



BIOCORROSIÓN DE MUESTRAS DE HORMIGÓN EN CONDICIONES CONTROLADAS DE LABORATORIO.

Frank Ernesto Gordis Santana.

Trabajo entregado para la obtención del grado de Máster
en Tecnología Ambiental.

Modalidad: Investigación.

Diciembre/2023

Directores:

Francisco Córdoba García.
Universidad de Huelva

Julio Castillo Hernández
Natural and Agricultural Sciences, South Africa

Francisco Córdoba García, Catedrático de Biología Celular del Departamento de Ciencias Integradas de la Universidad de Huelva y **Julio Castillo Hernández**, Investigador Senior de la Facultad de Ciencias Naturales y Agricultura de Bloemfontein (Sudáfrica)

INFORMAN:

Que el trabajo titulado: **Biocorrosión de muestras de hormigón en condiciones controladas de laboratorio**, presentado por **D. Frank Ernesto Gordis Santana** con D.N.I.: **Z0284922A**, ha sido realizado en **Laboratorio de Biología de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Huelva**”, bajo nuestra dirección, autorizando su presentación y defensa como **Trabajo Fin de Máster** (Modalidad: **Trabajo de Investigación**), para el Máster Universitario en Tecnología Ambiental de la Universidad de Huelva.

En Huelva, a 10 de diciembre de 2023

F. Córdoba

J. Castillo

RESUMEN

La Faja Pirítica es considerada como una de las mayores concentraciones de sulfuros masivos de la corteza terrestre. En un escenario ambiental inusual que refleja la belleza de un ambiente geológico que durante siglos ha sido testigo de extracciones de los minerales que se concentran en sus depósitos y donde, la presencia de estructuras de hormigón asociados a la minería y las actividades de la construcción y geológicas han progresado, se hace evidente la degradación de cientos de kilómetros de la red fluvial por el Drenaje Ácido de Mina (AMD) que transporta una serie de minerales que en contacto con el oxígeno produce reacciones químicas capaces de liberar al medio cantidades ingentes de metales como el hierro que le otorga al río su color característico. Estas reacciones catalizadas por la acción de agentes químicos y de organismos extremófilos que encuentran las condiciones ideales en estos ecosistemas para multiplicarse, provocan la acidez a partir de un proceso que durante miles de años ha provocado la oxidación de los sulfuros que afloran. Por tanto, en este contexto la vulnerabilidad de estructuras de hormigón asociadas a las actividades mineras es alta puesto que la oxidación microbológica está incidiendo negativamente sobre los elementos estructurales manifestándose en estos: agrietamientos, pérdida de volumen y la oxidación anticipada en acero y hormigón.

Con el objetivo de analizar el potencial oxidativo de los consorcios bacterianos propios de las aguas afectadas por AMD se investigó su actividad sobre probetas de hormigón bajo condiciones controladas de laboratorio. En los experimentos realizados se midieron la evolución del pH, conductividad y potencial redox, la proporción de Fe^{2+}/Fe^{3+} , la concentración de diversos elementos químicos mediante ICP-óptico. También se analizaron los precipitados formados mediante SEM-EDS y se realizó un seguimiento macro- y microscópico de las muestras.

Los resultados obtenidos muestran efectos diferenciales cuando el hormigón se cultivó en medios que contenían bacterias con relación a los medios esterilizados por filtración.

Estos resultados se discuten sobre la función catalítica de las bacterias quimiolitotrofas oxidantes de hierro y/o azufre (como *Acidithiobacillus* o *Leptospirillum*) así como de otras bacterias heterótrofas que pueden oxidar compuestos orgánicos usando iones férricos como aceptores de electrones (ej. *Acidiphillum* sp)

ABSTRACT

The Pyritic Belt is considered one of the largest concentrations of massive sulfides in the Earth's crust. In an unusual environmental scenario that reflects the beauty of a geological environment that has witnessed mineral extractions concentrated in its deposits for centuries, the presence of concrete structures associated with mining, construction activities, and geological advancements highlights the degradation of hundreds of kilometers of river networks due to Acid Mine Drainage (AMD). This drainage carries a series of minerals that, upon contact with oxygen, trigger chemical reactions capable of releasing vast amounts of metals into the environment, such as iron, which gives the river its characteristic color.

These reactions, catalyzed by chemical agents and extremophilic organisms finding ideal conditions in these ecosystems to multiply, cause acidity through a process that, for thousands of years, has resulted in the oxidation of the exposed sulfides. Consequently, in this context, the vulnerability of concrete structures associated with mining activities is high, given that microbiological oxidation is negatively impacting the structural elements, leading to cracking, volume loss, and premature oxidation in both steel and concrete.

To analyze the oxidative potential of bacterial consortia present in waters affected by AMD, their activity on concrete test specimens was investigated under controlled laboratory conditions. The experiments measured the evolution of pH, conductivity, redox potential, the Fe²⁺/Fe³⁺ ratio, the concentration of various chemical elements via Optical ICP, and analyzed the precipitates formed using SEM-EDS. Macro- and microscopic monitoring of the samples was also conducted.

The results obtained revealed differential effects when concrete was cultivated in media containing bacteria compared to media sterilized by filtration. These results are discussed concerning the catalytic function of iron- and sulfur-oxidizing chemolithotrophic bacteria (such as *Acidithiobacillus* or *Leptospirillum*) as well as other heterotrophic bacteria capable of oxidizing organic compounds using ferric ions as electron acceptors (e.g., *Acidiphilium* sp).

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Antecedentes generales.....	1
1.2	Estructuras de hormigón en la minería.....	2
1.3	Generación de drenajes ácidos y organismos extremófilos.	3
1.4	Los microorganismos extremófilos de las aguas afectadas por AMD en la Faja Pirítica Ibérica.	5
1.5	La biocorrosión y configuración del paisaje.....	6
2	OBJETIVOS.	10
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
3.1	Origen de los consorcios bacterianos.	11
3.2	Características del hormigón.....	12
3.3	Preparación del medio de cultivo.	12
3.4	Enriquecimiento bacteriano.....	13
3.5	Determinación de parámetros físico-químicos	13
3.6	Determinación de las especies de hierro.	13
3.6.1	Fundamento	13
3.6.2	Materiales y reactivos	14
3.6.3	Preparación de la recta de calibración.....	14
3.6.4	Análisis de hierro de las muestras	15
3.7	Determinación de la concentración de elementos químicos	16
3.8	Análisis de los precipitados mediante SEM-EDS	16
3.9	Caracterización de las comunidades bacterianas	17
3.9.1	Extracción de ADN	17
3.9.2	Secuenciación de amplicones de ARNr 16S.	17
3.9.3	Bioinformática y análisis estadístico.	17
4	RESULTADOS.....	19
4.1	Características de las muestras de agua de la Rivera de Agustín.	19
4.2	Enriquecimiento y adaptación de los consorcios bacterianos.	19
4.3	Efecto de la incubación con aguas de la Rivera de Agustín sobre una muestra de hierro fundido.	22
4.4	Efecto de la incubación con aguas de la Rivera de Agustín sobre piezas de hormigón, en presencia o ausencia de hierro (II).	25
4.5	Efecto de la incubación con aguas de la Rivera de Agustín sobre piezas de hormigón, en presencia o ausencia de acero y/o S elemental.	29
4.6	Efecto de la incubación continua de piezas de hormigón en medio que incluye exclusivamente aguas de la Rivera de Agustín.	36
5	DISCUSIÓN.....	44
6	CONCLUSIONES.....	51
7	REFERENCIAS.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Mapa geológico de la zona sudportuguesa incluyendo las localizaciones más importantes de depósitos de sulfuros masivos dentro de la Faja Pirítica Ibérica (Almodóvar, et al., 2019).....	1
Figura 2. Interacciones durante el Drenaje Ácido de Minas. (Chen et al., 2016)6	6
Figura 3. Resumen gráfico del metabolismo de <i>A. ferrooxidans</i> . (Valdés, et al., 2008)	7
Figura 4. Mecanismo de la corrosión influenciada microbiológicamente (MIC) de hierro por bacterias reductoras de sulfato. (Tripathi et al., 2021)	8
Figura 5. Mapa de situación de la zona de muestreo.	11
Figura 6. Zona de muestreo y pértiga usada para recoger las muestras de agua.	11
Figura 7. Formación de complejo Fe ²⁺ -fenantrolina.	13
Figura 8. Variaciones de color según la concentración de hierro.	14
Figura 9. Recta-patrón de calibración de hierro.....	15
Figura 10. Microscopio SEM-EDS (izquierda) y muestras de precipitados (derecha).....	16
Figura 11. Metales en la Rivera de Agustín.....	19
Figura 12. Cambios visibles tras una semana de incubación de muestras de agua inoculadas en medio 9K + FeSO ₄ . En el frasco B, el inóculo fuero esterilizado por filtración, mientras que el frasco M contenía inóculo no filtrado.	20
Figura 13. En A se observan bacterias aisladas al comienzo del periodo de incubación (tiempo 0). En B, el número de bacterias es muy elevado (tras 4 semanas de incubación)	20
Figura 14. En A se muestra la variación de pH, conductividad (EC) y potencial redox (ORP) tras 4 semanas de incubación en ausencia (B) o presencia de bacterias (M). El valor de 100 se corresponde al medido a tiempo 0. En B se muestra la proporción de hierro reducido.....	21
Figura 15. Aspecto inicial de la pieza de hierro (arriba) y aspecto final tras 4 semanas de incubación en medio 9K + inóculo de la Rivera de Agustín (10% v/v).	22
Figura 16. Extraordinario desarrollo de las poblaciones bacterianas tras la incubación de la pieza de hierro en medio 9K + inóculo de la Rivera de Agustín (10% v/v). Obsérvese la presencia de sedimentos.	23
Figura 17. Imagen de SEM-EDS y análisis elemental de precipitados resultado de la incubación de una pieza industrial de hierro fundido en medio 9K + 10% inóculo de la Rivera de Agustín.....	23
Figura 18. Evolución del pH (A), conductividad (B) y potencial redox (C) en el medio de incubación de la pieza industrial de hierro. Las flechas indican la adición de nuevo medio 9K + inóculo de la Rivera de Agustín.....	24

Figura 19. Variación de peso de las piezas de hormigón.	25
Figura 20. Evolución del pH, conductividad y potencial redox en los diferentes tratamientos.....	27
Figura 21 Concentración de metales en el medio	28
Figura 22. Proporción de Fe ²⁺ / Fe ³⁺ en el medio.	28
Figura 23. Cambios visibles en el color del medio de cultivo tras 30 días de incubación. A la izquierda, la fotografía corresponde al tiempo 0.	29
Figura 24. Variaciones del peso en las piezas de hormigón y de acero. Los números corresponden al peso expresado en gramos.	30
Figura 25. Evolución del pH (A), conductividad (B) y potencial redox (C) en el medio de incubación. Las flechas indican la adición de nuevo medio 9K + inóculo de la Rivera de Agustín.....	32
Figura 26. Concentración de elementos químicos en los medios de cultivo al final del periodo de incubación.....	33
Figura 27. Proporción de Fe ²⁺ y Fe ³⁺ (expresado en porcentaje) en los diferentes tratamientos.....	34
Figura 28. Imagen y análisis químico de precipitados por SEM-EDS.....	35
Figura 29. Montaje experimental de flujo continuo de agua de la Rivera de Agustín (estéril o con bacterias) sobre piezas de hormigón.....	37
Figura 30. Evolución del pH (A), conductividad (B) y potencial redox (C) en los cultivos.	38
Figura 31. Evolución de la concentración de hierro en los medios estéril y no estéril (A) y de la proporción Fe(II)/Fe(III) en ambos tratamientos (B)	39
Figura 32. A la izquierda, pieza de hormigón en medio estéril; a la derecha, en medio con bacterias.	40
Figura 33. (A) Cristales (flechas) en gránulos precipitados bajo una lupa binocular (B) Numerosos cristales en una extensión de los gránulos precipitados. (C). Bacterias en el medio de cultivo.....	40
Figura 34. Diversidad microbiana de las muestras de hormigón (Bio: con bacterias; Est: estéril) y del inóculo de la Rivera de Agustín (AMD).....	41
Figura 35. Análisis de componentes principales de las comunidades bacterianas de los reactores (Bio: con bacterias; Est: estéril) y del inóculo de la Rivera de Agustín (AMD).....	42
Figura 36. Análisis de redundancia donde se incluyen los géneros bacterianos y su procedencia, así como diversos parámetros físico-químicos.....	43

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Aplicaciones de microorganismos en la recuperación de metales de diversos residuos.	9
Tabla 2. Composición del hormigón.....	12
Tabla 3. Composición del medio 9K.	13
Tabla 4. Protocolo para la preparación de los patrones de calibración.....	14
Tabla 5. Protocolo para el análisis de las especies de hierro en las muestras	15
Tabla 6. Parámetros físico-químicos de la Rivera de Agustín.....	19
Tabla 7. Diseño experimental de la incubación de piezas de hormigón en presencia de medio 9K + inóculo de la Rivera de Agustín ± Fe ± S.....	25
Tabla 8. Diseño experimental de la incubación de piezas de hormigón en presencia de medio 9K + inóculo de la Rivera de Agustín + acero ± S.	29
Tabla 9. Proporción (% en peso) de elementos químicos en los precipitados tras análisis por SEM-EDS.....	36

1 INTRODUCCIÓN.

1.1 Antecedentes generales.

La Faja Pirítica Ibérica es una estrecha franja de unos 35 km de anchura y 240 km de largo que se localiza al SW de la península Ibérica, desde Sevilla (España) hasta Grandola (Portugal). Esta amplia región ha albergado la mayor reserva de metales no férricos del mundo, con una gran acumulación de sulfuros metálicos que han sido explotados desde tiempos inmemoriales (Fig. 1)

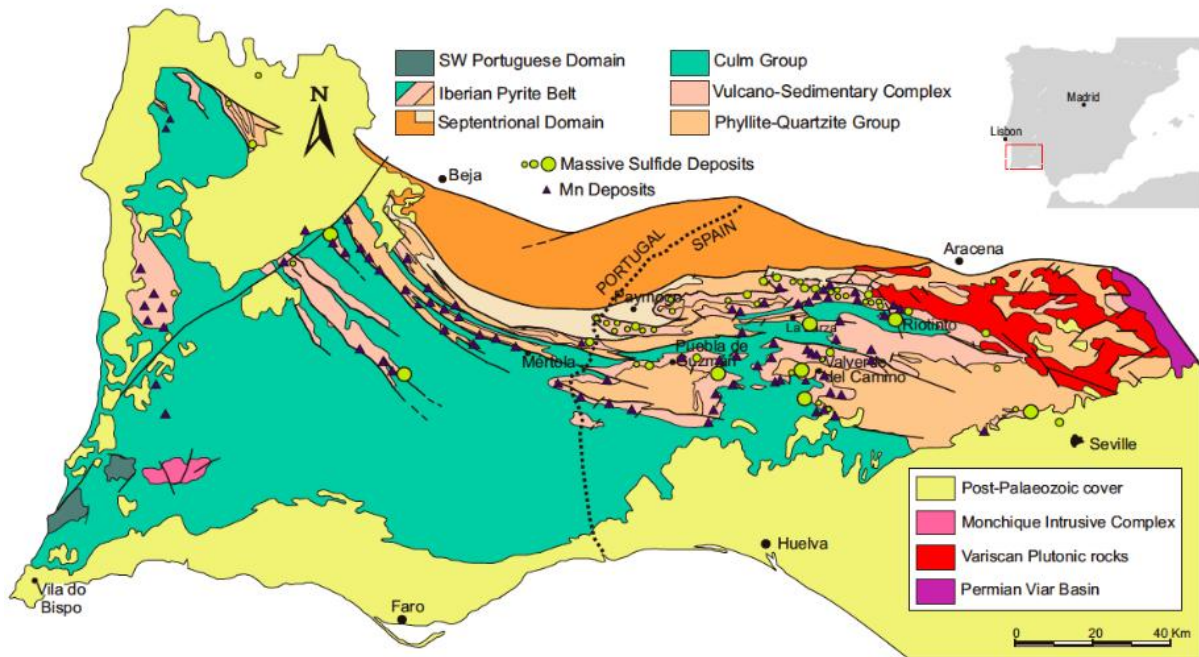


Figura 1. Mapa geológico de la zona sudportuguesa incluyendo las localizaciones más importantes de depósitos de sulfuros masivos dentro de la Faja Pirítica Ibérica (Almodóvar, et al., 2019)

Las rocas que afloran en la Faja Pirítica son en su mayoría del Devónico Medio al Carbonífero Superior y reflejan los cambios que experimentó la cuenca subportuguesa mientras la orogenia varisca se producía. Por tanto estamos ante un contexto temporal y tectónico relativamente similar al que del Carbonífero de la zona Cantábrica. Los depósitos de sulfuros masivos volcanogénicos (SMV) son el rasgo más destacado de la Faja Pirítica y constituyen enormes acumulaciones de sulfuros de diferentes metales (cobre, plata, plomo, cinc, oro...) (Tronos F. , 2008) (Tronos, López Pamo, & Sánchez España, 2009), (Sánchez-España, et al., 2005) (Hernández Barreña, 2015)

Siendo uno de los elementos geológicos más importantes y por su alto interés fundamentalmente metalogénico por las significativas mineralizaciones de sulfuros, la explotación de sus recursos comenzó hace más de 4000 años, y se ha dilatado en la historia de esta región, lo que la convierte en uno de los distritos mineros más antiguos conocidos.

Esta incesante actividad minera, superficial y subterránea, produjo la apertura de numerosas minas con sus pozos, socavones y cortas, la construcción de innumerables kilómetros de túneles, la aparición de centenares de escombreras y

balsas mineras en las que se apilan hoy millones de metros cúbicos de estériles, (Grande, et al., 2011), (Olías & Nieto, 2015).

Decenas de estas minas se han convertido en algunas de las mayores empresas europeas dedicadas a la extracción de diferentes metales y azufre por su importancia en la industria de metales y la industria química.

Acorde a las operaciones mineras y la evolución en el tiempo de las extracciones en la Faja Pirítica, la construcción de estructuras estrechamente relacionadas a la minería ha sido creciente. Las estructuras se diseñan, calculan y construyen para que satisfagan los requisitos mínimos de seguridad, funcionalidad e interperismo. La construcción de minas específicamente requiere una importante inversión, y su diseño y ejecución, condicionará necesariamente todo el desarrollo del proyecto. Por tanto, dada su importancia debe escogerse adecuadamente su ubicación y materiales de la construcción.

1.2 Estructuras de hormigón en la minería.

Las propiedades del hormigón lo convierten actualmente en el material más sustentable y ventajoso en el mercado con relación a otros materiales puesto que es dúctil y maleable, tiene alta resistencia a la compresión, flexión, corte y tracción, es de fácil adaptación de acuerdo los propósitos estructurales, reduce los riesgos de permeabilidad y tiene larga durabilidad¹.

Los distintos proyectos mineros cuentan con diferentes elementos en función de una serie de factores técnicos y económicos y en dependencia del método de destape del yacimiento, pero todos cuentan con numerosas edificaciones civiles e industriales de hormigón.

Las ventajas del hormigón son las posibilidades de conseguirse resistencias altas de hasta 50 Mpa. Y aunque determinados parámetros determinan la capacidad de respuesta del hormigón (detalles constructivos, dimensiones de los elementos, calidad de los materiales), las características geológicas y geotécnicas del macizo jugarán un papel importante en el desarrollo de la obra, por tanto, es decisivo considerar una interacción fuerte entre infraestructura – medio ambiente de forma tal que se obtengan obras altamente resistentes a la agresividad ambiental que generalmente viene dada por factores de contaminación y meteorológicos que a menudo actúan simultáneamente potenciando sus efectos.

El acero embebido en un hormigón de buena calidad permanece pasivo durante prolongados períodos de tiempo de servicio. Sin embargo, esta pasividad puede destruirse debido al ingreso de sustancias agresivas en el interior del hormigón, debilitando así toda la estructura en sí.

Por tanto, es importante mantener una actitud responsable a la hora de la construir infraestructuras de hormigón, haciendo hincapié no solo en cómo extender la vida útil de estos elementos sino en cómo evitar la pérdida de volumen, resistencia y durabilidad asociada a la corrosión bacteriana en el escenario que ofrece la Faja Pirítica Ibérica.

¹ <https://www.ultratechcement.com/for-homebuilders/home-building-explained-single/descriptive-articles/what-is-concrete-types-composition-properties-and-uses>

1.3 Generación de drenajes ácidos y organismos extremófilos.

Una explotación minera de tan dilatada historia en una zona en la que ya afloraban muchos sulfuros masivos como es la Faja Pirítica ha modificado notablemente el paisaje y ha generado una compleja hidroquímica fluvial, dando lugar a uno de los sistemas fluviales más complejos y extraordinarios del mundo (Tronos F. , 2008) (Grande J. , 2016). Esta característica de la región y no menos importante se manifiesta en dos significativos procesos: el Drenaje Ácido de Roca (ARD) en el que se produce ácido sulfúrico cuando los minerales sulfurosos se exponen al aire y al agua y el Drenaje Ácido de Mina (AMD) de carácter antropogénico cuando las rocas de actividades de explotación minera a cielo abierto o subterráneas reaccionan con el oxígeno atmosférico y el agua para crear ácido sulfúrico (Pérez Ostalé, 2014). Tanto el ARD como el AMD responden a los mismos procesos biogeoquímicos, como veremos posteriormente (Gómez-Ortiz , et al., 2004).

Por su naturaleza el AMD es una de las causas más graves de contaminación de los cursos fluviales por su extensión y dificultad de resolución. (Grande J. , 2016) (Grande, et al., 2011), (Sánchez-España, et al., 2005). La incorporación de drenajes ácidos a la red de fluvial es responsable de la modificación de las características físico-químicas de los cauces, aumentando la acidez de las aguas, así como su contenido en metales pesados y sulfatos, y la concentración de metales de sus sedimentos, hasta valores extremos.

Los daños producidos varían desde alteraciones subletales para algunos individuos de los ecosistemas más afectados en los casos de polución muy débil, con problemas asociados de bioacumulación y de biomagnificación, hasta los graves niveles de contaminación de los ecosistemas más afectados que reducen dramáticamente la biocenosis permitiendo solamente el progreso de las especies extremófilas (Grande J. , 2016),(Luis et al., 2022); (Córdoba, 2023).

En España, los principales problemas del AMD están asociados a la intensa actividad minera, superficial y subterránea, que ha dejado, en las cuencas de los cauces afectados, un legado de más de 150 minas abandonadas, 2 en actividad y varias en proyecto de reapertura, con una superficie total de afección próxima a 20.000 ha (Grande J. , 2016). Todo ello ha acelerado el proceso natural de desulfuración de la pirita, al aumentar la superficie de contacto por las labores mineras y disminuir la granulometría. La actividad extractiva genera un volumen de minerales, residuos y efluentes que constituyen las causas antrópicas de la contaminación de los ríos Tinto y Odiel y sus afluentes (Gómez Olivera, 2011).

El AMD se origina cuando un mineral sulfuroso entra en contacto con el oxígeno y la humedad atmosférica. En la superficie del mineral comienza un complejo mecanismo que se inicia con la oxidación de los sulfuros, muy insolubles, transformándolos en sulfatos con producción de ácidos. La cinética de esta oxidación por oxígeno es muy lenta, pudiendo aumentar su velocidad hasta cien veces por la presencia del ión férrico. Junto a la oxidación de la pirita, finalmente se producen reacciones secundarias entre los productos de las reacciones anteriores y los restantes minerales presentes en la roca, siendo el resultado final un conjunto de contaminantes solubles depositados sobre el mineral que posteriormente son disueltos y arrastrados por el agua de lluvia o de escorrentía, produciéndose un

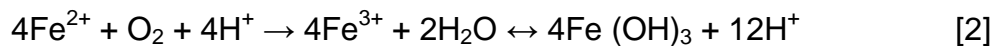
caudal líquido contaminante que lleva su acidez, sus sulfatos y metales pesados hasta los cursos de agua.

El proceso de oxidación de la pirita se explica mediante las siguientes reacciones:

En primer lugar, el proceso se inicia cuando los sulfuros metálicos se exponen al oxígeno del aire en medio acuoso:



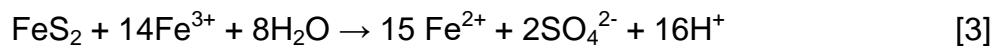
Esta reacción de iniciación produce condiciones ácidas. Cuando el pH es mayor a 4,5, el ion ferroso (Fe^{2+}) generado se oxida espontáneamente en el aire a ion férrico (Fe^{3+}), pudiendo formar hidróxido férrico $\text{Fe}(\text{OH})_3$, que precipita a $\text{pH} > 3$:



Realmente el hidróxido férrico es una mezcla de óxidos férricos hidratados y la base para la formación de minerales oxidados e hidratados de hierro, como la schwertmannita (un sulfato hidratado de hierro), la goethita (un oxihidróxido de hierro (III)), u otros asociados a los sulfatos como la jarosita (un sulfato hidratado de potasio y hierro o la basaluminita (un sulfato hidratado de aluminio).

La reacción [2], es decir la oxidación por oxígeno del hierro se considera el factor limitante de la oxidación de la pirita.

Cuando las aguas se vuelven ácidas, el papel del Fe^{3+} como agente oxidante llega a ser más importante que el del O_2 . A pH más bajos (<3), el Fe^{3+} oxida a la pirita más rápidamente de lo que el oxígeno oxida al Fe^{2+} . Como resultado, todo el Fe^{3+} se reduciría y la reacción se detendría (reacción [3]). Por consiguiente, la oxidación del Fe^{2+} al Fe^{3+} representa el factor limitante en la producción del AMD:



El oxígeno siempre se requiere para aportar ion férrico, de acuerdo a la reacción [2], de tal forma que la velocidad de oxidación de la pirita depende en gran parte de la disponibilidad de oxígeno (Nordstrom & Alpers, 1999)

En la naturaleza, estas reacciones son extremadamente lentas. Sin embargo, las bacterias acidófilas quimioautolitotrofas, como *Acidithiobacillus ferrooxidans* o *Leptospirillum ferrooxidans*, son capaces de catalizar la reacción de oxidación en un proceso que genera energía. Esto da lugar a que la velocidad de oxidación del Fe^{2+} por las bacterias sea alrededor de 106 veces mayor que la oxidación de la pirita por procesos abióticos. El Fe^{3+} formado en estas condiciones, siendo soluble (a $\text{pH} < 3$), puede fácilmente reaccionar con más pirita. Por consiguiente, hay un incremento progresivo de la velocidad de oxidación de la pirita, llamado ciclo de propagación (Nordstrom y Alpers, 1999); (Pearce , Weber , Pearce, & Scott , 2016)

Es decir, la exposición de las piritas a la atmósfera (oxígeno y agua) conduce a una acidificación extrema de las aguas de drenaje, que a su vez son el medio de transporte de iones férricos y otros metales (Cu, Zn, Mn, etc.) solubles a pH ácidos (Rohwerder y Sand, 2003).

En conclusión, la función principal de los microorganismos acidófilos en los ambientes AMD es mantener los iones de hierro en forma oxidada y generar ácido sulfúrico para proporcionar protones necesarios para el ataque por hidrólisis (Sánchez-España, et al., 2005).

El AMD resulta el principal problema al que se enfrentan las explotaciones mineras no solo por sus efectos ecológicos sino porque una vez aparecido es muy complicado dar marcha atrás puesto que la tecnología para su tratamiento es altamente cara y este proceso puede continuar a lo largo de los siglos.

De hecho, es habitual la concepción de que el AMD es una “máquina de polución perpetua”²

1.4 Los microorganismos extremófilos de las aguas afectadas por AMD en la Faja Pirítica Ibérica.

Las aguas altamente ácidas con valores medibles de pH entre 1 y 3 y con un contenido de metales tan alto limitan la vida de muchos organismos en un medio severamente modificado por los procesos antes descritos generando ecosistemas inhóspitos. Sin embargo, existen organismos extremófilos que encuentran en este medio las condiciones esenciales para su alimentación y a los cuales esta contaminación les resulta clave para su desarrollo.

Desde el Centro de Astrobiología de Madrid y bajo la dirección del Dr. Ricardo Amils se han realizado numerosos estudios que demostraron que las aguas del río Tinto contienen una rica comunidad de especies bacterianas –procariotas- y de algas, hongos y protozoos –eucariotas- (ej. (Aguilera, 2013); (Amils, 2016). Las bacterias más abundantes en las aguas ácidas del Tinto se califican, desde un punto de vista metabólico, como quimiolitotróficas aerobias. Esta terminología nos indica que su fuente de energía y de poder reductor proviene de materia inorgánica reducida (los sulfuros metálicos), y que poseen la maquinaria necesaria para reducir el CO_2 del aire hasta formar compuestos orgánicos. Su metabolismo implica además que utilizan el oxígeno como aceptor final de electrones derivados de la oxidación de la materia orgánica sintetizada en su seno. Además, su pH óptimo de crecimiento se sitúa en torno a 2, por lo que se consideran como bacterias extremas hiperacidófilas. Las bacterias más representativas de las aguas del Tinto son, por orden de abundancia, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* y *Acidiphilium* sp. Las dos primeras especies representan aproximadamente el 50% del total de las bacterias identificadas y son las principales responsables de la oxidación del hierro y azufre en el ecosistema del Tinto (García-Moyano , González-Toril , Aguilera , & Amils , 2007). *Acidiphilium* es, sin embargo, una bacteria heterótrofa que puede oxidar la materia orgánica usando Fe^{3+} como aceptor. Sin embargo, en las aguas de lagos de residuos ácidos de cortas de minas (*pit lakes*), la proporción de géneros bacterianos es diferente y muy variable según el área de muestreo y su profundidad. Así, en superficie abundan *Acidiphilium* y *Leptospirillum*; en profundidad *A. ferrooxidans* es más frecuente, probablemente porque, dada su condición de bacteria anaerobia facultativa, utiliza el sulfato como agente oxidante. Otros géneros identificados son: *Metallibacterium*, *Ferrimicrobium*, *Acidisphaera*, etc.; en general hay pocas arqueobacterias (Santofimia , et al., 2013); (González-Toril , et al., 2014)

² <https://earthworks.org/issues/acid-mine-drainage/>

En los ríos afectados por el AMD, numerosas especies bacterianas forman biofilms. Combinando técnicas de análisis genómico y proteómico se ha comprobado que su distribución espacio-temporal evoluciona en estos ambientes desde combinaciones genotípicas que explican la colonización inicial a otras propias de estados de sucesión ecológica más avanzados (Chen et al., 2016). Durante esos procesos de sucesión, las bacterias conforman consorcios metabólicos que actúan sinérgicamente y establecen sistemas de comunicación célula a célula mediante mecanismos quimiotáxicos (Bryan, Hallberg, & Johnson); (Bellenberg, et al., 2014). A modo de ejemplo de la importancia de estos consorcios se conoce que la actividad de los organismos oxidantes del hierro lleva a la producción de hierro férrico pero su actividad también produce la acumulación de azufre elemental y polisulfuros en la superficie del sustrato (capa de pasivación). Esta acumulación actúa como barrera para la difusión del oxígeno y de los iones de hierro (III) lo que lleva a la inhibición de la lixiviación. Las bacterias oxidantes del azufre son capaces

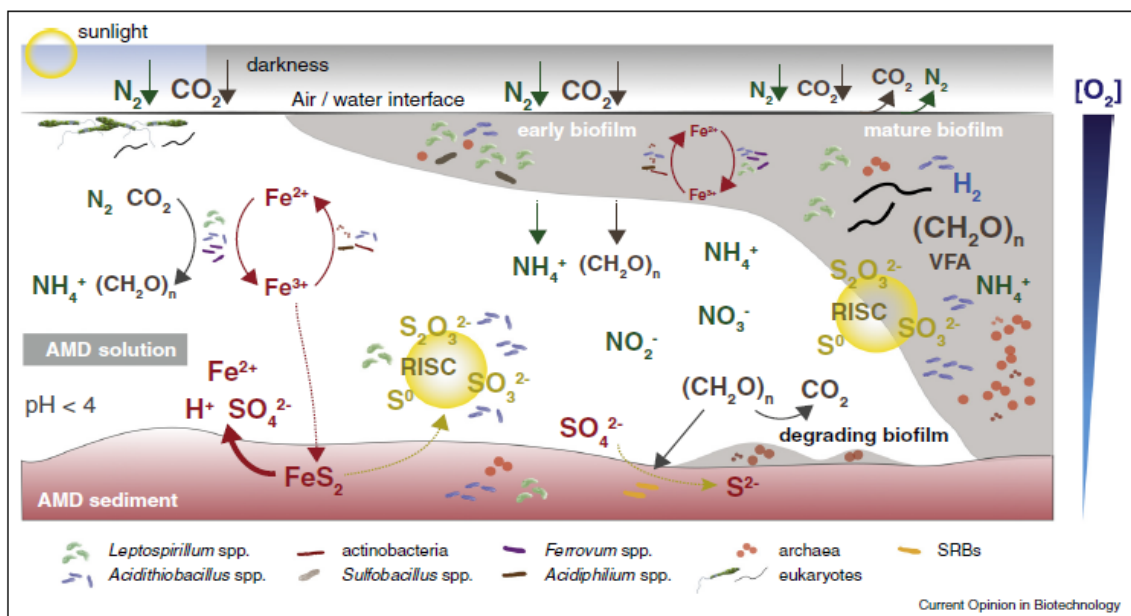


Figura 2. Interacciones durante el Drenaje Ácido de Minas. (Chen et al., 2016)

y diazotróficas fijan CO_2 y N_2 mediante la reducción acoplada a la oxidación de Fe(II) . Las reacciones redox a cargo de bacterias litotróficas que consumen sulfuros metálicos (RISC) se llevan a cabo mediante la formación de biofilms y procesos de colaboración metabólica. En los sedimentos, una variedad de bacterias heterotróficas degrada los biofilms en condiciones microaeróbicas y anaeróbicas, a la vez que las bacterias reductoras de sulfato regeneran los RISC.

oxidar esta capa formada por azufre y polisulfuros y además formar ácido sulfúrico a partir de estos compuestos, reduciendo el pH y eliminando esta capa de pasivación (Rohwerder et al., 2003) (Fig. 2). Evidentemente, cuando se estudia la acción de las aguas ácidas derivadas del AMD sobre materiales como el hormigón y el acero, estas relaciones interespecíficas deben ser consideradas.

1.5 La biocorrosión y configuración del paisaje

La biocorrosión o corrosión microbiana, es la corrosión inducida o influenciada por microorganismos (*MIC*, *Microbiologically Influenced Corrosion*). Es un fenómeno

que cada vez cobra más interés debido al fuerte impacto económico sobre los materiales de ingeniería.

A la deforestación en época romana de las primeras explotaciones y la obtención de carbón vegetal para la minería le siguió un desarrollo generado por la necesidad de obtener cobre, que generó grandes cortas y toneladas de escoria y residuos que han modificado significativamente el paisaje original de la FPI que debía ser alomado y tapizado por el bosque mediterráneo. (Delgado et al., 2021)

Las diversas estructuras mineras (cortas, escombreras, balsas e instalaciones asociadas a las explotaciones mineras) han modificado el paisaje y las características geoquímicas del entorno. Se evidencian los tonos naranjas y rojizos habituales no solo en el suelo sino también en los propios ríos. Estos colores tan poco frecuentes son debidos a la presencia de óxidos de hierro y otros metales (Pérez Oсталé, 2014).

Las aguas ácidas y los ácidos minerales, como el ácido sulfúrico que generan las bacterias en el proceso de oxidación de los sulfuros metálicos tienen la propiedad de disolver el cemento fraguado y los áridos a base de carbonatos. En condiciones aerobias, *A. ferrooxidans* es, sin duda, la especie responsable del AMD dada su elevada capacidad para oxidar los sulfuros de hierro y otros metales, generando una acidez extrema y la biolixiviación de numerosos metales (Fig. 3). En condiciones anaerobias, el azufre se puede reducir a sulfuro de hidrógeno (H_2S), un gas fuertemente corrosivo, mediante la actividad de las bacterias reductoras de sulfato (Fig. 4). Por consiguiente, en la corrosión de elementos estructurales en aguas afectadas por AMD se combinan dos mecanismos: el químico y el biológico. Entre los factores que afectan a la corrosión se pueden enumerar los siguientes: oxígeno disuelto, acidez, temperatura, concentración de sulfato y microorganismos presentes. Recientemente, se han publicado sendos artículos acerca de la corrosión de elementos metálicos y estructurales (hormigón) expuestos a AMD en la FPI donde se analiza la interacción de las diversas variables citadas y las pruebas usadas para medir los daños estructurales (Fortes et al., 2020); (Dávila et al., 2021).

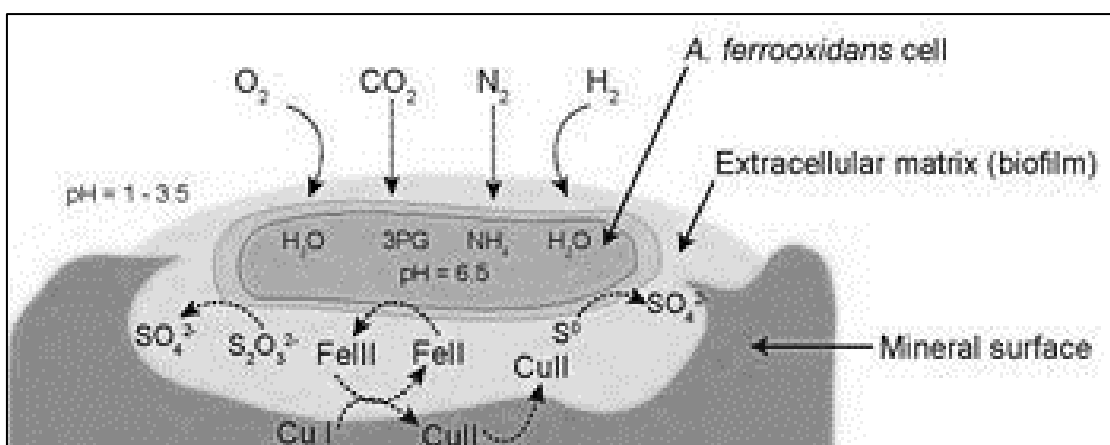


Figura 3. Resumen gráfico del metabolismo de *A. ferrooxidans*. (Valdés, et al., 2008)

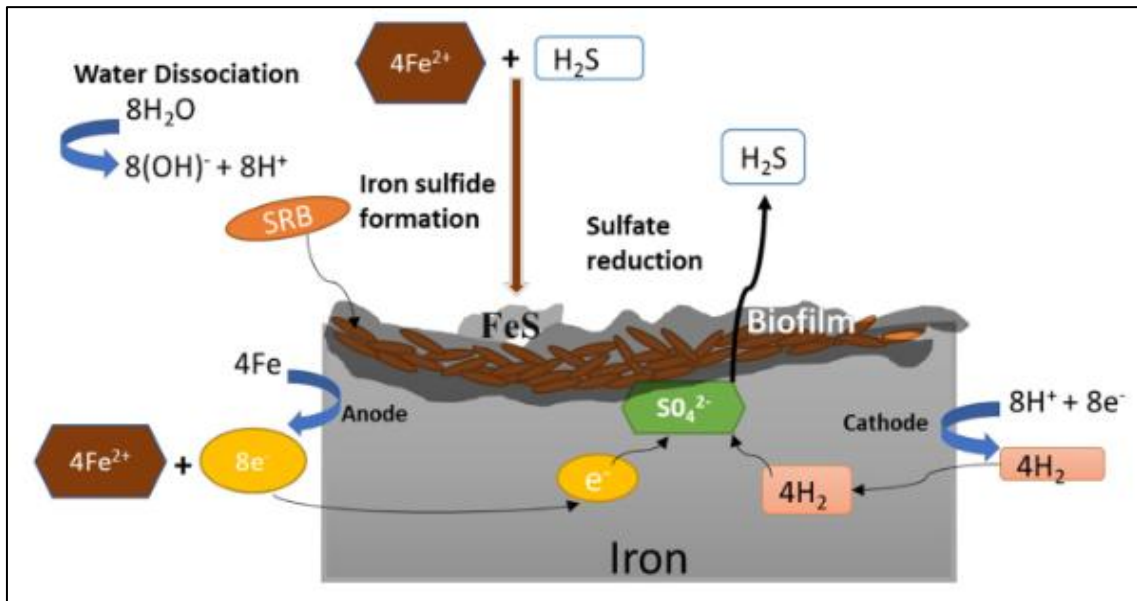


Figura 4. Mecanismo de la corrosión influenciada microbiológicamente (MIC) de hierro por bacterias reductoras de sulfato. (Tripathi et al., 2021)

Por tanto, se plantea como problema de la investigación la corrosión de estructuras de hormigón asociadas a la minería de sulfuros metálicos como efecto de la variedad de bacterias quimiolitotrofas aerobias y heterótrofas anaerobias presentes en las aguas de ríos afectados por Drenaje Ácido de Minas (DAM).

Actualmente, los procesos microbianos que explican el AMD se están considerando desde un punto de vista productivo. Así, se está extrayendo metales a través del proceso de biolixiviación de un modo más económico y eficiente mediante un conjunto de técnicas que se agrupan bajo la denominación de biominería y biometalurgia (Ospina et al., 2014; Banerjee et al., 2017; Johnson, 2018; Katsonen et al., 2018; Pollmann et al., 2018; Córdoba, 2021) que complementa las técnicas tradicionales. Estas técnicas tienen un especial interés cuando se trata de recuperar metales de residuos mineros acumulados en las escombreras o de una diversidad de “basura” tecnológica e industrial, que con frecuencia es rica en metales de interés estratégico (Tabla 1).

RESIDUO	METAL LIXIVIADO	MICROORGANISMOS
Catalizadores	Al, V, Mo, Ni, Co, Li	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <i>Aspergillus niger</i> ¹ <i>Penicillium simplicissimum</i> ¹
Chatarra electrónica	Al, Cu, Ni, Pb, Sn, Zn, Au	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> <i>Aspergillus niger</i> ¹ <i>Penicillium simplicissimum</i> ¹ <i>Cromobacterium violaceum</i> ² <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> ³
Residuos sólidos urbanos. de Cenizas de incineración	Al, Fe, Mn, Ni, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <i>Pseudomonas putida</i> ⁴ <i>Bacillus megaterium</i> ⁵ <i>Aspergillus niger</i> ¹ <i>Acidianus brierleyi</i> ⁶
Pilas y baterías	Li, Co	<i>Acidithiobacillus</i> spp.
Filtros sólidos	Cu	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>
Lodos de aguas residuales	Cu, Mn, Zn, Ni, Cd, Cr, Pb	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>
Lodos de curtiduría	Cr	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>
Residuos de joyería/ Catalizadores de automóviles	Ag, Pt, Au	<i>Cromobacterium violaceum</i> ² , <i>Pseudomonas fluorescens</i> ⁴

Tabla 1. Aplicaciones de microorganismos en la recuperación de metales de diversos residuos.

1: hongos; 2: bacteria anaerobia facultativa heterotrofa; 3: bacteria termófila oxidante de azufre; 4: bacterias saprófitas del suelo; 5: bacteria del suelo y endófito; 6: archea acidófila y termofílica, oxidante/reductora de azufre.

2 OBJETIVOS

En este trabajo fin de máster se han recolectado y cultivado, bajo condiciones controladas de laboratorio, consorcios bacterianos procedentes de las aguas de un río afectado por AMD próximo a Tharsis. El efecto de la presencia o ausencia de bacterias sobre testigos de hormigón ha sido analizado bajo diferentes tratamientos experimentales.

Los objetivos propuestos son los siguientes:

Objetivo general.

Analizar la corrosión de muestras de hormigón en condiciones controladas de laboratorio bajo el posible efecto de los consorcios bacterianos propios de un río afectado por AMD.

Objetivos específicos.

- ❖ Cultivar los consorcios bacterianos colectados en ríos afectados por Drenaje Ácido de Mina.
- ❖ Exponer muestras de hormigón sin signos de corrosión a cultivos bacterianos en condiciones controladas de laboratorio y analizar una diversidad de indicadores físico-químicos y biológicos, prestando especial atención a la presencia/ausencia de bacterias y a la presencia/ausencia de hierro y/o azufre.

3 MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 Origen de los consorcios bacterianos.

Muestras de agua ácida rica en consorcios bacterianos (Borrego, Bacedoni, Moreno-Ventas Bravo, & Córdoba, 2020) se colectaron en la Rivera de Agustín, Alosno, Huelva (Latitud 37.546799; Longitud -7.082374), fuertemente contaminado por Drenaje Ácido de Mina (AMD) (Fig. 5).

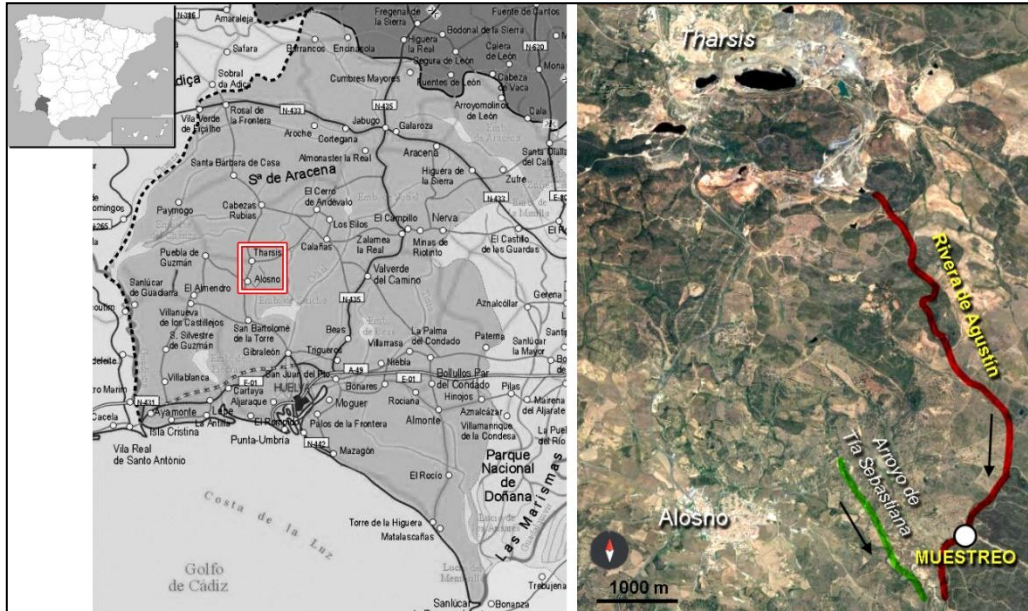


Figura 5. Mapa de situación de la zona de muestreo.

Se tomaron muestras con un vaso acoplado a una pértiga de las aguas más superficiales y por tanto bien oxigenadas (Fig. 6). Las muestras se trasladaron al laboratorio y se almacenaron en frío hasta su uso.



Figura 6. Zona de muestreo y pértiga usada para recoger las muestras de agua.

3.2 Características del hormigón.

En diversos experimentos se usó hormigón cuya composición se detalla a continuación (Tabla 2):

AGUA	ÁRIDO		CEMENTO SR	
	SiO ₂	>98,00%	CaO	62%
	Al ₂ O ₃	<0,80%	SiO ₂	21%
	Fe ₂ O ₃	<0,05%	Al ₂ O ₃	6,5%
	CaO	<0,10%	Fe ₂ O ₃	2,5%
	MgO	<0,05%	SO ₃	2%
	Na ₂ O	<0,06%	MgO	2%
	K ₂ O	<1,00%	Na ₂ O + K ₂ O	0,5%

Tabla 2. Composición del hormigón.

Además, el cemento SR contenía 1% de residuos insolubles de naturaleza silícea y 2% de pérdida de fuego de adiciones de naturaleza caliza. Las exigencias para la característica SR son:



3.3 Preparación del medio de cultivo.

La preparación del medio de cultivo se realizó a partir de medio 9K (Silverman & Lundgren, 1959) El medio se componía de dos soluciones tal y como se indica en la Tabla 3.

Para el enriquecimiento de los consorcios bacterianos aislados de la Rivera de Agustín se usó una mezcla de 600 ml de medio A con 400 ml de medio B. Se ajustó el pH a 2,0 con H₂SO₄ 0,1N.

La esterilización del medio A se realizó en autoclave a 121°C, 1 Atm, durante 15 minutos. El medio B se esterilizó mediante filtración con filtros de 0,22 µm de poro. La mezcla de ambos medios se realizó en una cámara de flujo laminar.

MEDIO A

		Peso (g/l)
Sulfato Amónico	(NH ₄) ₂ SO ₄	3,00
Cloruro de Potasio	KCL	0,1
Fosfato mono ácido de Potasio	K ₂ HPO ₄	0,5
Sulfato de Magnesio	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5
Nitrato de Calcio	Ca(NO ₃)	0,01

MEDIO B		
		Peso (g/l)
Sulfato de Hierro	FeSO ₄ · 7H ₂ O	44,4

Tabla 3. Composición del medio 9K.

3.4 Enriquecimiento bacteriano.

Con objeto de aumentar el número de bacterias antes de iniciar los experimentos que se indicarán, se añadió una fracción alícuota de la muestra de la Rivera de Agustín al medio 9K estéril en una proporción 1:10 v/v. La mezcla se mantuvo durante 4 semanas a 30°C en un agitador orbital a 100 rpm (P-Selecta, Unitronic). Estas condiciones favorecen la oxigenación del medio y por consiguiente el desarrollo de especies quimiolitotrofas aerobias, dado que el medio carece de fuentes nutricionales orgánicas.

3.5 Determinación de parámetros físico-químicos

Las muestras de agua recolectadas se analizaron in situ con una sonda multiparamétrica portátil Hanna (modelo HI-9828). De igual forma, se analizaron el pH, la conductividad (EC) y el potencial redox (ORP) durante el curso de los diferentes experimentos realizados.

3.6 Determinación de las especies de hierro.

3.6.1 Fundamento

El hierro disuelto en los medios de cultivo se determinó mediante el método de la fenantrolina³.

El método se basa en que el agente quelante 1,10-cloruro de fenantrolina forma complejos de color rojo-anaranjado (absorbancia a 510 nm) con el hierro reducido

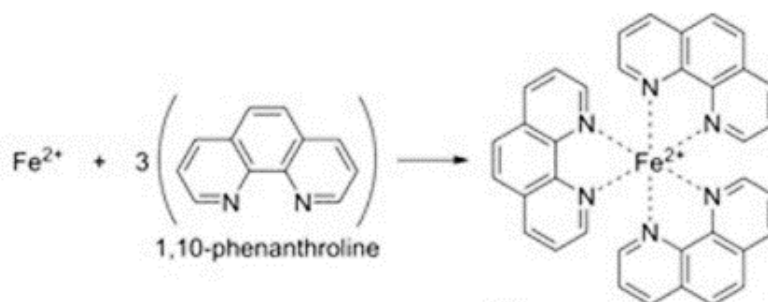


Figura 7. Formación de complejo Fe²⁺-fenantrolina.

(Fig. 7). Para que se forme el complejo es necesario tamponar a pH 4,5 para lo cual se usó un tampón citrato (pK₂=4,77). El método se adaptó para su uso con pequeños volúmenes de muestra y reactivos. Tradicionalmente se usa tampón acetato que en nuestro caso se sustituyó por tampón citrato, por sus mejores cualidades de solubilidad.

Esta reacción sólo es aplicable para medir hierro reducido (Fe²⁺). Si se desea medir hierro oxidado (Fe³⁺), a la muestra inicial hay que añadirle un agente reductor como es el clorhidrato de hidroxilamina, que reducirá el Fe³⁺ a Fe²⁺.

³ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 23th 2017. Method 3500-Fe B.

Tras la adición de fenantrolina, se podrá conocer la concentración total de hierro (Fe^T). La concentración de Fe^{3+} será la diferencia entre el Fe^T y el Fe^{2+} .

3.6.2 Materiales y reactivos

- ❖ Solución estándar certificada de Fe^{3+} : 1000 ± 5 mg/L
- ❖ Citrato sódico: 25 g/100ml de agua destilada.
- ❖ 1,10 - clorhidrato de fenantrolina: 1,25 g/250 ml de agua destilada caliente, sin llegar a hervir.
- ❖ Clorhidrato de hidroxilamina: 10 g/100 ml de agua destilada.
- ❖ Agua destilada
- ❖ Pipetas automáticas y puntas de pipeta de 0,1 y 1 ml.
- ❖ Espectrofotómetro UV/VIS (Beckman, DU-530).

3.6.3 Preparación de la recta de calibración

Dada la elevada sensibilidad del método usado, la solución estándar de hierro (1000 mg/l) fue diluida 1:50 (20 mg/l) previamente a la realización del patrón:

0,1 ml estándar + 0,35 ml HNO_3 + 4,55 ml agua

Con esta solución y los reactivos que se indican en la siguiente tabla se empleó el siguiente protocolo (Tabla 4):

TUBO	B	1	2	3	4	5
Fe (μg)	0	0,8	1,6	2,4	3,2	4
Fe (ml)	0	0,04	0,08	0,12	0,16	0,2
Citrato	0,2	0,16	0,12	0,08	0,04	0
Hidroxilamina	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Fenantrolina	1	1	1	1	1	1
Agua	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
Volumen total	2	2	2	2	2	2

Tabla 4. Protocolo para la preparación de los patrones de calibración

Tras la adición de los reactivos y un tiempo de espera de 30 minutos, cuando eran patentes las diferencias de color debidas a las distintas concentraciones usadas (Fig. 8), se midió la absorbancia a 510 nm, resultando la siguiente recta de calibración que se muestra en la Fig. 9.



Figura 8. Variaciones de color según la concentración de hierro.

Como puede observarse, la recta de regresión mostró una elevada correlación. De la ecuación de la recta se deduce que:

$$\mu\text{g Fe en el volumen de muestra} = 9,79 \cdot \text{Abs}_{510} \quad [4]$$

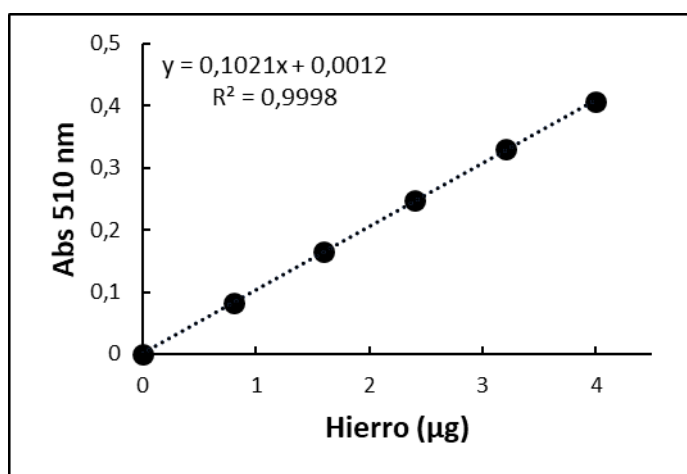


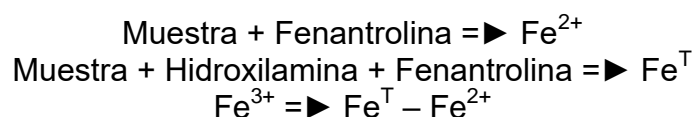
Figura 9. Recta-patrón de calibración de hierro.

El patrón de calibración se repitió periódicamente sin que se observaran variaciones significativas.

3.6.4 Análisis de hierro de las muestras

De las muestras obtenidas de los diversos experimentos realizaron se tomaron fracciones alícuotas que hubo que diluir hasta que la absorbancia obtenida estuviese dentro del rango de los patrones de calibración realizados (hasta 0,5 de absorbancia a 510 nm).

Con cada muestra se realizaron dos medidas: una para hierro total (tras la adición de hidroxilamina) y otra para hierro reducido:



Se siguió el siguiente protocolo (Tabla 5):

TUBO	B	Fe ^T	Fe ²⁺
Muestra (ml)	0	0,1*	0,1*
Citrato	0,1	0,1	0,1
Hidroxilamina	0,1	0,1	0
Fenantrolina	1	1	1
Agua	0,8	0,7	0,8
Volumen total	2	2	2

Tabla 5. Protocolo para el análisis de las especies de hierro en las muestras

* tras dilución adecuada

Tras medir la absorbancia a 510 nm, la concentración de las especies de hierro en las muestras se calculó según la ecuación [4] tras considerar el factor de dilución empleado.

3.7 Determinación de la concentración de elementos químicos

Se realizaron análisis de la concentración de diversos elementos químicos en cada muestra. Para ello, se recogieron unos 40 ml de medios de cultivo de los diversos experimentos realizados, se filtraron a través de poros de 0,45 μm y se trataron con ácido nítrico al 2% para alcanzar un $\text{pH} < 2$, para asegurar su solubilización. Posteriormente, las muestras se llevaron a Servicios Centrales de Investigación de la Universidad de Huelva (CIDERTA) donde se analizaron mediante ICP-óptico los siguientes elementos:

Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Sr, Ti, V, Zn

La concentración de cada elemento se expresó en mg/l (ppm).

3.8 Análisis de los precipitados mediante SEM-EDS

La microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés, *Scanning Electron Microscopy*) y el análisis elemental (EDS, *Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy*) se realizó con un microscopio electrónico JEOL JSM-IT500 HR (Servicios Centrales, Universidad de Huelva) (Fig. 10). Las micrografía y análisis EDS se realizaron bajo vacío de 1 Pa. Se tomaron micrografías a distintas magnificaciones y el análisis elemental se realizó en regiones puntuales de la muestra.

Las muestras para analizar consistieron en extensiones desecadas de sedimentos, derivados de distintos experimentos, realizadas sobre portaobjetos de vidrio, como se muestra en la Fig. 10.



Figura 10. Microscopio SEM-EDS (izquierda) y muestras de precipitados (derecha)

3.9 Caracterización de las comunidades bacterianas

3.9.1 Extracción de ADN

Al final de los experimentos, se recogieron pequeños bloques de hormigón de los frascos o reactores (medio estéril y no estéril). Los procedimientos que se resumen a continuación (extracción de ADN, secuenciación y análisis de la diversidad microbiana) se llevaron a cabo en la Facultad de Ciencias Naturales y Agrícolas de Bloemfontein (Sudáfrica) bajo la dirección del Dr. Castillo Hernández.

Las superficies se rasparon para recuperar las células adheridas al bloque. Al mismo tiempo, se filtró al vacío un volumen de 5 l del AMD usado como inóculo a través de discos de filtro de celulosa estériles de 0,2 μm (PALL corporations, EE. UU.) para concentrar las células microbianas. La mitad de cada filtro se cortó en trozos pequeños con una cuchilla quirúrgica estéril. La biomasa recuperada del bloque y los pequeños trozos de los filtros se colocaron en tubos de 2 ml, y se extrajo el ADN ambiental (eDNA) utilizando un kit de aislamiento de ADN para suelos NucleoSpin® (Macherey-Nagel™, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante. Las concentraciones de eDNA se cuantificaron utilizando Qubit™ dsDNA (Thermo Scientific, EE. UU.), y la integridad del eDNA se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con GelRed™ (Anatech, Sudáfrica). Finalmente, el eDNA de alta calidad y pureza se almacenó a -20 °C para su posterior secuenciación.

3.9.2 Secuenciación de amplicones de ARNr 16S.

En el protocolo de secuenciación, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el gen del ARNr 16S. La mezcla de reacción consistió en NEB OneTaq 2X MasterMix con tampón estándar, ADN genómico (de los aislamientos), cebadores hacia adelante y hacia atrás 27 (hacia adelante: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG; hacia atrás 1492: TACGGCTACCTTGTACGACTT), y agua sin nucleasas. La amplificación de ADN involucró una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, apareamiento a 50°C durante 30 segundos y extensión a 68°C durante 1 minuto (Palkova, y otros, 2021). Se incluyó un paso de extensión final a 68°C durante 10 minutos, y luego la reacción se mantuvo a 4°C. Se utilizó el kit de limpieza de PCR Montage (Millipore Corporation, EE. UU.) para eliminar los cebadores de PCR no incorporados y los dNTP de los productos de PCR. La calidad y cantidad del producto de PCR se verificaron utilizando Qubit™ dsDNA. La secuenciación de nanoporos se realizó con 1 μg de ADN amplificado. El flujo de trabajo de secuenciación incluyó los siguientes pasos: reparación de extremos/agregación de dA, ligación de código de barras, codificación de adaptadores, reparación de extremos/agregación de dA de PCR, ligación de adaptadores al extremo romo, purificación mediante unión a cuentas de perlas AMPure XP, cebado y carga de la celda de flujo SpotON.

3.9.3 Bioinformática y análisis estadístico.

Las secuencias crudas obtenidas a partir de los datos de bases se procesaron utilizando un canal SituSeq modificado (Zorz, y otros, 2023) Las secuencias se asignaron taxonómicamente utilizando la base de datos de referencia SILVA_132_99% (McDonald, Wang, Huang, & Leu, 2011). A partir de la tabla taxonómica, se construyó un archivo *biom* utilizando QIIME2. El archivo *biom* y los metadatos se fusionaron en un objeto *phyloseq* utilizando *read_biom2phyloseq*

dentro del paquete microbioma (Lahti & Shetty, 2017) en RStudio (R Core Team, 2013) para análisis posteriores.

3.9.3.1 Diversidad α - β bacteriana.

La diversidad α - β se analizó utilizando los paquetes "Microeco" y "File2meco". Utilizando la función *trans_abund*, se analizó la abundancia relativa de los taxones. Las distancias Bray-Curtis y el análisis de coordenadas principales (PCoA) se analizaron y visualizaron mediante la función *trans_beta* (Liu, y otros, 2022). Se utilizó la prueba PERMANOVA para analizar las diferencias en la composición entre grupos, mientras que la prueba PERMDISP se empleó para medir las diferencias dentro de cada grupo.

3.9.3.2 Análisis no paramétrico y multifactoriales

Las diferencias en la hidroquímica se analizaron utilizando la prueba de Kruskal-Wallis dentro del paquete "stats" (R Core Team, 2013).

La relación entre los géneros bacterianos identificados y el pH, conductividad potencial redox y especiación de hierro en las distintas muestras procedentes de las aguas de la Rivera de Agustín y de los biorreactores se valoró mediante un análisis de componentes principales.

También se realizó un análisis de redundancia (RDA) cuyo objetivo, como el anterior, fue examinar las relaciones entre la composición de las comunidades bacterianas (variables de respuesta) y los diversos factores ambientales o químicos (variables explicativas) que se definieron y registraron en este experimento. Esto puede ayudar a identificar qué factores ambientales están más estrechamente relacionados con la variabilidad observada en las comunidades bacterianas. La redundancia se refiere a la proporción de varianza de las variables de respuesta que puede ser explicada por las variables explicativas. Es decir, El RDA ayuda a visualizar y cuantificar cómo estas variables explicativas influyen en la estructura de las comunidades bacterianas.

A continuación, se detallan los procedimientos y resultados de los distintos experimentos realizados. A efectos de facilitar la comprensión de éstos, el apartado metodológico específico se ha desarrollado inmediatamente antes de presentar los resultados correspondientes.

4 RESULTADOS

4.1 Características de las muestras de agua de la Rivera de Agustín.

Como es habitual en los ríos afectados por AMD de la FPI, los parámetros físico-químicos que caracterizan las aguas de la Rivera de Agustín son variables en función de la estación del año y de la pluviometría. La tabla 6 muestra los valores promedio resultados de varios muestreos a lo largo de los años 2022 y 2023.

pH	2,3
EC (mS/cm)	5,2
E _H (mV)	742,0

Tabla 6. Parámetros físico-químicos de la Rivera de Agustín.

Con respecto a su composición química, también variable, los valores resultantes de su análisis con ICP-óptico se muestran en la figura 11.

Como cabe esperar en un río gravemente afectado por AMD, la concentración de azufre (en forma de sulfato), y de hierro fueron muy elevadas. Además, hay también concentraciones muy altas de Al, Mg, Zn, etc.

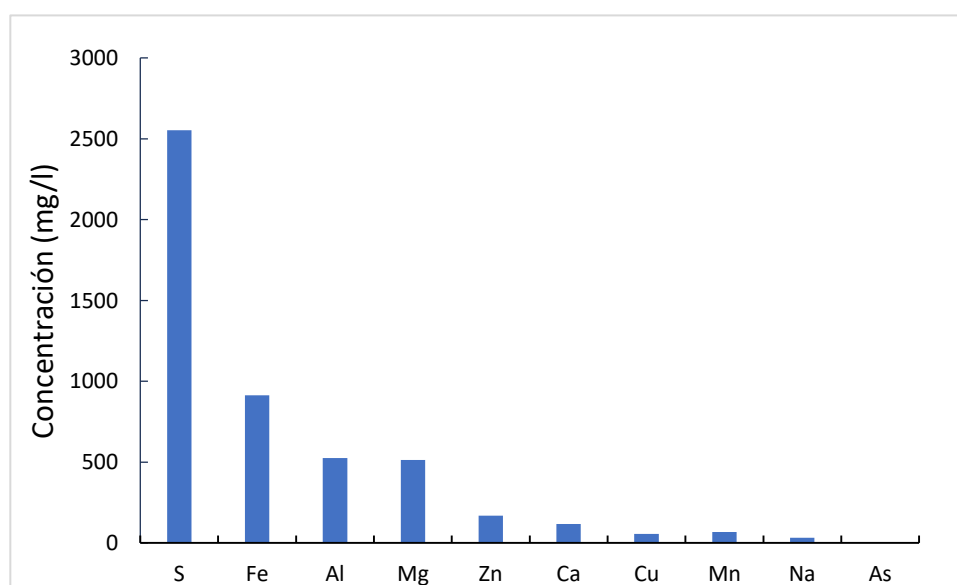


Figura 11. Metales en la Rivera de Agustín.

4.2 Enriquecimiento y adaptación de los consorcios bacterianos.

Antes de iniciar los experimentos de la interacción del hormigón con aguas afectadas por AMD, fracciones de las muestras recogidas en la Rivera de Agustín fueron inoculadas en frascos que contenían medio 9K más hierro (en forma de sulfato ferroso). Las muestras inoculadas se mantuvieron durante 4 semanas en agitación constante para asegurar su oxigenación.

El propósito de esta incubación fue aumentar el número de bacterias y facilitar su adaptación a las condiciones de laboratorio (30°C, agitación constante).

Tras una semana de incubación, se observó que los frascos inoculados con muestras estériles (por ausencia de bacterias al ser esterilizadas con filtros de 0,22 μm) apenas mostraron cambios visibles. Sin embargo, los frascos inoculados con muestras no filtradas mostraron una coloración intensa (Fig. 12).

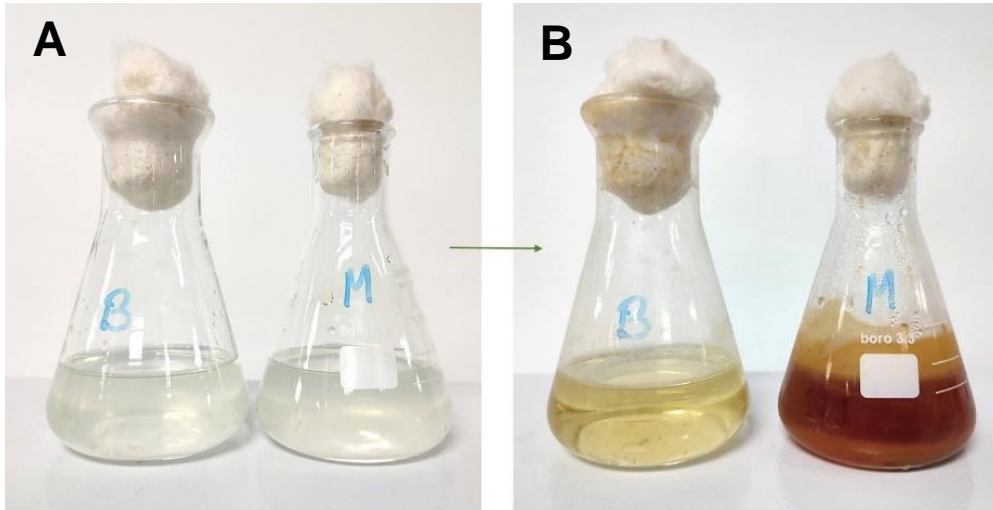


Figura 12. Cambios visibles tras una semana de incubación de muestras de agua inoculadas en medio 9K + FeSO₄. En el frasco B, el inóculo fue esterilizado por filtración, mientras que el frasco M contenía inóculo no filtrado.

Como cabía esperar, los frascos incubados en presencia de bacterias mostraron un notable incremento del número de células (Fig. 13).

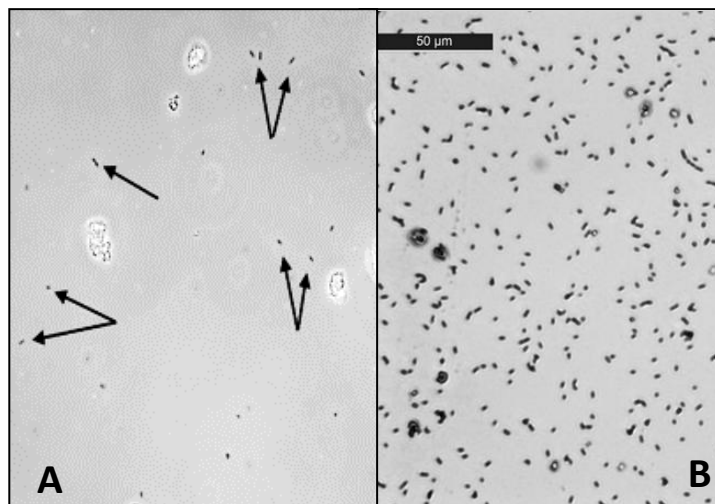


Figura 13. En A se observan bacterias aisladas al comienzo del periodo de incubación (tiempo 0). En B, el número de bacterias es muy elevado (tras 4 semanas de incubación)

Tras las 4 semanas de incubación, se observaron cambios en los parámetros físico-químicos (Figura 14-A). El pH disminuyó como consecuencia de las reacciones de oxidación del FeSO_4 , lo que genera iones Fe^{3+} y H^+ . La conductividad disminuyó, probablemente por la precipitación de diversas sales, especialmente férricas. Por otra parte, el potencial redox aumentó considerablemente debido a la oxidación de hierro y por tanto a la disminución de la proporción $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ (Fig. 14-B). Obsérvese que en ausencia de bacterias la mayor parte del hierro se mantuvo reducido.

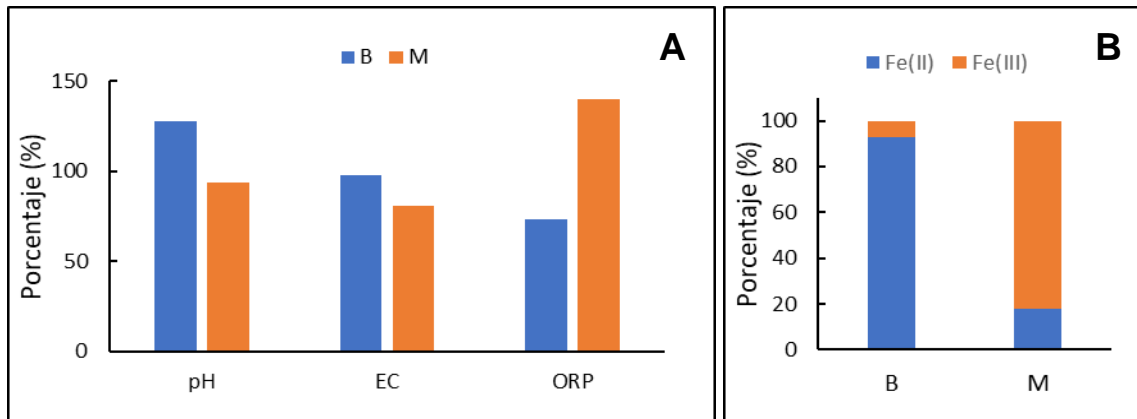


Figura 14. En A se muestra la variación de pH, conductividad (EC) y potencial redox (ORP) tras 4 semanas de incubación en ausencia (B) o presencia de bacterias (M). El valor de 100 se corresponde al medido a tiempo 0. En B se muestra la proporción de hierro reducido.

4.3 Efecto de la incubación con aguas de la Rivera de Agustín sobre una muestra de hierro fundido.

En este experimento, el sulfato de hierro usado en el medio de cultivo se sustituyó por una pieza industrial parcialmente corroída de hierro fundido recuperada en las proximidades de la mina de Tharsis. En este caso, el medio de incubación fue el componente A del medio 9K, al que se añadió un 10% (v:v) de aguas de la Rivera de Agustín. El volumen total fue de 200 ml. El periodo de incubación fue de 27 días. Periódicamente se tuvo que rellenar el frasco de incubación con nuevo medio + inóculo (en la proporción del 10%) para mantener relativamente constante el volumen de 200 ml, debido a las pérdidas por evaporación.

Durante la incubación se observó una pérdida de peso de la pieza en torno al 7%, aunque ésta acumuló numerosos precipitados (Fig. 15). También se constató un extraordinario desarrollo de las poblaciones bacterianas (Fig. 16).

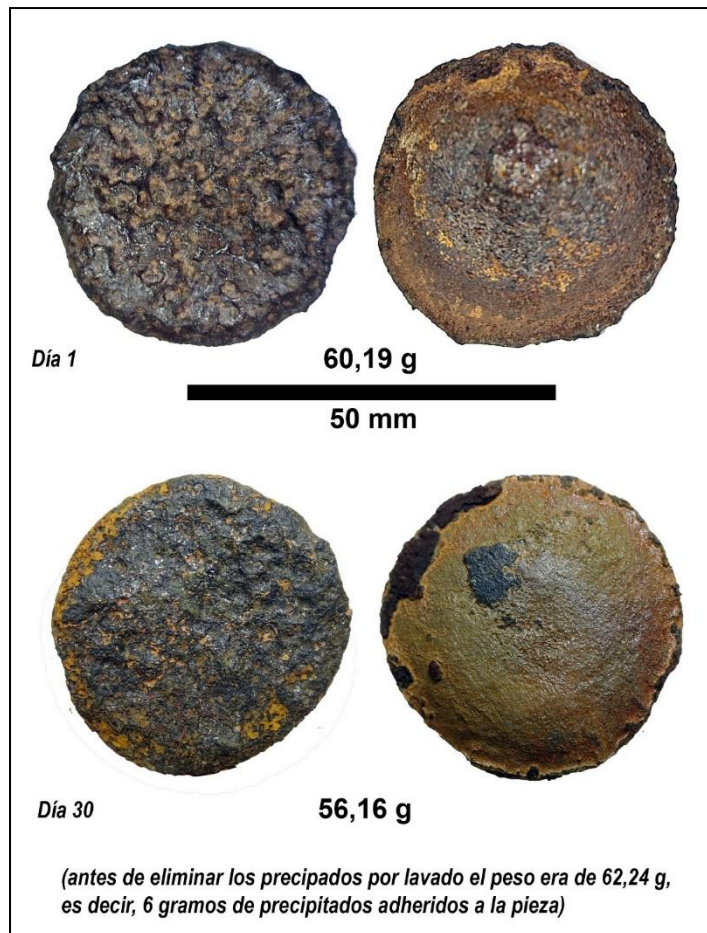


Figura 15. Aspecto inicial de la pieza de hierro (arriba) y aspecto final tras 4 semanas de incubación en medio 9K + inóculo de la Rivera de Agustín (10% v/v).

Al final del periodo de incubación, se recogieron algunos de los precipitados que, tras dejarlos secar a temperatura ambiente, se analizaron mediante SEM-EDS. Los resultados se muestran en la figura 17. Como puede observarse en los precipitados sólo se registraron picos de O, Fe y S, lo que indica la presencia de sulfatos y óxidos de hierro, con las siguientes proporciones en peso: O:54-S:23-Fe:20.

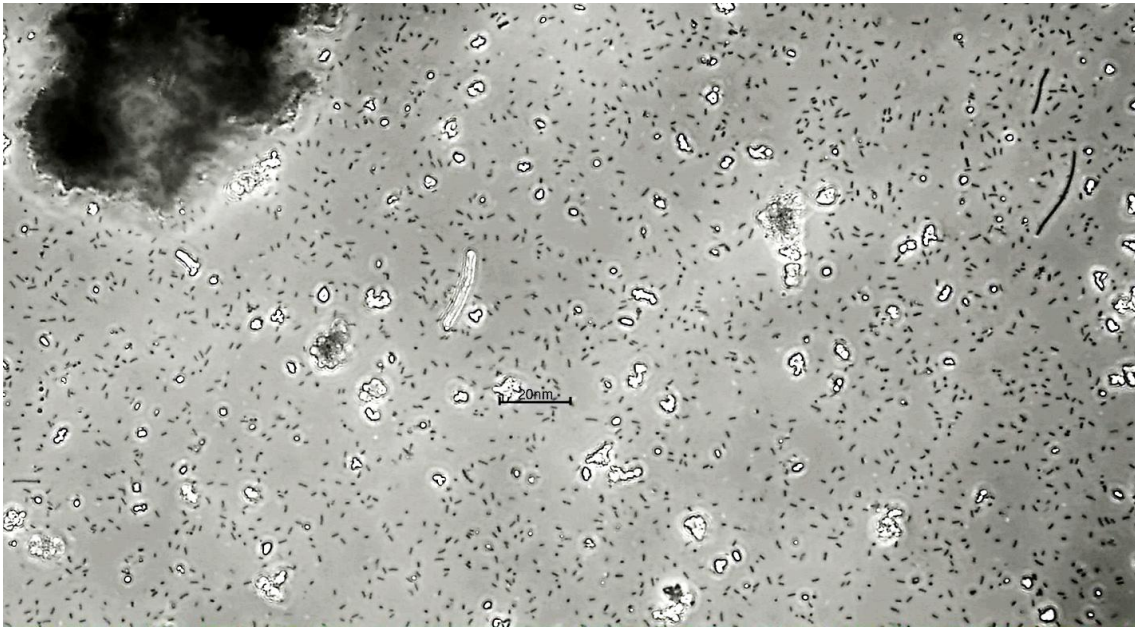


Figura 16. Extraordinario desarrollo de las poblaciones bacterianas tras la incubación de la pieza de hierro en medio 9K + inóculo de la Rivera de Agustín (10% v/v). Obsérvese la presencia de sedimentos.

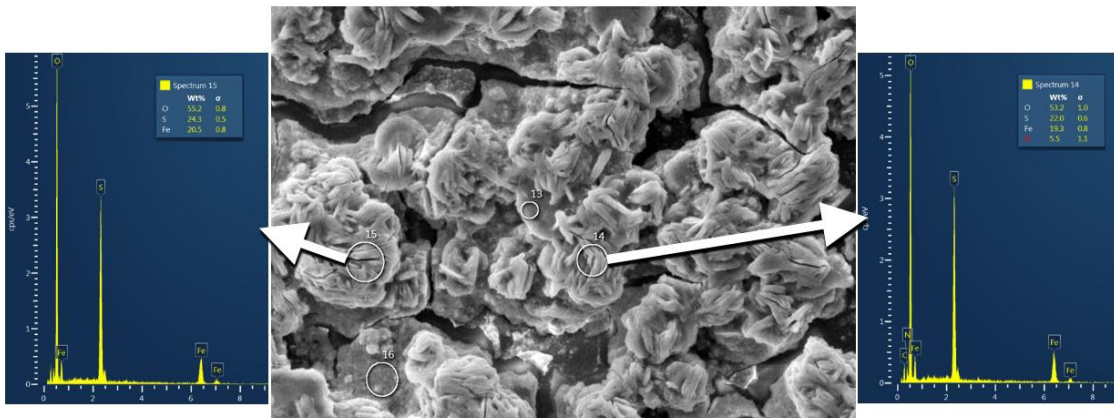


Figura 17. Imagen de SEM-EDS y análisis elemental de precipitados resultado de la incubación de una pieza industrial de hierro fundido en medio 9K + 10% inóculo de la Rivera de Agustín.

A lo largo del periodo de incubación se midieron las variaciones de pH, conductividad y potencial redox. Los resultados se muestran en la figura 18. Las flechas en dicha figura indican la adición de nuevo medio + inóculo como antes se ha comentado.

Obsérvese que el pH (Fig. 18-A) experimentó un aumento de 1,3 puntos (desde 2,5 a 3,8) en los primeros días de incubación. El pH volvía a disminuir tras la adición de nuevo medio seguidamente volvía a ascender.

Así ocurrió durante la mayor parte del periodo de incubación, aunque parece estabilizarse en torno a pH 2,7 en los últimos días.

Con relación a la conductividad, se observa un patrón diferente al del pH (Fig. 18-B) ya que el valor de EC aumentó progresivamente a lo largo de los días. Sin embargo, a partir del día 15 la conductividad desciende hasta situarse a un valor relativamente constante de unos 13 mS/cm.

Por último, se observa que el potencial redox sigue un patrón relativamente inverso al del pH: descenso brusco en los primeros días, con aumento tras la adición de nuevo medio. Una vez más, tras 15 días de incubación el valor de ORP se estabilizó en torno a 300 mV (Fig. 18-C).

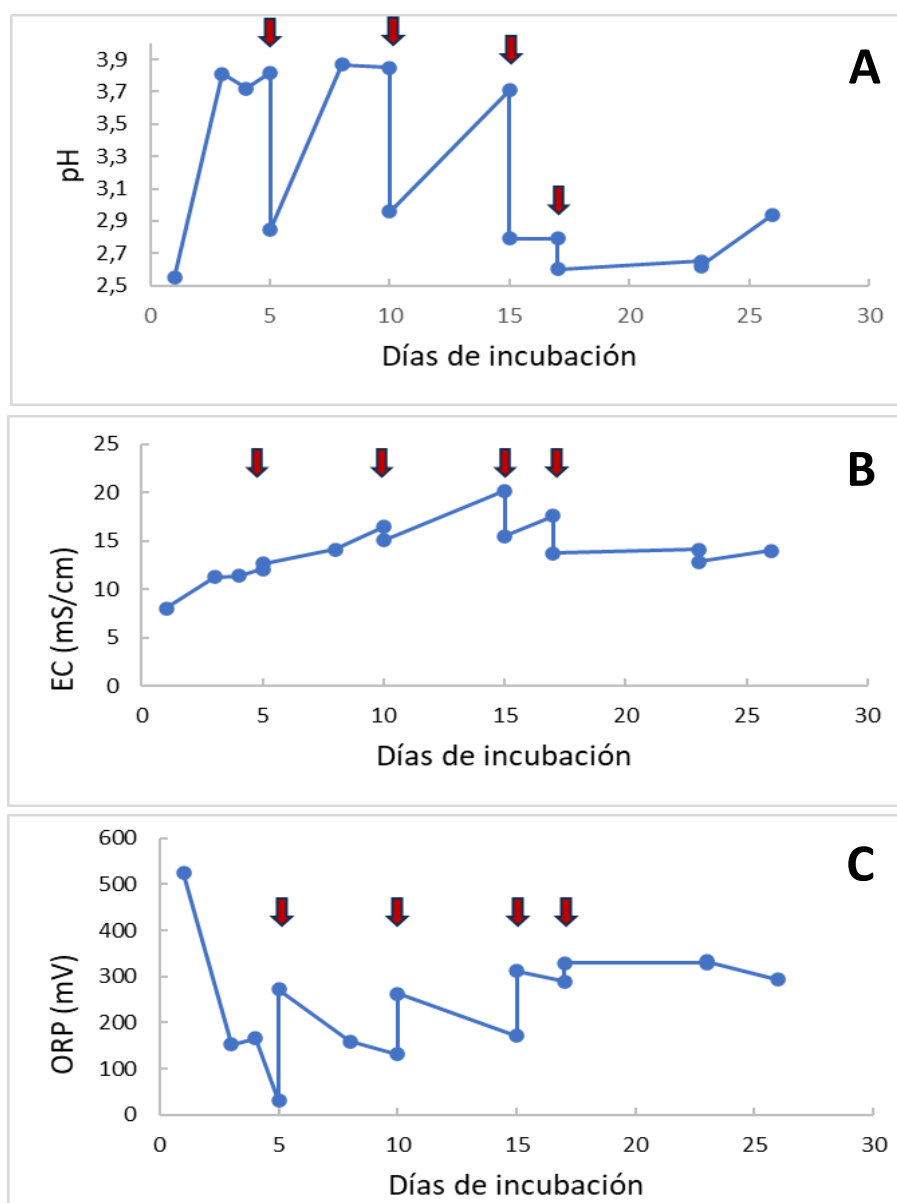


Figura 18. Evolución del pH (A), conductividad (B) y potencial redox (C) en el medio de incubación de la pieza industrial de hierro. Las flechas indican la adición de nuevo medio 9K + inóculo de la Rivera de Agustín.

4.4 Efecto de la incubación con aguas de la Rivera de Agustín sobre piezas de hormigón, en presencia o ausencia de hierro (II).

Con el objetivo de reproducir los efectos de las aguas afectadas por AMD sobre las construcciones de hormigón frecuentes en las instalaciones industriales de la FPI, se realizó un nuevo experimento donde a 50 ml del medio de incubación 9K se añadió un inóculo de 5 ml enriquecido durante 4 semanas de incubación, como se indica en el apartado 4.2. Cada frasco contenía, por tanto, 44 mg de hierro. En los frascos usados se introdujeron piezas de hormigón de unos 4 gramos en presencia o ausencia de 2 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Es decir, en los frascos donde se añadieron sales de hierro reducido, se añadieron 400 mg de Fe que hay que sumar a los contenidos en el medio de enriquecimiento. El periodo de incubación fue de 24 días. El diseño experimental fue (tabla 7).

Frasco	Medio 9K (ml)	Inóculo (5 ml)	Hierro (mg)
B1	50	Filtrados	44
B2	50	Filtrados	444
M1	50	No filtrados	44
M2	50	No filtrados	444

Tabla 7. Diseño experimental de la incubación de piezas de hormigón en presencia de medio 9K + inóculo de la Rivera de Agustín \pm Fe \pm S.

Tras el periodo de incubación las piezas de hormigón perdieron un leve porcentaje de peso, aunque de mayor magnitud cuando los medios contenían bacterias (Fig. 19):

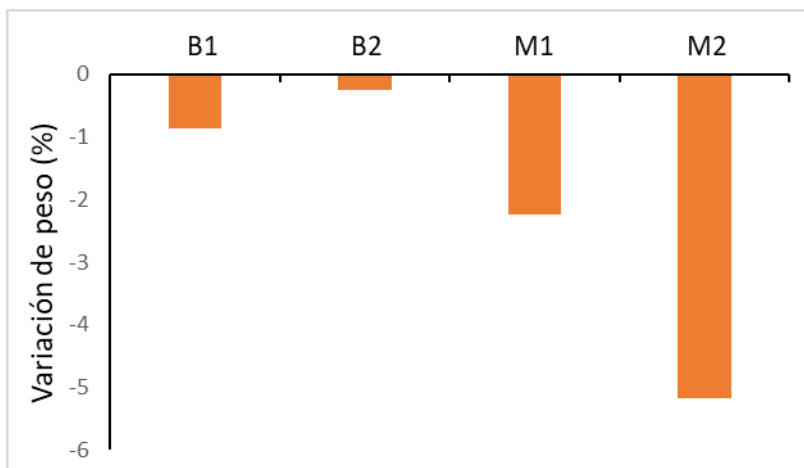


Figura 19. Variación de peso de las piezas de hormigón.

Cuando se analizaron las variaciones de pH, conductividad y potencial redox se observó una clara evolución diferencial entre los diferentes tratamientos (Fig.20). Así, el pH del medio se incrementó notablemente en los medios estériles sin suplemento de hierro (B1), alcanzando valores superiores a 8,0. Este aumento fue progresivo en presencia de bacterias (M1). Sin embargo, con suplemento de hierro y en ausencia (M1) o presencia de bacterias (M2) el pH se mantuvo estable en torno a pH 2,0. (Fig. 20A)

La conductividad disminuyó en todos los casos, aunque en B1 y B2 la disminución fue progresiva y en M1 y M2, la disminución ocurrió en la primera semana de cultivo, alcanzando un valor estable que no se alteró durante el periodo de incubación (Fig. 20B).

El potencial redox se comportó de forma similar al pH, aunque en sentido inverso (Fig. 20C). Es decir, en las muestras sin bacterias y sin suplemento de hierro (B1), el valor de Eh' disminuyó bruscamente; sin embargo, en medios con bacterias (M1) esta disminución fue progresiva y dependiente del tiempo de incubación. En los medios suplementados con hierro, sin (B2) o con (M2) bacterias, el valor de Eh' aumentó hasta alcanzar niveles similares a los observados en tiempo 0.

Mediante ICP-óptico se analizaron los metales disueltos en el medio al final del periodo de incubación. La concentración de éstos fue, de mayor a menor, en los medios no suplementados con hierro: S > Ca > K > Mg > Na, mientras que en los suplementados con hierro fue S > Fe > Ca > Mg > Al > P > Na > Mn > K. En los medios no suplementados con hierro no se detectaron Fe, Al, P ni Mn (Fig. 21).

Con relación a la proporción a las proporciones de Fe²⁺ y de Fe³⁺, medidas con fenantrolina, en los medios suplementados con hierro, la forma predominante fue el Fe³⁺, sin que influyera la presencia de bacterias. A la inversa ocurrió en los no suplementados (Fig. 22), aunque su concentración es prácticamente imperceptible (<1,2 mg/l). Además, se observaron numerosos precipitados, que explican la disminución de hierro en el medio (8000 mg/ml añadidos frente a unos 1400 mg/ml recuperados).

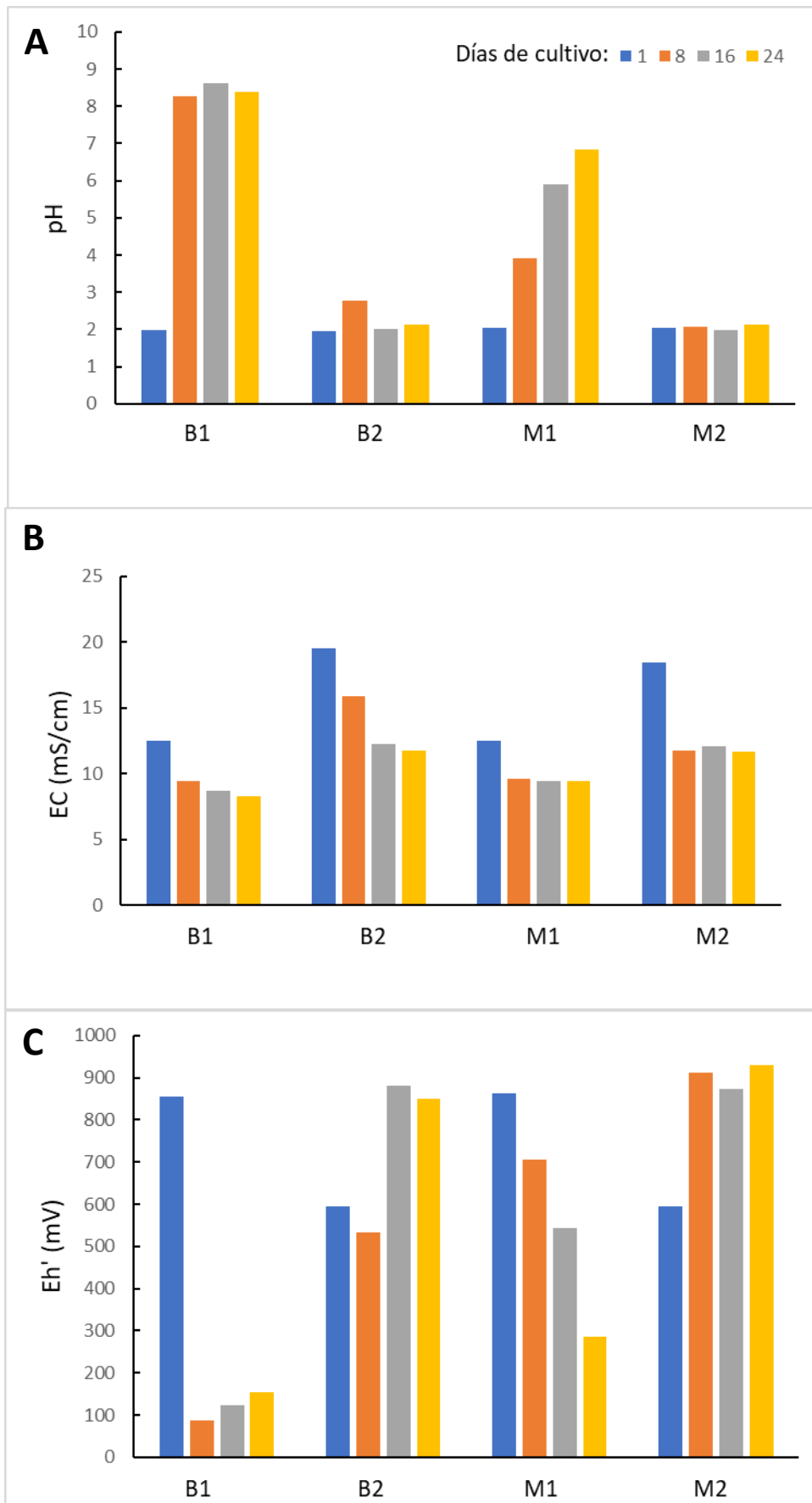


Figura 20. Evolución del pH, conductividad y potencial redox en los diferentes tratamientos.

A: pH; B: conductividad; C: Potencial redox

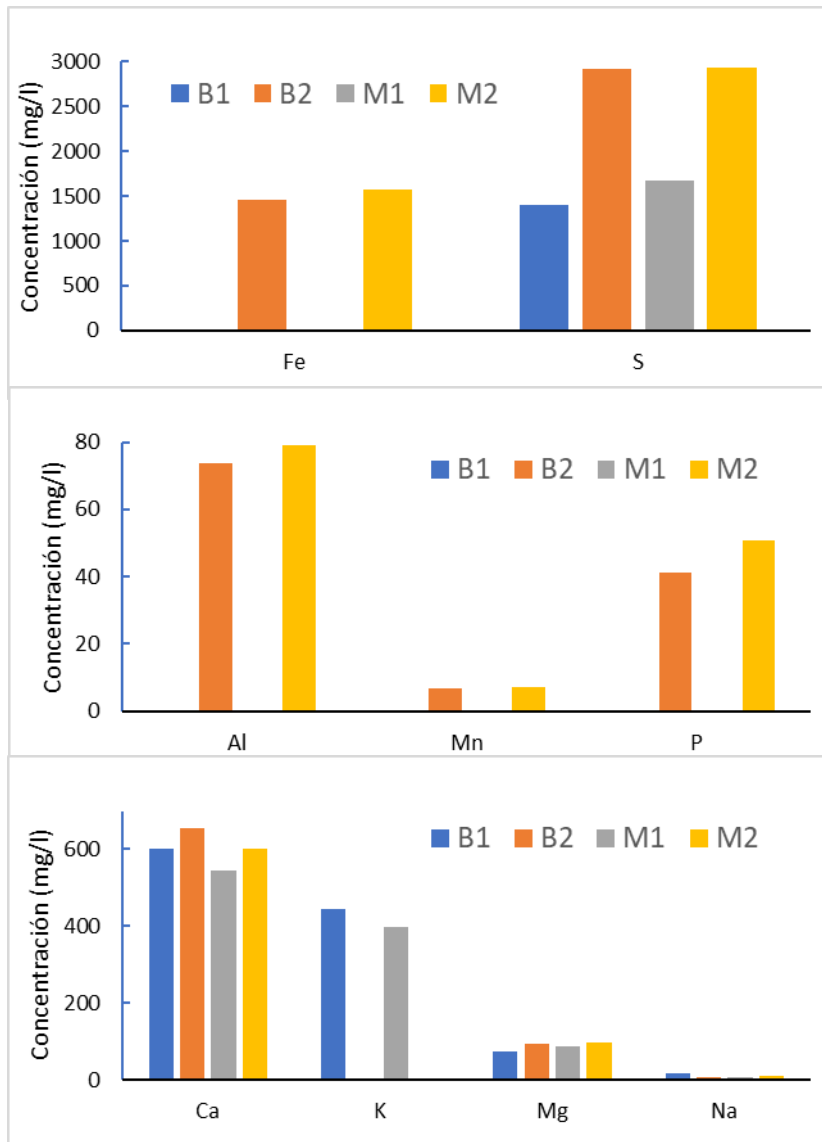


Figura 22 Concentración de metales en el medio

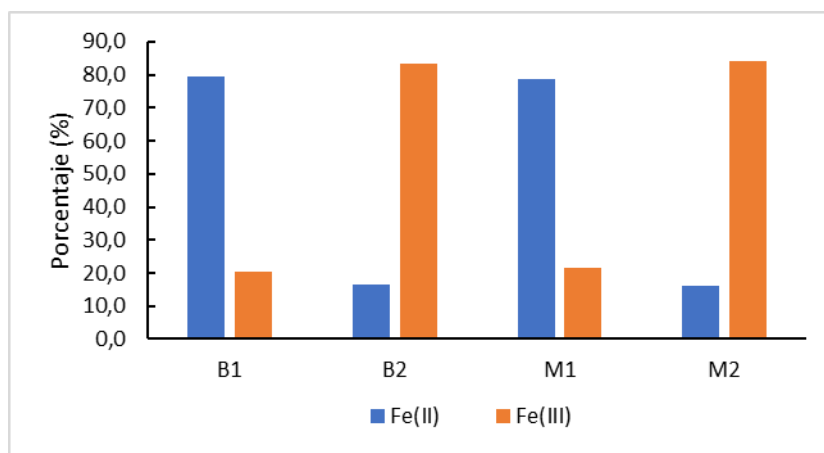


Figura 21. Proporción de Fe²⁺ / Fe³⁺ en el medio.

4.5 Efecto de la incubación con aguas de la Rivera de Agustín sobre piezas de hormigón, en presencia o ausencia de acero y/o S elemental.

Con el objetivo de reproducir los efectos de las aguas afectadas por AMD sobre el hormigón armado, se hizo un nuevo experimento donde además de las piezas de hormigón se usaron varillas roscadas de acero (Fe >98% + C 0,067% + Mn 0,53% + Si, P, Al < 0,07%). En este caso no se usó FeSO₄ como suplemento.

El protocolo usado fue el siguiente (tabla 8):

Frasco	Medio 9K (ml)	Inóculo (10ml)	Azufre (g)
B	100	Filtrado	-
1	100	No filtrado	-
2	100	No filtrado	-
BS	100	Filtrado	1
1S	100	No filtrado	1
2S	100	No filtrado	1

Tabla 8. Diseño experimental de la incubación de piezas de hormigón en presencia de medio 9K + inóculo de la Rivera de Agustín + acero ± S.

El periodo de incubación fue de 34 días, en agitación continua en un agitador orbital, a 30°C. El pH inicial se reguló a 2,0. En dicho periodo se observó un cambio de color muy conspicuo en todos los frascos, además de la formación de precipitados (Fig. 23). Obsérvese que, a tiempo 0, se aprecian los granos de azufre elemental (insolubles) y las piezas de acero y hormigón usadas.

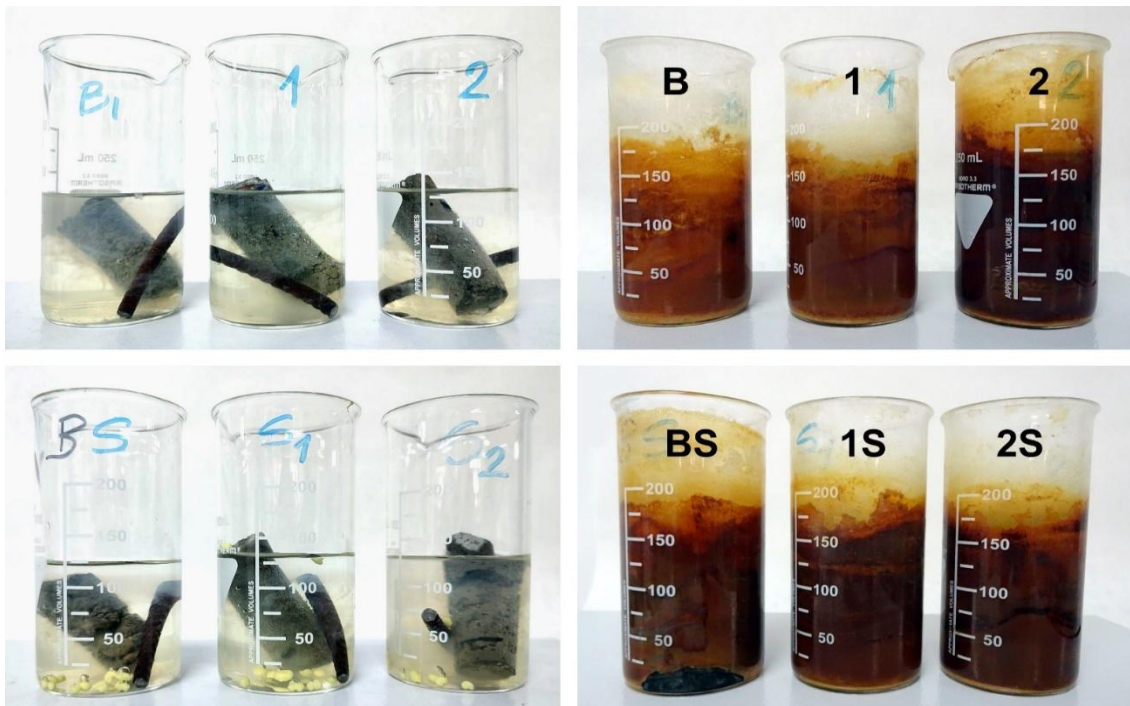


Figura 23. Cambios visibles en el color del medio de cultivo tras 30 días de incubación. A la izquierda, la fotografía corresponde al tiempo 0.

Al final del periodo se observaron los siguientes cambios en el peso del hormigón y del acero (Fig. 24).

Obsérvese que las todas las piezas de acero perdieron alrededor de un 8% de peso, mientras que las de hormigón aumentaron levemente su peso (menos de un 2%). La razón de este incremento fue la presencia de precipitados fuertemente adheridos en la superficie del hormigón que no se pudieron eliminar con chorro de agua a presión ni cepillado manual. Obsérvese también que el color de los precipitados era anaranjado salvo en las muestras con bacterias y azufre (1S y 2S) cuyo color fue negruzco.

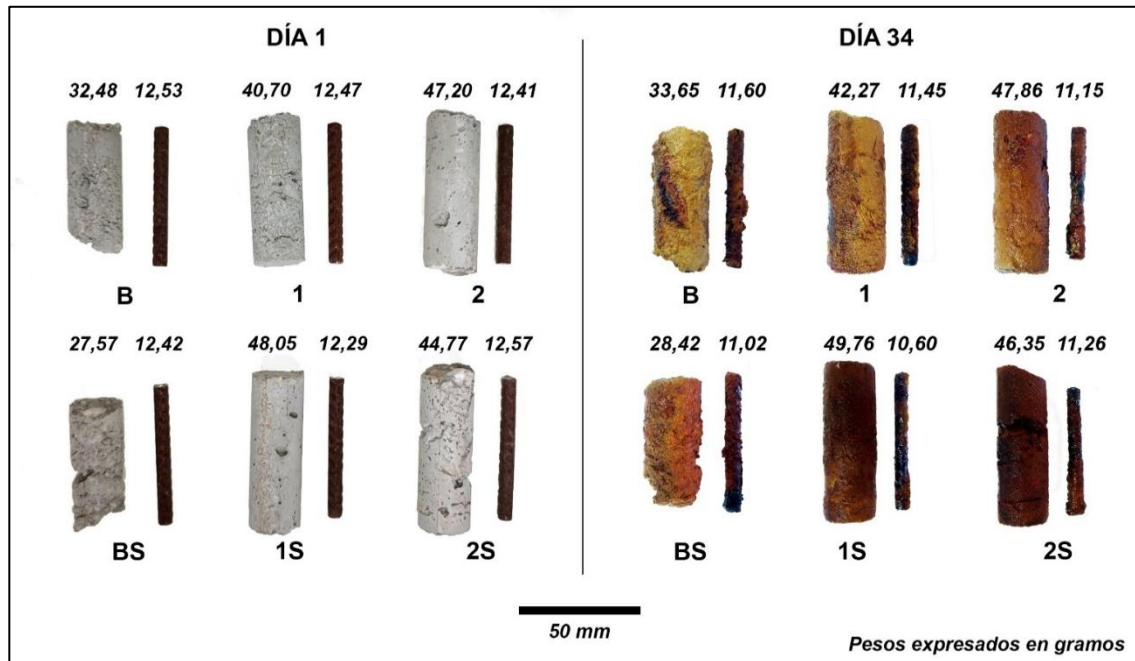


Figura 24. Variaciones del peso en las piezas de hormigón y de acero. Los números corresponden al peso expresado en gramos.

Como en los casos anteriores, se midió la evolución del pH, conductividad y potencial redox. Con objeto de facilitar la interpretación de los resultados, los datos de las muestras 1 y 2 (con bacterias, sin azufre) se promediaron y se agruparon bajo la denominación de M; de igual forma los de las muestras 1S y 2S (con bacterias y azufre) se agruparon bajo la denominación de MS. Los controles estériles mantuvieron la denominación: B (sin azufre), BS (con azufre).

Por otra parte, y con objeto de mantener un volumen constante de 100 ml, periódicamente se añadían a los frascos nuevo medio 9K + inóculo filtrado (sin bacterias) o no filtrado (con bacterias).

Los resultados obtenidos, que se muestran en la figura 25, indican que el pH aumenta hasta cerca de 3 puntos al comienzo de la incubación. Ese aumento fue mayor en medios estériles. La adición de nuevo medio provoca una caída inmediata del pH aunque sin llegar al nivel inicial de pH 2,0. Estos efectos se observan a lo largo del todo el tiempo de incubación aunque con una amplitud más baja que al comienzo (el pH se mantiene entre 2,5 y 3,5). En los últimos días de incubación, no

se aprecian diferencias entre los medios con o sin bacterias, con o sin azufre (Fig. 25-A).

Con respecto a la conductividad (Fig. 25-B) se observa un incremento progresivo a lo largo del periodo de incubación, con descensos inmediatos, aunque breves, tras la adición de nuevo medio. Al final del periodo de incubación, el mayor aumento del valor de conductividad se obtuvo en medio con bacterias y sin azufre (de un valor de 12 mS/cm al comienzo del experimento a un valor de unos 25 mS/cm al final del periodo de incubación).

Los resultados con relación al potencial redox se muestran en la fig. 25-C. En los primeros 5 días de incubación se observó un dramático descenso del valor de ORP desde los 470 mV iniciales hasta valores negativos de unos -100 mV, con la excepción de los medios con bacterias+S cuyo valor de ORP descendió hasta unos 150 mV. La adición de nuevo medio provocó siempre un aumento del valor de ORP hasta aproximadamente el valor inicial. Al final del experimento, los valores más bajos de ORP se observaron en los medios estériles sin azufre. Si los datos se hubieran expresado como Eh' , la oscilación en mV del potencial redox se extendió desde los 77 mV (en medios estériles) hasta los 668 mV (en medios no estériles) sin que hubiera diferencias importantes en presencia o ausencia de azufre.

Como en el experimento anterior, la concentración de elementos químicos se midió en los medios de cultivo de cada tratamiento al final del periodo de incubación (Fig. 26). Los metales más abundantes fueron (de mayor a menor concentración): $S > K > Mg > Ca > Al > Zn > Mn > Na > Fe > Ni > Co$. Nótese que, a pesar de la presencia de las barras de acero, la concentración de hierro en el medio fue muy baja. Obsérvese que azufre, aluminio, manganeso, zinc, cobalto y níquel siguen un patrón similar: en medios estériles hay una concentración sensiblemente menor que en medios con bacterias. La presencia/ausencia de azufre provocó cambios en la concentración de mayor (Al y Ni) o menor grado (S, Co y Zn). El hierro tuvo una respuesta diferente, ya que las mayores concentraciones se obtuvieron en medios con azufre, independientemente de la presencia de bacterias. Con respecto a los metales alcalinos y alcalino-térreos, el Ca y el Na apenas mostraron diferencias entre los distintos medios. Sin embargo, el K y el Mg generaron respuestas muy similares a las observadas con otros metales (con excepción del Fe): una mayor concentración en medios con bacterias.

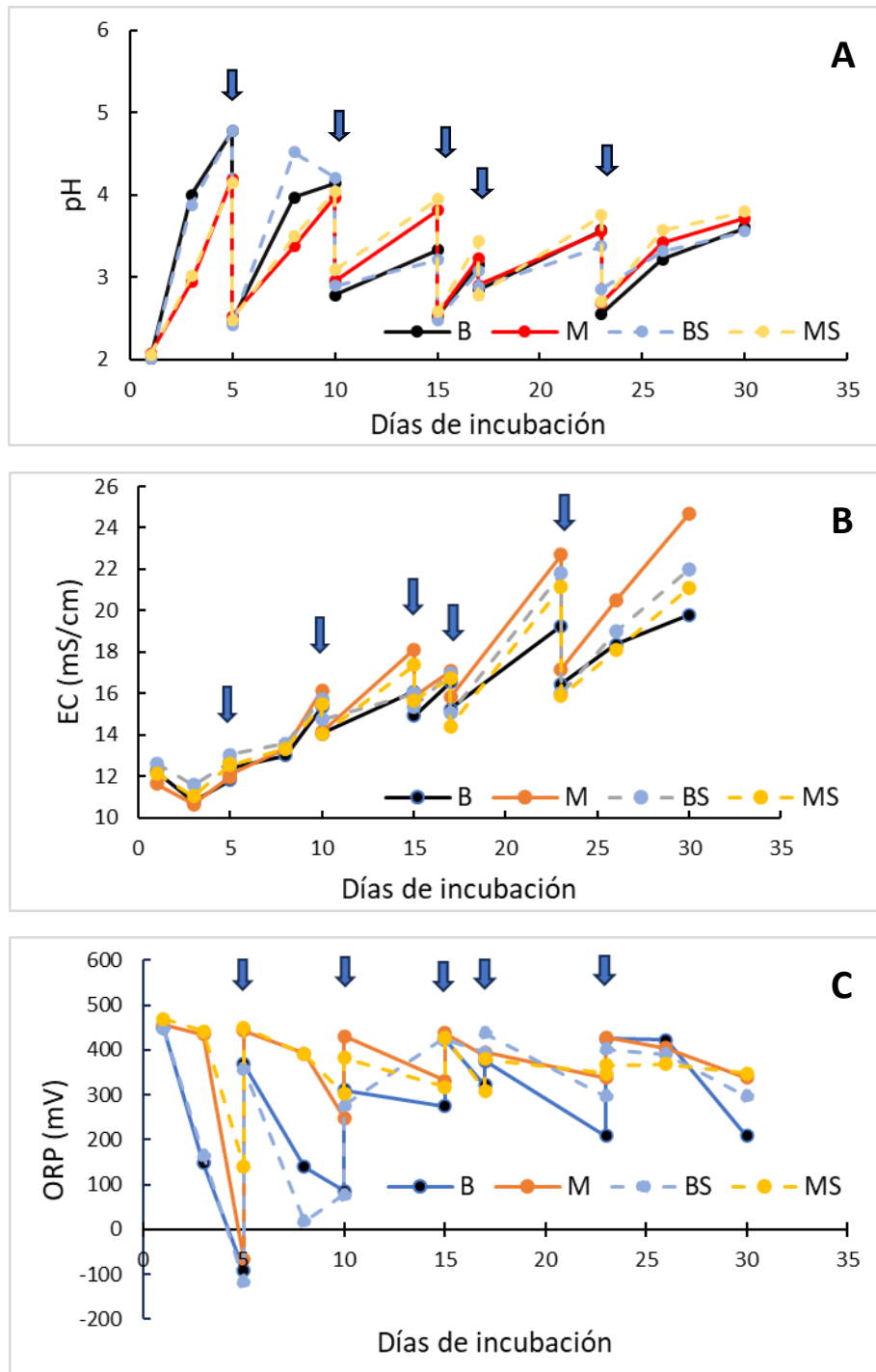


Figura 25. Evolución del pH (A), conductividad (B) y potencial redox (C) en el medio de incubación. Las flechas indican la adición de nuevo medio 9K + inóculo de la Rivera de Agustín.

B: muestras estériles sin azufre; **M:** muestras no estériles sin azufre; **BS:** muestras estériles con azufre; **MS:** muestras no estériles con azufre.

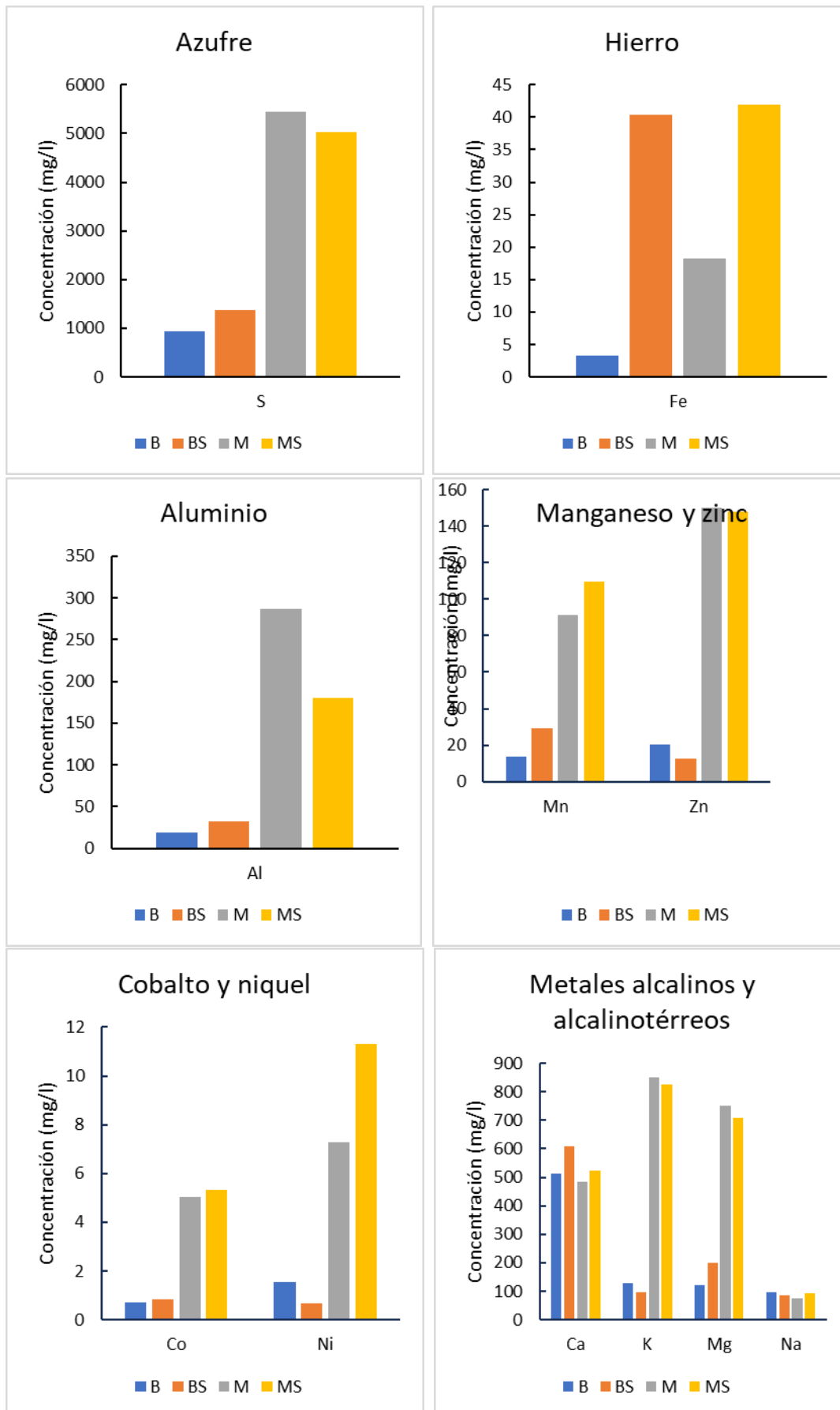


Figura 26. Concentración de elementos químicos en los medios de cultivo al final del periodo de incubación.

B: estéril; BS: estéril + S; M: no estéril; MS: no estéril + S

Con relación al estado de óxido-reducción del hierro se observó que Independientemente de la concentración total de hierro, en ausencia de bacterias, la mayor parte del hierro se encuentra reducido, mientras que en presencia de bacterias se observó una fuerte oxidación, acompañada de una disminución de la concentración de hierro reducido (Fig. 27). La presencia de azufre no afectó a la proporción Fe^{2+}/Fe^{3+} en los medios con bacterias.

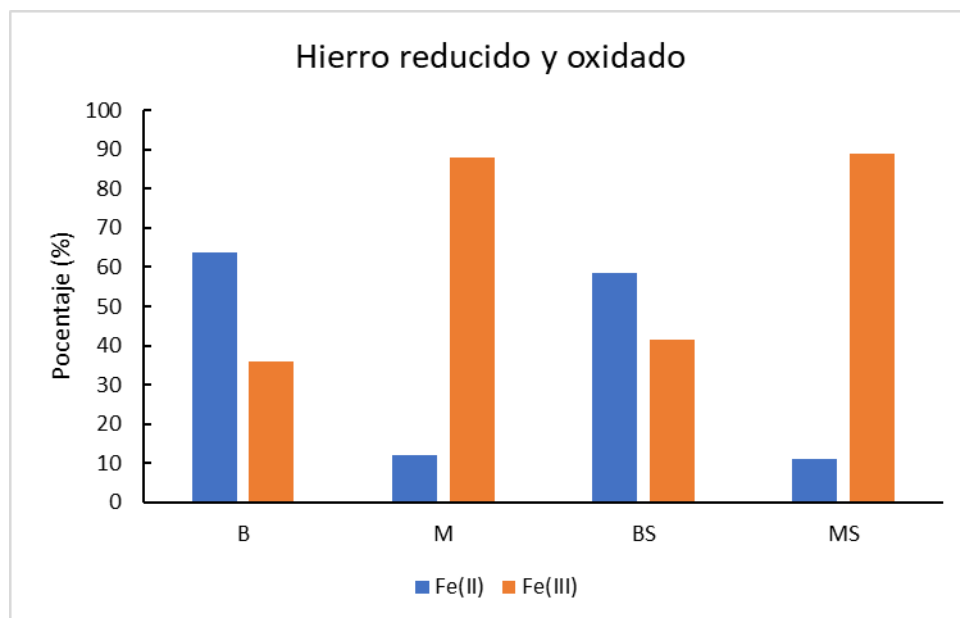


Figura 27. Proporción de Fe^{2+} y Fe^{3+} (expresado en porcentaje) en los diferentes tratamientos.

B: estéril; BS: estéril + S; M: no estéril; MS: no estéril + S

Como en experimentos anteriores, se observaron numerosos precipitados en los medios de cultivo. Parte de los precipitados se depositaron en portaobjetos y se dejaron secar, para su análisis mediante SEM-EDS. Los resultados obtenidos se muestran en la fig. 28. Obsérvese que, en los sedimentos procedentes de los tratamientos sin azufre, con (M) o sin bacterias (B), se aprecian dos formas de cristalización lo que hace suponer una composición diferencial. Sin embargo, el análisis químico mediante EDS mostró una composición prácticamente idéntica en ambos tipos de morfología, a las que hemos definido como “lisa” y “rugosa” (tabla 9).

La presencia de potasio en la composición de estos precipitados sugiere que se trata mayoritariamente de jarosita ($KFe^{3+}_3(SO_4)_2(OH)_6$). La proporción molar de K:S: Fe en la jarosita es de 1:1,5:4,2, respectivamente; la proporción promedio en las muestras fue de K:6,3-S:2,3-Fe:1.

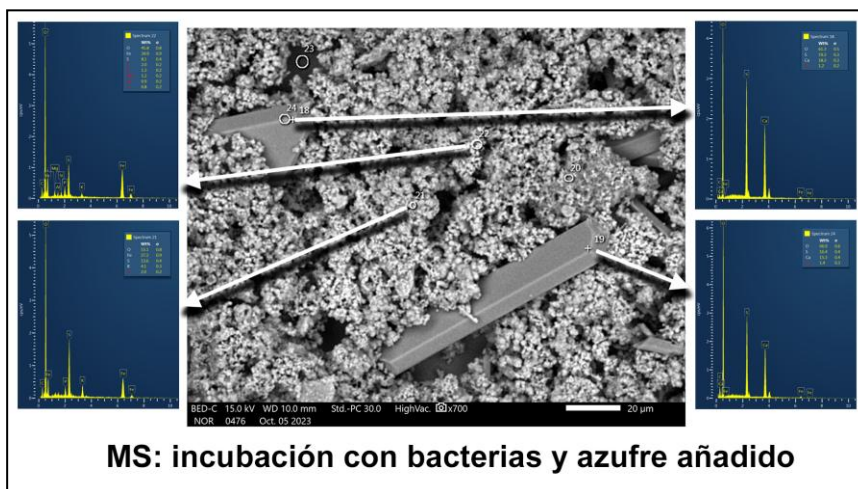
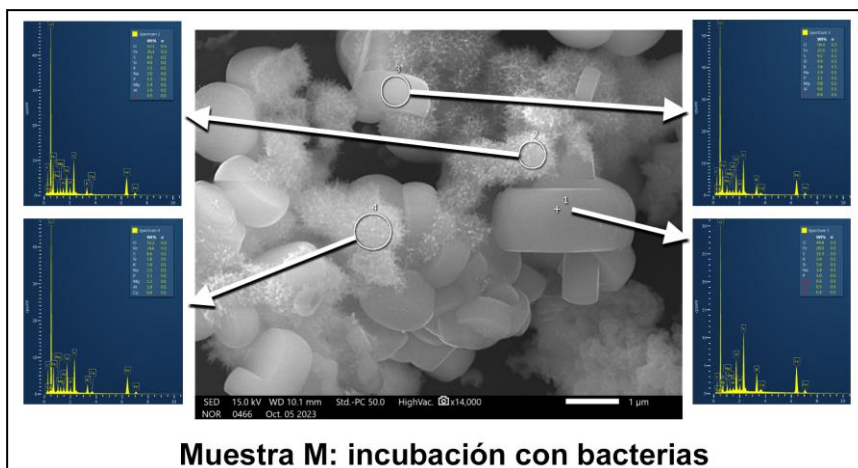
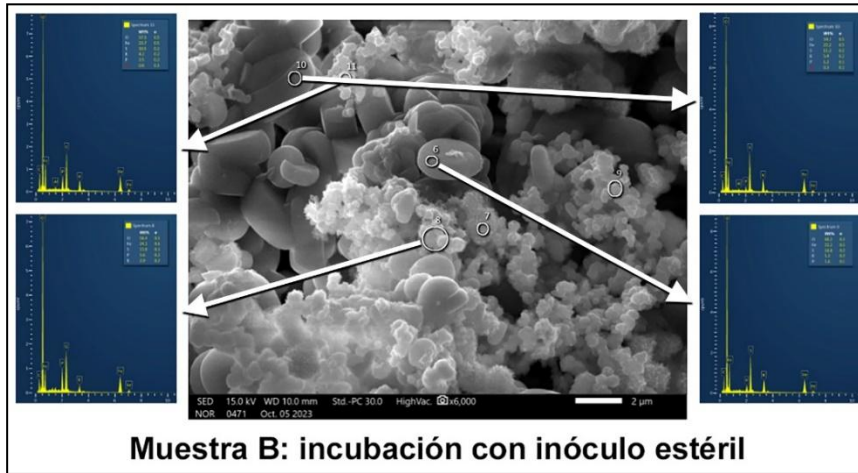


Figura 28 Imagen y análisis químico de precipitados por SEM-EDS.

Sin embargo, en muestras incubadas en presencia de bacterias y de azufre (MS) se apreciaron importantes diferencias entre los precipitados de aspecto rugoso y los cristales bien formados de morfología lisa. En el primer caso (tabla 9), los precipitados tuvieron una composición muy similar a la observada en las muestras sin azufre; sin embargo, los cristales poseían una elevada concentración de calcio, y muy poco hierro. Esta composición unida a la morfología de los cristales sugiere que se trata de yeso (CaSO_4).

Tratamiento	B		M		MS	
Morfología	LISA	RUGOSA	LISA	RUGOSA	LISA	RUGOSA
O	60	56,9	48,5	49,8	64,1	49,5
Fe	22,2	23,9	27,6	26,1	1,3	33,6
S	11	10,8	10,2	9,4	17,8	10,9
K	5,3	3,6	4,7	3,9	1,3	2,7
Ca			0,5	0,5	16,8	

Tabla 9 Proporción (% en peso) de elementos químicos en los precipitados tras análisis por SEM-EDS.

B: estéril; M: no estéril; MS: no estéril + S

4.6 Efecto de la incubación continua de piezas de hormigón en medio que incluye exclusivamente aguas de la Rivera de Agustín.

En anteriores experimentos se usó medio 9K al que se añadieron inóculos de la Rivera de Agustín, como fuente de bacterias. Además, hubo que rellenar periódicamente los frascos de cultivo con medio nuevo, dada la evaporación del medio.

En este experimento, aún incompleto y del que por tanto sólo se muestran resultados preliminares, se usó exclusivamente agua de la Rivera de Agustín (sin medio 9K) y sin ningún tipo de suplemento (hierro y/o azufre) y se diseñó un medio de aporte continuo de agua mediante el uso de bombas peristálticas de tal forma que el volumen de medio se mantuviera constante en los “reactores” (Fig. 29). Se usaron sólo dos tipos de tratamiento: agua filtrada con filtros de $0,22\ \mu\text{m}$ (medio estéril) o agua no filtrada (medio con bacterias). Se muestran los resultados correspondientes a los primeros 15 días de incubación realizada a temperatura ambiente, con agitación continua en un agitador orbital.

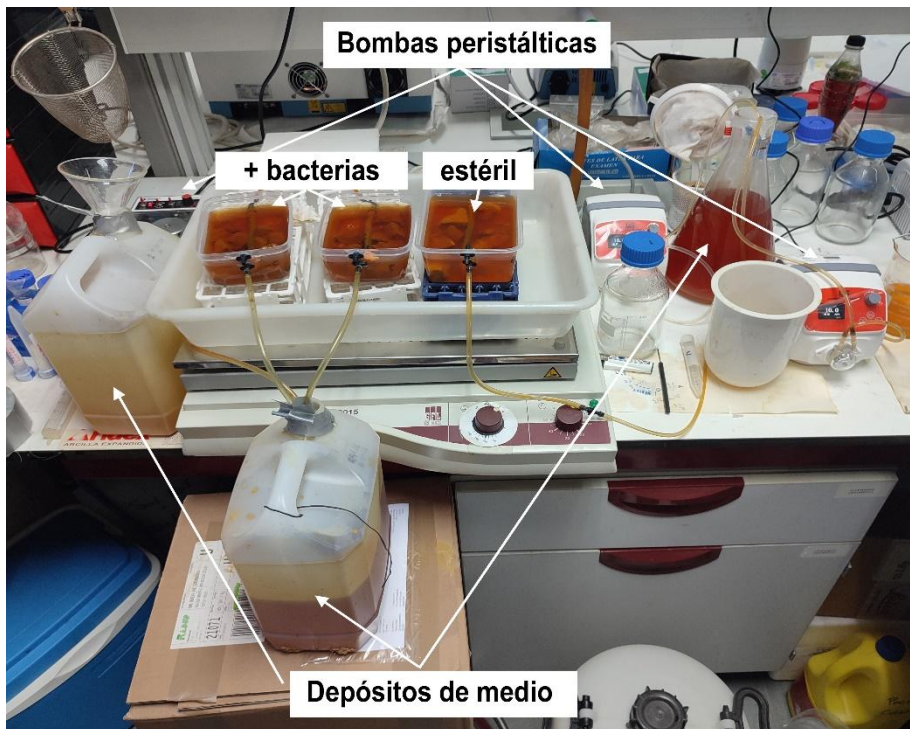


Figura 29 Montaje experimental de flujo continuo de agua de la Rivera de Agustín (estéril o con bacterias) sobre piezas de hormigón.

A lo largo del periodo de incubación se observaron los siguientes cambios en los parámetros físico-químicos (fig. 30).

El pH registró oscilaciones a lo largo del periodo de incubación. En los primeros días se observó un descenso similar en las muestras estériles y no estériles. Entre el día 3 y el 9, hubo un incremento de pH en las muestras estériles de 0,2 puntos, mientras que en las cultivadas con bacterias se mantuvo estable en torno a pH 2,4. Entre el día 9 y el 15, el valor de pH aumentó en las muestras no fértiles hasta 2,55 mientras que en las fértiles disminuyó hasta un valor de 2,35. (Fig. 30-A)

La conductividad mostró una evolución creciente a lo largo de todo el periodo de incubación, siendo levemente más elevado en las muestras estériles (Fig. 30-B).

Por el contrario, la evolución del potencial redox fue decreciente, con pocas variaciones entre las muestras con o sin bacterias. El descenso fue aproximadamente de 150 mV (Fig. 30-C).

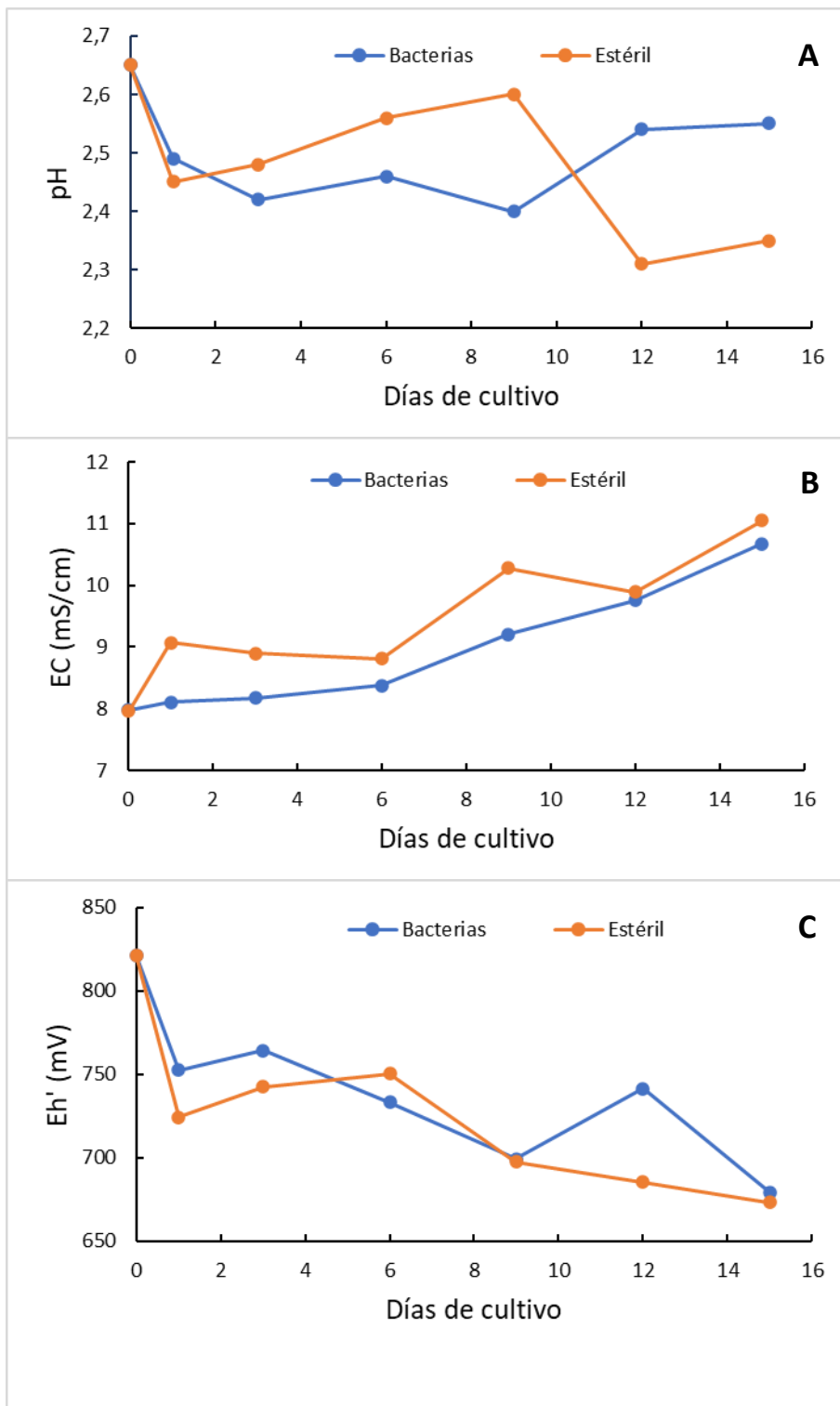


Figura 30. Evolución del pH (A), conductividad (B) y potencial redox (C) en los cultivos.

Con relación al contenido de hierro, se observó que la concentración de hierro en el medio (Fig. 31-A) descendió en presencia y ausencia de bacterias. En el medio estéril, el descenso fue brusco en los primeros días manteniéndose relativamente estable la concentración hasta el final del periodo de incubación. En el medio con bacterias, el descenso tuvo menos oscilaciones, aunque al final de la incubación, apenas hubo diferencias entre los dos tratamientos.

El cambio más notable entre los dos tratamientos se observó cuando se midió la proporción de hierro reducido y de hierro oxidado (Fig. 31-B). En el medio con bacterias esta proporción se mantuvo relativamente estable con un valor de 0,3. Sin

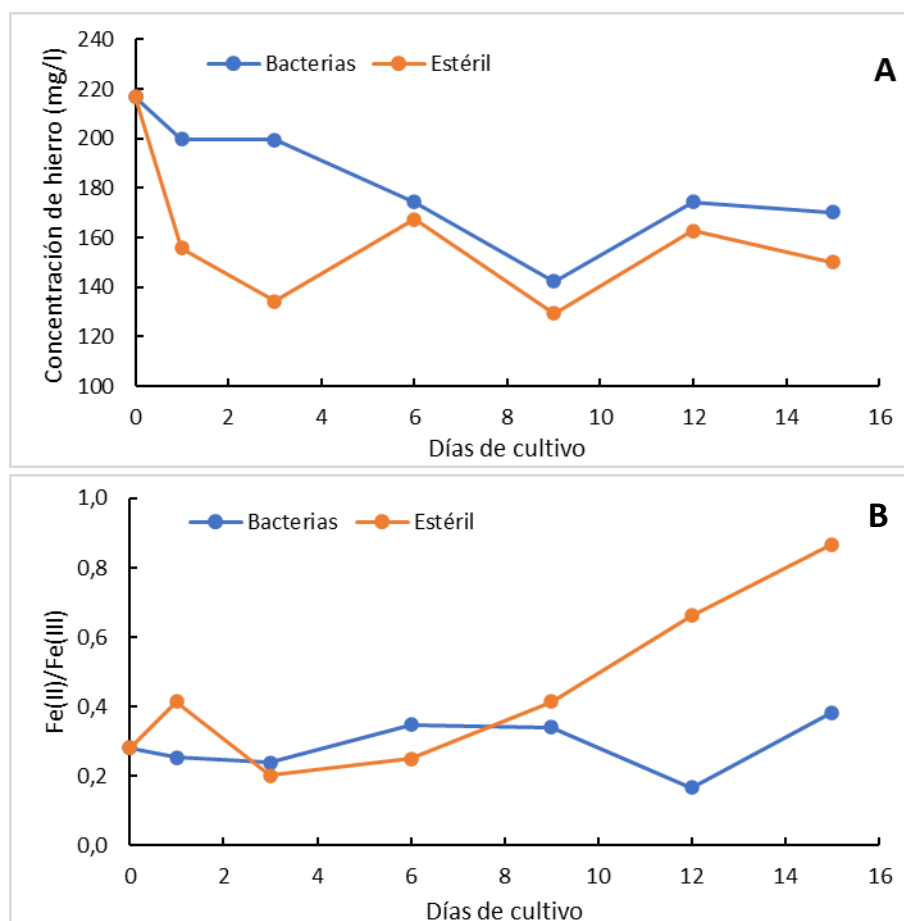


Figura 31 Evolución de la concentración de hierro en los medios estéril y no estéril (A) y de la proporción Fe(II)/Fe(III) en ambos tratamientos (B)

embargo, en el medio estéril se incrementó muy significativamente dicha proporción, es decir, aumentó la concentración de Fe^{2+} con respecto a la de Fe^{3+} desde 0,28 hasta 0,87 mV, es decir, más de 300%.

La observación macroscópica de las muestras permitió observar diferencias muy notables (Fig. 32). Así, en las muestras estériles, el hormigón no acumuló apenas precipitados, aunque se observaron pequeñas erosiones. Sin embargo, en las muestras con bacterias, se observaron numerosos precipitados con forma más o menos esférica.



Figura 33. A la izquierda, pieza de hormigón en medio estéril; a la derecha, en medio con bacterias.

Bajo la lupa binocular se observó que los precipitados esféricos formados en el hormigón expuesto a la acción bacteriana contenían formaciones cristalinas (Fig. 33-A). Una extensión de estos precipitados se observó con un microscopio de contraste de fase donde se pudo apreciar la existencia de numerosas formas cristalinas (Fig. 33-B). Sin embargo, en el medio de cultivo no se apreciaron estas formaciones cristalinas, aunque sí se comprobó la presencia de numerosas bacterias (Fig.33-C)

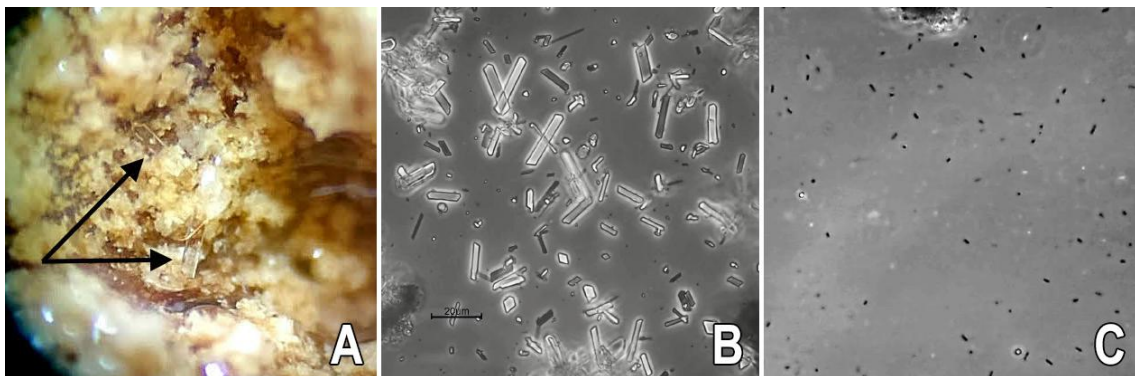


Figura 32 (A) Cristales (flechas) en gránulos precipitados bajo una lupa binocular (B) Numerosos cristales en una extensión de los gránulos precipitados. (C). Bacterias en el medio de cultivo.

Las piezas de hormigón fueron raspadas para obtener el material necesario para el análisis de las comunidades bacterianas. Con el mismo objetivo, se filtró el inóculo usado procedente de la Rivera de Agustín. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 34. Obsérvese que la gran mayoría de especies identificadas son Proteobacterias, es decir bacterias gram negativas. Estas bacterias aparecieron en todas las muestras, incluyendo las supuestamente estériles. El género más abundante fue *Acidiphilium* en todas las muestras. *Acidibacter* no se encontró en el medio AMD, mientras que *Leptospirillum* no se encontró en los biorreactores a los que se añadió inóculo no filtrado, es decir, no estéril.

Curiosamente, en el inóculo procedente de la Rivera de Agustín (AMD) no se

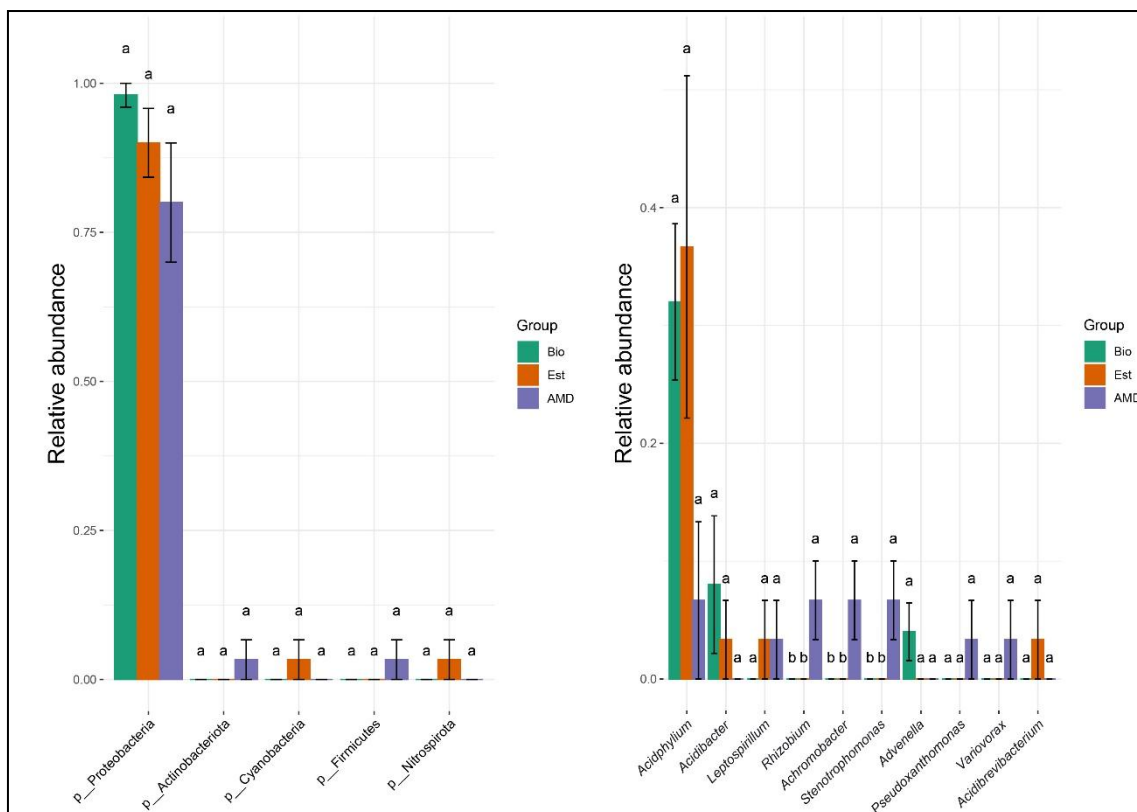


Figura 34 Diversidad microbiana de las muestras de hormigón (Bio: con bacterias; Est: estéril) y del inóculo de la Rivera de Agustín (AMD).

A la izquierda: phyla bacterianos; a la derecha: géneros bacterianos.

identificaron los géneros anteriores sino *Rhizobium*, *Achromobacter* y *Stenotrophomonas*, bacterias cuyo metabolismo difiere notablemente de las halladas en los biorreactores: *Acidiphilium* oxida compuestos orgánicos usando hierro férrico e incluso azufre (Li et al., 2020; (Panyushkina, et al., 2021)Panyushkina et al., 2021); *Acidibacter* es un heterótrofo obligado que crece a pH moderadamente ácido (pH 3,5-4) (Falagan y Johnson, 2014); *Leptospirillum* es quimiolitotrofo aerobio oxidante de hierro (García-Moyano et al., 2007)(García-Moyano et al., 2007); *Rhizobium* es una bacteria heterótrofa/autótrofa facultativa fijadora de nitrógeno (Munyai et al., 2021); *Achromobacter* y *Stenotrophomonas* son bacterias heterotrofas que pueden oxidar azufre e incluso manganeso (Dean et al., 2016; Mao et al., 2022; Tianhao et al., 2022). Debe subrayarse, no obstante, que la comunidad bacteriana de las aguas

usadas en este experimento contenía un número relativamente bajo de bacterias, por lo que fue necesario procesar entre 3 y 5 muestras de cada ambiente.

En cualquier caso, un análisis de componentes principales mostró que la muestra empleada -agua afectada por AMD de la Rivera de Agustín- difería en su composición microbiológica de las obtenidas en los biorreactores que contenían hormigón (Fig. 35).

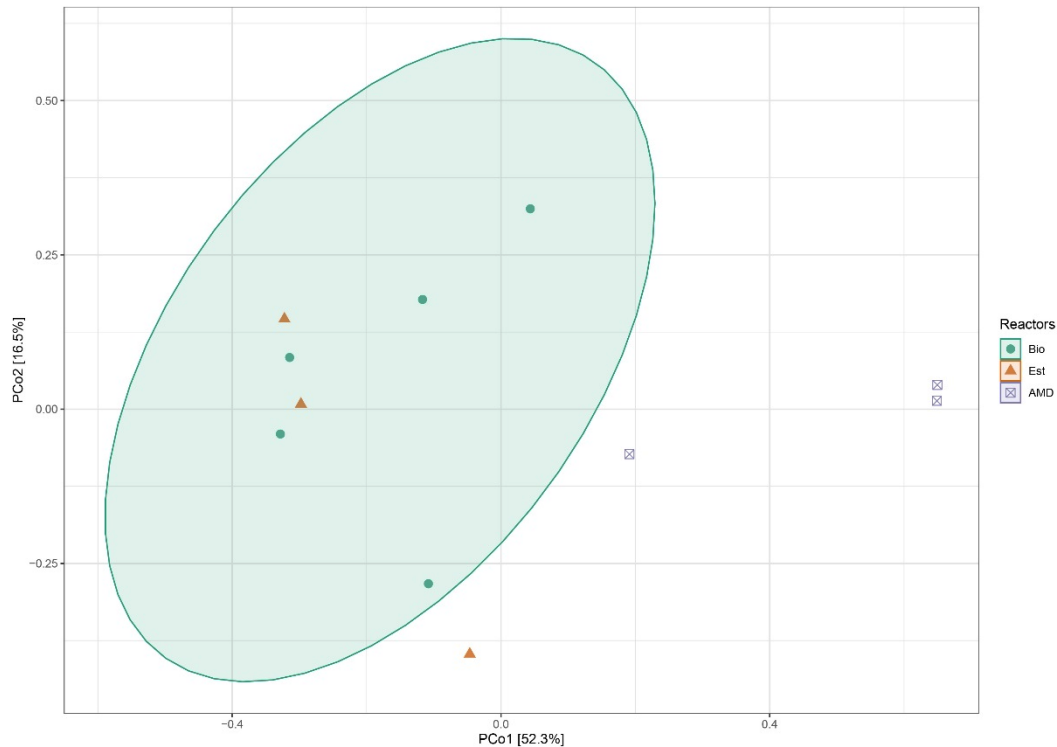


Figura 35 Análisis de componentes principales de las comunidades bacterianas de los reactores (Bio: con bacterias; Est: estéril) y del inóculo de la Rivera de Agustín (AMD).

Por último, se analizó mediante un análisis multifactorial de redundancia la relación entre los géneros de bacterias identificados diversas variables físico-químicas. Los resultados obtenidos (Fig. 36) indican que los géneros identificados en los biorreactores se correlacionan con la concentración de hierro reducido y la conductividad, mientras que el resto de géneros, especialmente *Rhizobium* y *Achromobacter*, propios del medio inoculado, lo hacen con el pH y el potencial redox, además de con la concentración de hierro total.

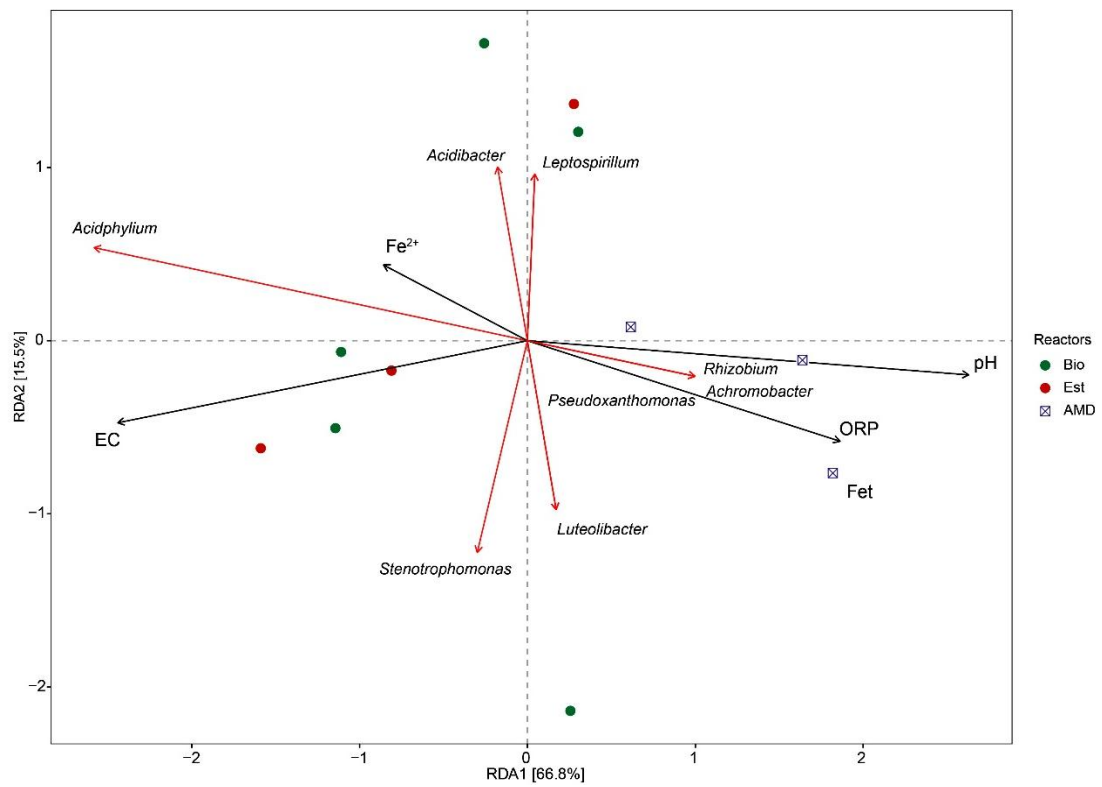


Figura 36 Análisis de redundancia donde se incluyen los géneros bacterianos y su procedencia, así como diversos parámetros físico-químicos

5 DISCUSIÓN

Los ambientes afectados por AMD son muy complejos dada la interacción de numerosas variables, físicas, químicas y biológicas. Es por ello que, cuando se tratan de analizar los efectos de la exposición a las aguas ácidas de las estructuras de construcción como hormigones y aceros, se requieren una diversidad de diseños experimentales que sirvan para dilucidar los posibles daños producidos por la exposición a las aguas contaminadas, así como las variables que los explican.

Como se comentó en la Introducción de este trabajo, la extraordinaria magnitud del AMD de los ríos que discurren a través de la FPI sólo se puede explicar por la actividad catalítica de una serie de bacterias que oxidan hierro y azufre. En un primer experimento se comprobó que las aguas del río Rivera de Agustín, procedentes de las minas de Tharsis son una fuente adecuada de bacterias quimiolitotrofas autótrofas sin cuya presencia, la oxidación de Fe^{2+} sería extremadamente lenta. Para evaluar el efecto de la actividad bacteriana, las aguas del río usadas como inóculo fueron esterilizadas mediante filtración con filtros estériles de $0,2 \mu\text{m}$. Tras el periodo de incubación, sólo el medio $9\text{K} + \text{FeSO}_4$ inoculado con agua no estéril permitió el enriquecimiento de las comunidades bacterianas, a la vez que se produjo la oxidación de la mayor parte del hierro contenido en el medio, lo que generó un conspicuo cambio de color del medio. En el medio de control, inoculado con aguas estériles, la oxidación de hierro fue muy leve, manteniéndose reducido en su mayor parte. Esta oxidación en ausencia de bacterias se puede explicar por la adición de hierro oxidado presente en el inóculo, ya que las aguas de la Rivera de Agustín contienen esencialmente hierro oxidado. El papel oxidante del oxígeno atmosférico quedaría mayormente descartado ya que el medio se mantuvo a $\text{pH} \approx 2,0$; en estas condiciones el Fe^{3+} es un oxidante mucho más potente que el oxígeno (Sánchez España, 2008) (Pearce , Weber , Pearce, & Scott , 2016)

A la vez que se va oxidando el hierro, se produjo un descenso de pH de acuerdo con la ecuación [3] (pág. 11), un notable incremento del potencial redox al aumentar la proporción $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ y un leve descenso de la conductividad probablemente por la formación de precipitados.

Este procedimiento experimental fue reproducido, aunque sustituyendo el FeSO_4 por el hierro metálico parcialmente oxidado contenido en una pieza de hierro fundido. En este caso, el enriquecimiento bacteriano fue sorprendente. Curiosamente, en los primeros días de incubación se producía un incremento del pH y de la conductividad y un notable descenso del potencial redox. Sin embargo, la adición necesaria de nuevo medio ($9\text{K} + 10\%$ inóculo de la Rivera de Agustín), debido al descenso de volumen por evaporación, disminuía radicalmente el pH y elevaba el valor del potencial redox, mientras que el progreso de la conductividad apenas sufría cambios. Tras 15 días de incubación, los valores de pH, EC y ORP se mantuvieron relativamente estables.

Estos resultados parecen contradecir los del experimento anterior. Sin embargo, hay una diferencia fundamental. En el experimento anterior la fuente de hierro (FeSO_4) se haya disuelta, mientras que la pieza de hierro fundido era insoluble. Tras el periodo experimental de 4 semanas, se comprobó que aproximadamente 6 g de precipitados estaban fuertemente adheridos la pieza de hierro (un 10% del peso de dicha pieza). Estos precipitados representan una capa de pasivación que reducen la

oxidación del material, como se ha comprobado en experimentos a largo plazo (10 años) usando piritita sintética, requiriéndose periodos más prolongados de exposición para eliminar la capa de pasivación (Fan, y otros, 2022). Los precipitados formados se analizaron mediante SEM-EDS comprobándose que estaban formados exclusivamente por óxidos de hierro y azufre.

En un experimento similar donde se utilizó acero como fuente de hierro se observó que inicialmente el pH aumentaba y el potencial redox se mantenía estable; sin embargo, a medida que discurría el tiempo de incubación el pH comenzó a descender y el potencial redox a incrementarse, aunque siempre que se usara como inóculo aguas afectadas por AMD, ricas en bacterias quimiolitotrofas (Córdoba & Sarmiento, 2023). Resultados similares se observaron cuando se expusieron escorias de cobre a las aguas de la Rivera de Agustín (Borrego, Bacedoni, Moreno-Ventas Bravo, & Córdoba, 2020).

La relación inversa entre pH y ORP ha sido constatada en numerosas ocasiones en ríos afectados por AMD de la FPI (Sarmiento, 2007), (Córdoba, y otros, 2022).

Seguidamente se realizó un nuevo experimento donde piezas de hormigón fueron expuestas al medio ácido procedente de la Rivera de Agustín, en presencia o ausencia de sales de hierro reducido y utilizando, a modo de control, inóculos filtrados como modo de esterilización.

La presencia del hormigón alteró de forma inmediata tanto el pH del medio, que se incrementó de 2 a 8 y el potencial redox que, por el contrario, disminuyó desde 860 mV a 95 mV. Estos cambios no se produjeron cuando se añadió hierro reducido a las muestras. La inoculación con medio enriquecido, no estéril, no impidió la subida de pH ni la subida de Eh', aunque en ambos casos fue paulatina.

Debe considerarse que el hormigón aporta numerosos óxidos de elementos alcalinos y alcalino-térreos como calcio, magnesio, sodio y potasio. Las pérdidas de peso de las piezas de hormigón, aunque leves, indican su disolución lo que podría explicar el aumento de pH. El calcio se observó en el medio en todos los tratamientos y tanto el Al, Mn y P sólo aparecieron en el medio cuando las muestras se incubaron con hierro reducido. Dado que el Fe^{2+} puede ser oxidado por diversas bacterias (*A. ferrooxidans*, *L. ferrooxidans*) en las condiciones del experimento se explicaría que el potencial redox no disminuya y que el pH se mantenga en torno a pH 2,0. La conductividad disminuyó en todos los casos probablemente por la precipitación de oxihidróxidos de hierro lo que explica la relativamente baja concentración de este con relación a la concentración esperada en los medios suplementados con sulfato de hierro.

En un nuevo experimento, las sales de hierro reducido se sustituyeron por varillas roscadas de acero, donde el componente mayoritario es hierro, con objeto de simular materiales de hormigón armado. Por otra parte, se usaron piezas de hormigón de mayor tamaño que las usadas en experimentos anteriores. Esto obligó a usar vasos de precipitado en vez de Erlenmeyer, lo que provocó una excesiva evaporación de las muestras (similar a lo ocurrido con la pieza de hierro fundido). Por ello, hubo que rellenar periódicamente los vasos con nuevo medio. En algunos frascos se añadió azufre elemental, que aunque no es soluble, puede servir de sustrato tanto para bacterias oxidantes como reductoras de azufre.

Los resultados mostraron una leve pérdida de peso de las varillas de acero, como era previsible por la oxidación y lixiviación de los oxihidróxidos de hierro debido a la

actividad catalítica de las bacterias quimiolitotrofas. Este resultados es similar a otros previamente observados con escorias de cobre (ricas en hierro) o con probetas de acero (Borrego, Bacedoni, Moreno-Ventas Bravo, & Córdoba, 2020) (Córdoba & Sarmiento, 2023).

Sin embargo, las piezas de hormigón aumentaron de peso debido a los de precipitados fuertemente adheridos, lo cual actúa como una “capa de pasivación”. En efecto, cuando se liberan sustancias alcalinas, se reduce la carga de acidez que podría actuar sobre el granito reduciendo su degradación (Varios autores, 2016) (Chen, et al., 2020). Por otra parte, La actividad de los organismos oxidantes del hierro lleva a la producción de hierro férrico pero su actividad también produce la acumulación de azufre elemental y polisulfuros en la superficie del sustrato. Esta acumulación actúa como barrera para la difusión del oxígeno y de los iones de hierro (III) lo que lleva a la inhibición de la lixiviación. Las bacterias oxidantes del azufre son capaces de oxidar esta capa formada por azufre y polisulfuros y además formar ácido sulfúrico a partir de estos compuestos, reduciendo el pH y eliminando esta capa de pasivación (Rohwerder, T ; Gehrke, T ; Kinzler, K ; Sand, W, 2003). Sin embargo, la actividad de estas bacterias requiere generalmente pH muy ácidos (pH 1-3) y la presencia de hormigón incrementó notablemente el pH hasta valores próximos a 5. Obsérvese también que en las muestras donde se había añadido azufre los precipitados son negruzcos, posiblemente por la actividad de bacterias reductoras acidófilas (Dopson & Johnson, 2012) en las muestras donde no se había añadido azufre, los precipitados era de color amarillento-anaranjado, propios de las sales derivadas de la oxidación de hierro.

Como se ha comentado previamente, la exposición del hormigón y acero al medio de cultivo provocó un rápido incremento del pH así como una fuerte disminución del potencial redox. El resultado es esperado ya que, como se comentó para un experimento anterior, el hormigón proporciona diversos compuestos alcalinos. Estos resultados no se producen en ausencia de hormigón: al contrario, la presencia exclusiva de acero provoca una disminución del pH y un incremento del potencial redox debido a la oxidación y lixiviación de hierro (Córdoba & Sarmiento, 2023). La adición de nuevo medio provocaba una disminución inmediata del pH y un aumento del valor de ORP (o Eh') aunque muy transitorio, ya que rápidamente se invertía la tendencia.

La conductividad, sin embargo, aumentó a lo largo del periodo de incubación con dientes de sierra provocados por la adición de nuevo medio, que la disminuía transitoriamente. El nuevo medio tenía un pH de 2,0 lo que permitiría la disolución de los materiales insolubles generados al pH alcalino provocado por la presencia de hormigón.

En experimentos previos muy recientes, se ha mostrado que en diseños similares al empleado aquí, pero usando exclusivamente acero, la conductividad y el pH disminuyen continuamente a lo largo del periodo de incubación mientras que el potencial redox aumenta considerablemente (Córdoba & Sarmiento, 2023). Por otra parte, debe ser tenida en cuenta la complejidad del metabolismo de algunas bacterias habituales en aguas afectadas por AMD. Por ejemplo, *Acidithiobacillus ferrooxidans* es una bacteria quimiolitotrofa que oxida hierro y azufre en medios aerobios extremadamente ácidos pero también es capaz de impulsar la neutralización del pH alcalino y el intemperismo o meteorización mineral en los

relaves de mineral de hierro (Yi, et al., 2021). Curiosamente, el carácter facultativo de *A. ferrooxidans* le permite actuar reduciendo azufre y hierro cuando la tensión de oxígeno disminuye en el agua (Osorio , et al., 2013); (Kucera, et al., 2020); (Norris , et al., 2020).

La concentración de metales en los medios de cultivo de los diferentes tratamientos fue medida con ICP-óptico. Con respecto al hierro, la presencia de bacterias aumentó su lixiviación como cabía esperar. Sin embargo, la adición de azufre, con o sin bacterias provocó un notable aumento de la cantidad de hierro en el medio de cultivo. Este resultado se podría explicar por la oxidación del azufre, acoplada a la reducción de hierro, reacción catalizada por una variedad de bacterias , y que facilitaría la solubilización del hierro al pH de los cultivos (Bao & Li , 2017); (Malik & Hedrich , 2022); (Breuker & Schippers, 2023). Sin embargo, esta reacción requiere condiciones anaerobias o microaerofilas, que en los frascos de cultivo sólo sería posible en la base de los mismos. Sin embargo, se observaron precipitados negruzcos tanto en la parte inferior de los frascos como en los sedimentos adheridos al hormigón lo que hace pensar en procesos de reducción -no de oxidación- del azufre, lo que generaría sulfuros insolubles. Además, hay que considerar que el mismo efecto de acumulación de hierro se observó en medios presuntamente estériles, lo cual lleva a pensar en una consecuencia del aumento del pH que facilitaría la solubilización del hierro (II) y la precipitación del hierro (III), la forma mayoritaria observada en los medios no estériles, con o sin azufre, ya que el hierro reducido fue la forma más habitual en ausencia de bacterias. Es evidente que la comprensión de este resultado requiere nuevos experimentos ya que las explicaciones proporcionadas son meramente especulativas e, incluso, contradictorias.

A diferencia del hierro, la presencia de bacterias -con o sin azufre- provocó un incremento de la concentración de aluminio, manganeso, zinc, cobalto, níquel, potasio y magnesio en los medios de cultivo. Esto indica que el metabolismo bacteriano puede provocar de forma directa -mediante ataque bacteriano al hormigón- o indirecto -mediante cambios en la relación de oxidantes/reductores en el medio- la lixiviación de estos elementos en el medio. Ya se ha comentado la extraordinaria complejidad microbiana en los medios AMD (por ejemplo:

(Quatrini & Johnson, 2018); (Quatrini & Johnson, 2020); (Córdoba F. , 2022) por lo que la comprensión de estos resultados requiere del análisis de las especies microbianas presentes, lo que pudo realizarse en el último experimento que se describe en este trabajo. Lo que si es evidente es que la presencia de bacterias fue necesaria, ya que en su ausencia (medios estériles) la concentración en los medios de los elementos citados fue muy inferior, por lo que cabe descartar su solubilización por causas exclusivamente físico-químicas.

Por el contrario, también se observaron numerosos precipitados que se analizaron mediante SEM-EDS. En ausencia de azufre, con o sin bacterias se observaron precipitados muy similares tanto en su aspecto como en su composición química. Al respecto, llaman la atención dos cristalizaciones muy diferentes, una muy rugosa y la otra de superficie relativamente lisa que sin embargo son prácticamente indistinguibles por su composición química porcentual. De mayor a menor estos precipitados estaban formados por $O > Fe > S > K$. La presencia de estos elementos sugiere la formación de oxihidróxidos de hierro como schwertmannita ($(Fe^{3+})_{16}O_{16}(OH)_{9.6}(SO_4)_{3.2} \cdot 10H_2O$) y al haber potasio también la presencia de

jarosita ($\text{KFe}^{3+}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$). La schwertmannita es un mineral muy abundante en las riberas de los ríos afectados por AMD que se forma por precipitación en zonas inundadas por aguas de drenaje, con pH ácido y alto contenido en iones de sulfato de hierro. Con respecto a la jarosita, (GAN, et al., 2017) han demostrado mediante el uso de medios sintéticos que usan FeSO_4 como fuente de hierro (II) que el principal mineral precipitado por la actividad de *A. ferrooxidans* es jarosita bien cristalizada. Ambas mineralizaciones tienen colores que van desde el amarillo al marrón anaranjado, similares a los observados en los precipitados adheridos a las piezas de hormigón.

Sin embargo, en presencia de azufre, se observaron cristales de yeso bien formados (CaSO_4) además de otras mineralizaciones carentes de calcio, que son similares en composición a las observadas en ausencia de azufre, es decir, con este rango de abundancia elemental: $\text{O} > \text{Fe} > \text{S} > \text{K}$.

Por último, y con objeto de conseguir un flujo continuo de medio nutricional, se optó por usar directamente aguas de la Rivera de Agustín que se añadieron sin más aditivos sobre dos bandejas o biorreactores mediante un flujo continuo regulado por bombas peristálticas. Se trató de un circuito cerrado, ya que agua se hacía pasar por las bandejas desde unos reservorios de 10 l que, tras alcanzar cierto nivel, retornaba al reservorio. Se usaron dos bandejas abiertas. En una de ellas se hacía pasar el agua del río directamente, mientras que en la otra se hacía pasar agua de río filtrada previamente en un kitasato usando filtros de $0,22 \mu\text{m}$ y bomba de vacío para facilitar el filtrado. En el primer caso, las aguas contendrían las bacterias presentes en la muestra del río, mientras que en el segundo el agua sería presuntamente estéril. Durante el periodo de incubación, las bandejas se mantuvieron en agitación constante a temperatura ambiente.

Este experimento se realizó en dos fases. La primera de ellas, que comprende todo el periodo de incubación se realizó en el laboratorio donde se habían realizado el resto de experimentos (BIO-282 de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Huelva), mientras que la segunda de ellas, que consistió en el análisis mediante técnicas moleculares de la diversidad microbiana, se realizó en la Facultad de Ciencias Naturales y Agrícolas (Bloemfontein, Sudáfrica) bajo la dirección de Dr. Castillo Hernández, codirector de este trabajo, como investigador responsable del grupo de *Microbial Biochemical and Food Biotechnology*.

Durante el periodo de incubación (15 días) se observó una evolución del pH con profundos dientes de sierra. Este perfil puede indicar alteraciones en la composición microbiológica de los biorreactores. Sin embargo, tanto la conductividad como el potencial redox tuvieron una evolución relativamente homogénea: de aumento en la conductividad y de disminución en el valor de potencial, sin que hubiera una clara diferencia entre los biorreactores en función de la flora microbiana esperada, considerando que a priori uno de ellos se alimentaba con agua presuntamente estéril.

Con respecto al hierro, la cantidad total disminuyó levemente aunque sí hubo diferencias importantes con relación a la proporción $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ entre el biorreactor alimentado con muestras no estériles, donde el valor de E_h' fue relativamente estable, mientras que en el biorreactor alimentado con agua estéril, se produjo un aumento continuado en dicha proporción.

El conjunto de estas medidas sugiere que durante la incubación se van alterando diversos parámetros debido a la interacción de agua suministrada con el hormigón,

además de los debidos a alteraciones en la sucesión de las comunidades microbianas, que proceden de un río a pH \approx 2,2, bien oxigenado y con apenas materia orgánica, al cambiar radicalmente de medio, ya el hormigón proporcionará compuestos alcalinos.

Por otra parte, la degradación de hormigón fue diferente en ambos reactores. Con medio estéril, el hormigón presentó una superficie alterada por porosidad, mientras que en el hormigón expuesto al agua del río no esterilizada se acumularon numerosos precipitados esféricos y de aspecto granulado. Bajo el microscopio estos gránulos contenían cristales -presuntamente de yeso- muy abundantes.

Dado que la composición de la flora bacteriana en ambos medios podría explicar los resultados es por lo que se procedió a determinar los géneros bacterianos presentes tanto en el agua procedente de la Rivera de Agustín y almacenada en frascos de 10 litros, como en ambos biorreactores. Los resultados obtenidos fueron inesperados en un doble sentido: las aguas usadas como inóculo tenían una composición bacteriana diferente a la observada en los biorreactores; y el agua presuntamente estéril contenía bacterias.

La primera observación indica que durante la incubación se produce una rápida sucesión de las comunidades bacterianas. Así, en presencia de hormigón hay un enriquecimiento en *Acidiphilium* y *Acidibacter* (que no se observan en el agua inoculada), mientras que los géneros más abundantes en ésta, *Rhizobium*, *Achromobacter* y *Stenotrophomonas*, no se detectan en los biorreactores.

Con respecto a la segunda observación, la esterilización con filtros estériles de 0,22 μm es un procedimiento muy eficaz como se ha demostrado en experimentos previos en este trabajo y en otros anteriores (Córdoba & Sarmiento, 2023) y su uso como procedimiento de esterilización es recomendado en numerosos protocolos. El diseño experimental usado es cerrado, lo que significa que el agua que entra en los biorreactores retorna al reservorio antes de volver a circular por los biorreactores. Dado que estos son bandejas abiertas y que el hormigón no se esterilizó previamente, no sería sorprendente que se produjera contaminación a lo largo del experimento. Este factor es muy importante, por lo que será tenido en cuenta en futuros experimentos que se iniciarán en breve.

Con relación a los géneros bacterianos identificados, la ausencia de *A. ferrooxidans* en el medio original (recuérdese que procede de un río donde la mayor parte del hierro está oxidada) es llamativa e indicativa de un cambio importante en el agua almacenada y usada en este experimento. Dado que se mantuvo sin agitación y sin añadir ninguna fuente de hierro reducido (procedimiento usado en el enriquecimiento de bacterias quimiolitotrofas) se podría sugerir que las bacterias aerobias disminuyen su número, incrementándose las bacterias heterótrofas como las observadas (ver pág. 53).

El género más abundante en los biorreactores fue *Acidiphilium* seguido por *Acidobacter*. Como se comentó previamente *Acidiphilium* es un género de bacterias heterótrofas facultativas (hay cepas autótrofas) que utiliza Fe^{3+} como aceptor (Panyushkina et al., 2021). *Acidibacter* es una bacteria heterótrofa, moderadamente acidófila, capaz de reducir hierro férrico (Falagan y Johnson, 2014). Esta capacidad de reducir el Fe^{3+} puede explicar la asociación observada en el análisis de redundancia (Fig. 34). Curiosamente, *Leptospirillum*, una bacteria quimiolitotrofa oxidante de hierro muy abundante en las aguas del río Tinto (García-Moyano et al.,

2008) sólo se observó en el supuestamente medio “estéril” y en el medio suplementado.

Aunque estos datos deben ser revisados en nuevos experimentos, parece evidente que se puede observar un proceso de colonización y enriquecimiento de bacterias acidófilas oxidantes y reductoras de hierro en los reactores.

6 CONCLUSIONES

1. En el medio de control, inoculado con aguas estériles, la oxidación de hierro fue muy leve, manteniéndose reducido en su mayor parte.
2. En ausencia de hierro añadido, no hay lixiviación de Al, Mn y P. La presencia de bacterias apenas afecta a esta lixiviación.
3. La presencia del hormigón alteró de forma inmediata tanto el pH del medio. La inoculación con medio enriquecido, no estéril, no impidió la subida de pH ni la subida de Eh', aunque en ambos casos fue paulatina.
4. Con relación a los géneros bacterianos identificados, la ausencia de *A. ferrooxidans* en el medio original es llamativa e indicativa de un cambio importante en el agua almacenada y usada en este experimento.
5. El género más abundante en los biorreactores fue *Acidiphilium* seguido por *Acidobacter*.

7 REFERENCIAS

- Aguilera, A. (2013). Eukaryotic Organisms in Extreme Acidic Environments, the Río Tinto Case. *Life*, 3, 363-374. doi:10.3390/life3030363
- Almodóvar, G., Yesares, L., Sáez, R., Toscano, M., González, F., y Pons, J. (2019). Massive Sulfide Ores in the Iberian Pyrite Belt: Mineralogical and Textural Evolution. *Minerals*. doi:10.3390/min9110653
- Amils, R. (2016). Lessons learned from thirty years of geomicrobiological studies of Río Tinto. *Research in Microbiology*, 539-545.
- Bao, P., y Li, G.-X. (June de 2017). Sulfur-Driven Iron Reduction Coupled to Anaerobic Ammonium Oxidation. *Environ Sci Technol*(12), 6691-6698. doi:10.1021/acs.est.6b05971
- Bellenberg, S., Díaz, M., Noel, N., Sand, W., Poetsch, A., Guilian, N., & Vera, M. (2014). Biofilm formation, communication and interactions of leaching bacteria during colonization of pyrite and sulfur surfaces. *Research in Microbiology*, 165, 773-781.
- Bonzel, J. (1964). Protección del hormigón en las agua agresivas. Principios y procedimientos. *Materiales de la Construcción*, 14(116), 42-51.
- Borrego, P., Bacedoni, M., Moreno-Ventas Bravo, I., y Córdoba, F. (2020). Biometallurgy: partial biolixiviation of copper from pyrometallurgical slag by a local consortium of hiperacidophilic, quimiolithotrophic bacteria. *Comunicações Geológica*, 107(Especial II), 167-171. Obtenido de https://www.lneg.pt/wp-content/uploads/2020/05/Volume_107_CIG.pdf
- Breuker, A., y Schippers, A. (August de 2023). Rates of iron(III) reduction coupled to elemental sulfur or tetrathionate oxidation by acidophilic microorganisms and detection of sulfur intermediates. *Research in Microbiology*, 104110. doi:10.1016/j.resmic.2023.104110
- Bryan, C., Hallberg, K., y Johnson, D. (s.f.). Mobilisation of metals in mineral tailings at the abandoned São Domingos copper mine (Portugal) by indigenous acidophilic bacteria. *Hydrometallurgy*, 83, 184-194.
- Chen, M., Lu, G., Wu, J., Sun, J., Yang, C., Xie, Y., Dang, Z. (July de 2020). Acidity and metallic elements release from AMD-affected river sediments: Effect of AMD standstill and dilution. *Environmental Research*, 186, 109490. doi:10.1016/j.envres.2020.109490
- Córdoba, F. (2022). Las bacterias extremófilas de los ríos ácidos de Huelva y sus aplicaciones. En *Biología de Huelva* (R. Torronteras, ed) (págs. 17-50). Huelva: Universidad de Huelva.
- Córdoba, F., y Sarmiento, A. M. (Abril de 2023). Biocorrosion of Carbon Steel under Controlled Laboratory Conditions. *Minerals*, 13(5). doi:doi.org/10.3390/min13050598

- Córdoba, F., Luís, A., Leiva, M., Sarmiento, A., Santisteban, M., Fortes, J., Grande, J. (2022). Biogeochemical indicators (waters/diatoms) of acid mine drainage pollution in the Odiel river (Iberian Pyritic Belt, SW Spain). *Environ Sci Pollut Res Int*, 31748-31760. doi:10.1007/s11356-021-18475-2
- Delgado, J., Balanyá, J. C., Díaz Azpiroz, M., Expósito, I., Jiménez, A., Moral, F., y Rodríguez, M. (2021). *La Faja Pirítica Ibérica en la Sierra Norte (Sevilla): patrimonio histórico-minero e implicaciones medioambientales*. Colección Geología. Sociedad Geológica de España. Salamanca.
- Dopson, M., y Johnson, D. (2012). Biodiversity, metabolism and applications of acidophilic sulfur-metabolizing microorganisms. *Environ Microbiol*(10), 2620-2631. doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02749.x
- Fan, R., Qian, G., Li, Y., Short, M., Schumann, R., Chen, M., Gerson, A. (2022). Evolution of pyrite oxidation from a 10-year kinetic leach study: Implications for secondary mineralisation in acid mine drainage control. *Chemical Geology*, 588. doi:10.1016/j.chemgeo.2021.120653
- Fortes, J., Dávila, J., y Sarmiento, A. (2020). Corrosion of Metallic and Structural Elements Exposed to Acid Mine Drainage (AMD). *Mine Water Environ*(39), 195-203. doi:10.1007/s10230-020-00681-y
- Gan, m., Li, M.-m., Zeng, j., Liu, X.-x., Zhu, J.-y., Hu, Y.-h., y Qiu, G.-z. (2017). *Acidithiobacillus ferrooxidans* enhanced heavy metals immobilization efficiency in acidic aqueous system through bio-mediated coprecipitation. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 1156-1164. doi:10.1016/S1003-6326(17)60135-3
- García-Moyano, A., González-Toril, E., Aguilera, A., y Amils, R. (2007). Prokaryotic community composition and ecology of floating macroscopic filaments from an extreme acidic environment, Río Tinto (SW, Spain). *Systematic*, 30, 601-614.
- Gómez Olivera, T. (2011). *Drenaje ácido de mina en la Faja Pirítica Ibérica. Caracterización de procesos y resultados mediante aplicación de estadística clásica y lógica borrosa*. Obtenido de Dialnet: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=26015>
- Gómez-Ortiz, D., Fernández-Remolar, D., Granda, C., Quesada, C., Granda, T., Prieto-Ballesteros, O., Amils, R. (2004). Identification of the subsurface sulfide bodies responsible for acidity in Río Tinto sourcewater. *Earth and Planetary Science Letters*, 391, 36-41.
- González-Toril, E., Santofimia, E., López-Pamo, E., García-Moyano, A., Aguilera, A., & Amils, R. (2014). Comparative microbial ecology of the water column of an extreme acidic pit lake, Nuestra Señora del Carmen, and the Río Tinto basin (Iberian Pyrite Belt). *International Microbiology*, 17, 225-233.
- Grande, J. (2016). *Drenaje Ácido de Mina en la Faja Pirítica Ibérica: Técnicas de estudio e inventario de explotaciones*. Huelva, España: Alonso Barba.

- Grande, J., Aroba, J., Andújar, J., Gómez, T., De La Torre, M., Borrego, J., . . . Santisteban, M. (2011). Tinto versus Odiel: Two AMD polluted rivers and an unresolved issue. An artificial intelligence approach. *Water Resources Managment* , 3575-3594.
- Hernández Barreña, D. (9 de septiembre de 2015). *HOMBRE GEOLÓGICO*. Obtenido de HOMBRE GEOLÓGICO: <https://geologicalmanblog.wordpress.com/>
- Kucera, J., Lochman, J., Bouchal, P., Pakostova , E., Mikulasek, K., Hedrich, S., . . . Johnson, D. (30 de Nov de 2020). A Model of Aerobic and Anaerobic Metabolism of Hydrogen in the Extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Front Microbiol*, 11:610836. doi:10.3389/fmicb.2020.610836
- Lahti, L., & Shetty, S. (2017). Microbiome R package. *Bioconductor*. doi:10.18129/B9.bioc.microbiome
- Liu, C., Li , X., Mansoldo, F., An, J., Kou, Y., Zhang, X., Yao, M. (2022). Microbial habitat specificity largely affects microbial co-occurrence patterns and functional profiles in wetland soils. *Geoderma*, 418(115866). doi:10.1016/j.geoderma.2022.115866
- Malik , L., y Hedrich , S. (January de 2022). Ferric Iron Reduction in Extreme Acidophiles. (818414, Ed.) *Frontiers in Microbiology*. doi:10.3389/fmicb.2021.818414
- McDonald, M., Wang, W.-C., Huang, H.-D., & Leu, J.-Y. (14 de Junio de 2011). Clusters of Nucleotide Substitutions and Insertion/Deletion Mutations Are Associated with Repeat Sequences. *Plos Biology*. Obtenido de <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000622>
- Nordstrom, D., y Alpers, C. (1999). The Environmental Geochemistry of Mineral Deposits. (L. M. Plumlee GS, Ed.) *Geochemistry of acid mine waters.*, 133-160.
- Norris , P., Falagán , C., Moya-Beltrán, A., Castro , M., Quatrini , R., & Johnson, D. (2020). *Acidithiobacillus ferrianus* sp. nov.: an ancestral extremely acidophilic and facultatively anaerobic chemolithoautotroph. *Extremophiles*(2), 329-337. doi:10.1007/s00792-020-01157-1
- Olías, M., y Nieto, J. (2015). Background conditions and mining pollution throughout history in the río Tinto (SW Spain). *Environments* 2, 295 -316.
- Olías, M., Nieto, J., Sarmiento, A., Cerón, J., y Cánovas, C. (2004). *La ontaminación minera de los ríos Tinto y Odiel*. Apéndice al Plan Hidrológico del Distrito Tinto-Odiel-Piedras. Agencia Andaluza del Agua, Sevilla.
- Osorio , H., Mangold, S., Denis, Y., Ñancuqueo, I., Esparza, M., Johnson, D., . . . Holmes, D. (January de 2013). Anaerobic sulfur metabolism coupled to dissimilatory iron reduction in the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol*(79), 2172-81. doi:10.1128/AEM.03057-12

- Ospina Correa, J. D., Osorno Bedoya, L., Giraldo Builes, J., Mejía Restrepo, E., & Márquez Godoy, M. A. (Enero - Diciembre de 2011). Aplicaciones Biotecnológicas en minería aurífera: Esta del arte sobre la oxidación bacteriana de arsenopirita (FeAsS). *Informador Técnico*, 75, 53-62.
- Palkova, L., Tomoya, A., Repiska, G., Babinska, K., Bokor, B., Mikula, J., Soltys, K. (2021). Evaluation of 16S rRNA primer sets for characterisation of microbiota in paediatric patients with autism spectrum disorder. *Scientific Reports*, 6871. doi:10.1038/s41598-021-86378-w
- Pearce , J., Weber , P., Pearce, S., & Scott , P. (2016). Acid and metalliferous drainage contaminant load prediction for operational or legacy mines at closure. In AB Fourie & M Tibbett (eds), *Mine Closure 2016: Proceedings of the 11th International Conference on Mine Closure*, Australian Centre for Geomechanics, Perth, pp. 663-676, https://doi.org/10.36487/ACG_rep/1608_49_PearceAustralian Centre for Geomechanics.
- Pérez Ostalé, E. (2014). *Caracterización Ambiental de Estructuras mineras en la Faja Pirítica Ibérica como soporte metodológico de gestión territorial*. Huelva.
- Quatrini , R., y Johnson, D. (2018). Microbiomes in extremely acidic environments: functionalities and interactions that allow survival and growth of prokaryotes at low pH. *Current Opinion in Microbiology*, 43, 139-147. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.01.011>
- Quatrini , R., y Johnson, D. (2020). Acidophile Microbiology in Space and Time. *Curr Issues Mol Biol*(39), 63-76. doi:10.21775/cimb.039.063
- Rohwerder , T., Gehrke , T., Kinzler , K., y Sand , W. (2003). Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 239–248.
- Rohwerder, T ; Gehrke, T ; Kinzler, K y Sand, W. (2003). Bioleaching progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 239-248. doi:10.1007/s00253-003-1448-7
- Sánchez España, J. (2008). Acid Mine Drainage in the Iberian Pyrite Belt: an Overview with Special Emphasis on Generation Mechanisms, Aqueous Composition and Associated Mineral Phases. *Macla*, 10, 34-43.
- Sánchez-España, J., López-Pamo, E., Santofimia, E., Aduvire, O., Andrés, J., y Martín, J. (2005). The Tintillo acidic river (Rio Tinto mines, Huelva, Spain): an example of extreme environmental impact of pyritic mine wastes on the environment or an exceptional site to study acid-sulphate mine drainage systems ? *Securing the Future International Conference on Mining, Metals and the Environment.*, (págs. 278-287). Skellefteå, Sweden.
- Santofimia , E., González-Toril , E., López-Pamo , E., Gomariz , M., Amils , R., y Aguilera , A. (2013). Microbial diversity and its relationship to physicochemical

- characteristics of the water in two extreme acidic pit lakes from the Iberian Pyrite Belt (SW Spain). *PLoS One* 8, e66746.
- Sarmiento, M. (2007). Estudio de la contaminación por drenajes ácidos de mina de las aguas superficiales en la cuenca del río Odiel (SO España). *Tesis doctoral* directores Nieto, J.M. y Olias, M.) . Huelva, España: Universidad de Huelva.
- Silverman, M., y Lundgren, D. (1959). Studies of the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*: an improved medium and harvesting procedure for securing high cell yields. *Journal of Bacteriology*, 642-647.
- Tronos, F. (2008). La Geología y Metalogenia de La Faja Pirítica Ibérica. *Macla: Revista de Sociedad Española de Mineralogía*, 13-23.
- Tornos, F., López Pamo, E., & Sánchez España, F. (2009). The Iberian Pyrite Belt. En: Contextos geológicos españoles: una aproximación al patrimonio geológico de relevancia internacional (pp.56-64). (A. García Cortés, ed.). Capítulo 4. Instituto Geológico y Minero de España, Madrid
- Valdés, J., Pedroso , I., Quatrini , R., Dodson , R., Tettelin , H., Blake , R., Holmes, D. (2008). *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC Genomics*, 9, 597-621.
- Varios autores. (2016). *Preventing acid and metalliferous drainage*. Program for the Mining Industry, Commonwealth of Australia.
- Yi, Q., Wu, S., Southam, G., Robertson, L., You, F., Liu, Y., Huang, L. (2021). Acidophilic Iron- and Sulfur-Oxidizing Bacteria, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, Drives Alkaline pH Neutralization and Mineral Weathering in Fe Ore Tailings. *Environmental Science & Technology*, 8020-8034. doi:10.1021/acs.est.1c00848
- Zorz, J., Li, C., Chakraborty, A., Gittins, D., Surcon, T., Morrison, N., Hubert , C. (2023). SituSeq: an offline protocol for rapid and remote Nanopore 16S rRNA amplicon sequence analysis. *ISME Communications*, 5459. Obtenido de <https://www.nature.com/articles/s43705-023-00239-3>

FINANCIACIÓN Y AGRADECIMIENTOS

Este TFM se ha financiado mediante el proyecto PID2021-123130OBI00 concedido por el Ministerio de Ciencia e Innovación.

Agradecemos a D. Carlos Casal Bejarano, técnico del CIDERTA, su trabajo en el análisis de elementos mediante ICP-óptico y a D. Cristóbal Cantero Serrano los análisis de los precipitados mediante SEM-EDS.