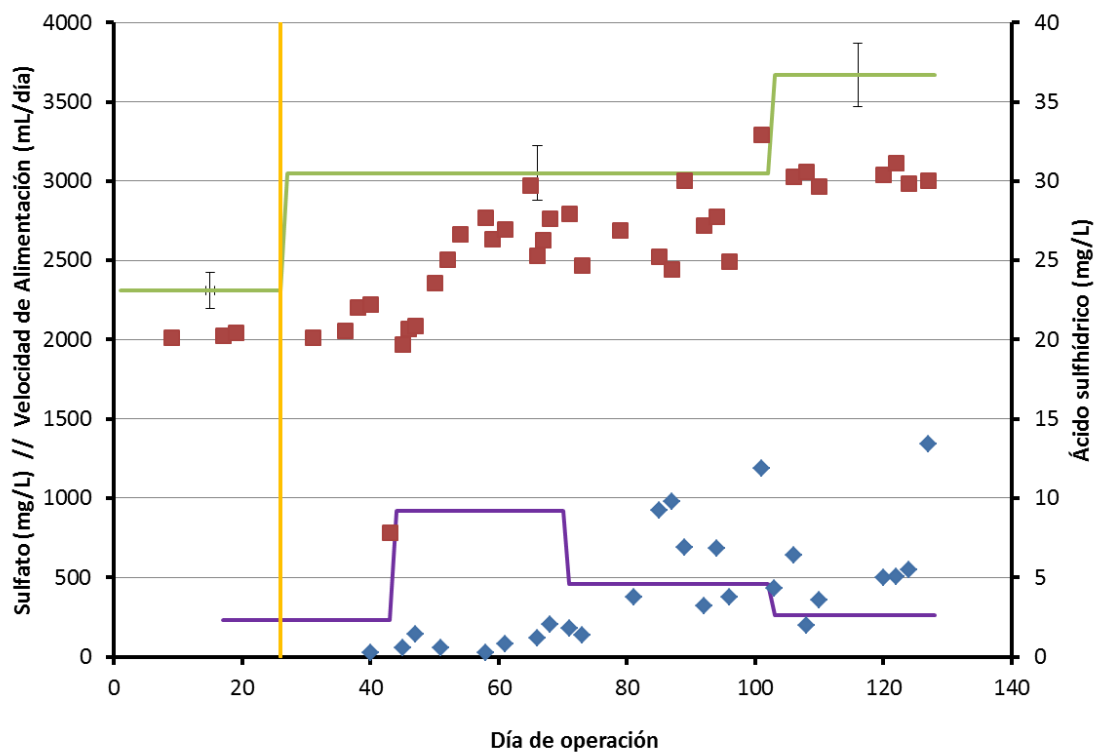
#### 5.1.1.1. Monitoreo de parámetros metabólicos.

Con el fin de evaluar los parámetros de operación de la columna exploratoria y determinar si se estableció un metabolismo reductor de sulfato, se realizaron mediciones periódicas de distintos parámetros metabólicos desde muestras de efluente de la columna.

En cuanto a los niveles de sulfato, de acuerdo a los resultados presentados en la Figura 5, en un inicio no hubo desarrollo considerable de la reducción de sulfato, por lo que se optó por aumentar la concentración de sulfato del medio de cultivo agregando 3.050 mg/L de sulfato, siendo la diferencia observada entre las mediciones desde el efluente y el medio de cultivo causada por el tiempo de retención del medio de cultivo al interior de la columna.

Luego del aumento de velocidad de alimentación, indicado anteriormente y que se muestra en la Figura 5, se equipararon los niveles de sulfato en el efluente con los del medio de cultivo, hasta que se disminuyó la velocidad de alimentación, luego de lo cual se volvió a observar una reducción en los niveles de sulfato del efluente, los que son más evidentes a

partir del día de operación 90, donde se observa un aumento en el sulfato del medio de cultivo y no así en el efluente. Esto último se debe a un aumento en los niveles de sulfato presentes en el agua proveniente de la estación de monitoreo de tranques de relaves, usada para la preparación de medio de cultivo.

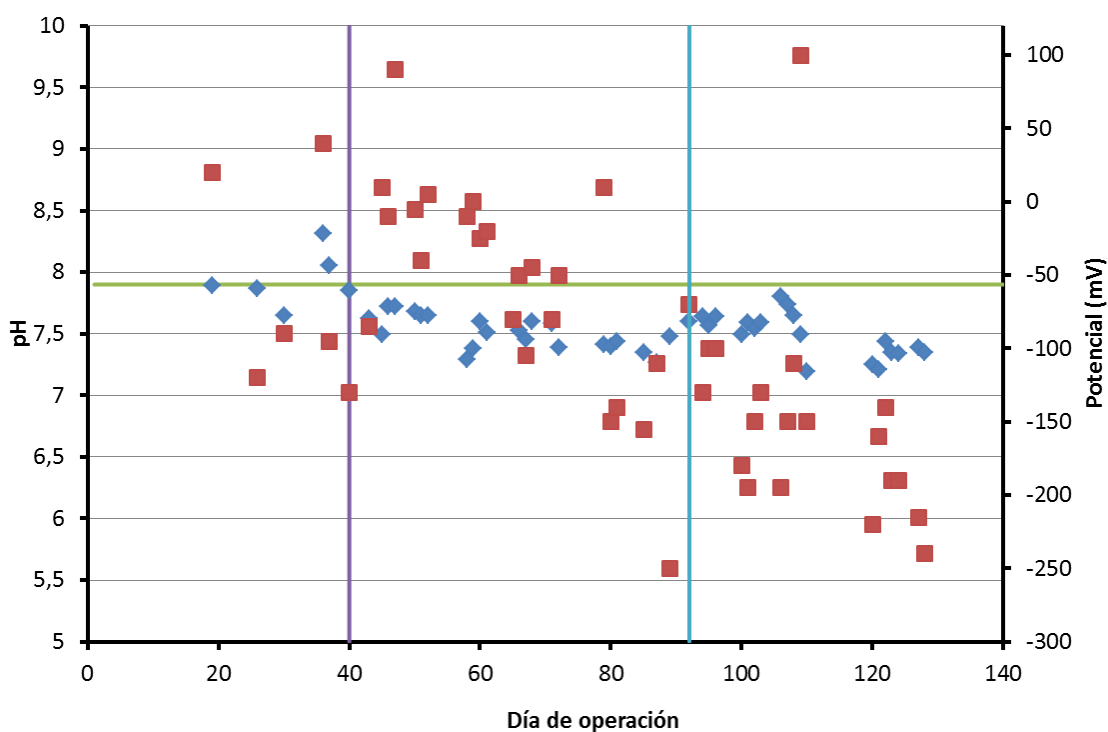


**Figura 5.** Velocidad de alimentación, sulfato y ácido sulfhídrico en la columna exploratoria. Mediciones de sulfato desde el efluente (■) y medio de cultivo (—), mediciones de ácido sulfhídrico (◆) en el efluente y velocidades de alimentación (—) de la columna durante la duración del experimento. La línea vertical amarilla (—) indica el día de operación 24, donde se aumentó la concentración de sulfato en el medio T.R. a 3.050 mg/L.

A partir de este punto, se observa una clara diferencia entre los niveles de sulfato medidos desde el efluente de la columna experimental y los del medio de cultivo, con presencia de agua proveniente de la barrera hidráulica del tranque de relave Ovejería y tioglicolato (medio de cultivo T.R), lo que se puede asociar al establecimiento de un metabolismo reductor de sulfato al interior de la columna.

En relación a los niveles de ácido sulfhídrico producidos, como se puede observar en los resultados presentados en la Figura 5, se encontró un aumento sostenido en el tiempo en los niveles de sulfuros, el que comenzó a aumentar de forma considerable a partir del día de operación 80.

De los resultados presentados en el gráfico, se concluye que existió reducción de sulfato al interior de la columna durante el desarrollo del experimento. Esto, debido a la diferencia entre el sulfato del efluente y el del medio de cultivo y la generación de sulfuros, la que a su vez coincide con el período donde hubo mayor reducción de sulfato.



**Figura 6.** pH y potencial de óxido-reducción en la columna experimental. Mediciones de pH (♦) y potencial de óxido-reducción (■) desde el efluente. La línea vertical celeste (—) indica el día de operación 92, donde la columna comenzó a ser alimentada con medio T.R. sin tioglicolato, la línea vertical morada (—) indica el día de operación 40, donde apareció gas al interior de la columna, mientras la línea horizontal verde (—) indica el pH al que se ajusta el medio de cultivo al finalizar su preparación (7,9).

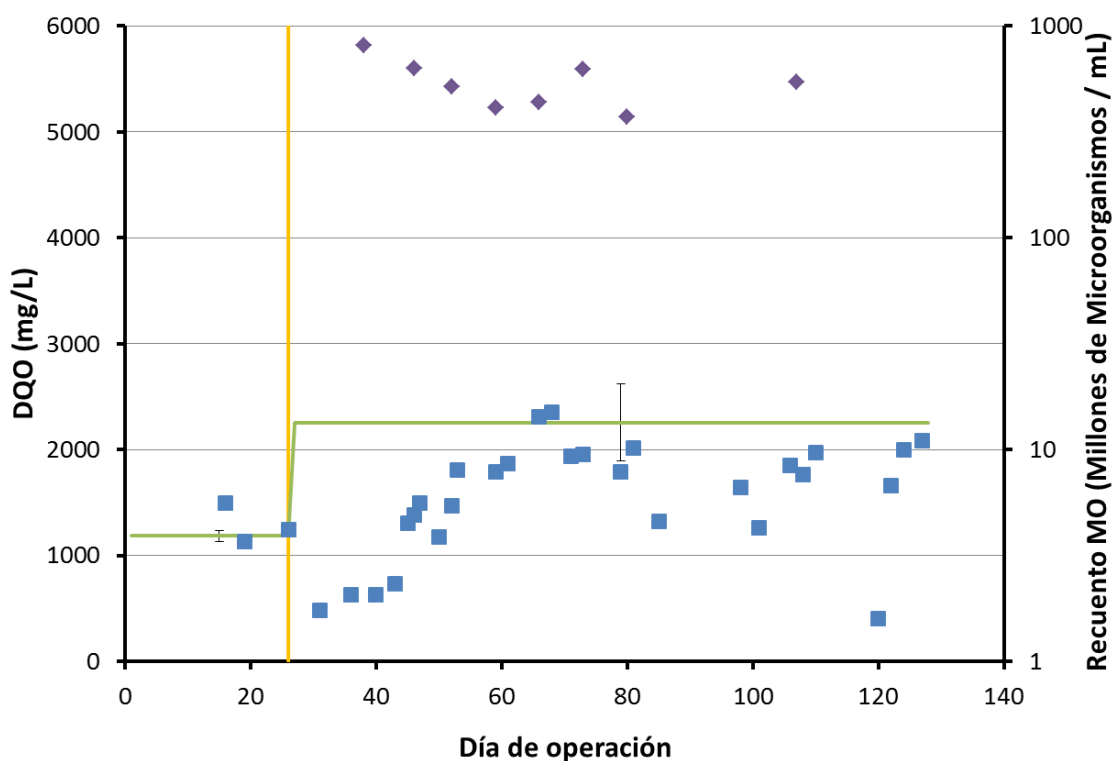
También se realizaron mediciones del pH del efluente de la columna exploratoria, como monitoreo de los procesos que ocurrieron en el interior de la columna durante el experimento, cuyos resultados se pueden ver en la Figura 6. En un inicio ocurrió un aumento en el pH hasta el evento ocurrido el día de operación número 40, donde apareció gas al interior de la columna, luego de lo cual este parámetro se mantuvo bajo pH 8. Este resultado no era conveniente para la mineralización al interior de la columna, ya que este fenómeno se ve favorecido a pH alcalino, por lo que en la realización del próximo objetivo, con las columnas definitivas, se hizo necesario intentar mantener un metabolismo reductor de sulfato dominante.

En la Figura 6 también se muestran los resultados de potencial de óxido-reducción, donde se observa una disminución progresiva en el potencial a lo largo del experimento, coincidiendo con el aumento en el consumo de sulfato. Esto corrobora los resultados mencionados anteriormente que indican el establecimiento del metabolismo reductor de sulfato en la columna exploratoria (Figura 5), dado que este metabolismo se asocia a bajos niveles de potencial (Postgate, 1984).

Además, los niveles de potencial se mantuvieron bajos incluso luego de retirar el tioglicolato del medio de cultivo el día de operación 92, indicando que el ácido sulfhídrico generado al interior de la columna permite mantener el ambiente reductor dentro de la columna. Esto es importante al pensar en una posible aplicación de este proceso a nivel industrial, debido a la reducción de costos que implicaría el retiro de uno de los compuestos químicos del medio de cultivo a utilizar.

También, se midió la demanda química de oxígeno (DQO), como una forma de monitorear el consumo de fuente de carbono al interior de la columna, cuyos resultados se presentan en la Figura 7. Al inicio del cultivo no se notó un gran consumo de sustrato, por lo que se aumentó la concentración de acetato en el medio de cultivo, de 1.799 mg/L a 3.238 mg/L. Luego de esto, los niveles de DQO en el medio de cultivo aumentaron mientras en el efluente se mantuvieron bajos, esto se debió al tiempo de retención del medio de cultivo al interior de la columna mencionado anteriormente. Después del aumento de la velocidad de

alimentación, con la consecuente disminución del tiempo de retención del medio de cultivo en la columna, las mediciones de DQO del medio de cultivo y el efluente se equipararon. Posteriormente, con las disminuciones en la velocidad de alimentación y el aumento del tiempo de retención del medio de cultivo al interior de la columna exploratoria, se hacen más evidentes las diferencias entre la DQO del efluente y el medio de cultivo, entre los días de operación 85 y 100, luego de lo cual vuelven a estabilizarse, indicando un metabolismo activo bacteriano al interior de la columna.

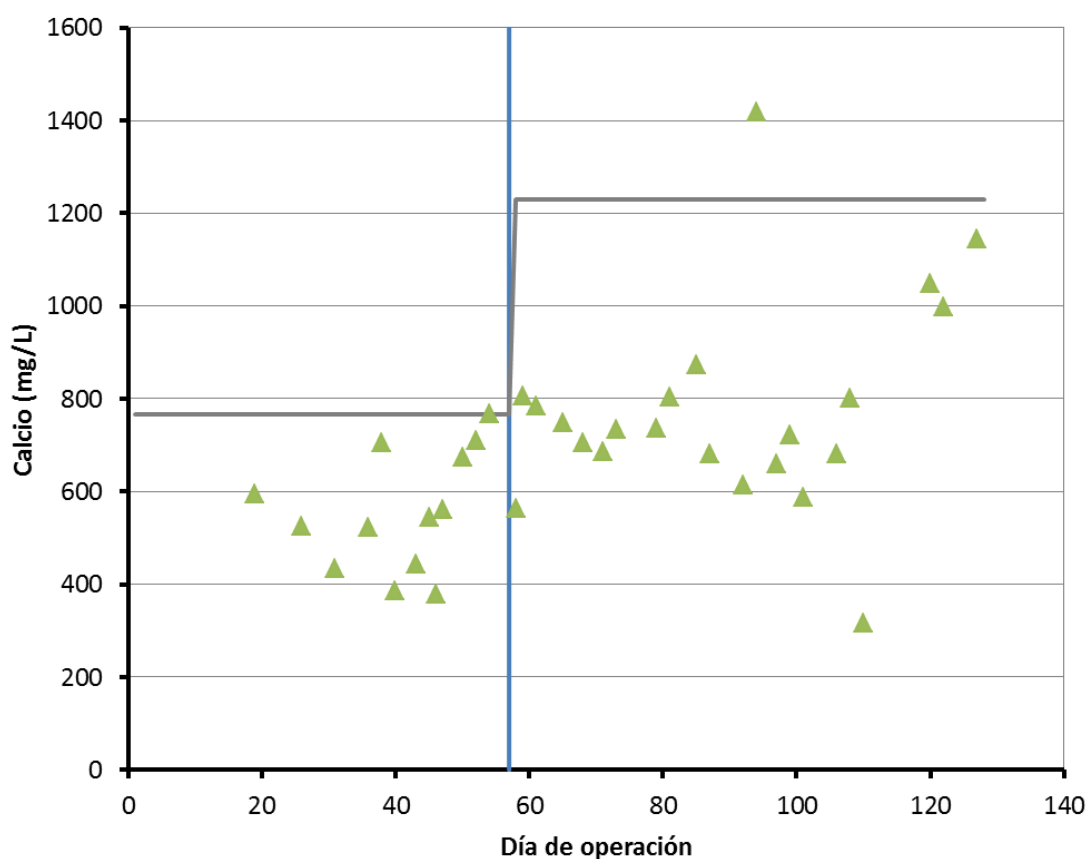


**Figura 7.** DQO y recuento de MO en la columna experimental. Resultados de mediciones de demanda química de oxígeno (DQO) desde el efluente (■), DQO del medio de cultivo (—) y recuento de microorganismos (MO) (◆) desde el efluente de la columna durante el experimento. La línea vertical amarilla (—) indica la fecha en la que se aumentó la cantidad de acetato a 3.238 mg/L con la que se preparó el medio T.R.



Por otra parte, en la Figura 7 se muestran, además, los resultados del recuento de microorganismos, los que indican un alto número de estos desde que se comenzó a realizar esta medición hasta el final del experimento.

En cuanto al calcio, como se puede observar en la Figura 8, a lo largo de todo el experimento se observó una diferencia entre los niveles de calcio del efluente y del medio de cultivo. Sin embargo, se esperaba observar una tendencia sostenida a la disminución de calcio en el efluente, de acuerdo a los resultados obtenidos por Pontigo (2017)



**Figura 8.** Calcio en la columna exploratoria. Resultados de las mediciones de calcio desde el efluente (▲) y medio de cultivo (—). La línea vertical azul (—) indica la fecha en que aumentó la cantidad de calcio a 1229 mg/L.

Con el experimento de la columna exploratoria, se puede concluir que se estableció el desarrollo de un metabolismo reductor de sulfato al interior de la columna con un volumen total 53 veces mayor que las columnas pequeñas usadas hasta el comienzo de esta tesis en el laboratorio, con cuyos efluentes se inoculó esta columna. Sin embargo, no se lograron las condiciones óptimas para la precipitación de carbonato de calcio, debido a que no se pudo provocar el aumento en los niveles de pH y, además, tampoco hubo una disminución sostenida en los niveles de calcio medidos.

#### 5.1.1.2. Monitoreo de parámetros hidráulicos.

Además de monitorear los parámetros metabólicos, para verificar el establecimiento de metabolismo reductor de sulfato, se realizaron mediciones de parámetros hidráulicos para monitorear el desarrollo de colmatación a lo largo del experimento, el que potencialmente pudo ser causado por la actividad microbiana.

En relación al volumen de poro, no se obtuvo una diferencia entre la arena al finalizar e iniciar el experimento. Por otra parte, no se pudieron realizar cálculos de conductividad hidráulica, debido a la poca diferencia medida de altura en la columna de agua de los piezómetros. Como conclusión, se estableció que de acuerdo a los resultados del volumen de poro no se observó una disminución en este parámetro.

#### 5.1.1.3. Cambios en el medio de cultivo.

Para concluir este objetivo, es necesario mencionar que a lo largo de la duración de este experimento se modificó la composición original del medio T.R. buscando optimizar el proceso de instalación de un metabolismo reductor de sulfato al interior de la columna, los que se indican en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Resumen de los ajustes realizados al medio de cultivo T.R. durante el desarrollo del objetivo 1. Los valores en negrita indican las concentraciones finales de los compuestos luego de su modificación.

Compuesto	Concentración (mg/L)	
	Medio T.R. inicial	Medio T.R. final
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	243,1	243,1
Ca <sup>2+</sup>	765,5	<b>1229</b>
Mg <sup>2+</sup>	88,29	88,29
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1923	<b>3050</b>
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	337,3	337,3
SiO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	5,61	5,61
Acetato	1799	<b>3238</b>
Citrato	254,1	254,1
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	27,26	27,26
Extracto de Levadura	1000	1000
Tioglicolato	99,75	99,75

## 5.2. Estudio del proceso de organomineralización en columnas escaladas de 140 centímetros de alto, aplicando parámetros evaluados en el objetivo 1.

5.2.1. Escalamiento del proceso de organomineralización a columnas de 140 centímetros de alto.

En la siguiente etapa del estudio, se escaló el proceso de organomineralización a columnas de mayor tamaño, las que fueron diseñadas y funcionaron tomando como base lo aprendido durante el funcionamiento de la columna experimental. Se trabajó con tres columnas, una con microorganismos (columna L.S.), una columna control sin biocida y una columna control con biocida.

Todas las columnas se iniciaron con una recirculación del medio durante 15 días, para favorecer la adherencia de bacterias en la columna L.S., para posteriormente alimentar las columnas con 816 mL/día de medio T.R final hasta el día de operación número 30.

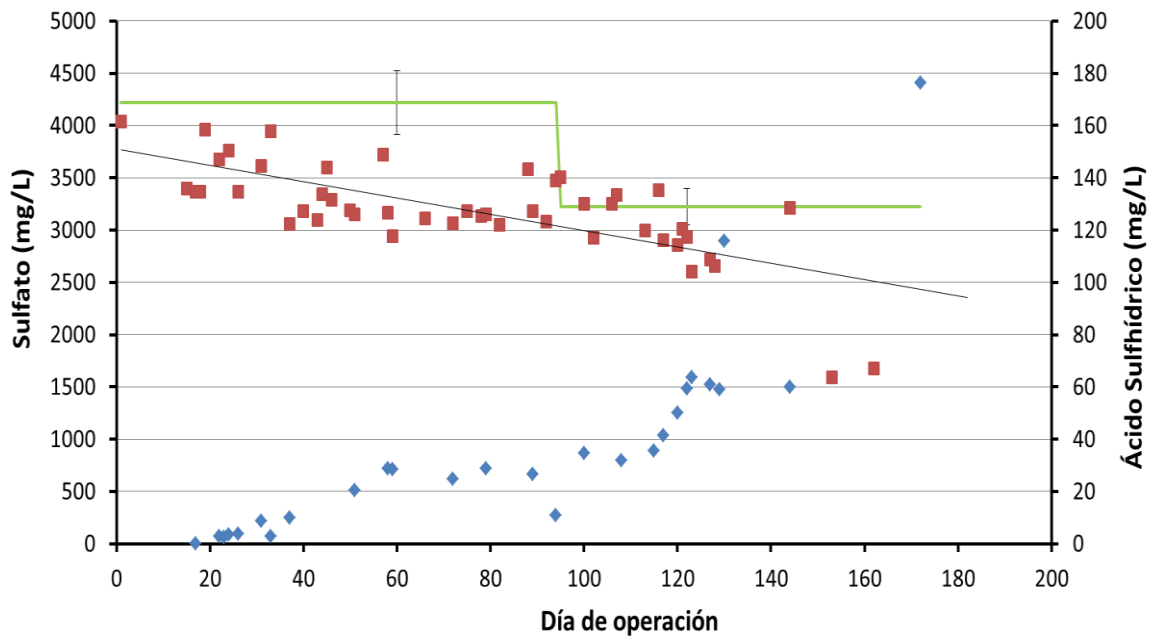
Posteriormente las columnas se alimentaron con una velocidad de 302 mL/día para reactivar el metabolismo reductor de sulfato al interior de la columna L.S. hasta el día de operación 107, cuando se aumentó la velocidad de alimentación a 907 mL/día, debido a la alta actividad microbiana al interior de la columna L.S., a los bajos niveles de DQO y al aumento progresivo de los niveles de ácido sulfhídrico, que podrían llevar a la muerte de las bacterias al interior de la columna L.S. Esto pudo solucionarse en parte con la mayor dilución de nutrientes a lo largo de la columna al alimentarla a mayor velocidad. Esta velocidad de alimentación se mantuvo en ambas columnas hasta el fin de su funcionamiento, salvo por el mes de febrero (días de operación 127 a 155 para la columna control sin biocida, 98 a 126 para la columna control con biocida, 139 a 168 en la columna L.S.) donde esta se redujo a 302 mL/día de medio de cultivo, para evitar el agotamiento del medio de cultivo disponible para este periodo.

#### 5.2.1.1. Monitoreo de parámetros metabólicos de la columna L.S.

En esta columna se realizaron mediciones rutinarias de los distintos parámetros, con el fin de determinar si se estableció el metabolismo reductor de sulfato así como otras condiciones favorables para la precipitación de carbonato de calcio en la columna L.S., y verificar si los cambios observados se deben a la actividad microbiana.

Las mediciones de sulfato a partir del efluente, que se muestran en la Figura 9, indican que desde el inicio del experimento hubo una disminución en los valores de sulfato medidos desde el efluente de la columna L.S. en relación al medio de cultivo con que era alimentada. Al final del experimento se puede apreciar una disminución del sulfato a la mitad de la concentración a la que se estaba alimentando.

En cuanto a la producción de ácido sulfhídrico en esta columna (que se muestra en la Figura 9), se puede observar una tendencia al aumento en los valores de las mediciones de sulfuros a lo largo del tiempo, con una pendiente mayor a partir del día de operación número 120, cuando aumenta la reducción de sulfato al interior de la columna, llegando a valores cercanos a 180 mg/L hacia el final del experimento.

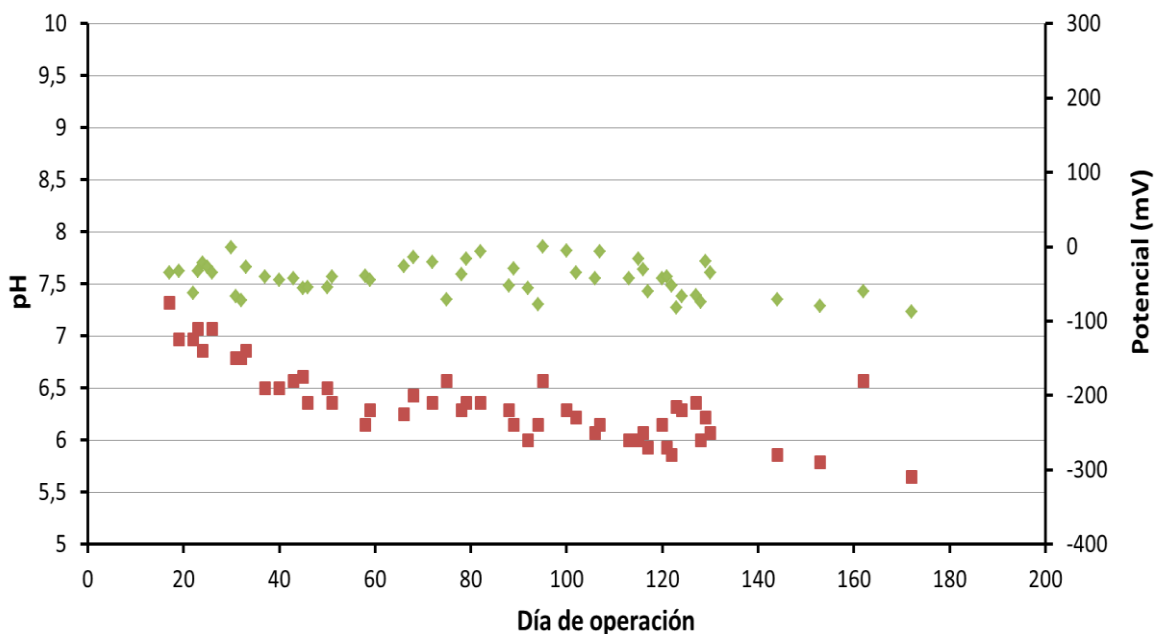


**Figura 9.** Sulfato y ácido sulfhídrico en la columna L.S. Mediciones de sulfato del efluente (■), tendencia lineal de sulfato (—) en el efluente, sulfato promedio del medio de cultivo (—) y ácido sulfhídrico (◆) en la columna. Barras de error indican la desviación estándar de las mediciones del medio de cultivo.

Se observó una leve pero constante tendencia a la disminución del pH (Figura 10), sin superar el pH inicial del medio de cultivo (7,9), lo que no es conveniente para la precipitación de carbonato de calcio al interior de la columna.

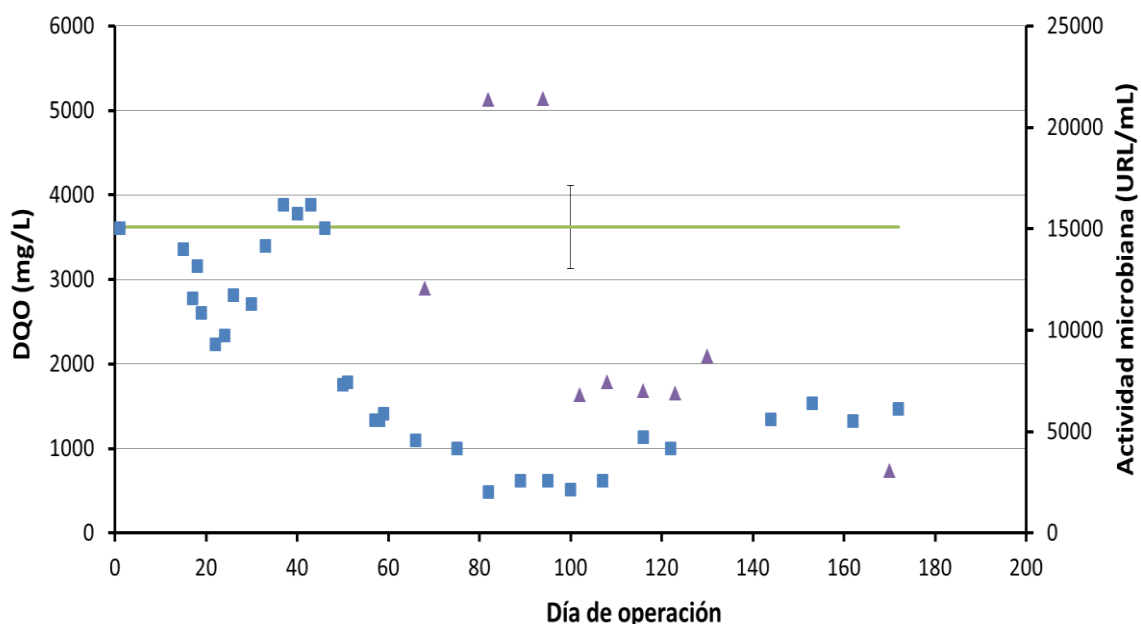
En relación al potencial de óxido-reducción, la columna L.S. tiene un comportamiento similar a la columna exploratoria (ver Figura 6), lo que se muestra en la Figura 10, disminuyendo el potencial en ambas, alcanzando valores negativos y manteniéndose alrededor de los -250 mV, con ciertas mediciones incluso bajo los -300 mV. Esto da indicios del desarrollo de un metabolismo reductor de sulfato al interior de la columna

inoculada, el que se mantiene aún luego de retirar el tioglicolato del medio de cultivo el día de operación 80, lo que fue corroborado con las mediciones de sulfato del efluente.



**Figura 10.** pH y potencial de óxido-reducción en la columna L.S. Mediciones de pH (◆) y potencial de óxido-reducción (■) desde el efluente de la columna.

En relación a las mediciones de DQO, presentadas en la Figura 11, se observa una disminución paulatina en la demanda química de oxígeno de la columna L.S. en relación a las mediciones obtenidas desde el control, las que se mantienen relativamente constantes a lo largo del experimento. Si bien se observó un mayor consumo de fuente de carbono a medida que avanzó el experimento, esta tendencia se pierde a partir del día de operación 120 cuando los valores de DQO comienzan a aumentar paulatinamente.

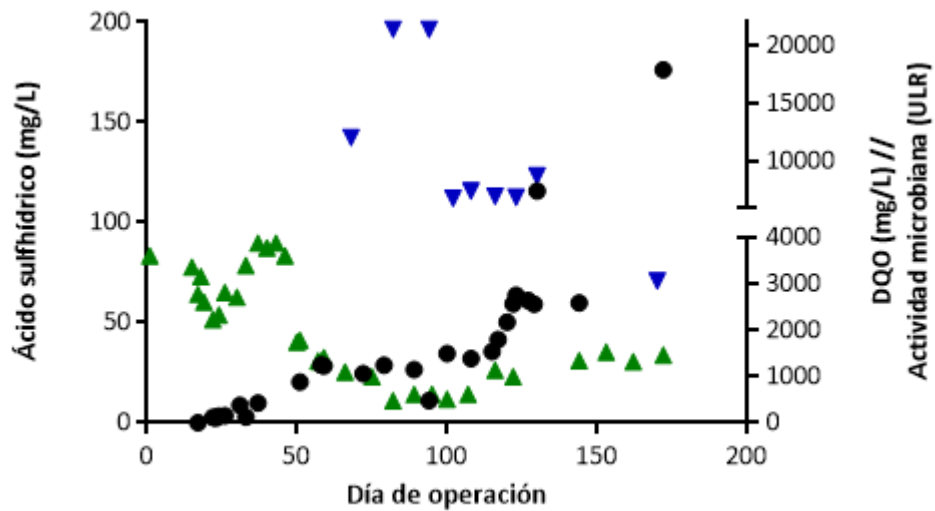


**Figura 11.** DQO y actividad microbiana en la columna L.S. Mediciones de DQO en el sobrenadante (■), DQO promedio en el medio de cultivo (—) y actividad microbiana (▲) en la columna. Barras de error indican la desviación estándar de las mediciones del medio de cultivo.

Los resultados recién mencionados tienen relación con las mediciones de actividad microbiana, las que también se muestran en la Figura 11, determinada como ATP intracelular, medidas en los efluentes de las columnas. En estas se observó una alta producción de ATP en la columna L.S., con una disminución posterior al día de operación 120.

El patrón observado en el aumento de las concentraciones de ácido sulfhídrico, de DQO y en la disminución del ATP intracelular, todas posterior al día de operación 120, indicarían un posible efecto tóxico del ácido sulfhídrico, lo que se muestra en la Figura 12. McCartney & Oleszkiewicz (1991), así como Reis *et al.* (1992) observaron que este compuesto, a concentraciones sobre 200 mg/L, tiene un efecto tóxico de carácter reversible (es decir, que al retirar el compuesto del sistema se pierde el efecto tóxico) sobre bacterias reductoras de sulfatos, mientras que concentraciones de 547 mg/L de H<sub>2</sub>S inhiben completamente el crecimiento de cultivos de bacterias reductoras de sulfato del género *Desulfovibrio* (Reis *et*

al., 1992). Existe la posibilidad de que el aumento en las concentraciones de  $H_2S$  al interior de la columna L.S. posterior al día de operación 120 inhibiese en cierta medida la actividad de bacterias reductoras de sulfato al interior de la columna, explicando la disminución de la actividad microbiana y del consumo del sustrato al interior de la columna expresada en las mediciones mencionadas anteriormente.

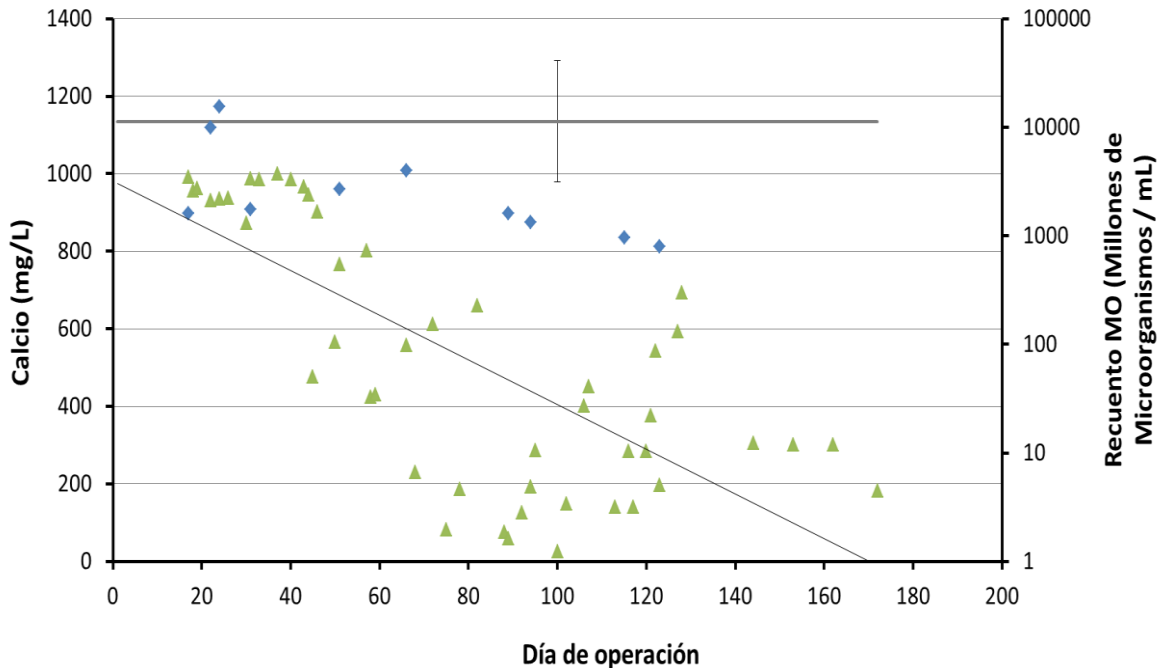


**Figura 12.** Comparación de parámetros asociados al ácido sulfhídrico en la columna L.S. Comparación entre las mediciones de ácido sulfhídrico en el efluente (●), demanda química de oxígeno (DQO) (▼) y actividad microbiana (▲) en la columna.

En el caso de las mediciones de calcio, indicadas en la Figura 13, en la columna L.S. se observa una disminución en los niveles de calcio medidos desde el efluente en relación al medio de cultivo a partir del día de operación 50, observándose una tendencia a la disminución de calcio hasta finalizar el experimento. A diferencia de la columna exploratoria, las mediciones dan cuenta de que gran parte del calcio que ingresa a la columna L.S. es retenida en la misma, existiendo la posibilidad de que este precipite al interior de la columna mediante organomineralización como carbonato de calcio.

La Figura 13 también muestra los recuentos de microorganismos, donde se observó una alta presencia de microorganismos en todos los recuentos realizados.





**Figura 13.** Calcio y recuento de MO en la columna L.S. Mediciones de calcio en el efluente ( $\blacktriangle$ ), calcio promedio en el medio de cultivo ( $\text{—}$ ) y recuento de microorganismos (MO) ( $\blacklozenge$ ) en la columna. Barras de error indican la desviación estándar de las mediciones del medio de cultivo. La línea en diagonal indica la tendencia de las mediciones de calcio en el efluente.

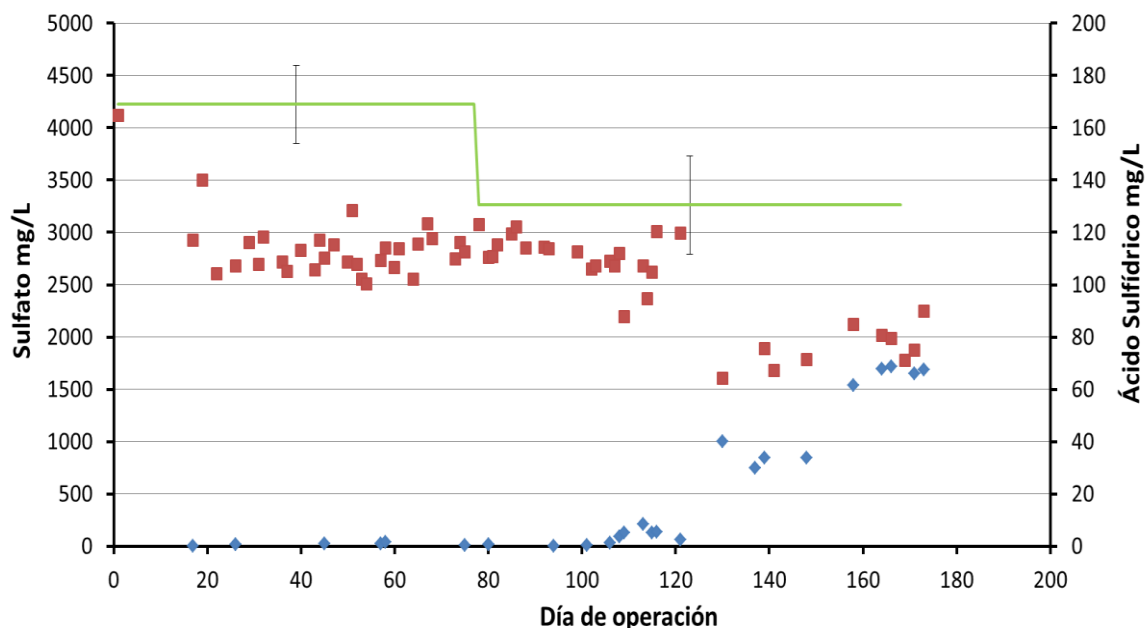
#### 5.2.1.2. Monitoreo de parámetros metabólicos de la columna control sin biocida.

Al igual que en la columna L.S. se realizó un monitoreo regular a los distintos parámetros metabólicos de esta columna, la que no fue inoculada con microorganismos. Esto se llevó a cabo para comparar los resultados de la columna L.S., inoculada con microorganismos antes de su funcionamiento, con los de esta columna, donde la actividad microbiana observada correspondería solo a la originada por la microorganismos presentes en la agua proveniente del pozo de la barrera hidráulica del tranque Ovejería, usada para preparar los medios de cultivo.

En relación al sulfato, cuyas mediciones se muestran en la Figura 14, a lo largo del experimento se observó un comportamiento distinto al de la columna L.S., con una disminución inmediata en los niveles de sulfato medidos desde el efluente en relación al del

medio de cultivo, el que se mantuvo estable hasta llegar al día de operación 120, donde se observa una disminución adicional en el sulfato medido desde el efluente.

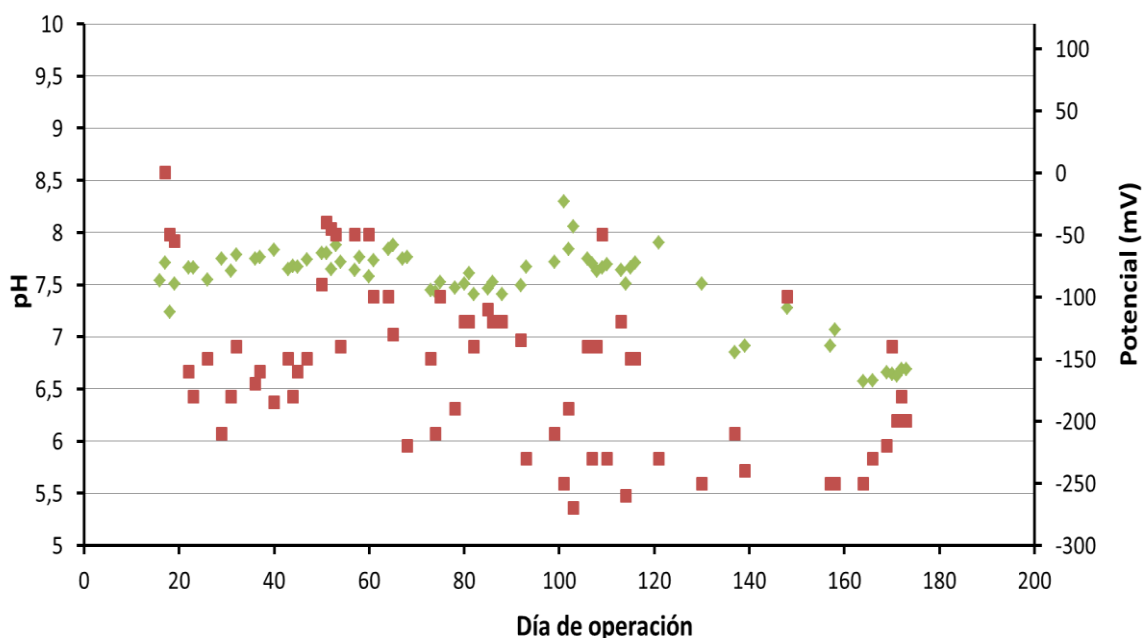
En cuanto a las mediciones de ácido sulfhídrico, también en la Figura 14, a diferencia de la columna L.S., en el control sin biocida no se observó formación del compuesto hasta el día de operación 120, alcanzando hacia el fin del experimento valores sobre los 60 mg/L. Estos resultados, en conjunto a los de sulfato, indican que la microbiota presente en el agua proveniente de la barrera hidráulica del tranque Ovejería son capaces de establecer un metabolismo dominante reductor de sulfato en las condiciones presentes en la columna durante el período del experimento, aunque a una velocidad más lenta que en la columna L.S.



**Figura 14.** Sulfato y ácido sulfhídrico en la columna control sin biocida. Mediciones de sulfato del efluente (■), sulfato promedio del medio de cultivo (—) y ácido sulfhídrico (◆) en la columna. Barras de error indican la desviación estándar de las mediciones del medio de cultivo.

En cuanto al comportamiento del pH de la columna control sin biocida durante el transcurso del experimento, que se muestra en la Figura 15, este también difiere de lo ocurrido en la columna L.S. En un principio el pH se mantuvo estable, cerca del valor del

medio de cultivo, a partir del día de operación 70 los valores comenzaron a disminuir y posteriormente aumentan, alcanzando un valor de 8,3 el día de operación 101. Luego de alcanzar este valor máximo el pH medido desde el efluente de la columna comenzó a disminuir, llegando a valores de pH cercanos a 6,5 hacia el término del experimento. Esto indica que hubo un período de tiempo (alrededor del día de operación 100) donde se favoreció la precipitación de carbonato de calcio al interior de la columna control sin biocida, sin embargo, luego de este período los valores de pH medidos no favorecen la precipitación del mineral.

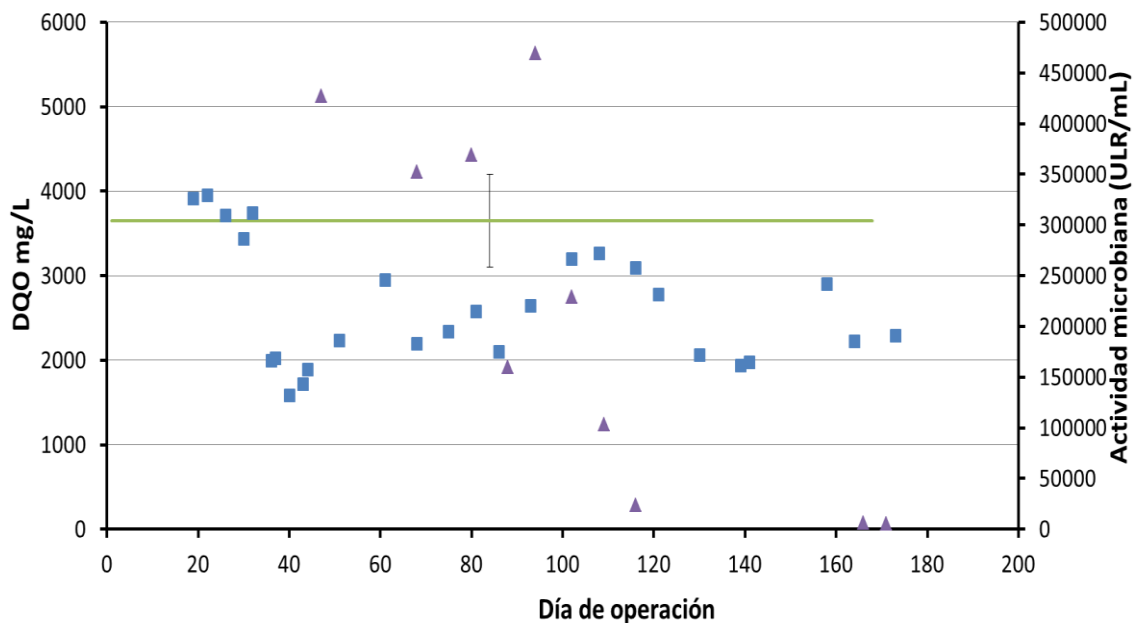


**Figura 15.** pH y potencial de óxido-reducción en la columna control sin biocida. Mediciones de pH (♦) y potencial de óxido-reducción (■) desde el efluente de la columna.

En relación al potencial de óxido reducción, también mostrado en la Figura 15, se puede observar una tendencia a la disminución del potencial, el que es más disperso que el observado en la columna L.S. A pesar de esto, se obtuvo valores óptimos para el desarrollo de bacterias reductoras del sulfato, incluso después de retirar el tioglicolato desde el medio de cultivo, el día de operación 80.

En la columna control sin biocida, en las mediciones de DQO (que se muestran en la Figura 16) se observó un consumo de fuente de carbono los primeros días de operación de la columna, el que posteriormente comenzó a perderse, hasta el día de operación 108, luego de lo cual vuelven a disminuir las mediciones de la demanda química de oxígeno en el efluente, en relación al medio de cultivo.

En cuanto a la actividad microbiana, mostrada también en la Figura 16, se observó que luego de las primeras mediciones existe una gran actividad microbiana en el efluente de la columna la que disminuye drásticamente luego del día de operación 100, perdiéndose casi completamente hacia el final del experimento.

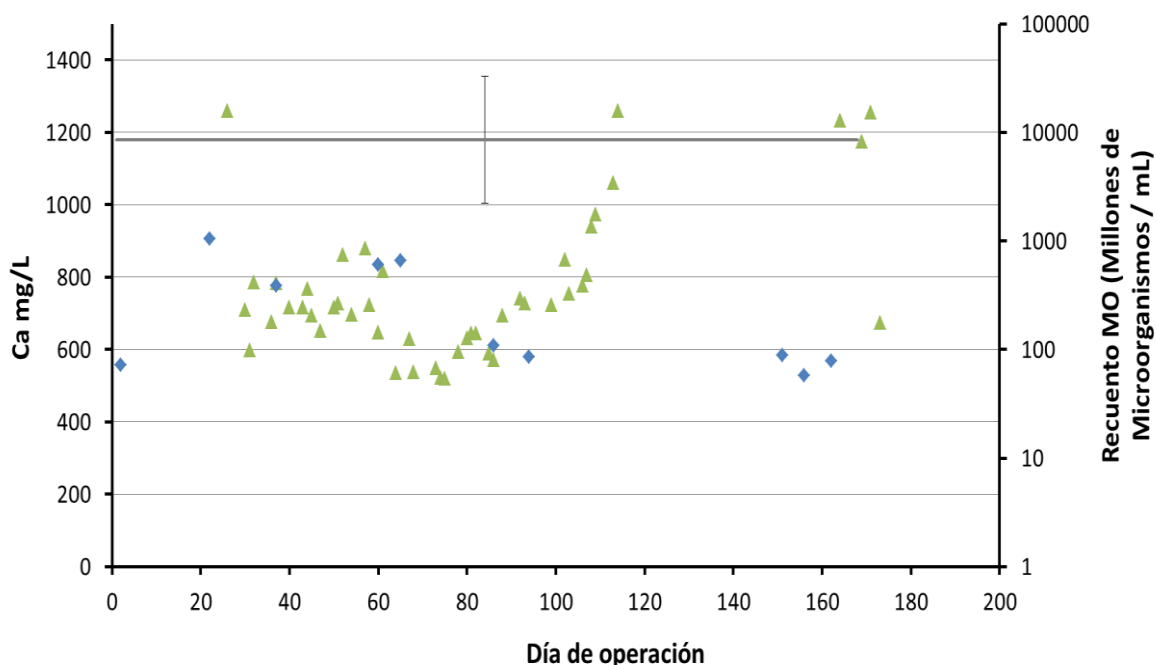


**Figura 16.** DQO y actividad microbiana en la columna control sin biocida. Mediciones de DQO en el sobrenadante (■), DQO promedio en el medio de cultivo (—) y actividad microbiana (▲) en la columna. Barras de error indican la desviación estándar de las mediciones del medio de cultivo.

Tomando tanto los resultados de las mediciones de DQO como de actividad microbiana, se puede observar que la relación entre estos parámetros no tiene relación entre sí, ya que se observa una menor actividad microbiana cuando aumenta el consumo de fuente de carbono. Una posible explicación es que las bacterias presentes en la columna se adhieran a la arena

y no salgan de ésta a través del efluente, esto probablemente ocurre en mayor medida con bacterias anaeróbicas, las que, en los análisis de metagenómica de otras columnas, tienen una mayor abundancia en la arena de dicha columna que en su efluente (ver Figura 28).

Las mediciones de calcio desde el efluente de la columna control sin biocida, mostradas en la Figura 17, indican que al inicio del experimento parte del calcio que estaba ingresando a la columna, no estaba saliendo de ésta, por lo que se espera que haya quedado atrapada al interior de la columna. Este efecto, sin embargo, se pierde luego del día de operación 100, donde el calcio medido desde el efluente comienza a alcanzar valores más cercanos a los del medio de cultivo, lo que coincide con la disminución en los valores de pH medidos desde el efluente.



**Figura 17.** Calcio y recuento de MO en la columna control sin biocida. Mediciones de calcio en el efluente ( $\blacktriangle$ ), calcio promedio en el medio de cultivo ( $\text{—}$ ) y recuento de microorganismos (MO) ( $\blacklozenge$ ) en la columna. Barras de error indican la desviación estándar de las mediciones del medio de cultivo.

En relación a los recuentos de microorganismos, que se muestran también en la Figura 17, se observa que hubo una alta presencia de microorganismos en el efluente de la columna control sin biocida, con valores sobre los  $5 \cdot 10^7$  y los  $1 \cdot 10^9$  de microorganismos por mL, la

que, sin embargo, dista mucho en relación a los recuentos de la columna L.S., donde siempre se obtuvo valores superiores a los  $1 \cdot 10^9$  de microorganismos por mL.

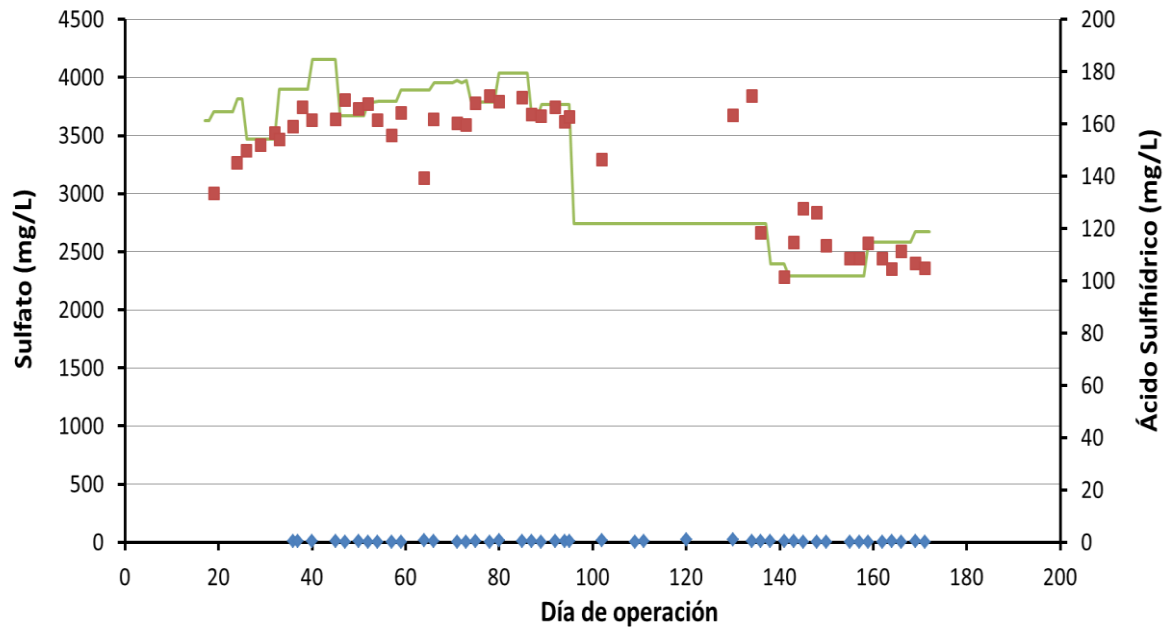
Como conclusión del funcionamiento de la columna control sin biocida, se plantea que, a pesar de no haber sido inoculada con microorganismos externos a los presentes en el agua de pozo del tranque de relaves, utilizada para la preparación del medio T.R final, estos microorganismos logran establecer el desarrollo de un metabolismo reductor de sulfato al interior de la columna, aunque este no es tan marcado como en la columna L.S. Por otra parte, si bien al comienzo del funcionamiento de la columna se observa una disminución en las mediciones de calcio, esta tendencia se pierde con el tiempo, a diferencia de la columna L.S. donde ésta es constante.

#### 5.2.1.3 Monitoreo de parámetros metabólicos de la columna control con biocida.

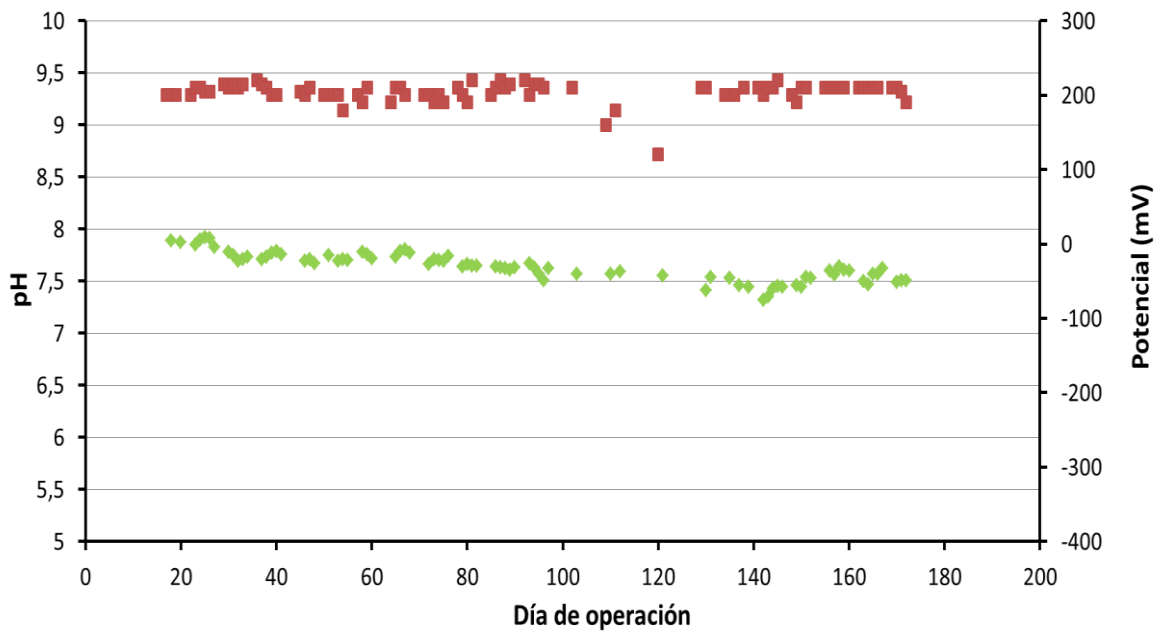
Esta columna fue tratada con sulfato de cadmio como biocida, para prevenir la actividad microbiana en su totalidad y comparar los resultados del monitoreo de los distintos parámetros metabólicos con las otras columnas definitivas.

Para comenzar, los valores de sulfato en el efluente y sulfato en el medio de cultivo son similares, lo que se muestra en la Figura 18, con la excepción de los valores obtenidos entre los días de operación 110 y 140. Esto se debió al aumento en la concentración de sulfatos en el agua de pozo de monitoreo con el que se preparó el medio T.R., con el consecuente aumento de las concentraciones de sulfato del medio. Esto se contrarrestó añadiendo 500  $\mu\text{g/L}$  de sulfato menos durante la preparación del medio, obteniéndose valores de sulfato en el efluente acorde a los medio de cultivo anteriores.

En relación al ácido sulfhídrico, esta columna no presenta producción del compuesto. Los datos obtenidos de las mediciones de este parámetro, junto a los obtenidos de las mediciones de sulfato, confirman el desarrollo del metabolismo reductor de sulfato en la columna L.S.



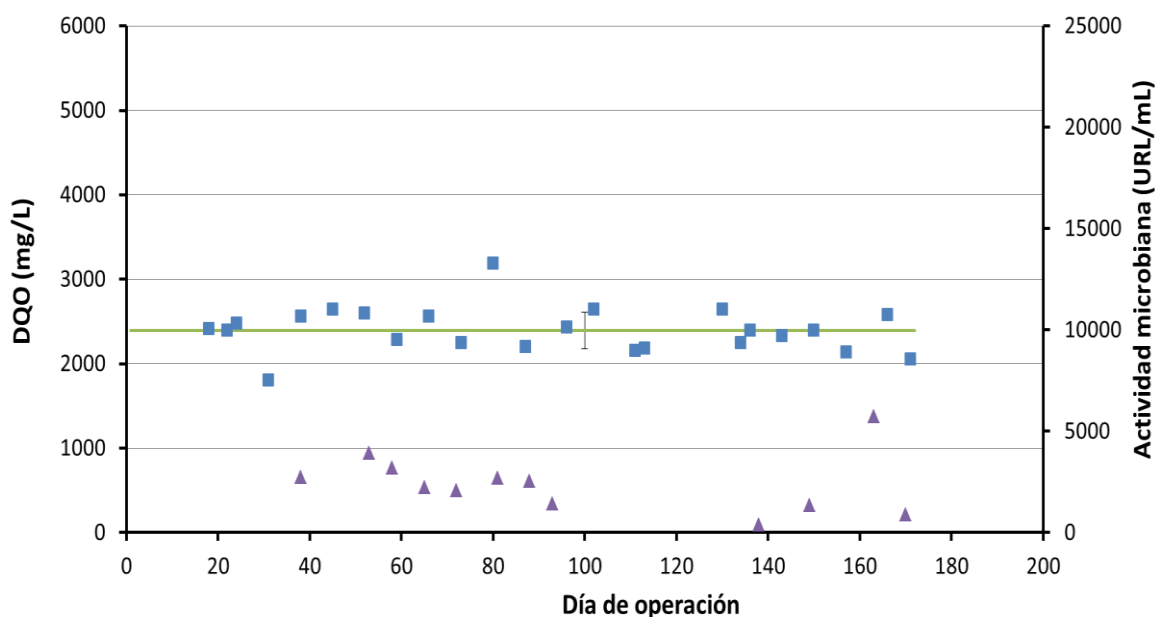
**Figura 18.** Sulfato y ácido sulfhídrico en la columna control con biocida. Mediciones de sulfato del efluente (■), sulfato promedio del medio de cultivo (—) y ácido sulfhídrico (◆) en la columna control. Barras de error indican la desviación estándar de las mediciones en el medio de cultivo.



**Figura 19.** pH y potencial de óxido-reducción en la columna control con biocida. Mediciones de pH (◆) y potencial de óxido-reducción (■) desde el efluente de la columna control con biocida.

En el caso del pH (Figura 19) se observa que en la columna control con biocida las mediciones se mantienen relativamente constantes, aunque con una leve disminución a lo largo del tiempo. Por otra parte, las mediciones del potencial de óxido reducción se mantienen en valores cercanos a los 200 mV a lo largo del experimento.

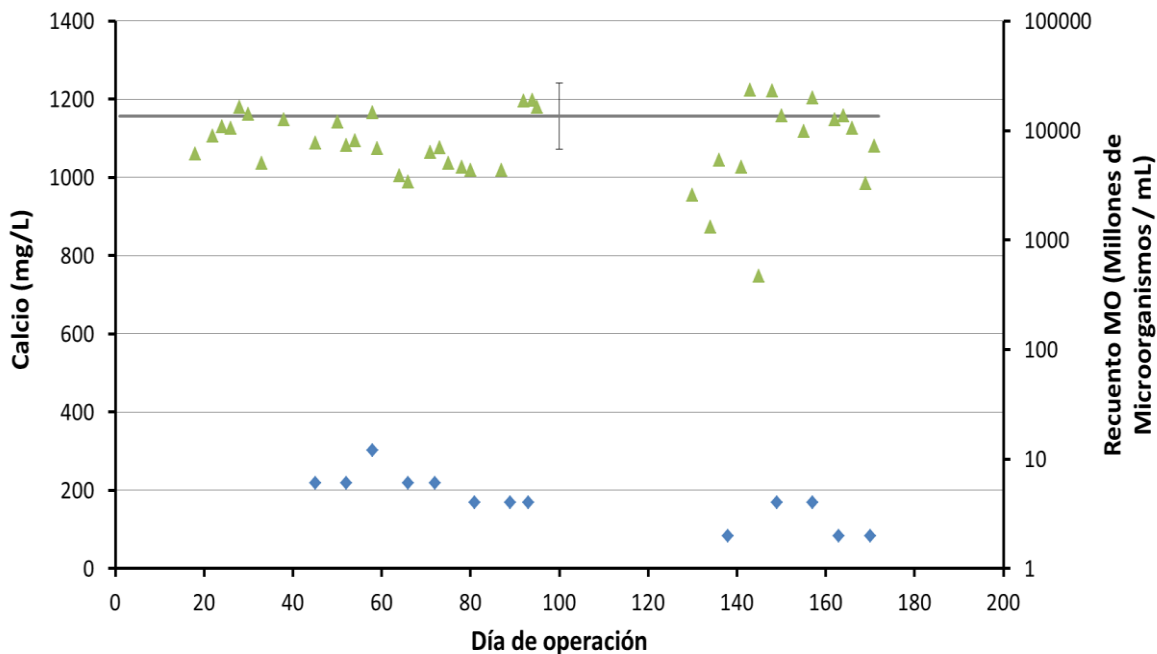
En la Figura 20 se muestran las mediciones de la demanda química de oxígeno desde el efluente de esta columna, las que se mantienen en todo momento en torno a, valor del medio de cultivo. Esto da cuenta de que no hay un mayor consumo de fuente de carbono en la columna control con biocida. Esto tiene relación con la actividad microbiana, también presentada en la Figura 20, donde se observa que si bien existe una leve actividad microbiana, esta es mucho menor que la encontrada en la columna L.S y al inicio del funcionamiento de la columna control sin biocida.



**Figura 20.** DQO y actividad microbiana en la columna control con biocida. Mediciones de DQO en el sobrenadante (■), DQO promedio en el medio de cultivo (—) y actividad microbiana (▲) en la columna. Barras de error indican la desviación estándar de las mediciones del medio de cultivo.



En el caso de las mediciones de calcio, que se muestran en la Figura 21, las mediciones realizadas desde el efluente de esta columna se mantienen cercanas a los valores de las mediciones realizadas desde el medio de cultivo. Esto indica que el calcio que ingresa a la columna con el medio de cultivo sale de la columna en su totalidad, sin quedar atrapada al interior de la columna.

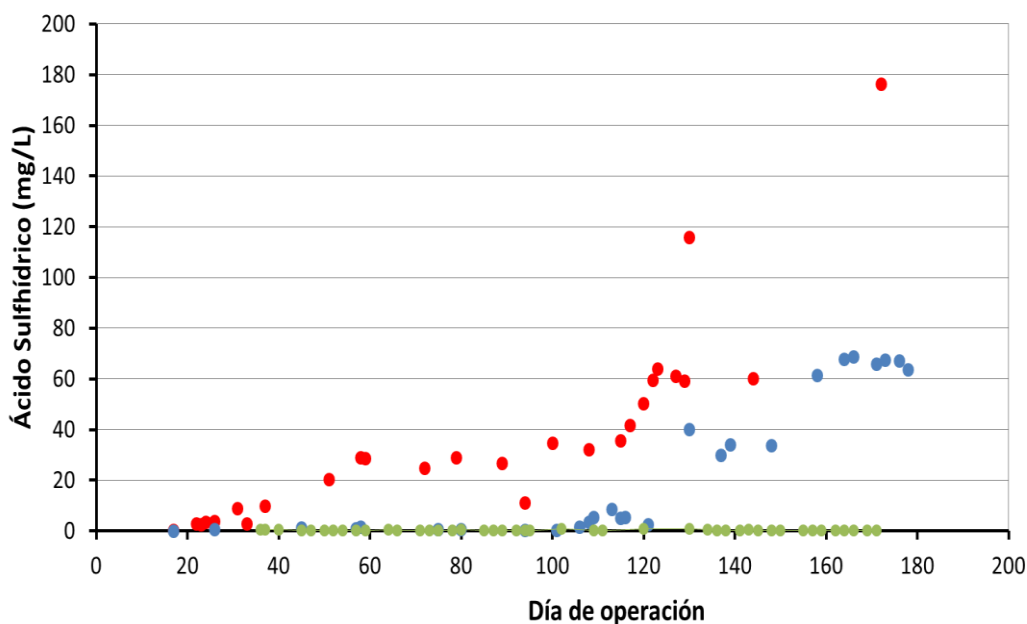


**Figura 21.** Calcio y recuento de MO en la columna control con biocida. Mediciones de calcio en el efluente (▲), calcio promedio en el medio de cultivo (—) y recuento de microorganismos (◆) en la columna. Barras de error indican la desviación estándar de las mediciones del medio de cultivo.

En relación al recuento de microorganismos, se observa que a lo largo de todo el experimento los niveles se mantienen bajos, en relación a las otras columnas. Por ejemplo, la cantidad de microorganismos por mL de efluente de la columna L.S. (día 89 de operación) es 400 veces mayor que la de la columna control con biocida (día 87 de operación).

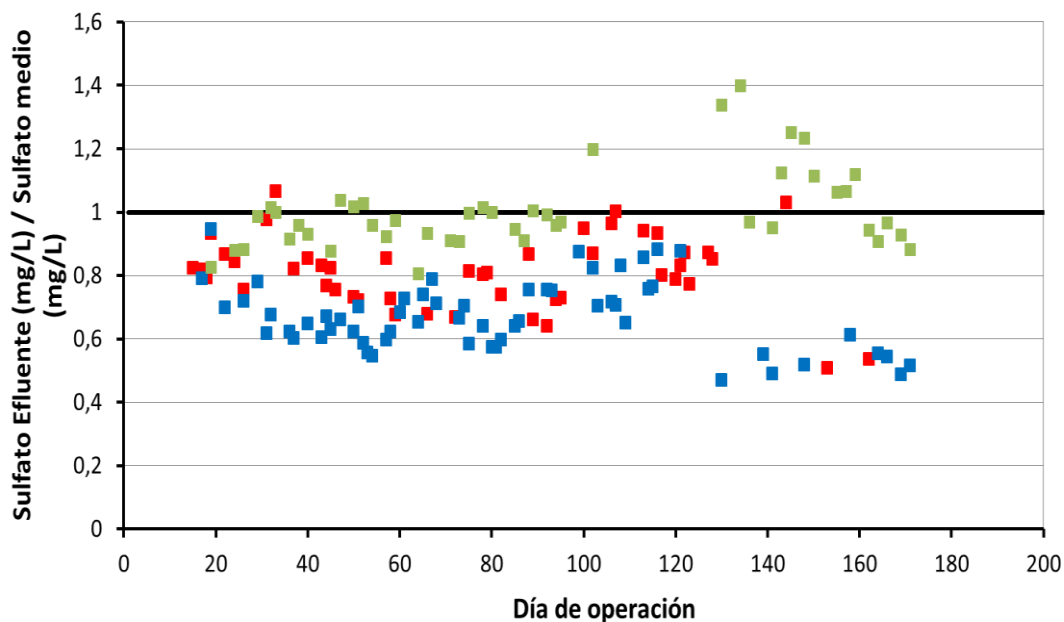
#### 5.2.1.4 Comparación de los parámetros metabólicos medidos entre las tres columnas.

Al comparar la columna L.S. y la columna control sin biocida respecto a los parámetros metabólicos, se puede concluir que en ambas se logró instalar y mantener un metabolismo dominante reductor de sulfato, lo que se logró primero en la columna inoculada con microorganismos, evidenciado por la producción de ácido sulfhídrico en la columna L.S. antes que en la columna control con biocida, lo que se muestra en la Figura 22, mientras que sus niveles de sulfato en el efluente en relación al medio de cultivo es bastante similar entre sí, como se observa en la Figura 23.

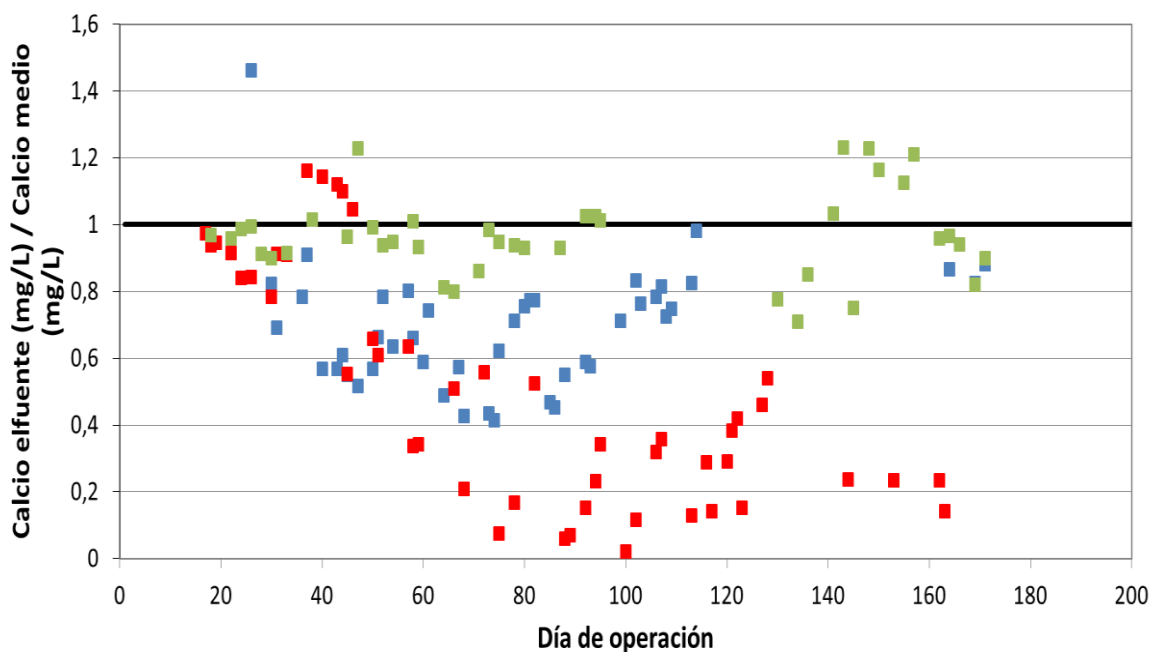


**Figura 22.** Comparación del ácido sulfhídrico en las columnas definitivas. Mediciones de ácido sulfhídrico desde el efluente de la columna L.S. (●), columna control sin biocida (●), y columna control con biocida (●).

Además, se obtuvo una tendencia a la disminución de calcio en el efluente de la columna L.S. en relación al medio de cultivo, a pesar de que el pH obtenido a lo largo del experimento en esta columna no sea el óptimo para la precipitación de carbonato de calcio. Mientras, en la columna control sin biocida, existe una diferencia entre el calcio del efluente en relación al del medio de cultivo, la que sin embargo se pierde con el tiempo, lo que se muestra en la Figura 24.



**Figura 23.** Comparación del sulfato en las columnas definitivas. Mediciones de sulfato desde el efluente de la columna L.S. (■), columna control sin biocida (■), y columna control con biocida (■).



**Figura 24.** Comparación del calcio en las columnas definitivas. Mediciones de calcio desde el efluente de la columna L.S. (■), columna control sin biocida (■) y columna control con biocida (■).

También se debe destacar el nivel de escalamiento alcanzado, considerando que las columnas definitivas tienen 350 veces el volumen total de las columnas pequeñas usadas en el laboratorio hasta el desarrollo de esta tesis y 6,5 veces el volumen total de la columna exploratoria.

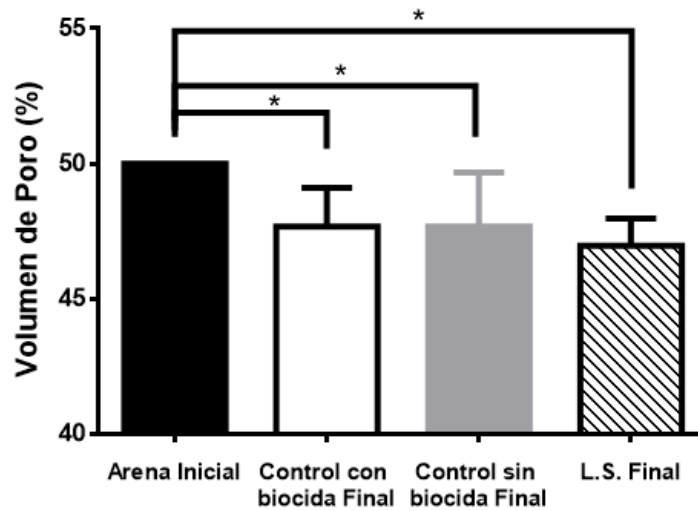
Finalmente, en el caso de la columna L.S., se observó el efecto de la creciente concentración del ácido sulfhídrico sobre la actividad microbiana, actividad que se vio disminuida a medida que aumentaba la concentración del ácido.

#### 5.2.2. Monitoreo de parámetros hidráulicos:

Además de verificar el establecimiento de un metabolismo reductor de sulfato, también se realizaron mediciones de volumen de poro y conductividad hidráulica. Esto, con la finalidad de verificar el desarrollo de un proceso de colmatación en la columna L.S., por lo que se compararon los resultados obtenidos con la columna control para comprobar que los cambios observados en la columna inoculada con microorganismos se deban a la actividad de estos.

Se calculó el volumen de poro de la arena estéril antes de empacar las columnas (arena inicial para ambas columnas), así como de la arena de las columnas control y L.S. luego de su desarme. Se obtuvo un valor de 50% para la arena inicial, 47,7% para la arena de la columna control con biocida, 47,7 % para la columna control sin biocida y 47% para la arena de la columna L.S. (Figura 25).

### Variación en Volumen de Poro



**Figura 25.** Volumen de poro. Comparación entre volumen de poro de la arena antes de empacar las columnas control con biocida, control sin biocida y L.S. y luego de su desarme. "\*" indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ( $P < 0.05$ ) al realizar un análisis estadístico ANOVA de dos vías.

Se realizó un análisis estadístico de ANOVA de dos vías con el que se determinó que existe una diferencia estadísticamente significativa entre el volumen de poro de la arena de todas las columnas con la arena inicial, no así entre la arena de las columnas luego de su desarme entre sí. De esto se desprende que si bien existe una disminución en el volumen de poro de la arena en la columna L.S., no se puede afirmar que esta se deba a la actividad microbiológica en su interior, debido a que la columna control, sin actividad microbiana, presenta la misma reducción en el volumen de poro. La cual posiblemente fue causada por fenómenos físicos, como una mayor compactación de la arena durante el funcionamiento de las columnas

En cuanto a las mediciones de conductividad hidráulica (Tabla 4), las mediciones a bajas velocidades no mostraron diferencias a lo largo del tiempo, a pesar de usar durante este experimento medidores de presión electrónicos más sensibles que piezómetros, por lo que se compararon los datos obtenidos al comienzo y al final de experimento, medidos con una velocidad de 960 mL/min.

**Tabla 4.** Conductividad hidráulica en columnas definitivas. Valores obtenidos en el cálculo de la conductividad hidráulica ( $H_{sat}$ ) adimensional, el porcentaje de disminución de la conductividad hidráulica en cada columna y la razón de disminución de la conductividad hidráulica de la columna L.S. y la columna control sin biocida en relación a la columna control con biocida.

	Columna L.S.	Columna control sin biocida	Columna control con biocida
$H_{satf} / H_{sat0}$	0,33	0,39	0,68
Disminución $H_{sat}$ ( $L/cm^2 \cdot min$ )	0,67	0,61	0,32
Disminución $H_{sat}$ L.S/control	2,08	1,89	-

En el caso de la columna control con biocida, al realizar la razón entre la conductividad hidráulica a lo largo de la columna al finalizar su funcionamiento y al comienzo se obtuvo un valor adimensional de este parámetro de 0,68, para la columna control sin biocida de un 0,39, mientras que para la columna L.S. este alcanzó un 0,33, indicando una disminución en la conductividad hidráulica en ambas columnas, de un 32% en el control con biocida, 61% en la columna control sin biocida y de un 67% en la columna L.S. Por otra parte, al realizar la razón entre la disminución de la conductividad hidráulica entre las columnas con el control con biocida durante la duración del experimento, resultó que la disminución del parámetro hidráulico fue el doble en la columna L.S. que en la control, con un valor de 2,08, luego de 172 días de funcionamiento y casi el doble en el caso de la columna control sin biocida con un valor de 1,89.

Si bien se observó una disminución sustantiva en la conductividad hidráulica tanto en la columna control sin biocida como en la columna L.S., lo que indicaría un posible efecto de colmatación al interior de la columna, también ocurrió una disminución en la conductividad hidráulica de la columna control con biocida, donde no hay ningún indicio de que haya ocurrido desarrollo de actividad microbiana.

Además de la precipitación de minerales también se deben considerar otros mecanismos por los que este parámetro haya disminuido al interior de la columna, como la formación de biomasa o la precipitación de sulfuros de hierro, así como la colmatación producida por la

compactación de la arena en la columna a lo largo del experimento. Es importante considerar que las columnas funcionaron casi exactamente de la misma forma y por el mismo tiempo. Por lo que si bien fenómenos físicos como la compactación de la arena afectaron a la columna L.S., lo hicieron también y en la misma medida con la columna control sin biocida, mientras que los efectos dependientes de la actividad microbiana debiesen ser mínimos en esta última.

Es por eso, que uno de los factores mencionados, o una combinación de dos o más, son los causantes de la mayor colmatación producida en la columna control sin biocida y en la columna L.S., donde destaca la precipitación de carbonato de calcio al interior de la columna debido a organomineralización, lo que se confirmará con los análisis de la arena de las columnas posterior a su desarme.

Finalmente, si bien existe una disminución en la conductividad hidráulica en las columna, no es en el mismo nivel como el observado en la literatura (Vandevivere, 1992). Una de las razones para esto podría ser el tamaño de la arena utilizada para empacar la columna. En esa investigación mencionada, se usó arena de diámetro entre  $63\mu\text{m}$  y  $125\mu\text{m}$ , mientras que en este estudio se usó arena de diámetro entre 500 y 297 micrómetros. Por otra parte, en el objetivo 2 se utilizó arena en un rango entre 841 y 105 micrómetros de diámetro, requiriendo de una mayor precipitación de carbonato de calcio para obstruir los poros entre granos de arena y así disminuir la conductividad hidráulica en mayor medida.

### 5.2.3. Mediciones realizadas durante el desarme de las columnas

Antes de comenzar el desarme de las columnas se hicieron análisis de la actividad microbiana, ácido sulfhídrico, pH y potencial del líquido al interior de las columnas, tomando 6 muestras desde las mangueras de alimentación mientras se drenó la columna, cada 5 litros. Luego, al desarmar la columna L.S se realizó mediciones de actividad microbiana en muestras de arena obtenidas a distintas alturas de la columna, lo que se presenta en la Tabla 5.

De estos datos se desprende que las mediciones a partir del efluente indican de buena manera lo que está ocurriendo al interior de las columnas. Aunque en la columna L.S. y la columna control sin biocida los parámetros medidos no son uniformes a lo largo de la columna, los valores de potencial de óxido-reducción, actividad microbiana y ácido sulfhídrico dan cuenta de la instauración de un metabolismo reductor de sulfato al interior de la columna, lo que no ocurre en la columna control, donde se observa una baja actividad microbiana y una casi nula producción de ácido sulfhídrico.

De acuerdo a lo indicado en la Tabla 5, posiblemente la mayor actividad microbiana ocurrió en la zona inferior de la columna L.S. (mayor producción de ATP en la arena, no así en el líquido). La llegada constante de medio de cultivo promovió el desarrollo de una alta actividad microbiana en esta zona, así como una alta producción de ácido sulfhídrico, el que es tóxico para las bacterias presentes en el líquido de la columna y posteriormente es transportado hacia zonas superiores por el flujo de medio de cultivo.

En la columna control sin biocida, se observó que la actividad microbiana al interior de la columna se concentra en el líquido ubicado en la base de la columna, pero al avanzar hacia la zona superior de ésta, la actividad microbiana se concentra en la arena, indicando que las bacterias activas se adhirieron a esta, lo que podría explicar los bajos niveles de actividad microbiana encontrada en el efluente de esta columna durante su monitoreo (ver Figura 13).



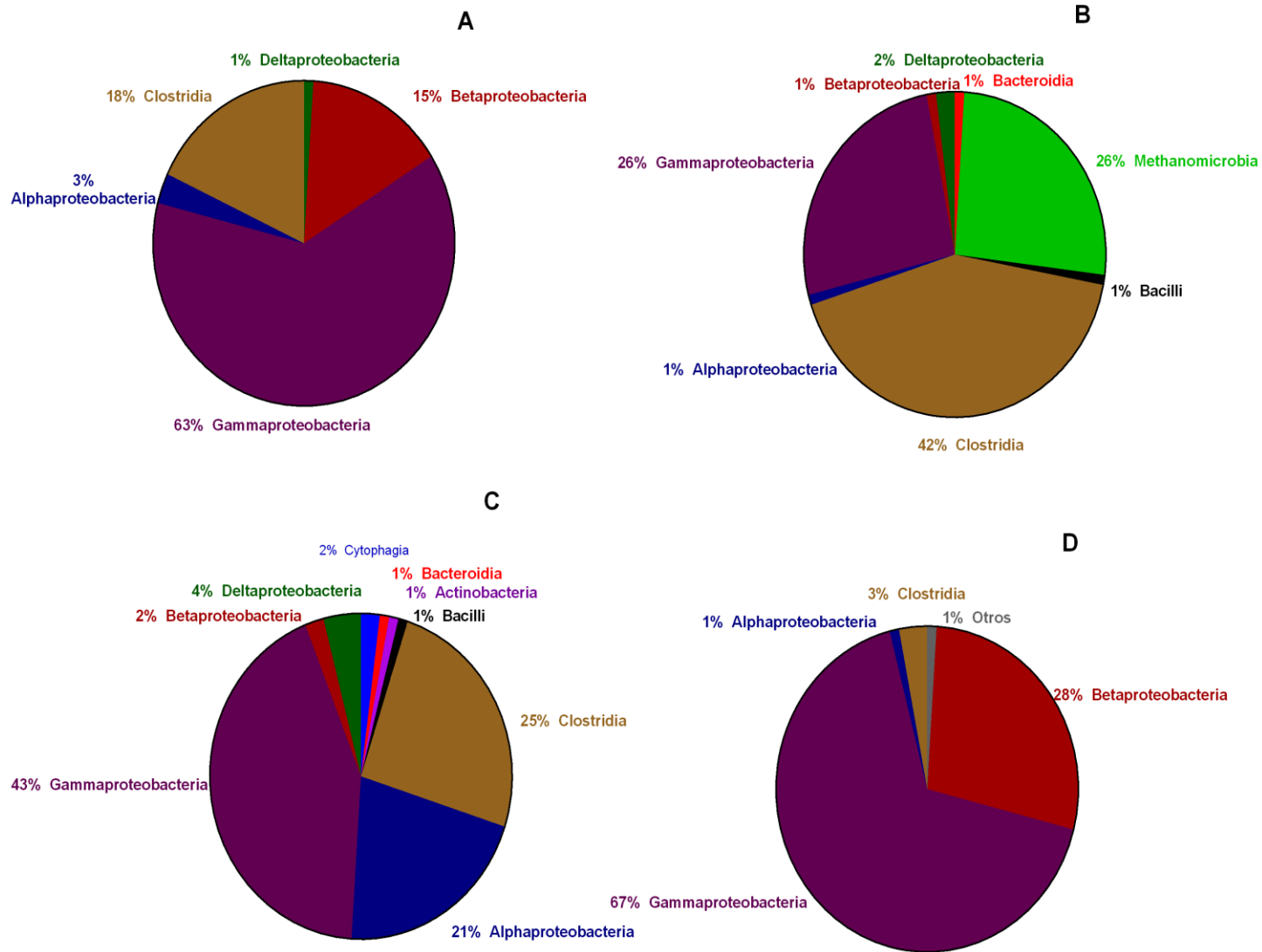
**Tabla 5.** Mediciones durante el desarme de las columnas. Mediciones realizadas con muestras del líquido de las columnas control con biocida, sin biocida y L.S. obtenidas cada 5 litros, siendo la muestra 1 la obtenida primero, correspondiente al fondo de la columna y la muestra 6 correspondiente a la más cercana al extremo superior de la columna. En la columna altura se indica la altura de la columna en la que se obtuvo la muestra para medir la producción de ATP, medida desde el extremo superior de la columna hacia el inferior.

<b>Columna L.S.</b>						
<b>Muestra</b>	6	5	4	3	2	1
<b>Altura (cm)</b>	40	62	83	96	113	133
<b>pH líquido</b>	6,8	6,7	6,7	6,8	6,9	6,0
<b>Eh líquido (mV)</b>	0	-300	-310	-320	-330	-340
<b>H<sub>2</sub>S líquido (mg/L)</b>	211,6	209,4	182,3	162,7	102,3	8,7
<b>Actividad microbiana - líquido (URL/mL)</b>	3069	1317	1274	1620	2492	500
<b>Actividad microbiana - arena (URL/g)</b>	23595	14070	14660	13135	11755	29475
<b>Columna control sin biocida</b>						
<b>Muestra</b>	6	5	4	3	2	1
<b>Altura (cm)</b>	40	62	83	96	113	133
<b>pH líquido</b>	6,6	6,7	6,7	6,6	6,9	7,1
<b>Eh líquido (mV)</b>	-220	-260	-295	-300	-300	-230
<b>H<sub>2</sub>S líquido (mg/L)</b>	90,6	94,2	111	105,8	118	75,1
<b>Actividad microbiana - líquido (URL/mL)</b>	5150	4980	13150	11040	14020	50780
<b>Actividad microbiana - arena (URL/g)</b>	99255	1860	1920	1725	2385	35515
<b>Columna control con biocida</b>						
<b>Muestra</b>	6	5	4	3	2	1
<b>Altura (cm)</b>	40	62	83	96	113	133
<b>pH líquido</b>	7,5	7,6	7,5	7,5	7,6	7,7
<b>Eh líquido (mV)</b>	190	190	190	190	190	210
<b>H<sub>2</sub>S líquido (mg/L)</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,9
<b>Actividad microbiana - líquido (URL/mL)</b>	222	765	1091	113	234	6286
<b>Actividad microbiana - arena (URL/g)</b>	-	-	-	-	-	-

#### 5.2.4. Análisis de metagenómica de la región hiper-variable del rRNA 16 S microbiano de muestras de efluente de las columnas.

Con el fin de evaluar el proceso de selección de microorganismos reductores de sulfato y otros tipos de microorganismos durante el funcionamiento de la columna experimental, columna control sin biocida y columna L.S. se realizó un análisis metagenómico de la región hiper-variable del rRNA 16 S microbiano. Para realizar esto, se extrajo una muestra de efluente desde la columna exploratoria en el día de operación 121, una muestra de efluente de la columna L.S. el día de operación 54 y una muestra de efluente obtenida el día de operación 38 para el caso de la columna control sin biocida. Para obtener datos sobre la posible selección de microorganismos reductores de sulfato en el tiempo, los datos obtenidos se compararon con análisis de metagenómica obtenidos de la columna pequeña desde donde se obtuvo el efluente para alimentar la columna experimental y la columna L.S. (Hurtado *et al.*, datos no publicados).

En la Figura 26 se presentan los resultados del análisis, realizado en base a 729 OTUs de la muestra de la columna pequeña inoculada con una muestra de microbialito proveniente de Lago Sarmiento, 645 OTUs proveniente de la muestra de la arena de la columna mencionada anteriormente, 403 OTUs de la muestra de efluente de la columna experimental y 645 OTUs de la muestra de la columna L.S, considerando OTUs definidos dentro del 97% de similitud. Las curvas de rarefacción de los perfiles dieron cuenta de un muestreo adecuado, mientras que los índices de riqueza y diversidad resultaron similares entre las muestras (información completa en anexo). Para facilitar la comprensión de los resultados, los OTUs obtenidos, presentados en la Figura 26, se agruparon por clase, considerando aquellos cuya abundancia relativa fuese igual o mayor al 1%.



**Figura 26.** Distribución relativa por clase de distintos grupos microbianos obtenidos del análisis de la región hiper-variable V4 del rRNA 16 S bacteriano. Análisis realizado a muestras provenientes de: efluente de una columna pequeña inoculada con muestra de microbialito de Lago Sarmiento (A), arena de una columna pequeña inoculada con muestra de microbialito de Lago Sarmiento (B), efluente de la Columna L.S. (C) y efluente de la columna exploratoria (D). Solo se consideraron para la presentación de resultados agrupaciones de OTUs que superaran el 1% del total de clases identificadas.

Al analizar los resultados, se observa una diferencia entre las abundancias relativas microbianas del efluente de la columna pequeña, su arena de empaque, así como en la columna experimental y la columna L.S. Al comparar la abundancia relativa microbiana de las muestras obtenidas desde la columna pequeña, se observa una mayor proporción de microorganismos de la clase Methanomicrobia en la arena en relación a su efluente (Figura 26 A y Figura 26 B). Esta clase microbiana está conformada por arqueas anaeróbicas estrictas y metanogénicas, lo que podría explicar la generación de gas ocurrida en la columna exploratoria al comienzo del funcionamiento de la columna.

También se observan diferencias en la abundancia relativa de OTUs pertenecientes a clases bacterianas con metabolismos más heterogéneos. En el análisis de las muestras obtenidas desde el efluente y arena de la columna pequeña (Figura 26 A y B), así como del efluente de la columna L.S y exploratoria (Figura 26 C y D), se observa una alta abundancia de la clase Gammaproteobacteria, aunque en menor medida en la arena de la columna pequeña. Dentro de esta clase, se encontraron OTUs pertenecientes principalmente a las familias *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae*, cuyos miembros presentan un metabolismo aeróbico o aeróbico facultativo.

En el caso de la columna L.S. (Figura 26 C) se observa nuevamente una alta abundancia relativa de la clase Gammaproteobacteria, aunque también se aprecia un aumento de otras clases microbianas con abundancias relativas mayores al 1% (Actinobacteria y Cytophagia), con relación al efluente de las otras columnas. En el caso de la clase Gammaproteobacteria, al igual que en la columna pequeña, se encontraron OTUs pertenecientes principalmente a las familias *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae*, cuyos miembros presentan un metabolismo aeróbico o aeróbico facultativo. Respecto a las familias Actinobacteria y Cytophagia, así como de la clase Alfabroteobacteria, donde también se observa un aumento, se encontraron OTUs pertenecientes a las familias Actinomycetaceae, Nocardiaceae (ambas de la clase Actinobacteria), Cyclobacteriaceae (clase Actinobacteria) y Caulobacteraceae (clase Alfabroteobacteria), cuyos miembros también presentan metabolismo aeróbico o aeróbico facultativo.

Por otra parte, al sumar las abundancias relativas de clases microbianas donde los miembros que las componen son mayoritariamente anaeróbicos (Bacteroidia, Deltaproteobacteria, Clostridia y Methanomicrobia) se obtiene que un 19% de los OTUs identificados en el efluente de la columna pequeña, contra un 75% de la arena de dicha columna y un 3,5% en el efluente de la columna experimental (3,4% Clostridia, 0,09% Deltaproteobacteria, 0,03% Bacteroidia y 0,001% Methanomicrobia, los tres últimos no presentados) y un 30% en el efluente de la columna L.S (1% Bacteroidia, 4% Deltaproteobacteria y 25% Clostridia), poseen este metabolismo.

Estos resultados, indican que la heterogeneidad de las composiciones microbianas observadas, especialmente entre las muestras de efluente y la muestra de arena, podría deberse a un microambiente más favorable para el desarrollo de microorganismos anaeróbicos dado por la arena, además de una mejor adaptación de este tipo de microorganismos en la Columna L.S. en relación a la columna experimental, siempre considerando que la muestra de la columna L.S se tomó el día de operación 54 y de la columna experimental el día 121.

Luego de estudiar de forma general las familias de microorganismos encontradas en cada perfil, es posible enfocarse en las bacterias reductoras de sulfatos, los microorganismos más importantes para el desarrollo de esta tesis. Para esto, en la Tabla 6 se presenta un desglose de las clases Clostridia y Deltaproteobacteria, con un enfoque en los OTUs relacionados con bacterias reductoras de sulfato, enlistados con el nivel taxonómico más específico posible y considerando una abundancia relativa igual o superior al 0,01% como considerable (Ahn *et al.*, 2015).

Al analizar los datos presentados en la Tabla 6, se observa que en todos los análisis de abundancia relativa microbiana estudiados, hubo presencia de bacterias reductoras de sulfato, tanto de la clase Clostridia como de la clase Deltaproteobacteria. Se observó una mayor abundancia relativa de OTUs asociados a bacterias de la clase Clostridia en la arena de la columna pequeña en relación a los otros perfiles (ver Figura 26), posiblemente debido a las mejores condiciones para su desarrollo que podría ofrecer este ambiente, mientras que

se observa una mayor abundancia relativa de la clase Deltaproteobacteria en el efluente de la columna L.S., en relación a las otras muestras. Por otra parte, se observa una mayor abundancia relativa del género *Desulfosporosinus* que del género *Desulfomicrobium* tanto en la arena de la columna pequeña, como en el efluente de la columna experimental y de la columna L.S., no así en el efluente de la columna pequeña, donde esta relación es inversa.

Además, en el efluente de la columna L.S. se observa la presencia del género *Desulfotomaculum*, superado solamente en la muestra de arena de la columna pequeña. Por otra parte, se debe considerar la presencia de otros géneros microbianos asociados a las familias Clostridia y Deltaproteobacteria en los tres perfiles estudiados, que no superaron la abundancia relativa de 0,01% y por lo tanto no se consideraron para el análisis, tales como, *Desulfurispora* (clase Clostridia), *Desulfovermiculus*, *Desulfovibrio* y bacterias de las familias *Desulfobulbaceae* y *Desulfuromonadaceae* identificadas a nivel de género (todas de la clase Deltaproteobacteria).

Finalmente, en la Tabla 6 se presenta la abundancia relativa, en las tres muestras estudiadas, para los microorganismos metanogénicos. Se encontró que los OTUs asociados a este tipo de microorganismos, de la clase Methanomicrobia, corresponden al género *Methanosarcina*, el que se encuentra en mayor abundancia en la arena de la columna pequeña, en relación al efluente de la misma columna (ver Figura 26).

**Tabla 6.** Abundancia de grupos microbianos de interés, OTUs presentes en el efluente de la columna pequeña, la arena de la columna pequeña, en el efluente de la columna experimental y columna L.S.

Clase	Género (Familia)	Abundancia relativa (%)		
		Efluente columna L.S.	Efluente columna control sin biocida	Efluente columna experimental
Clostridia	Desulfosporosinus (Peptococcaceae)	0,76	0,12	0,64
	Desulfotomaculum (Peptococcaceae)	0,02	0,03	0,02
Deltaproteobacteria	Desulfomicrobium (Desulfomicrobiaceae)	3,57	<0,01	0,09
Methanomicrobia	Methanosarcina (Methanosarcinaceae)	<0,01	<0,01	<0,01

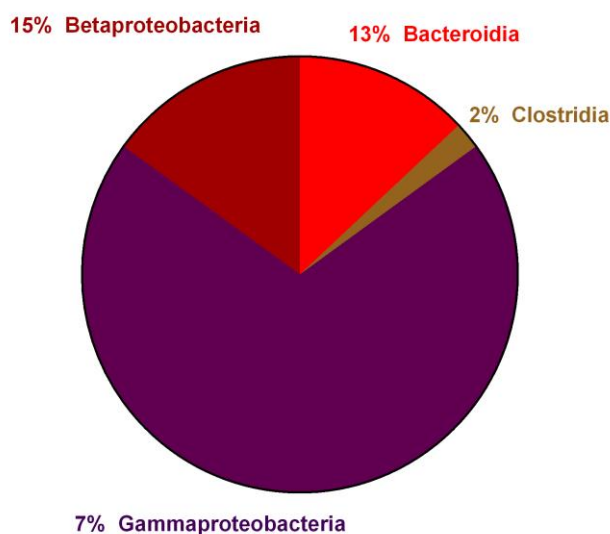
En resumen, en todas las muestras se observó una abundancia relativa mayoritaria de OTUs asociados a la familia Gammaproteobacteria. En relación a las bacterias anaeróbicas, se observa una mayor presencia de familias asociadas a bacterias con este metabolismo, como Bacteroidia, Deltaproteobacteria, Clostridia y Methanomicrobia. En cuanto a las bacterias reductoras de sulfato, en los análisis realizados a todas las muestras se detectaron OTUs asociados a géneros de bacterias con este metabolismo. La mayoría de los géneros encontrados se encuentran en mayor medida en la arena de la columna pequeña, a excepción de *Desulfomicrobium*, con una mayor abundancia relativa en el efluente de la columna L.S. en relación a las otras muestras.

En cuanto al análisis metagenómico del efluente de la columna control sin biocida (muestra tomada el día de operación 38), se observó una clara dominancia de OTUs pertenecientes a la familia Gammaproteobacteria (Figura 27). Dentro de esta clase, se encontró, a diferencia de los otros perfiles presentados con anterioridad, una mayoría de OTUs asociados al género *Acinetobacter* (familia *Moraxcellaceae*), cuyos miembros presentan un metabolismo aerobio estricto.

En cuanto a los OTUs asociados a familias cuyos miembros son principalmente anaeróbicos, se observó una abundancia relativa del 13% de la familia Bacteroidia y un 2% de la familia Clostridia, siendo esta última de importancia ya que en esta se encuentran microorganismos con metabolismo reductor de sulfato.

Respecto a bacterias reductoras del sulfato, dentro de la familia Clostridia, se encuentran OTUs asociados a bacterias de los géneros *Desulfosporosinus* y *Desulfotomaculum*, con abundancias relativas de 0,12% y 0,03%, respectivamente. Esto indicaría que el agua proveniente de la barrera hidráulica del tranque de relave Ovejería posee microorganismos reductores de sulfato.

Como conclusión, se observó la presencia de microorganismos reductores de sulfato en el agua proveniente de la barrera hidráulica del tranque de relave Ovejería, a estos se les agregó los presentes en el efluente de la columna pequeña para el funcionamiento de la columna L.S. Durante el funcionamiento de esta columna, se logró seleccionar bacterias reductoras de sulfato (principalmente del género *Desulfomicrobium*) y otros microorganismos anaeróbicos, pertenecientes a las familias Deltaproteobacteria y Clostridia, al comparar la abundancia relativa de este tipo de microorganismos en el efluente de la columna L.S. en relación al de la columna pequeña.



**Figura 27.** Distribución relativa por clase de distintos grupos microbianos obtenidos del análisis de la región hiper-variable V4 del rRNA 16 S bacteriano, de una muestra provenientes efluente de la columna control sin biocida.



### **5.3. Determinación de organomineralización en distintos niveles de las columnas.**

#### **5.3.1. Determinación de carbonato de calcio en la arena de las columnas.**

Luego del desarme de las columnas se obtuvieron muestras de arena a distintas alturas, en las que se determinó el porcentaje de carbonato de calcio presente en ellas. Los resultados de la determinación de carbonato de calcio en las muestras obtenidas de la columna exploratoria, columna L.S, columna control sin biocida y columna control con biocida se presentan en la Tabla 7.

En el caso de la columna exploratoria no se encontró carbonato de calcio en ninguna de las muestras tomadas, ocurriendo lo mismo en la columna control con biocida usada en el objetivo 2. La determinación de carbonato de calcio indica que se encontró carbonato de calcio en la columna L.S, con porcentajes entre el 0,077% y 0,343% en las fracciones donde se detectó el mineral. Además, en el caso de la columna control sin biocida, se encontró carbonato de calcio en la arena de la zona superior de la columna y en la zona cercana al filtro inferior, con un porcentaje de  $\text{CaCO}_3$  de 0,17% y 0,09%, respectivamente.

Estos resultados indican que la actividad microbiana presente en la columna exploratoria no produjo organomineralización, esto concuerda con los resultados obtenidos del monitoreo de parámetros metabólicos de la columna, donde desde el efluente no se obtuvieron valores de pH que indicasen que se estaba promoviendo este proceso al interior de la columna. Además, el monitoreo del calcio medido desde el efluente indica que no habría calcio atrapado al interior de la columna, ya que las concentraciones de calcio en el efluente son similares a las del medio de cultivo.

**Tabla 7.** Porcentaje de carbonato de calcio encontrado en las distintas muestras. Muestras tomadas a distintas alturas, de la columna exploratoria, columna L.S. y columna control.

Columna exploratoria			Columna L.S.			Columna control sin biocida			Columna control con biocida		
Muestra	Altura (cm)	% CaCO <sub>3</sub>	Muestra	Altura (cm)	% CaCO <sub>3</sub>	Muestra	Altura (cm)	% CaCO <sub>3</sub>	Muestra	Altura (cm)	% CaCO <sub>3</sub>
1	133	n.d.	1-Centro	133	0,082	1-Centro	133	0,017	1	133	n.d.
			1-Orilla	133	0,08	1-Orilla	133	0,09			
			2-Centro	113	0,077	2-Centro	113	n.d.			
			2-Orilla	113	0,081	2-Orilla	113	n.d.			
2	66	n.d.	3-Centro	69	n.d.	3-Centro	69	n.d.	2	66	n.d.
			3-Orilla	69	0,081	3-Orilla	69	n.d.			
			4-Centro	83	0,08	4-Centro	83	n.d.			
			4-Orilla	83	0,082	4-Orilla	83	n.d.			
3	40	n.d.	5-Centro	62	0,079	5-Centro	62	n.d.	3	40	n.d.
			5-Orilla	62	0,078	5-Orilla	62	n.d.			
			6-Centro	40	0,081	6-Centro	40	n.d.			
			6-Orilla	40	0,162	6-Orilla	40	n.d.			
			0-Filtro		0,343	0-Filtro		0,09			

n.d. : no detectado, bajo el límite de detección del método

En el caso de la columna L.S., la presencia de carbonato de calcio en la arena se debe a la actividad microbiana, específicamente la reductora de sulfato, la que no está presente en la columna control con biocida, donde no se detectó presencia de carbonato de calcio en la arena. Si bien durante el funcionamiento de esta columna los valores de pH medidos en el efluente no fueron óptimos para la precipitación de carbonato de calcio, el monitoreo del calcio en el efluente en el tiempo indican que parte del calcio que entró en la columna L.S. no se observa en el efluente, sino que quedó atrapado en la columna, lo que se puede observar con los resultados de la determinación de  $\text{CaCO}_3$ .

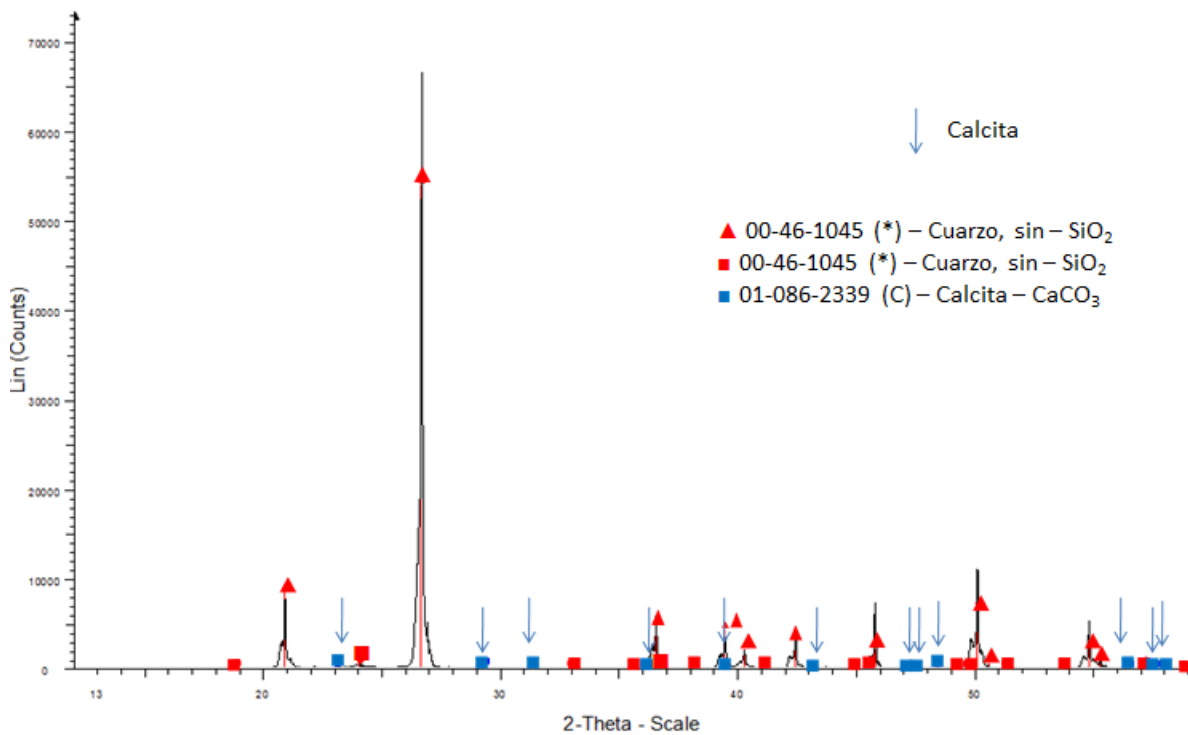
Por otra parte, en el caso de la columna control sin biocida, el análisis es similar al de la columna L.S., con la diferencia de que en algún momento del funcionamiento de la columna sí se detectaron niveles de pH alcalinos, lo que podría explicar la presencia de carbonato de calcio en zonas superiores de esta columna.

### 5.3.2. Determinación de la forma de precipitación del $\text{CaCO}_3$ .

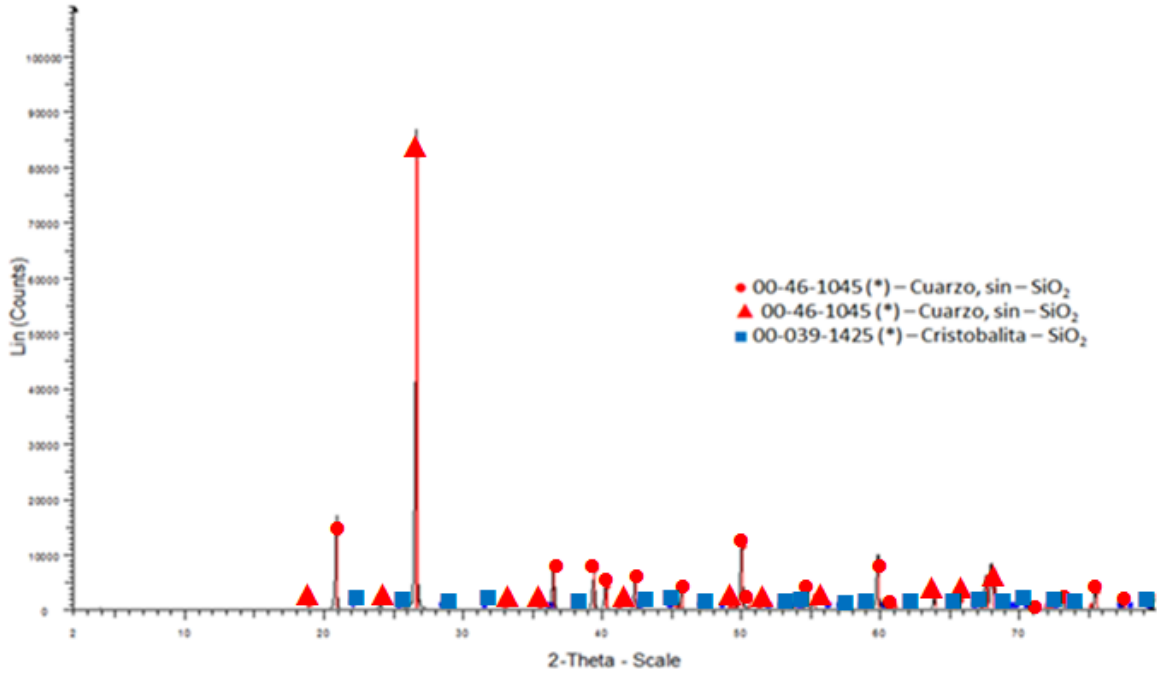
En cuanto a la determinación de la forma de precipitación del carbonato de calcio en las columnas, se preparó una muestra de arena estéril (que funcionó como control) y una muestra de arena proveniente de la columna L.S. para realizar difracción de rayos X. No se prepararon muestras de arena de las columnas exploratoria y control con biocida ya que la determinación de carbonato de calcio en la arena arrojó que no se encontró carbonato en estas columnas.

Tanto en la arena estéril como en la arena de la columna L.S. se encontró cuarzo, correspondiente a la arena usada como material de empaque. Por otra parte, en la arena de la columna L.S. se encontró calcita, no así en la arena estéril (Figura 28 y Figura 29). La calcita es un mineral de carbonato de calcio, el que precipitó al interior de esta debido a las condiciones presentes al interior del sistema, incluyendo la actividad microbiana, principalmente reductora de sulfato, observada al interior de la columna L.S. en la sección 5.2.1.1.

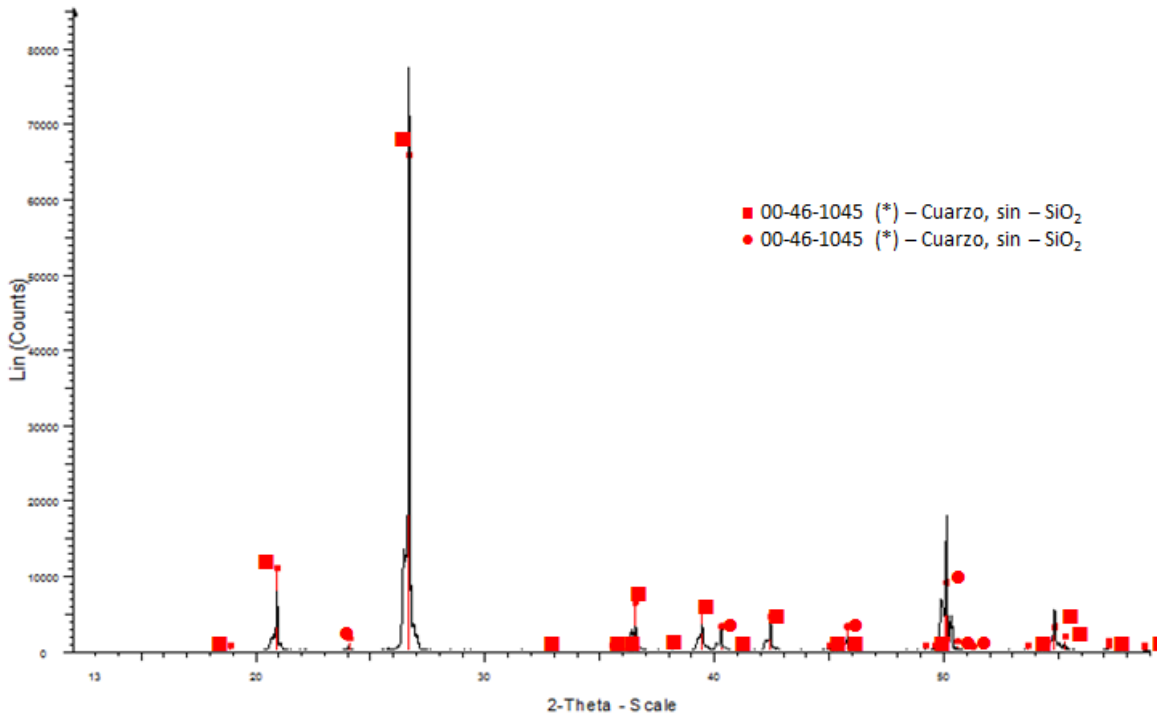
En relación a la arena proveniente de la columna control sin biocida, el análisis por difracción de rayos X, indica que solo hay presencia de cuarzo (Figura 30). Esto posiblemente ocurrió por la baja presencia de carbonato de calcio en la arena detectada en promedio en toda la columna, por lo que las muestras preparadas para el análisis no tenían presencia del mineral, o este estaba en concentraciones bajo el límite de detección del método.



**Figura 28.** Espectro de difracción de rayos X de una muestra de arena de la columna L.S. Los cuadrados rojos (■) y triángulos rojos (▲) indican la presencia de cuarzo en la muestra, mientras que los cuadrados azules (■) indican la presencia de calcita.



**Figura 29.** Espectro de difracción de rayos X de una muestra de arena de cuarzo estéril. Los cuadrados rojos (■) y triángulos rojos (▲) indican la presencia de cuarzo en la muestra, mientras que los cuadrados azules (■) indican la presencia de cristobalita.



**Figura 30.** Espectro de difracción de rayos X de una muestra de arena de la columna control sin biocida. Los cuadrados rojos (■) y triángulos rojos (▲) indican la presencia de cuarzo en la muestra.

## 6. DISCUSIÓN

Durante la ejecución de esta tesis se realizó el escalamiento de un proceso de biocolmatación mediante la precipitación de carbonato de calcio, el que se había desarrollado en el laboratorio con columna pequeñas (Pontigo, 2017). La realización del escalamiento se hace necesario, pensando en la posible aplicación de este proceso para detener la contaminación de acuíferos debido a la filtración de aguas claras de tranques de relave, considerando las dimensiones del terreno en el que se tendrían que aplicar.

El tranque de relave Ovejería presenta distintos tipos de unidades hidrogeológicas, estas presentan espesores que van desde los 2 hasta los 48 metros de espesor, con distintas permeabilidades y ubicadas a distintas profundidades (Gestión Ambiental Consultores S.A., 2011). Dentro de estas, llama la atención la unidad hidrogeológica 9, compuesta principalmente por limos, arcillas, gravas y arenas, una parte de esta se encuentra actualmente cubierta por el tranque de relaves. Rio abajo del muro del tranque se encuentran zonas de alta permeabilidad (Gestión Ambiental Consultores S.A., 2011). Este sector podría estar sujeto a la filtración de aguas claras provenientes desde el tranque, siendo un terreno similar al que se debería tratar con un proceso basado en el trabajado en esta tesis.

Si bien no existe evidencia de investigaciones y aplicaciones industriales de un proceso de organomineralización, mediada por metabolismo reductor de sulfato, para los fines expuestos anteriormente, se encuentran casos de aplicaciones de procesos de biocolmatación y de organomineralización mediadas por otros microorganismos, los que requirieron de distintas etapas de escalamiento, similares a la desarrollada en esta tesis, antes de pasar a una aplicación en terreno.

De forma similar al escalamiento realizado en esta tesis, De Jong *et al.* (2006) comenzó, el año 2006, estudiando la organomineralización de especímenes triaxiales de arena de 7,2 cm de diámetro y 14,4 cm de alto utilizando cultivos de *Sporosarcina pasteurii*, similar al estudio que precede al desarrollo de esta tesis (Pontigo, 2017). Posteriormente, el mismo

grupo de investigadores investigó el proceso de organomineralización en columnas de 50 cm de alto (Martinez *et al.*, 2011), similar al trabajo realizado en esta tesis. Este caso es interesante, ya que posteriormente se realizaron otras etapas de escalamiento, en una muestra de terreno de 100 m<sup>3</sup> (Filet *et al.*, 2012) y finalmente a una aplicación en terreno (De Jong *et al.*, 2013).

Otro método de biocolmatación aplicada en terreno es Biosealing. Si bien no hay datos específicos sobre el tamaño de las columnas usadas durante el escalamiento (Liao *et al.*, 2007), luego del trabajo realizado en ellas se probó el sistema de colmatación en terreno, en una represa en Griefenstein, Austria, entre los años 2008 y 2009 (Blauw *et al.*, 2010).

Estas experiencias, indican la importancia de distintos pasos de escalamiento de un proceso, como el que se desarrolló en esta tesis, para poder finalmente llegar a una aplicación a gran escala.

Durante el desarrollo de esta tesis, en la columna exploratoria se estableció un metabolismo reductor de sulfato, marcado por el consumo de sulfato y producción de ácido sulfhídrico y disminución en los niveles de potencial de óxido reducción; sin embargo no se obtuvo niveles adecuados de pH para la precipitación de carbonato de calcio, mineral que no fue detectado en la arena. En la columna L.S., donde también se estableció un metabolismo reductor de sulfato, se obtuvo un mayor consumo de sulfato y producción de ácido sulfhídrico, alcanzando un potencial de óxido-reducción óptimo con mayor rapidez, si bien el pH obtenido no fue adecuado para la precipitación de carbonato de calcio, el mineral (en forma de calcita), fue detectado en la arena de la columna. En el caso de la columna control sin biocida se quería controlar la presencia de bacterias reductoras de sulfato, funcionando sin el inóculo que se usó en la columna L.S. Allí, se logró observar un desarrollo de este metabolismo, más lento, obteniéndose mediciones similares a las de la columna L.S., aunque no en el mismo nivel, lo que se reflejó en un menor porcentaje de CaCO<sub>3</sub> encontrado en la arena. Por último, en la columna control con biocida no se observó actividad reductora de sulfato, así como tampoco se detectó carbonato de calcio en la arena de la columna.

En relación al metabolismo general al interior de las columnas, durante el funcionamiento de las columnas definitivas, en la columna L.S. se observó niveles de actividad microbiana considerables, los que con el tiempo disminuyen. En el caso de la columna control sin biocida, el nivel de actividad microbiana observada durante los primeros 100 días de operación fue más alto que en la columna L.S., luego de lo cual disminuyó drásticamente. Esto ocurre, a pesar de que la columna L.S. fue inoculada con microorganismos de un consorcio (bioaumentación) y en la control sin biocida se trabajó solo con los microorganismos naturalmente presentes en el agua de pozo. Por otra parte, en la columna control con biocida, se observó solo una mínima actividad microbiana.

Una explicación para este fenómeno es que la columna L.S. fue inoculada con efluente de una columna pequeña usada previamente en el Laboratorio de Biotecnología, donde ocurrió un proceso de selección de microorganismos reductores de sulfato provenientes de la muestra de microbialito del lago Sarmiento (Hurtado *et al.*, datos no publicados). Por otra parte, la columna control con biocida poseía un consorcio microbiano que no había sufrido un proceso previo de selección o enriquecimiento. Existiendo la posibilidad de la presencia de microorganismos capaces de tener actividad en condiciones microaerobias, los que en presencia de oxígeno podrían generar mayor cantidad de ATP que las bacterias reductoras de sulfato, sin un número mayor de bacterias. Se ha observado que bacterias aeróbicas pueden tener una concentración mayor de ATP intracelular que las bacterias reductoras de sulfato, en un orden de magnitud mayor (Cappitelli *et al.*, 2006; Tran & Unden, 1998), lo que coincide con los datos obtenidos en esta tesis. Finalmente, la disminución de la actividad microbiana, el día de operación 100 en la columna control sin biocida, se explicaría por la selección de microorganismos reductores de sulfato, que no producen altos niveles de ATP, debido a la coincidencia de la disminución de este parámetro con la aparición de ácido sulfhídrico en la columna.

En cuanto al tipo de microorganismos encontrados en las columnas, el análisis de metagenómica de la región V4 del rRNA 16 S de las muestras de efluentes de las distintas columnas, permitió establecer que en todas las muestras analizadas se encuentran



abundancias relativas no despreciables de OTUs correspondientes a géneros pertenecientes a bacterias reductoras de sulfato, con un aumento en la columna L.S. respecto a las encontradas en las columnas pequeñas y experimental.

La presencia de estos géneros de bacterias se ha descrito en otras instancias, principalmente en biorreactores para el tratamiento de aguas contaminadas con sulfato, ya sea de forma individual o en conjunto (Koschorreck *et al.*, 2010; Kaksonen *et al.*, 2007; Kaksonen *et al.*, 2008; Baldwin *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2014), también se ha encontrado casos con una mayor diversidad de bacterias reductoras de sulfato que las encontradas en las columnas estudiadas durante el desarrollo de esta tesis (Baldwin *et al.*, 2015; Roest, 2007; Zhou *et al.*, 2015; Burns *et al.*, 2012) .

En esta tesis, así como en otras investigaciones, se ha observado la presencia de arqueas metanogénicas junto a las bacterias reductoras de sulfato (Baldwin *et al.*, 2015; Roest, 2007; Raskin *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 2010). Se ha descrito que las arqueas metanogénicas conviven con bacterias reductoras de sulfato, en ocasiones compitiendo por la fuente de carbono, particularmente las del género *Methanosarcina*, las que usan acetato como donador de electrones, al igual que gran cantidad de BRS (Raskin *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 2010). Cuando hay presencia tanto de sulfato como de acetato, los niveles de organismos metanogénicos se mantienen bajos ya que las BRS son más eficientes en metabolizar la fuente de carbono, esto sin embargo cambia con una disminución en los niveles de sulfato, disminuyendo los niveles de BRS y aumentando las arqueas metanogénicas (Raskin *et al.*, 1996). Esto toma importancia considerando que durante el desarrollo de esta tesis los medios de cultivo utilizados contenían acetato como principal fuente de carbono, manteniéndose durante la mayoría del tiempo un dominio de las bacterias reductoras de sulfato, excepto durante el episodio de presencia de gas en la columna exploratoria (ver sección 5.1.1.).

Las diversas bacterias reductoras de sulfato se pueden clasificar de acuerdo a su capacidad de metabolizar distintas fuentes de carbono. Las que son capaces de metabolizar diversos donadores de electrones, como algunos ácidos grasos y acetato, liberando finalmente CO<sub>2</sub>,

tienen un metabolismo completo, mientras que las que pueden metabolizar fuentes de carbono solo hasta acetato (liberando acetato al medio) tienen un metabolismo incompleto (Stackebrandt, E., 2013; Kuever, J., & Galushko, A., 2014; Kuever, J., 2014a; Kuever, J., 2014b). Esto tiene importancia para esta tesis ya que se ha descrito que las bacterias con metabolismo completo tienden a aumentar el pH del medio donde se encuentran, mientras que las bacterias con metabolismo incompleto tienden a disminuirlo (Gallagher *et al.*, 2012; Kleikamper *et al.*, 2002). Al analizar los géneros de bacterias reductoras de sulfato encontrados en todas las muestras analizadas se observa que individuos pertenecientes a los géneros *Desulfosporosinus*, *Desulfotomaculum* y *Desulfomicrobium* pertenecen al grupo de bacterias reductoras de sulfato con oxidación incompleta de la fuente de carbono, salvo contadas excepciones, como *Desulfotomaculum intricatum* y *Desulfotomaculum defluvii* (Stackebrandt, E., 2013; Kuever, J., & Galushko, A., 2014; Kuever, J., 2014a; Kuever, J., 2014b). Si bien hay presencia de microorganismos del género *Desulfotomaculum*, donde se encuentran BRS de oxidación completa de la fuente de carbono, una mayor abundancia de bacterias reductoras de sulfato con oxidación incompleta de la fuente de carbono, donde destaca el 3,57% de abundancia relativa del género *Desulfomicrobium*, podría explicar la disminución en el pH observado durante el funcionamiento de todas las columnas.

El motor de alcalinidad es una serie de procesos metabólicos realizados por un consorcio de bacterias, entre las cuales se encuentran las bacterias reductoras de sulfato, donde el consumo consecutivo de distintas fuentes de carbono concluyen con la modificación del pH del medio (Gallagher *et al.*, 2012). Dentro de estos procesos metabólicos se pueden liberar compuestos que pueden ser utilizados a su vez por las bacterias reductoras de sulfato, algunos de estos, como el lactato, etanol y glicolato, contribuyen a la acidificación del medio mientras que otros, como acetato, formiato y H<sub>2</sub>, son neutras o contribuyen a la alcalinización del medio (Gallagher *et al.*, 2012).

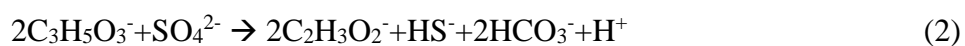
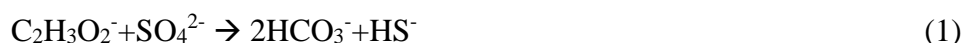
El acetato, principal fuente de carbono utilizada en los medios T.R y T.R final, fue probado previamente en el laboratorio, y se seleccionó como una fuente de carbono óptima para la alcalinización del medio (Pontigo, 2017). Si bien se esperaba que el uso de esta fuente de carbono contribuyera al aumento del pH del medio luego de su degradación por parte de las

BRS, tal como ocurrió en un estudio desarrollado por Han *et al.* (2016), esto no ocurrió, ya que se observó una disminución del pH en todas las columnas que funcionaron durante los experimentos de esta tesis.

Además de la presencia y actividad de bacterias reductoras de sulfato con metabolismo de oxidación incompleta, no se puede descartar que otras bacterias presentes en las columnas hayan contribuido a la disminución del pH, observada en las mediciones realizadas en el efluente de las columnas. Al analizar los resultados del análisis de metagenómica se observa que, al nivel taxonómico de clases, hay una alta abundancia relativa de organismos pertenecientes a la clase *Gammaproteobacteria* en el efluente de todas las columnas. Los microorganismos pertenecientes a la clase *Gammaproteobacteria* presentan distintos metabolismos, incluyendo los anaeróbicos estrictos y anaeróbicos facultativos, con la capacidad de fermentar distintas fuentes de carbono, liberando ácidos orgánicos en el proceso (Song & Lee, 2006; Octavia & Lan, 2014)..

Como conclusión, de acuerdo a la literatura, se esperaba que las bacterias reductoras de sulfato presente en las columnas pudiesen metabolizar todas las fuentes de carbono presentes en el medio de cultivo de forma completa, especialmente acetato, liberando CO<sub>2</sub> y contribuyendo al aumento del pH del sistema, lo que a su vez promovería la organomineralización (Jong & Parry, 2003; Braissant *et al.*, 2007). Sin embargo, durante el desarrollo de los experimentos se observó una acidificación en el efluente de las columnas, lo que podría deberse a la actividad de bacterias reductoras de sulfato que metabolizan los distintos donadores de electrones presentes en el medio de cultivo (citrato y otros presente en el extracto de levadura) solo hasta acetato, liberando protones en el proceso y disminuyendo el pH del sistema, dificultando el proceso de organomineralización (Han *et al.*, 2016). En el estudio realizado por Kleikemper *et al.* (2002) se indica que, de forma teórica, la oxidación incompleta de fuentes de carbono genera protones. De igual forma, Gallagher *et al.* (2012) determinaron que la oxidación incompleta de lactato generó protones.

Tomando todo esto en consideración, probablemente durante el funcionamiento de las columnas hubo desarrollo tanto de bacterias reductoras de sulfato de metabolismo completo (ecuación 1, utilizando acetato como donador de electrones) y metabolismo incompleto para la oxidación del donador de electrones (ecuación 2, utilizando lactato como donador de electrones), con una predominancia de estas últimas, lo que explicaría la disminución del pH detectado en el efluente de las columnas. En la Figura 31, se presenta de forma gráfica el metabolismo reductor de sulfato con oxidación completa del donador de electrones y con oxidación incompleta del donador de electrones, así como los efectos que tuvieron en distintos parámetros estudiados en el desarrollo de esta tesis.

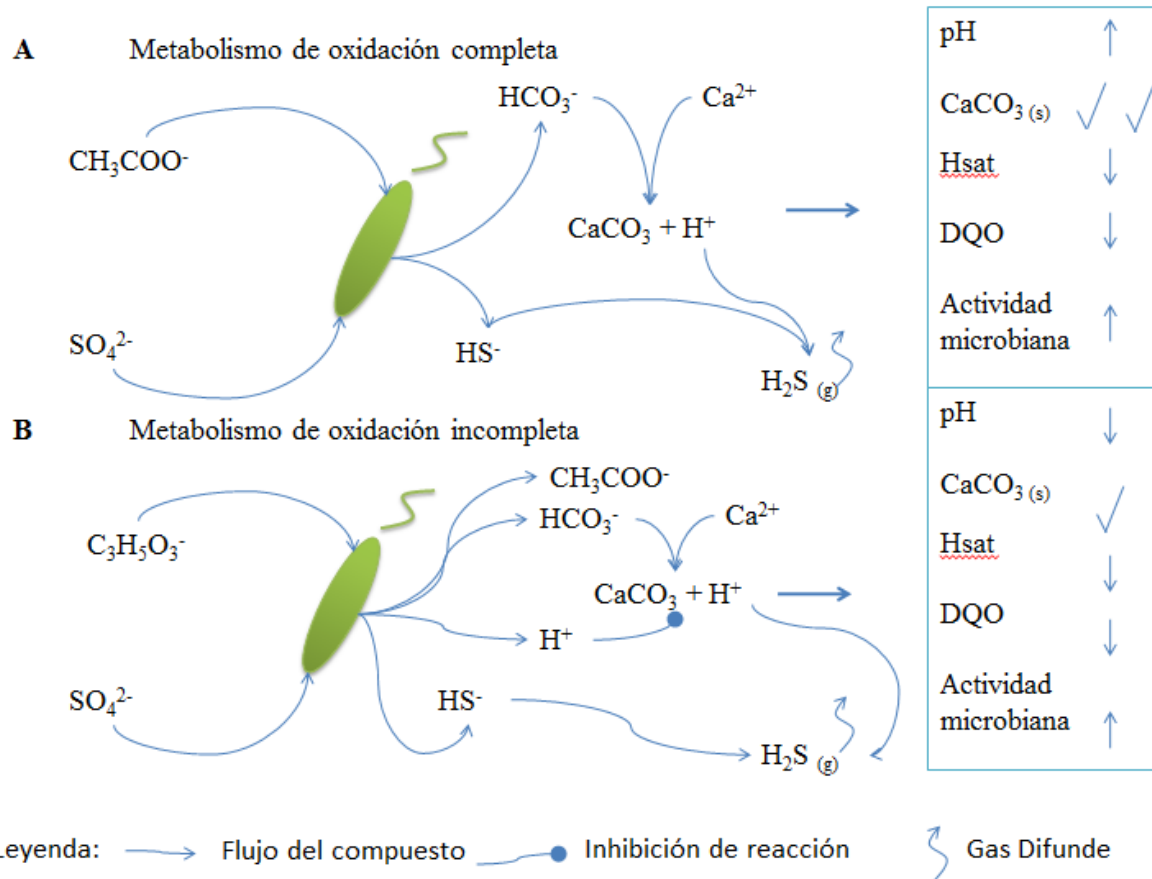


En todas las columnas con las que se trabajó durante el desarrollo de la tesis, no se logró incrementar el pH a valores por sobre el medio de cultivo (pH 7,9), lo que influyó en que no precipitara el carbonato de calcio al interior de las columnas.

En relación a esto, los resultados obtenidos del seguimiento del funcionamiento de todas las columnas, se encuentran dos factores que pudieron haber contribuido a las dificultades encontradas para aumentar el pH del medio de cultivo al interior de las columnas. Estos son la alta concentración de ácido sulfhídrico y la generación de protones durante la metabolización incompleta de fuentes de carbono.

Como se ha mencionado anteriormente, la generación de ácido sulfhídrico es un producto del metabolismo reductor de sulfato, por lo que se esperaba que se generara al interior de las columnas. El aumento de pH como consecuencia del metabolismo reductor de sulfato se explica por la necesidad de que el ácido sulfhídrico en solución sea retirado del sistema para que el aumento de pH en el medio efectivamente ocurra (Castanier *et al.*, 1999, Soetaert *et al.*, 2007). De forma natural esto ocurriría por la liberación del ácido sulfhídrico disuelto en forma de gas, precipitación de sulfuros de hierro o metabolización por parte de bacterias fotótrofas sulfuro oxigenogénicas (Castanier *et al.*, 1999; Wright, 1999; Soetaert

et al., 2007). A pesar de esto, en un momento, especialmente en la columna L.S., la concentración de ácido sulfhídrico medida en el efluente aumentó drásticamente, alcanzando concentraciones cercanas a los 180 mg/L.



**Figura 31.** Modelo del metabolismo reductor de sulfato con la oxidación completa del donador de electrones, resultando en un aumento del pH y precipitación de CaCO<sub>3</sub> (A). Metabolismo reductor de sulfato con la oxidación incompleta del donador de electrones (B) usando lactato, por ejemplo, como donador de electrones modelo, resultando en una mayor producción de protones, dificultando la precipitación de CaCO<sub>3</sub>. En ambos casos se indica el efecto del metabolismo sobre distintos parámetros medidos en el desarrollo de la tesis.

Considerando el diseño de las columnas, con una sola salida para efluente, así como su posición vertical, es probable que durante el desarrollo de los experimentos comenzara a generarse el compuesto, el que no fue detectado en el efluente hasta que este se acumuló ocupando todo el espacio posible en la columna. De esta forma, al momento de comenzar a detectar el ácido sulfhídrico en el efluente las concentraciones medidas no representaban las

encontradas al interior de la columna, donde las concentraciones eran más altas debido a la acumulación. Se ha observado que la presencia de ácido sulfhídrico en solución tiende a disminuir el pH de éstas (Koster *et al.*, 1986; Rinzema & Lettinga, 1988), lo que se refleja también en los resultados de esta tesis, a pesar de que se ha descrito que el metabolismo reductor de sulfato es capaz de aumentar el pH del medio y promover la organomineralización (Castanier *et al.*, 1999).

Además de la disminución del pH provocada por el H<sub>2</sub>S, como se mencionó en la sección 5.2.1.1, este compuesto también es tóxico, incluso para las mismas bacterias reductoras de sulfato, por lo que es necesario removerlo del sistema (McCartney & Oleszkiewicz, 1991; Reis *et al.*, 1992). Esto promovería la precipitación de CaCO<sub>3</sub> y evitaría efectos negativos para el medio ambiente y la salud humana.

Una alternativa para retirar el ácido del sistema es la precipitación de sulfuros metálicos, la que es utilizada actualmente en la minería como parte del tratamiento de los drenajes ácidos de minas, así como distintos metales (Wright, 1999; Garcia *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2000; Foucher *et al.*, 2001). El oxihidróxido de hierro es un compuesto con una alta capacidad de remoción de ácido sulfhídrico, formado en solución a partir de, por ejemplo, FeCl<sub>3</sub>, este forma el complejo FeOOH-HS<sup>-</sup>-H<sup>+</sup>, posteriormente precipitando el sulfuro y generando agua (Pyzik, 1981; Morse *et al.*, 1987). Sin embargo, al pH que funcionaron las columnas durante los experimentos el oxihidróxido de hierro tiende a precipitar, formando una suspensión que dificultaría el ingreso del compuesto al interior de las columnas y que este ocupe de forma uniforme el interior de estas, por lo que es necesario encontrar otra forma de retirar el ácido sulfhídrico, o encontrar una forma más eficaz de administrar el oxihidróxido de hierro, para promover la precipitación de carbonato de calcio.

El índice de saturación (IS) es un valor que indica la probabilidad de la precipitación de un mineral, el que está dado por la razón entre el producto de actividad iónica (IAP) de los iones que formen el mineral y la constante de solubilidad, produciéndose la precipitación cuando el valor de IS sea igual o superior a 1 (De Muynck *et al.*, 2010; Al-Tahwadi, 2011). En el caso del carbonato de calcio el IAP se ve afectado por el pH, debido a la mayor

presencia de iones carbonato a medida que este parámetro aumenta. Se ha descrito que si bien un IS igual o superior a 1 da cuenta de una precipitación del mineral consolidado, en el caso del  $\text{CaCO}_3$  se requiere de un valor de 0,8 para que este comience a precipitar (Dupraz *et al.*, 2009). Además, se ha descrito que la precipitación de carbonato de calcio puede iniciarse con niveles de pH de 7,3, sin embargo se consolida a pH más alcalinos (Bosak & Newman, 2003).

Lo anterior se observa en distintas investigaciones, donde se promueve la precipitación espontánea de carbonato de calcio con valores de pH sobre 8, principalmente en estudios realizados con bacterias ureolíticas (De Jong *et al.*, 2006; Bosak & Neuman, 2003; Fujita *et al.*, 2000; Gebauer *et al.*, 2008; Warren *et al.*, 2001) y algunas realizadas con bacterias reductoras de sulfato (Aloisi *et al.*, 2006; Braissant *et al.*, 2007; Deng *et al.*, 2010). Esto no ocurrió en las columnas utilizadas en el desarrollo de esta tesis, excepto en la columna L.S., donde posiblemente hubo aumentos de pH de forma localizada en la columna, permitiendo la precipitación del mineral en la arena más cercana a la base de la columna.

El carbonato de calcio encontrado al interior de la columna L.S. precipitó en forma de calcita. Es importante destacar que se ha descrito que las bacterias reductoras de sulfato promueven la precipitación de otros minerales de carbonato de calcio, como dolomita y aragonita (Deng *et al.*, 2010; De Jong *et al.*, 2006; Warren *et al.*, 2001). La precipitación de calcita al interior de la columna L.S., a diferencia de otros casos, probablemente se deba a la diferencia en las condiciones de cultivo de los microorganismos con los que se trabajó, desde la utilización de la columna empacada con arena, al pH y la temperatura al interior de esta.

En la columna L.S. se obtuvo la precipitación del mineral, junto a una disminución continua en los niveles de calcio medidos en el efluente, lo que se había observado en otros experimentos (Pontigo, 2017). En el caso de la columna exploratoria, si bien no se detectó carbonato de calcio en la arena, y no hubo mayor diferencia entre las mediciones de calcio desde el efluente y el medio de cultivo, la diferencia existente planteó la interrogante de qué había ocurrido con el calcio no detectado.

Durante el desarme de la columna exploratoria se detectó un sólido al interior de las mangueras del efluente de la columna, el que al ser analizado indicó que estaba formado en un 98% por carbonato de calcio. Posteriormente, durante el funcionamiento de las columnas definitivas, se observó en las salidas del efluente de las columnas la acumulación de un material sólido el que fue disuelto con ácido clorhídrico, para poder continuar con el normal funcionamiento de las columnas, observándose efervescencia, por lo que es posible que este material fuese carbonato de calcio.

La precipitación del mineral en las salidas de las columnas podría explicar la disminución en los niveles de calcio en el sistema (comparando las mediciones desde el efluente con las del medio de cultivo), lo que toma sentido al considerar que las mangueras de salida son de silicona, las que son permeable a gases, a diferencia de las mangueras de tygon utilizadas para la alimentación de las columnas, por lo que esta fue la única zona de los sistemas de columnas donde pudo haber contacto con el aire. Posiblemente el ácido sulfhídrico generado al interior de las columnas pudo haber difundido hacia el exterior, aumentando el pH del medio, y el índice de saturación y permitiendo la precipitación de carbonato de calcio. La salida del ácido del sistema se ha descrito como una etapa fundamental para la organmialización mediada por bacterias reductoras de sulfato (Castainer *et al.*, 1999), debido al aumento de pH producido, lo que fue también observado anteriormente en el laboratorio (Pontigo, 2017).

Durante el desarrollo de esta tesis se observó variaciones en la conductividad hidráulica de las columnas definitivas hacia el final de su funcionamiento, donde la disminución de este parámetro fue cercana al doble tanto en la columna L.S. y la columna control sin biocida, en relación a la columna control con biocida, indicando que parte de esta disminución estaría dada por la actividad microbiana observada en estas columnas.

Dentro de los factores que podrían explicar la disminución observada en la conductividad hidráulica de estas columnas destaca la formación de biopelículas. Si bien este es un mecanismo óptimo para la disminución de la conductividad hidráulica, ésta es más bien



localizada y proclive a perderse por factores ambientales que afecten la integridad de la biopelícula (Pintelon *et al.*, 2012), a diferencia de la precipitación de minerales que puedan resistir este daño.

Luego del desarme de la columna L.S se encontró un máximo de 0,34% de carbonato de calcio en la muestra de arena, mientras que en la columna control sin biocida se encontró un 0,09%. Estos valores no lograrían dar cuenta de la diferencia de la disminución de la conductividad hidráulica, en relación a la columna control, considerando que existen investigaciones donde se considera que se debe lograr un 1,3% de  $\text{CaCO}_3$  en una muestra para observar disminución en la conductividad hidráulica (Chu *et al.*, 2014). Por lo tanto, el proceso de colmatación podría deberse al efecto combinado de la acumulación de biomasa y de la precipitación de carbonato de calcio al interior de la columna L.S.

Finalmente, si bien no es posible asegurar que el carbonato de calcio precipitado en la arena de la columna L.S. haya influenciado en la disminución de la conductividad hidráulica de la columna, es posible que pueda explicar la mayor disminución del parámetro en comparación a la columna control sin biocida, en conjunto a la acumulación de biocida.

## 7. CONCLUSIONES

Luego del desarrollo de los experimentos de esta tesis y el análisis de los resultados obtenidos se obtienen las siguientes conclusiones:

Se logró escalar un proceso de organomineralización mediante el metabolismo reductor de sulfato a columnas con un volumen 350 veces mayor al de las columnas utilizadas en el Laboratorio de Biotecnología hasta el desarrollo de esta tesis (Pontigo, 2017).

Se estableció un metabolismo reductor de sulfato al interior de la columna exploratoria, identificándose OTUs asociados a los grupos *Desulfosporosinus* y *Desulfomicrobium*. En la columna definitiva de control sin biocida y en la columna L.S., también se encontraron OTUs pertenecientes a los grupos *Desulfosporosinus*, *Desulfotomaculum* y *Desulfomicrobium*, asociados a bacterias reductoras de sulfato.

Se logró detectar la precipitación de carbonato de calcio mediante organomineralización en las arenas pertenecientes a la columna control sin biocida con un porcentaje máximo de 0,09% de  $\text{CaCO}_3$  y en la columna L.S. un porcentaje máximo de 0,34%. En la columna L.S. el mineral precipitó en forma de calcita.

Se observó una disminución del pH de las columnas, el que pudo haber afectado negativamente la precipitación de carbonato de calcio. Esta reducción en el pH podría deberse al aumento de concentración de ácido sulfhídrico y la posible oxidación, solo hasta acetato, de los donadores de electrones por parte de bacterias reductoras de sulfato con metabolismo incompleto.

Se obtuvo una disminución en la conductividad hidráulica de la columna control sin biocida (61%) y de la columna L.S. (67%), ambas son aproximadamente el doble de la obtenida en la columna control con biocida (32%). Sin embargo, no es posible atribuir con seguridad esta disminución en la conductividad hidráulica a la organomineralización, debido a los bajos niveles encontrados en la arena de las columnas.

En resumen, con respecto a la hipótesis planteada, se demostró que es posible escalar el proceso de biocolmatación y organomineralización, a columnas con 350 veces el volumen de las utilizadas previamente en el Laboratorio de Biotecnología. Se logró establecer un metabolismo reductor de sulfato dominante, se observó disminución en la conductividad hidráulica de las columnas, así como la precipitación de carbonato de calcio en la arena.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Achal, V., Mukherjee, A., Basu, P. C., & Reddy, M. S. (2009). Strain improvement of *Sporosarcina pasteurii* for enhanced urease and calcite production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(7), 981-988.

Ahn, T. H., Chai, J., & Pan, C. (2015). Sigma: strain-level inference of genomes from metagenomic analysis for biosurveillance. *Bioinformatics*, 31(2), 170-177.

Airo A. 2010. Biotic and abiotic controls on the morphological and textural development of modern microbialites at Lago Sarmiento, Chile. Stanford University, Geological and Environmental Sciences Department, Ph.D. thesis, May 2010, 123 pp.

Al-Thawadi, S. M. (2011). Ureolytic bacteria and calcium carbonate formation as a mechanism of strength enhancement of sand. *J. Adv. Sci. Eng. Res*, 1(1), 98-114.

Aloisi, G., Gloter, A., Krüger, M., Wallman, K., Guyot, F., & Zuddas, P. (2006). Nucleation of calcium carbonate on bacterial nanoglobules. *Geology*, 34(12), 1017-1020.

American Public Health Association, American Water Works Association y Water Environment Federation. 1992a. "3500-Ca B ". En: "Standard methods for the examination of water and wastewater". Ed. 18.

American Public Health Association, American Water Works Association y Water Environment Federation. 1992a. "3111 A". En: "Standard methods for the examination of water and wastewater". Ed. 18.

American Public Health Association, American Water Works Association y Water Environment Federation. 1998a. "4500-SO4-2 E". En: "Standard methods for the examination of water and wastewater". Ed. 20.

American Public Health Association, American Water Works Association y Water Environment Federation. 1998b. "4500-S-2 D". En: "Standard methods for the examination of water and wastewater". Ed. 20.

Baldwin, D. S., & Mitchell, A. (2012). Impact of sulfate pollution on anaerobic biogeochemical cycles in a wetland sediment. *Water Research*, 46(4), 965-974.

Baldwin SA, Khoshnoodi M, Rezadehbashi M, Taupp M, Hallam S, Mattes A, Sanei H (2015) The microbial community of a passive biochemical reactor treating arsenic, zinc and sulfate-rich seepage. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 3:27.

Barkouki, T. H., Martinez, B. C., Mortensen, B. M., Weathers, T. S., de Jong, J. D., Ginn, T. R., . . . Fujita, Y. (2011). Forward and inverse bio-geochemical modeling of microbially induced calcite precipitation in half-meter column experiments. *Transport in Porous Media*, 90(1), 23-39.

Baumgartner, L. K., Reid, R. P., Dupraz, C., Decho, A. W., Buckley, D. H., Spear, J. R., . . . Visscher, P. T. (2006). Sulfate reducing bacteria in microbial mats: Changing paradigms, new discoveries. *Sedimentary Geology*, 185(3-4 SPEC. ISS.), 131-145.

Baveye, P., Vandevivere, P., Hoyle, B. L., DeLeo, P. C., & Sanchez De Lozada, D. (1998). Environmental impact and mechanisms of the biological clogging of saturated soils and aquifer materials. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 28(2), 123-191.

Biosand Filters Knowledge Base. How was the biosand filter pore volume determined? [en línea] <<http://www.biosandfilters.info/faq/how-was-biosand-filter-pore-volume-determined>> [consulta: 09 Agosto 2016].

Blauw, M., Lambert, J. W. M., & Latil, M. N. (2010). Biosealing: A method for in situ sealing of leakages. Paper presented at the *Geotechnical Society of Singapore* -

*International Symposium on Ground Improvement Technologies and Case Histories, ISGI'09*, 125-130.

Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.

Bosak, T., & Newman, D. K. (2003). Microbial nucleation of calcium carbonate in the Precambrian. *Geology*, 31(7), 577-580.

Braissant, O., Decho, A. W., Dupraz, C., Glunk, C., Przekop, K. M., & Visscher, P. T. (2007). Exopolymeric substances of sulfate-reducing bacteria: Interactions with calcium at alkaline pH and implication for formation of carbonate minerals. *Geobiology*, 5(4), 401-411.

Burns, A. S., Pugh, C. W., Segid, Y. T., Behum, P. T., Lefticariu, L., & Bender, K. S. (2012). Performance and microbial community dynamics of a sulfate-reducing bioreactor treating coal generated acid mine drainage. *Biodegradation*, 23(3), 415-429.

Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., ... Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7(5), 335-336.

Cappitelli, F., Zanardini, E., Ranalli, G., Mello, E., Daffonchio, D., & Sorlini, C. (2006). Improved methodology for bioremoval of black crusts on historical stone artworks by use of sulfate-reducing bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 72(5), 3733-3737.

Castanier, S., Le Métayer-Levrel, G., & Perthuisot, J. P. (1999). Ca-carbonates precipitation and limestone genesis—the microbiogeologist point of view. *Sedimentary Geology*, 126(1), 9-23.

Chang, H. T., Rittmann, B. E., Amar, D., Heim, R., Ehlinger, O., & Lesty, Y. (1991). Biofilm detachment mechanisms in a liquid- fluidized bed. *Biotechnology and Bioengineering*, 38(5), 499-506.

Chang, I. S., Shin, P. K., & Kim, B. H. (2000). Biological treatment of acid mine drainage under sulphate-reducing conditions with solid waste materials as substrate. *Water research*, 34(4), 1269-1277.

Chen, C., Ren, N., Wang, A., Yu, Z., & Lee, D. -. (2008). Microbial community of granules in expanded granular sludge bed reactor for simultaneous biological removal of sulfate, nitrate and lactate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(6), 1071-1077.

Chu, J., Ivanov, V., Naeimi, M., Stabnikov, V., & Liu, H. -. (2014). Optimization of calcium-based bioclogging and biocementation of sand. *Acta Geotechnica*, 9(2), 277-285.

Cunningham, A. B., Characklis, W. G., Abedeen, F., & Crawford, D. (1991). Influence of biofilm accumulation on porous media hydrodynamics. *Environmental Science and Technology*, 25(7), 1305-1311.

De Jong, J. T., Fritzges, M. B., & Nüsslein, K. (2006). Microbially induced cementation to control sand response to undrained shear. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 132(11), 1381-1392.

De Jong, J. T., Soga, K., Kavazanjian, E., Burns, S., Van Paassen, L. A., AL Qabany, A., ... Weaver, T. (2013). Biogeochemical processes and geotechnical applications: Progress, opportunities and challenges. *Geotechnique*, 63(4), 287-301.

De Muynck, W., De Belie, N., & Verstraete, W. (2010). Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review. *Ecological Engineering*, 36(2), 118-136.

De Santis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., ... Andersen, G. L. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 5069-5072.

Decreto n° 248. Diario Oficial de la República de Chile, Santiago, Chile, 11 de Abril de 2007.

Deng, S., Dong, H., Lv, G., Jiang, H., Yu, B., & Bishop, M. E. (2010). Microbial dolomite precipitation using sulfate reducing and halophilic bacteria: Results from qinghai lake, tibetan plateau, NW china. *Chemical Geology*, 278(3-4), 151-159.

Demergasso, C., Casamayor, E. O., Chong, G., Galleguillos, P., Escudero, L., & Pedrós-Alió, C. (2004). Distribution of prokaryotic genetic diversity in athalassohaline lakes of the atacama desert, northern Chile. *FEMS Microbiology Ecology*, 48(1), 57-69.

Dold, B. (2014). Submarine tailings disposal (STD)—A review. *Minerals*, 4(3), 642-666.

Dupraz, C., Reid, R. P., Braissant, O., Decho, A. W., Norman, R. S., & Visscher, P. T. (2009). Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats. *Earth-Science Reviews*, 96(3), 141-162.

Electron Microscopy Sciences. Petroff-Hausser Counting Chamber. [en línea] <<https://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/datasheet/63512-20.aspx>> [consulta: 02 abril de 2017].

Elliott, M. A., Stauber, C. E., Koksal, F., DiGiano, F. A., & Sobsey, M. D. (2008). Reductions of *E. coli*, echovirus type 12 and bacteriophages in an intermittently operated household-scale slow sand filter. *Water research*, 42(10), 2662-2670.

Filet, A. E., Gadret, J. P., Loygue, M., & Borel, S. (2012). Biocalcis and its applications for the consolidation of sands. In *Grouting and deep mixing 2012* (pp. 1767-1780).



Foucher, S., Battaglia-Brunet, F., Ignatiadis, I., & Morin, D. (2001). Treatment by sulfate-reducing bacteria of Chessy acid-mine drainage and metals recovery. *Chemical Engineering Science*, 56(4), 1639-1645.

Fujita, Y., Ferris, F. G., Lawson, R. D., Colwell, F. S., & Smith, R. W. (2000). Calcium carbonate precipitation by ureolytic subsurface bacteria. *Geomicrobiology Journal*, 17(4), 305-318.

Gallagher, K. L., Kading, T. J., Braissant, O., Dupraz, C., & Visscher, P. T. (2012). Inside the alkalinity engine: The role of electron donors in the organomineralization potential of sulfate-reducing bacteria. *Geobiology*, 10(6), 518-530.

Gallagher, K. L., Dupraz, C., & Visscher, P. T. (2014). Two opposing effects of sulfate reduction on carbonate precipitation in normal marine, hypersaline, and alkaline environments: Comment. *Geology*, 42(1).

Garcia, C., Moreno, D. A., Ballester, A., Blazquez, M. L., & Gonzalez, F. (2001). Bioremediation of an industrial acid mine water by metal-tolerant sulphate-reducing bacteria. *Minerals Engineering*, 14(9), 997-1008.

Gebauer, D., Völkel, A., & Cölfen, H. (2008). Stable prenucleation calcium carbonate clusters. *Science*, 322(5909), 1819-1822.

Gestión Ambiental Consultores S.A. (2011). Estudio de impacto ambiental proyecto expansión andina 244, Anexo n° 4.4: Modelo Conceptual del Tranque Ovejería. Recuperado de <http://sea.gob.cl/>.

Geurts, J. J. M., Sarneel, J. M., Willers, B. J. C., Roelofs, J. G. M., Verhoeven, J. T. A., & Lamers, L. P. M. (2009). Interacting effects of sulphate pollution, sulphide toxicity and

eutrophication on vegetation development in fens: A mesocosm experiment. *Environmental Pollution*, 157(7), 2072-2081.

Guo, H., Cheng, X., & Li, M. (2013). Experimental analysis of bio-stimulated sealing process in environmental geotechnical engineering. *Science China Technological Sciences*, 56(3), 732-738.

Han, X., Schultz, L., Zhang, W., Zhu, J., Meng, F., & Geesey, G. G. (2016). Mineral formation during bacterial sulfate reduction in the presence of different electron donors and carbon sources. *Chemical Geology*, 435, 49-59.

Illumina: Highspeed multiplexed 16S microbial sequencing on the MiSeq System. Application Note: DNA Sequencing. [https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/appnotes/appnote\\_miseq\\_16S.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/appnotes/appnote_miseq_16S.pdf).

Ismail, M., Yahaya, N., Bakar, A. A., & Noor, N. M. (2014). Cultivation of sulphate reducing bacteria in different media. *Malaysian Journal of Civil Engineering* 26(3):456-465.

Ivanov, V., & Chu, J. (2008). Applications of microorganisms to geotechnical engineering for bioclogging and biocementation of soil in situ. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 7(2), 139-153.

Jong, T., & Parry, D. L. (2003). Removal of sulfate and heavy metals by sulfate reducing bacteria in short-term bench scale upflow anaerobic packed bed reactor runs. *Water Research*, 37(14), 3379-3389.

Kaksonen, A. H., Spring, S., Schumann, P., Kroppenstedt, R. M., & Puhakka, J. A. (2007). *Desulfurispora thermophila* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, spore-forming sulfate-reducer isolated from a sulfidogenic fluidized-bed reactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(5), 1089-1094.

Kaksonen, A. H., Spring, S., Schumann, P., Kroppenstedt, R. M., & Puhakka, J. A. (2008). *Desulfotomaculum alcoholivorax* sp. nov., a moderately thermophilic, spore-forming, sulfate-reducer isolated from a fluidized-bed reactor treating acidic metal- and sulfate-containing wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(4), 833-838.

Karol, R. H. (2003). *Chemical grouting and soil stabilization, revised and expanded* (Vol. 12). p. 124. CRC Press.

Kleikamper, J., Pelz, O., Schroth, M. H., & Zeyer, J. (2002). Sulfate-reducing bacterial community response to carbon source amendments in contaminated aquifer microcosms. *FEMS microbiology ecology*, 42(1), 109-118.

Koschorreck, M., Geller, W., Neu, T., Kleinsteuber, S., Kunze, T., Trosiener, A., & Wendt-Potthoff, K. (2010). Structure and function of the microbial community in an in situ reactor to treat an acidic mine pit lake. *FEMS Microbiology Ecology*, 73(2), 385-395.

Koster, I. W., Rinzema, A., De Vegt, A. L., & Lettinga, G. (1986). Sulfide inhibition of the methanogenic activity of granular sludge at various pH-levels. *Water Research*, 20(12), 1561-1567.

Kuever, J., & Galushko, A. (2014). The family Desulfomicrobiaceae. *The prokaryotes: Deltaproteobacteria and epsilonproteobacteria* (pp. 97-102).

Kuever, J. (2014). The family Desulfobacteraceae. *The prokaryotes: Deltaproteobacteria and epsilonproteobacteria* (pp. 45-73).

Kuever, J. (2014). The family Desulfohalobiaceae. *The prokaryotes: Deltaproteobacteria and epsilonproteobacteria* (pp. 87-95).

Lamers, L. P. M., Ten Dolle, G. E., Van Den Berg, S. T. G., Van Delft, S. P. J., & Roelofs, J. G. M. (2001). Differential responses of freshwater wetland soils to sulphate pollution. *Biogeochemistry*, 55(1), 87-102.

Liao, H., Zhao, K., Lambert, J. W., & Veenbergen, V. (2007). Experimental study on biosealing technology for seepage prevention. [en línea] <<http://www.chincold.org.cn/zt/learning3/liaohongzhi.pdf>> [consulta: 24 abril de 2015].

Liu, X., Monger, H. C., & Whitford, W. G. (2007). Calcium carbonate in termite galleries - biomineralization or upward transport? *Biogeochemistry*, 82(3), 241-250.

Martin, D., Dodds, K., Ngwenya, B. T., Butler, I. B., & Elphick, S. C. (2012). Inhibition of *Sporosarcina pasteurii* under anoxic conditions: Implications for subsurface carbonate precipitation and remediation via ureolysis.

Martinez, B. C., Barkouki, T. H., DeJong, J. D., & Ginn, T. R. (2011). Upscaling microbial induced calcite precipitation in 0.5 m columns: Experimental and modeling results. In *Geo-Frontiers 2011: Advances in Geotechnical Engineering* (pp. 4049-4059).

McCartney, D. M., & Oleszkiewicz, J. A. (1991). Sulfide inhibition of anaerobic degradation of lactate and acetate. *Water Research*, 25(2), 203-209.

McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE*, 8(4).

Morse, J. W., Millero, F. J., Cornwell, J. C., & Rickard, D. (1987). The chemistry of the hydrogen sulfide and iron sulfide systems in natural waters. *Earth-Science Reviews*, 24(1), 1-42.

Norma n°409/1. Diario Oficial de la República de Chile, Santiago, Chile, 16 de Julio de 2006.

Octavia, S., & Lan, R. (2014). The family enterobacteriaceae. *The Prokaryotes: Gammaproteobacteria*, 225-286.

Petersen, G. W., Chesters, G., & Lee, G. B. (1966). Quantitative determination of calcite and dolomite in soils. *European Journal of Soil Science*, 17(2), 328-338.

Pintelon, T. R., Piciooreanu, C., van Loosdrecht, M. C., & Johns, M. L. (2012). The effect of biofilm permeability on bio-clogging of porous media. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(4), 1031-1042.

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 J.R. (1984) *The Sulphate Reducing Bacteria*. Cambridge University Press, Cambridge.

Pyzik, A. J., & Sommer, S. E. (1981). Sedimentary iron monosulfides: kinetics and mechanism of formation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 45(5), 687-698.

Ramírez, N. (2007). Guía técnica de operación y control de depósitos de relaves. *Santiago: SERNAGEOMIN*.

Raskin, L., Rittmann, B. E., & Stahl, D. A. (1996). Competition and coexistence of sulfate-reducing and methanogenic populations in anaerobic biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(10), 3847-3857.

Rasuk, M. C., Fernández, A. B., Kurth, D., Contreras, M., Novoa, F., Poiré, D., & Farías, M. E. (2016). Bacterial diversity in microbial mats and sediments from the atacama desert. *Microbial Ecology*, 71(1), 44-56.

Reid, R. P., Visscher, P. T., Decho, A. W., Stolz, J. F., Bebout, B. M., Dupraz, C., . . . DesMarais, D. J. (2000). The role of microbes in accretion, lamination and early lithification of modern marine stromatolites. *Nature*, 406(6799), 989-992.

Reis, M. A. M., Almeida, J. S., Lemos, P. C., & Carrondo, M. J. T. (1992). Effect of hydrogen sulfide on growth of sulfate reducing bacteria. *Biotechnology and bioengineering*, 40(5), 593-600.

Rinzema A, Lettinga G. Anaerobic treatment of sulfate containing waste water. In: Wise DL, editor. Biotreatment Systems, vol. III. Boca Raton, FL: CRC Press, 1988. p. 65-109.

Roest, K., (2007) Microbial community analysis in sludge of anaerobic wastewater treatment systems. PhD thesis, Wageningen University.

Seki, K., Suko, T., and Miyazaki, T. Bioclogging of Glass Beads by Bacteria and Fungi. Transactions of the World Congress of Soil Science, Symposium no. 51, Paper no. 1244: 1244-1 – 144-8, 2002.

Seki, K. (2013). Biological Clogging of Sand Columns. *Open Journal of Soil Science*, Vol. 3 No. 3, pp. 148-152. doi:10.4236/ojss.2013.33017.

SERNAGEOMIN (2003) Guía de buenas prácticas ambientales para la pequeña minería. Registro de Propiedad Intelectual N° 134.326 ISBN 956-8038-03-5. pp. 4.

Soetaert, K., Hofmann, A. F., Middelburg, J. J., Meysman, F. J. R., & Greenwood, J. (2007). Reprint of "the effect of biogeochemical processes on pH". *Marine Chemistry*, 106(1-2 SPEC. ISS.), 380-401.

Song, H., & Lee, S. Y. (2006). Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme and microbial technology*, 39(3), 352-361.

Solari, M. (2011). Estromatolitos y trombolitos: Fósiles vivientes en Torres del Paine, Patagonia. [En línea]

<[http://www.anilloantartico2.uchile.cl/doc/Solari\\_difusion\\_microbialitas\\_2011.pdf](http://www.anilloantartico2.uchile.cl/doc/Solari_difusion_microbialitas_2011.pdf)>

[Consulta: 25 de Mayo de 2017]

Soucek, D. J., & Kennedy, A. J. (2005). Effects of hardness, chloride, and acclimation on the acute toxicity of sulfate to freshwater invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(5), 1204-1210.

Stackebrandt, E. (2013). The emended family peptococcaceae and description of the families desulfitobacteriaceae, desulfotomaculaceae, and thermincolaceae. *The prokaryotes: Firmicutes and tenericutes* (pp. 285-290).

Tchernitchin, A. N., & Herrera, L. (2006). Relaves mineros y sus efectos en salud, medio ambiente y desarrollo económico. Ejemplo de relave en el valle de Chacabuco Polpaico. *Cuaderno Médico Social*, 46, 22-43.

Tran, Q. H., & Uden, G. (1998). Changes in the proton potential and the cellular energetics of *Escherichia coli* during growth by aerobic and anaerobic respiration or by fermentation. *European journal of biochemistry*, 251(1- 2), 538-543.

Vahabi, A., Ramezani pour, A. A., Sharafi, H., Zahiri, H. S., Vali, H., & Noghabi, K. A. (2015). Calcium carbonate precipitation by strain *Bacillus licheniformis* AK01, newly isolated from loamy soil: A promising alternative for sealing cement-based materials. *Journal of Basic Microbiology*, 55(1), 105-111.

Vandevivere, P., & Baveye, P. (1992). Effect of bacterial extracellular polymers on the saturated hydraulic conductivity of sand columns. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(5), 1690-1698.

Vandevivere, P., & Baveye, P. (1992). Relationship between transport of bacteria and their clogging efficiency in sand columns. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(8), 2523-2530.

Visscher, P. T., Reid, R. P., & Bebout, B. M. (2000). Microscale observations of sulfate reduction: correlation of microbial activity with lithified micritic laminae in modern marine stromatolites. *Geology*, 28(10), 919-922.

Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. (2016) VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. PeerJ 4:e2584. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>

Warren, L. A., Maurice, P. A., Parmar, N., & Ferris, F. G. (2001). Microbially mediated calcium carbonate precipitation: implications for interpreting calcite precipitation and for solid-phase capture of inorganic contaminants. *Geomicrobiology Journal*, 18(1), 93-115.

WHO (2003) *Sulfate in drinking-water. Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality. Geneva, World Health Organization (WHO/SDE/WSH/03.04/114).*

Williams, K. H., Long, P. E., Davis, J. A., Wilkins, M. J., N'Guessan, A. L., Steefel, C. I., ... Lovley, D. R. (2011). Acetate availability and its influence on sustainable bioremediation of uranium-contaminated groundwater. *Geomicrobiology Journal*, 28(5-6), 519-539.

Wright, D. T. (1999). The role of sulphate-reducing bacteria and cyanobacteria in dolomite formation in distal ephemeral lakes of the Coorong region, South Australia. *Sedimentary Geology*, 126(1), 147-157.

Zhang, H., Guo, H., Li, M., & Cheng, X. (2011). Experiment research from macro to micro on microbial-induced clogging by adding potato soup in beijing sand column. Paper presented at the *Geotechnical Special Publication*, (211 GSP) 4089-4098.



Zheng, B., Wang, L., & Liu, L. (2014). Bacterial community structure and its regulating factors in the intertidal sediment along the liaodong bay of bohai sea, china. *Microbiological Research*, 169(7-8), 585-592.

Zhou, J., Zhou, X., Li, Y., & Xing, J. (2015). Bacterial communities in haloalkaliphilic sulfate-reducing bioreactors under different electron donors revealed by 16S rRNA MiSeq sequencing. *Journal of Hazardous Materials*, 295, 176-184.