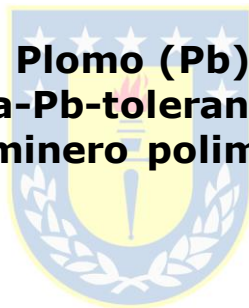




Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Magíster en Ciencias con Mención en Microbiología

Biorremediación de Plomo (Pb) mediante una cepa bacteriana ureolítica-Pb-tolerante, aislada desde un relave minero polimetálico.



Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción para optar al grado de Magíster en Ciencias con mención en Microbiología

HEIDI BEATRIZ AGUAD POBLETE

**CONCEPCIÓN-CHILE
2025**

PROFESOR GUÍA:
Dr. VÍCTOR CAMPOS ARANEDA
Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

PROFESOR GUÍA

Dr. Víctor Campos Araneda
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

COMITÉ EVALUADOR

Dr. Víctor Hernández Santander
Facultad de Ciencias Naturales y
Oceanográficas
Universidad de Concepción

Dr. Ítalo Fernández Fonseca
Instituto de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción



Dr. Rubén Moraga Mamani
Facultad de Salud
Universidad Santo Tomás

DIRECTOR PROGRAMA

Dr. Gerardo González Rocha
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi madre, Erica, quien ha sido un pilar fundamental en toda mi educación. A mi hermana, Yazna.

A todas las personas que han colaborado en mi formación académica, profesional y personal. En especial a mi tutor, Víctor Campos Araneda, quien siempre mantuvo la mejor disposición.

Agradecimientos al proyecto Fondecyt Regular N°1251397.



TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	ii
TABLA DE CONTENIDOS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Importancia del Plomo	1
1.2. Plomo y ambiente	1
1.3. Toxicidad del Plomo	3
1.4. Biorremediación del Plomo	4
1.5. HIPÓTESIS DE TRABAJO	9
1.3.1. El Problema	9
1.3.2. HIPÓTESIS	9
1.6. OBJETIVOS	10
1.6.1. Objetivo general	10
1.6.2. Objetivos específicos	10
2. METODOLOGÍA	11
2.1. Obtención de la muestra	11
2.2. Análisis granulométrico	11
2.3. Fluorescencia de rayos X	11
2.5. Análisis químico por ICP-OES	11
2.6. Mineralogía Automatizada QEMSCAN	12
2.6. Mineralogía Automatizada QEMSCAN	12
2.6.1. Condiciones analíticas de la mineralogía automatizada	12
2.7. Extracción y secuenciación masiva de ADN	13
2.8. Selección de bacterias ureolíticas con capacidad de precipitar Calcita (CaCO ₃)	14
2.9. Cinética de crecimiento	15
2.10. Niveles de tolerancia a Pb, Se, Cu, Ni, As y Cd	15
2.11. Identificación de la cepa seleccionada	15
2.12. Biomineralización de Pb en un reactor batch	15
2.13. Detección de Pb	16
2.14. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	16
3. RESULTADOS	17
3.1. Obtención de la muestra	17
3.2. Análisis granulométrico	17
3.3. Fluorescencia de rayos X	18
3.4. Difracción de rayos X	19
3.5. Análisis químico por ICP-OES	21
3.6. Mineralogía Automatizada QEMSCAN	21
3.6.1. Agrupamiento mineral	21
3.6.2. Composición modal	22
3.6.3. Caracterización de la muestra MF-01	23
3.7. Extracción y secuenciación masiva de ADN	25
3.8. Caracterización y selección de bacterias ureolíticas con capacidad de precipitar Calcita (CaCO ₃)	26
3.9. Cinética de crecimiento de la cepa <i>Sphingobium</i> RO-01 en presencia de Pb	27
3.10. Tolerancia a metales, metaloides y no metales	28
3.11. Identificación de la cepa seleccionada	29
3.12. Detección de Plomo en los reactores batch	29
3.13. Microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS)	30
4. DISCUSIONES	32
	iii

5.CONCLUSIONES	37
REFERENCIAS	39
ANEXOS	46

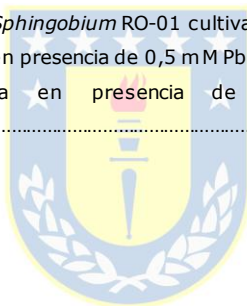
ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1: Concentraciones umbral de plomo por diversos organismos. Extraída de Sevak <i>et al.</i> (2021).....	4
Tabla 1.2: Bacterias tolerantes al plomo. Modificada de Sevak <i>et al.</i> (2021).....	5
Tabla 3.1: A la izquierda tabla de porcentaje acumulado y a la derecha tabla de frecuencia.....	17
Tabla 3.2: Resultados cuantitativos mediante fluorescencia de rayos X en la roca total.....	18
Tabla 3.3: Resultados de la semicuantificación automática (S-Q).....	19
Tabla 3.4: Resultados obtenidos mediante ICP-OES en mg/kg para Pb.....	21
Tabla 3.5: Composición mineralógica (vol. %) de 3 muestras estudiadas con Qemscan® en la modalidad PMA. Se destaca en verde el único mineral reconocido que posee plomo en su fórmula química. En amarillo se muestran fases minerales donde el Pb pudiera encontrarse como elemento sorbido. En rojo se destaca la presencia de posibles minerales muy raros de Pb.....	22
Tabla 3.6: Grupos taxonómicos dominantes recuperados de la muestra de relave minero polimetálico.....	26
Tabla 3.7: Se muestran las características de las distintas cepas estudiadas y su capacidad ureolítica. <i>E. coli</i> 25922 se utilizó como control negativo y <i>K. Neumoniae</i> como control positivo.....	27
Tabla 3.8: Se muestran los niveles de tolerancia a distintos metales, metaloides y no metales de las cepas en estudio en concentraciones de 0,5; 1; 2; 4 y 10 mM. En verde se destacan las cepas seleccionadas para la técnica de MICP. +/- se refiere a que se observó poco crecimiento.....	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Diagramas de Eh-pH de distintas especies de Pb. (a) Minerales de plomo a 298° K (~25° C) y 1 bar, carbonato total = 10^{-3} mol/L y azufre total disuelto = 10^{-2} mol/L (Krauskopf & Bird, 1994). (b) Sistema Pb-O-H. ΣPb = 10^{-10} mol/kg, 298.15° K (25° C), 10^5 Pa (1 bar) (Takeno, 2005).....	2
Figura 1.2: Efectos de la intoxicación por plomo. Extraída de Sri Chandana (2015).....	3
Figura 1.3: Mecanismos de biorremediación de metales pesados. Modificada de Pande <i>et al.</i> (2022).....	6

Figura 1.4: Diagrama esquemático de la biomineralización de las bacterias productoras de ureasa. Extraído de Zhang <i>et al.</i> (2021).....	8
Figura 3.1: Diagrama de distribución de tamaño de grano de las partículas con leve tendencia bimodal.....	17
Figura 3.2: Difractograma de la Muestra MF-01.....	20
Figura 3.3: Lista secundaria utilizada en el análisis de la muestra.....	21
Figura 3.4: Partícula típica de la muestra: (a) Lista secundaria y (b) Muestra MF-01.....	23
Figura 3.5: Los granos más grandes de la muestra MF-01 (feldespato, cuarzo, hierro metálico, epidota y carbonatos).....	23
Figura 3.6: Los granos de pirita (amarillo) en la muestra MF-01.....	24
Figura 3.7: Gráfico de barra que muestra la distribución porcentual de los distintos phyla presentes en la muestra de relave mayores a un 0,1%.....	25
Figura 3.8: Cinética de crecimiento, modelada por Gompertz, en presencia y ausencia de Pb (0.5mM).....	27
Figura 3.9: Eliminación de Pb por la cepa <i>Sphingobium</i> RO-01 en caldo químicamente definido suplementado con 5 mM de Pb a 25 °C en condiciones aeróbicas. Se incluyeron análisis de eliminación de Pb y control abiótico (sin la cepa bacteriana) en condiciones de incubación similares.....	29
Figura 3.10: Microscopía electrónica de barrido (SEM) (micrografías a la izquierda) y espectroscopía de energía dispersiva (EDS) (imágenes a la derecha) de la cepa <i>Sphingobium</i> RO-01 cultivada durante 48 h a 25 °C en condiciones aeróbicas en caldo MQD-Urea suplementado con 0,5 mM Pb o en ausencia de Pb que muestra los cristales de CaCO ₃ obtenidos. A) SEM-EDS de la cepa <i>Sphingobium</i> RO-01 cultivada en ausencia de Pb (control); B) SEM-EDS de la cepa <i>Sphingobium</i> RO-01 cultivada en presencia de 0,5 mM Pb, tras 24 h de incubación; C) SEM-EDS de la cepa <i>Sphingobium</i> RO-01 cultivada en presencia de 0,5 mM Pb tras 48 h de *incubación.....	30



RESUMEN

El plomo (Pb) es un metal pesado tóxico y no biodegradable, cuya presencia, producto de actividades industriales y procesos naturales, en ambientes terrestres, acuáticos y aéreos representa una amenaza grave para la salud humana y para la ecología (Sharma & Shukla, 2021; Qiao *et al.*, 2019; Kalita & Joshi, 2017). Predomina en la naturaleza como Galena (PbS), aunque su oxidación da origen a fases secundarias más móviles como Cerusita y Anglesita (Klein & Hurlbut, 1997). Si bien, en Chile se reconoce una preocupación por la contaminación de los suelos con metales pesados; no existe actualmente ninguna legislación nacional al respecto. Frente a las limitaciones de las técnicas físico-químicas convencionales para remover Pb, la biorremediación surge como una alternativa eficaz y sostenible, utilizando bacterias resistentes capaces de inmovilizar metales por biosorción, bioacumulación, biotransformación o biomineralización (Pande *et al.*, 2022). En particular, el proceso MICP (precipitación de carbonatos inducida microbianamente), mediado por bacterias ureolíticas, permite incorporar Pb en la red cristalina de la Calcita, reduciendo su movilidad y toxicidad (Kang *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2022). Esta tesis propone identificar una cepa ureolítica tolerante a Pb desde un relave polimetálico (Au, Ag, Cu, Pb y Zn) chileno, con el fin de evaluar su potencial para la inmovilización del metal mediante la técnica de biorremediación MICP. La caracterización geológica del relave minero se llevó a cabo mediante técnicas granulométricas, FRX, DRX, ICP-OES y QEMSCAN. La muestra presentó una mineralogía dominada por feldespatos (42,46%) y Cuarzo (26,02%), con sulfuros en baja proporción (0,45%), destacando Galena (0,1%) y Pirita (0,22%) como posibles fuentes de Pb. Se identificaron fases que podrían contener plomo sorbido, como Jarosita (0,12%) y óxidos/hidróxidos de Fe (1,1%). También se detectó Fe metálico (1,04%) de probable origen sintético. La muestra evidencia procesos de alteración de baja temperatura, con reemplazo parcial de silicatos y Fe metálico por arcillas y Goethita. Con el fin de conocer la diversidad microbiana se realizó una extracción y secuenciación masiva de ADN, cuyo resultado reveló una comunidad bacteriana compuesta principalmente por *Proteobacteria* (76,73%), con predominancia de *Gammaproteobacteria* (55,64%). Se aislaron 12 cepas bacterianas, de las cuales tres (RO-01, RO-11 y RO-14) mostraron alta actividad ureolítica. La cepa RO-01, identificada como *Sphingobium* sp., presentó la mayor tolerancia a Pb (hasta 10 mM) y fue seleccionada para estudios de MICP en reactores batch. En caldo químicamente definido, suplementado con 40% Urea (MQD-Urea) y 0,5 mM de Pb, *Sphingobium* RO-01 logró remover el alrededor de 82% del Pb soluble en 48 h, sin remoción en controles abióticos. La biomineralización fue confirmada por SEM-EDS, detectándose CaCO_3 y una creciente incorporación de Pb en los cristales con el tiempo. La cepa también toleró otros metales como Cu, Se y Ni, pero mostró baja tolerancia a As y Cd. Estos resultados confirman la capacidad de la cepa *Sphingobium* RO-01 para inmovilizar Pb mediante biomineralización, abriendo posibilidades para su aplicación en sistemas de tratamiento biológico de pasivos mineros.

ABSTRACT

Lead (Pb) is a toxic and non-biodegradable heavy metal. Its presence in terrestrial, aquatic, and aerial environments, resulting from industrial activities and natural processes, poses a serious threat to both human health and the environment (Sharma & Shukla, 2021; Qiao et al., 2019; Kalita & Joshi, 2017). In nature, it predominantly occurs as Galena (PbS), although oxidation generates more mobile secondary phases such as Cerussite and Anglesite (Klein & Hurlbut, 1997). While Chile is concerned about soil contamination by heavy metals, there is currently no national legislation addressing this issue. Considering the limitations of conventional physicochemical techniques for Pb removal, bioremediation emerges as an effective and sustainable alternative, employing resistant bacteria capable of immobilizing metals through biosorption, bioaccumulation, biotransformation, or biomineralization (Pande et al., 2022). In particular, the MICP (microbially induced carbonate precipitation) process, mediated by ureolytic bacteria, enables Pb incorporation into the calcite crystal lattice, thereby reducing its mobility and toxicity (Kang et al., 2014; Wei et al., 2022). The objective of this thesis is to isolate a Pb-tolerant ureolytic strain from Chilean polymetallic (Au, Ag, Cu, Pb, and Zn) tailings, and to evaluate its potential for metal immobilization via the MICP bioremediation process. The geological characterization of the mine tailings was conducted through particle size analysis, XRF, XRD, ICP-OES, and QEMSCAN techniques. The sample exhibited a mineralogy dominated by feldspars (42.46%) and quartz (26.02%), with a low proportion of sulfides (0.45%), where galena (0.1%) and pyrite (0.22%) stood out as potential sources of lead. Phases likely to contain sorbed lead were also identified, such as jarosite (0.12%) and iron oxides/hydroxides (1.1%). Metallic iron (1.04%) of probable synthetic origin was detected as well. Evidence of low-temperature alteration processes was observed, including partial replacement of silicates and metallic iron by clays and goethite. To assess microbial diversity, bulk DNA extraction and sequencing were performed, revealing a bacterial community composed primarily of Proteobacteria (76.73%), with *Gammaproteobacteria* (53.64%) as the dominant class. Twelve bacterial strains were isolated, three of which (RO-01, RO-11, and RO-14) displayed strong ureolytic activity. Strain RO-01, identified as *Sphingobium* sp., showed the highest Pb tolerance (up to 10 mM) and was selected for MICP studies in batch reactors. In MQD-Urea broth with 0.5 mM Pb, *Sphingobium* RO-01 removed approximately 82% of soluble Pb within 48 h, while no removal occurred in abiotic controls. Biomineralization was confirmed by SEM-EDS, which detected CaCO₃ and demonstrated progressive Pb incorporation into the crystals over time. The strain also tolerated other metals such as Cu, Se, and Ni, but showed low tolerance to As and Cd. These findings confirm the ability of the *Sphingobium* RO-01 strain to immobilize Pb through biomineralization, highlighting its potential for application in biological treatment systems for mining waste.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia del Plomo

El plomo (Pb) es un metal pesado que se considera uno de los contaminantes sustanciales que se encuentran en el suelo, el agua y el aire (Sharma & Shukla, 2021). La contaminación por metales pesados es un problema medioambiental global y ha recibido una gran atención. A diferencia de los contaminantes tradicionales, los metales pesados son no degradables, aunque sus concentraciones son bastante bajas (Qiao *et al.*, 2019) en la naturaleza.

Este metal se utiliza comercialmente para la producción de baterías, pigmentos, fundición de metales y en la fabricación de productos como insecticidas de arseniato de plomo y tuberías de agua que contienen plomo (Sharma & Shukla, 2021). El Pb también se utiliza para la producción de escudos de protección de reactores nucleares, finas láminas de componentes electrónicos, tetraetilo de plomo $[(CH_3CH_2)_4Pb]$ para vehículos, cerámica, cables y munición (Kalita & Joshi, 2017), entre otros. Asimismo, el Pb se genera a través de procesos naturales como la erosión del suelo, las emisiones volcánicas y la movilización del Pb de los minerales (Sharma & Shukla, 2021). En general, sólo una pequeña cantidad de Pb está presente en el medio ambiente de forma natural. Sin embargo, el nivel es elevado principalmente debido a las actividades humanas (Shivani Gupta *et al.*, 2020).

La presencia de Pb en el medio ambiente es muy peligrosa para los seres humanos (Sharma & Shukla, 2021) y otros organismos. El repentino auge de las actividades industriales ha contribuido cuantitativa y cualitativamente al alarmante aumento de los vertidos de contaminantes metálicos en el medio ambiente, especialmente en el medio acuático (Shivani Gupta *et al.*, 2020). Una vez que el plomo se vierte en un medio acuoso, los organismos acuáticos lo absorben y bioacumulan, lo que repercute en los seres humanos a través de la cadena alimentaria, provocando fuertes efectos toxicológicos en el corazón, el hígado, los riñones, el cerebro y los sistemas reproductores humanos, especialmente en los niños (Qiao *et al.*, 2019). Estos hechos hacen indispensable la eliminación de los metales pesados de las soluciones acuosas (Shivani Gupta *et al.*, 2020).

1.2. Plomo y ambiente

El plomo nativo (o elemental) es raro en la naturaleza; sin embargo, es mucho más común encontrarlo como mineral sulfurado de plomo, principalmente en la forma de Galena (PbS). No obstante, el plomo se encuentra en la naturaleza formando una gran variedad de minerales (alrededor de 573 especies válidas contienen plomo esencial), entre los que se encuentran

especialmente la Anglesita (PbSO_4) y Cerusita (PbCO_3), los que se forman producto de la oxidación de la Galena (Klein & Hurlbut, 1997). El Pb forma compuestos en los que su estado de oxidación es +2 y +4, el más común de ellos es el de +2. Los compuestos de Pb^{4+} son covalentes, mientras que los de Pb^{2+} , son iónicos principalmente. El Pb^{4+} sólo puede existir bajo condiciones extremas de pH y potencial de óxido-reducción (Eh) (Universidad de Chile & Servicio Agrícola y Ganadero, 2005), como se observa en la Figura 1.1b ($\text{PbO}_2(\text{s})$).

La disolución oxidativa de la Galena libera Pb acuoso y SO_4 al ambiente superficial y como se ha mencionado anteriormente, comúnmente causa la formación de Anglesita (en ambientes ácidos) o Cerusita (en ambientes alcalinos) (Bao *et al.*, 2021) (Figura 1.1a). Además, en el entorno de poros de agua con pH neutro, la oxidación de la Galena libera iones de Pb que dan lugar a la formación de precipitados carbonatados secundarios que contienen Pb, donde la Cerusita es la fase dominante y la shannonita [$\text{Pb}_2\text{O}(\text{CO}_3)$] es una posible fase secundaria (Bao *et al.*, 2021).

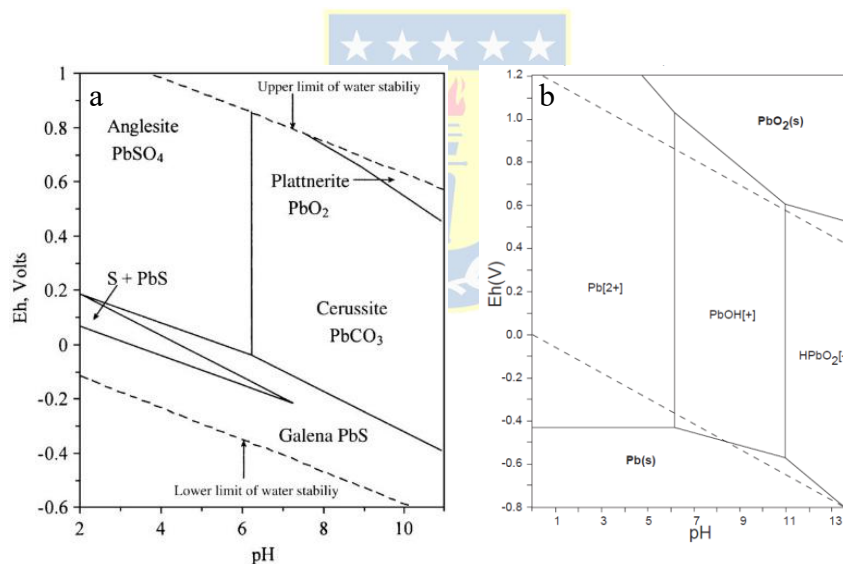


Figura 1.1: Diagramas de Eh-pH de distintas especies de Pb. (a) Minerales de plomo a 298° K (~25° C) y 1 bar, carbonato total = 10^{-3} mol/L y azufre total disuelto = 10^{-2} mol/L (Krauskopf & Bird, 1994). (b) Sistema Pb-O-H. $\Sigma\text{Pb} = 10^{-10}$ mol/kg, 298.15° K (25° C), 10^5 Pa (1 bar) (Takeno, 2005).

La espectroscopía de absorción de rayos X (XAS) es uno de los únicos métodos capaces de proporcionar una especiación directa a escala molecular del Pb en “geomedios” naturales (Hayes *et al.*, 2012). Varios estudios han empleado técnicas de XAS para estudiar la especiación en los estériles mineros y han ilustrado la transformación de PbS en productos de meteorización secundaria relativamente más bioaccesibles, incluyendo: Cerusita, Anglesita, plumbojarosita [$\text{Pb}_{0.5}\text{Fe}_3^{+3}(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$] y fases de Pb sorbido a menudo con (hidr)óxidos de Fe o Mn (Root *et al.*, 2015), entre los que se encuentran la birnessita [$(\text{Na},\text{Ca})_{0.5}(\text{Mn}^{4+},\text{Mn}^{3+})_2\text{O}_4 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$], la goethita [$\text{FeO}(\text{OH})$] (Ostergren *et al.*, 1999) y la jarosita [$\text{KFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$] (Hayes *et al.*, 2012), entre

otros. Los estudios sobre el Pb en estériles ricos en Fe con pH bajo destacan la importancia de la plumbojarosita y las especies sorbidas (Root *et al.*, 2015). Estos últimos autores señalan que existen otros estudios de ambientes semiáridos que han demostrado la acumulación de sales de sulfato ricas en Pb bioaccesibles en la superficie de los estériles mineros. Además, Hayes *et al.* (2012), indican que la mayoría de los estériles que estudiaron eran ricos en carbonatos, y el Pb se encontró principalmente en fases carbonatadas y sorbidas.

1.3. Toxicidad del Plomo

La toxicidad por plomo o intoxicación por plomo también se conoce como plumbismo. El nivel de cualquier metal más allá del límite permisible causa efectos tóxicos debido a su naturaleza venenosa y puede tener efectos perjudiciales para la vida. Estos metales tóxicos se acumulan en el cuerpo y en la cadena alimentaria después de entrar a través de diversos medios (Meena *et al.*, 2020). La intoxicación aguda y sintomática por Pb se detecta con mayor frecuencia en niños de países en vías de desarrollo y en poblaciones que viven en y/o cerca de lugares contaminados por Pb (Kalita & Joshi, 2017).

La literatura sugiere que el plomo no desempeña un papel significativo en el cuerpo humano. Al mismo tiempo, la ingesta de plomo a través de fuentes externas crea una variedad de efectos como elevación de la presión arterial, daño renal y cerebral, infertilidad en hombres, problemas de aprendizaje y comportamiento en niños y otros dentro del cuerpo humano (Shivani Gupta *et al.*, 2020), como se muestra en la Figura 1.2.

El plomo (Pb) es extremadamente tóxico y está clasificado como Clase B2 (probable carcinógeno humano) según el Sistema Integrado de Información de Riesgos de la EPA estadounidense (Beiuyan *et al.*, 2020).

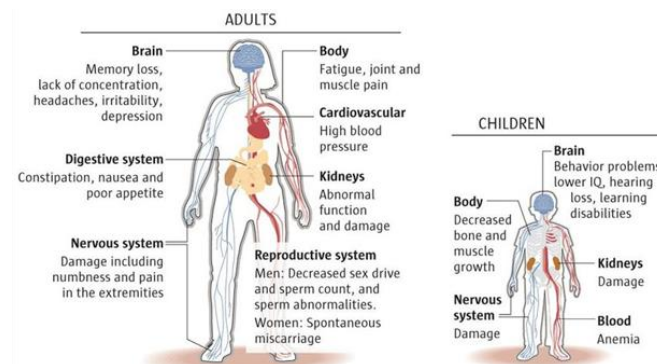


Figura 1.2: Efectos de la intoxicación por plomo. Extraída de Sri Chandana (2015).

De acuerdo con la legislación chilena, el Decreto 136 del 2001 establece la norma de calidad primaria para plomo en el aire, donde se menciona que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido que los niveles mínimos de plomo en la sangre, a los cuales se observa un efecto sobre la salud de las personas son 15-20 mg/dl en adultos y 10 µg/dl en niños, y que sobre esta base la OMS recomienda un nivel de concentración de plomo en el aire de 0.5 µg/m³ anual. De esta manera, el Decreto 136 indica que la norma primaria de calidad del aire para el contaminante plomo es de 0.5 microgramos por metro cúbico normal (µg/m³N) como concentración anual.

Por otro lado, la Norma NCh 1333 que establece los criterios de calidad para el uso de aguas de riego en 5 mg/L de Pb, al igual que la EPA de EE.UU. y Australia.

Si bien, en Chile se reconoce una preocupación por la contaminación de los suelos con metales pesados; no existe actualmente ninguna legislación nacional al respecto. Meena *et al.* (2020) indican que el suelo contaminado con plomo se puede clasificar en cinco grupos en función del nivel de contaminación por plomo, como: muy bajo (<150 ppm), bajo (150-400 ppm), medio (400-1000 ppm), alto (1000-2000 ppm) y muy alto (>2000 ppm). De acuerdo con la bibliografía revisada esto debería ser válido al menos para India, Estados Unidos y España.

Tabla 1.1 : Concentraciones umbral de plomo por diversos organismos. Extraída de Sevak *et al.* (2021).

	Environment Protection Agency (EPA)	World Health Organization	Bureau of Indian standard
Drinking water	0.015 mg/L	< 0.01 mg/L	0.01 mg/L
Freshwater	0.014-0.016 mg/L	0.01 mg/L	0.01 mg/L
Soil	400 mg/L	600 mg/L	400 mg/L
Industrial effluent	1.0 mg/L	0.1 mg/L	0.1 mg/L
Air	0.15 µg/m ³	< 0.5 µg/m ³	0.50 µg/m ³

Finalmente, la Tabla 1.1 muestra las concentraciones límite tanto para aire, suelo y agua según distintos organismos.

1.4. Biorremediación del Plomo

Los métodos tradicionales para eliminar el plomo de los medios acuosos incluyen la precipitación química, la extracción con disolventes, el intercambio iónico, la coagulación, la flotación por aire y la adsorción con carbón activado. Frente a la escasa eficacia, los elevados costos y los efectos poco respetuosos con el medio ambiente de estos métodos, la biorremediación se considera uno de los métodos más rentables para la inmovilización de metales pesados (Qiao *et al.*, 2019).

Las bacterias que pueden vivir en hábitats o entornos contaminados con plomo se denominan bacterias resistentes al plomo. Para soportar las inhóspitas condiciones de estos ambientes deben

tener un transporte activo (ATP) y poseer el operón Pbr (Arifiyanto *et al.*, 2017). En la Tabla 1.2 se presenta una lista de posibles bacterias resistentes al plomo, que muestra la tolerancia a este metal y otros parámetros importantes (Sevak *et al.*, 2021).

Tabla 1.2: Bacterias tolerantes al plomo. Modificada de Sevak *et al.* (2021)

Name of the bacteria	Site of isolation	MTC of Pb (mg/L)	Resistance to other pollutants	Mechanism of Pb resistance	Percentage HM removal	Optimum pH and temp.	Reference
<i>Acinetobacter junii</i> Pb1	Coal mine dump, India	500	-	Adsorption and/or accumulation	-	-	Singh <i>et al.</i> (2019)
<i>Microbacterium oxydans</i> CM3	Coal mine, soil sample, Iran	400	Cadmium	-	58% from 400 ppm Pb	-	Dabir <i>et al.</i> (2019)
<i>Bacillus subtilis</i> X3	Lead mine, China	2000	-	Biosorption, exopolysaccharide formation	590.49 mg/L	pH-4	Qiao <i>et al.</i> (2019)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Aquaculture plant volcanic ashes, Ecuadorian	100	-	Biosorption	>90% from 50 mg/L	pH-7	Gallardo-Rodríguez <i>et al.</i> (2019)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> N6P6	Water sample, Paradip Port, Odisha, India	1000	Zn, Cd, Cu, Hg, Cr	Exopolysaccharide, biofilm, metallothionein	-	-	Kumari and Das (2019)
<i>Enterococcus</i> sp.	Heavy metal polluted soil samples, Mauritius	40	Cd, Cr	P-type ATPase pumps	43.00%	Up to 3 pH	Andrea <i>et al.</i> (2017)
<i>Providencia vermicola</i> strain SJ2A	Soil sample from battery manufacturing industry waste, Goa, India	622	-	Intracellular and periplasmic sequestration, efflux	153.12 mg/g of biomass	pH 6	Sharma <i>et al.</i> (2017)
<i>Panibacillus</i> sp strain RM	Plant root, India	450	Cu, As and Zn	-	39.50% of initial 50 mg/ml	37 °C and pH 7	Govarthan <i>et al.</i> (2016)
<i>Bacillus</i> sp. SKK11	Sediment sample, Pulicat Lake, India	750	-	Oxidation-reduction, transformation	22.9% of 209.5 mg/kg	-	Govarthan <i>et al.</i> (2015)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Soil sample from root of plant in lead contaminated area, Tunisia	736	-	-	-	-	Jebara <i>et al.</i> (2015)
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	Soil samples, China	1658	-	Biotransformation, biomineralization	-	-	Teng <i>et al.</i> (2019a, b)
<i>Pseudomonas fluorescence</i>	Water sample, near Komarapalayam, India	32.64	Cd, Zn	Biosorption	94.32%	-	Basha and Rajaganesh (2014)
<i>Aeromonas caviae</i> strain KS-1	Water sample of Mandovi Estuary, India	290	Zn, Cd, Cu and Hg	Biosorption,	8% on cell surface	-	Shamim <i>et al.</i> (2013)
<i>Halomonas elongata</i>	Hypersaline soils and water, Iran	518	Cd	Biosorption, bioaccumulation, exopolysaccharide	90% from 103.5 mg/ml	pH 3.0-6.0, 35 °C	Amoozegar <i>et al.</i> (2012)
<i>Bacillus cereus</i>	Industrial effluents, Peenya Industrial area, India	500	-	Biosorption, complexing	73.6% from 100 mg/ml	pH 5, 30 °C	Murthy <i>et al.</i> (2012)
<i>Deftiatsuruhatensis</i>	Soil sample from mine, México	1243	Se, Zn, Cu, Ni, Al	Biosorption	0.216 mM/g of biomass	pH 6 and 25 °C	Bautista-Hernández <i>et al.</i> (2012)
<i>Halomonas</i> sp. WQL9	Lake Qarun water and soil sample, Egypt	829	Ni, Cu, Co, Cr, Hg	Extra- and intracellular accumulation and bioprecipitation	97% of 400 mg/ml	pH 5 and 24 °C	Abdel-Razik <i>et al.</i> (2020)

Los microorganismos utilizan procesos como la biosorción, la bioacumulación, la biotransformación y la biolixiviación para mantenerse con vida en un entorno contaminado por metales (Pande *et al.*, 2022) (Figura 1.3). Estas técnicas se han utilizado en procesos de biorremediación.

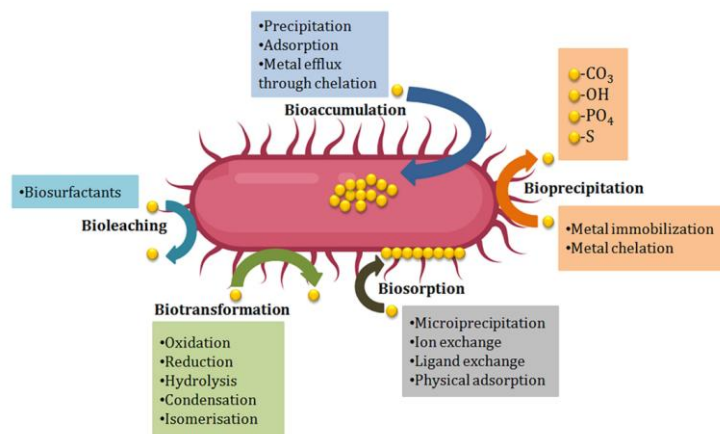


Figura 1.3: Mecanismos de biorremediación de metales pesados. Modificada de Pande *et al.* (2022).

Muchas especies bacterianas acumulan el plomo del suelo contaminado y de los sistemas hídricos mediante el proceso de bioacumulación y biosorción a través de procesos activos y pasivos.

Qiao *et al.* (2019) proporcionan más detalles de la biosorción, la cual definen como la unión de biomasa microbiana a metales pesados por métodos físicos y/o químicos. Particularmente, la biosorción del plomo se consigue principalmente a través de grupos funcionales de la pared celular, aunque también puede ocurrir a través de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) secretadas por los microbios. La capacidad de eliminar y adsorber metal es también significativamente mayor que la de las sustancias intracelulares. La pared celular está cargada negativamente como resultado de los grupos funcionales, incluidos los grupos fosfato, carboxilo, carbonilo, sulfhidrido e hidroxilo, que pueden unirse al plomo para formar sustancias insolubles. Cationes como Na^+ y K^+ pueden intercambiar Pb^{2+} en la capa externa. Además, la pared celular está compuesta por macromoléculas orgánicas, como polisacáridos, polipéptidos y proteínas, que pueden adsorber plomo mediante fuerzas electrostáticas, fuerzas de Van der Waals, enlaces covalentes o intercambio iónico. Además, la estructura porosa microfibrada de la pared celular implica que el plomo se depositará en la superficie de la pared celular o se incrustará en ella antes de entrar en la célula (Qiao *et al.*, 2019).

Mientras que, la bioacumulación es un proceso metabólicamente dependiente que utiliza la energía celular para la absorción de metales pesados. Se necesita más tiempo en comparación con el proceso de adsorción, ya que depende de la estructura interna microbiana, las características bioquímicas, la capacidad genética y fisiológica, y las condiciones ambientales. Además, se ha informado que el proceso de bioacumulación también se ve influido por las propiedades de la superficie celular, como los cambios de carga. Asimismo, la temperatura también afecta al proceso de bioacumulación; una temperatura más alta puede destruir la actividad metabólica de las células bacterianas (Sharma & Shukla, 2021).

De acuerdo con Pande *et al.* (2022), la biotransformación es un proceso en el que se altera estructuralmente un compuesto químico, por lo que se sintetiza una molécula relativamente más polar. En otras palabras, este contacto del metal y los microorganismos hace que los metales tóxicos y los compuestos orgánicos se alteren a una forma comparativamente menos peligrosa. Las transformaciones microbianas se pueden lograr mediante la producción de nuevos enlaces de carbono, isomerización, introducción de grupos funcionales, oxidación, reducción, condensación, hidrólisis, metilación y desmetilación.

La biolixiviación es realizada por una amplia gama de microbios y, entre ellos, los acidófilos son los más destacados. Los acidófilos son quimiolitótrofos que oxidan Fe (II) a Fe (III) y/o reducen el azufre a ácido sulfúrico y florecen en ambientes de pH bajo, particularmente 2 o menos. El ácido sulfúrico produce iones férricos y protones, que solubilizan los sulfuros y óxidos metálicos de los minerales, lo que ayuda a la extracción de metales al separar los metales en la fase sólida de la fase más soluble en agua (Pande *et al.*, 2022).

De acuerdo con Valencia *et al.* (2014): “la biomineralización o bioprecipitación ocurre por reacciones químicas entre iones o compuestos, como resultado de las actividades metabólicas de organismos vivos, en ciertas condiciones ambientales. Estos organismos forman precipitados minerales cristalinos o amorfos, siendo aproximadamente el 80% cristalinos y el 20% amorfos. La carbonatogénesis es un ejemplo de biomineralización en el cual se produce la precipitación de carbonatos. Este proceso es altamente dependiente del pH, y es aquí donde el papel principal de la bacteria se ha asociado a su habilidad de crear ambientes alcalinos e incrementar la concentración de carbono inorgánico diluido, por medio de varias de sus actividades fisiológicas”.

En esta tesis pretende utilizarse el método de precipitación de carbonatos inducida microbianamente (MICP), una de las estrategias innovadoras de biorremediación mediada por organismos vivos. El mecanismo microbiano más eficaz para lograr la MICP es la hidrólisis de la urea catalizada por la enzima ureasa que se encuentra en las bacterias productoras de ureasa. El principio básico asociado con MICP basado en la hidrólisis de la urea por la enzima ureasa en amoníaco y carbonato, lo que resulta además en la formación de CaCO_3 en presencia de Ca^{2+} (Figura 1.4). Los iones de metales pesados similares al Ca^{2+} como el Pb^{2+} , Cd^{2+} y Cu^{2+} pueden introducirse en cristales de Calcita sustituyendo al Ca^{2+} en la red cristalina o accediendo al intersticio o defecto cristalino durante la precipitación de la Calcita. Esto contribuye a la mineralización de los iones metálicos en formas minerales estables, reduciendo así la movilidad y la toxicidad de los metales. La amplia aplicación de MICP y la capacidad de su producto para

atrapar metales pesados podría contribuir a un nuevo enfoque de remediación *in situ* para suelos contaminados (Wei *et al.*, 2022).

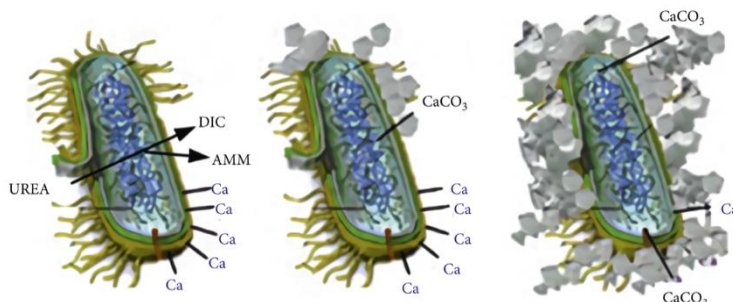


Figura 1.4: Diagrama esquemático de la biomineralización de las bacterias productoras de ureasa. Extraído de Zhang *et al.* (2021).

Kang *et al.* (2014) mostraron que una excelente eficiencia de eliminación de plomo (68,1%) fue registrada por la cepa *Enterobacter cloacae*. Los factores ambientales como la temperatura y el pH, afectan a la actividad ureasa y a la capacidad de restricción de metales pesados de las bacterias ureolíticas (Wei *et al.*, 2022). El proceso de MICP se lleva a cabo en un pH entre 7.0 y 9.5. Sin embargo, es necesario optimizar el rango de pH para la MICP según la cepa bacteriana específica que se va a utilizar. Por ejemplo, Stocks-Fischer *et al.* (1999) examinaron las propiedades físicas y bioquímicas de la precipitación de carbonato de calcio inducida por *Sporosarcina pasteurii*, y a partir de sus resultados cinéticos, encontraron que la actividad enzimática era significativamente alta a pH 7.7, donde se favorecía la precipitación de Calcita. No obstante, si los niveles de pH son muy bajos, el carbonato tiende a disolverse y no se precipita (Chaparro-Acuña *et al.*, 2018).

Hasta el momento no se han reportado estudios similares en Chile ni han sido evaluadas las capacidades de degradación, con el fin de obtener parámetros de diseño para un biorreactor especializado para la inmovilización de Pb bajo un sistema biológico MICP, utilizando bacterias ureolíticas tolerantes a Pb. En este contexto, el desafío principal de esta propuesta es caracterizar bacterias tolerantes a Pb presentes en un relave minero (residuo del proceso minero-metalúrgico de flotación por espuma, generalmente un lodo o polvo muy fino, que queda después de procesar el mineral y extraer los minerales valiosos) que sean capaces de mineralizar Calcita, con el propósito de aislar e identificar cepas bacterianas capaces inmovilizar Pb.

1.5. HIPÓTESIS DE TRABAJO

1.3.1. El problema

En el ambiente, tanto en los sistemas acuáticos como en los terrestres, pueden existir elementos tóxicos, como los metales pesados, que necesitan ser extraídos del mismo. Dentro de estos elementos contaminantes se encuentran, por ejemplo, el Mercurio (Hg), Arsénico (As), Antimonio (Sb) y Plomo (Pb), entre otros. Estos elementos pueden producir problemas en la salud humana, como para muchos otros organismos. Por lo tanto, es importante poder remediar estos sistemas utilizando las tecnologías más eficientes para ello.

En particular, en estos ambientes pueden existir microorganismos que capaces de biotransformar, bioacumular, biomineralizar y/o bioabsorber metales pesados. Por lo cual, estos microorganismos pueden ser utilizados como una estrategia para biorremediar ambientes contaminados con estos tipos de elementos.



1.3.2. HIPÓTESIS

En los relaves mineros existen bacterias ureolíticas, capaces de tolerar la presencia de plomo (Pb) en concentraciones mayores a 400 mg/L y pueden ser utilizadas para la implementación de un sistema de tratamiento biológico, basado en la biomineralización de Pb, para sistemas ambientales contaminados con el metal pesado.

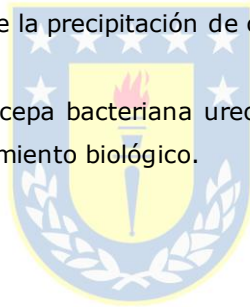
1.6. OBJETIVOS

1.6.1. Objetivo general

Aislar y caracterizar una cepa bacteriana ureolítica, tolerante a plomo, desde un relave minero polimetálico y evaluar su capacidad de biorremediar Pb mediante la implementación de sistema de tratamiento biológico.

1.6.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar microbiológica y geológicamente un relave minero producto de la explotación de un yacimiento hidrotermal vetiforme polimetálico (Au, Ag, Zn, Pb y Cu).
2. Aislar y seleccionar una bacteriana ureolítica-Pb-tolerante y evaluar su capacidad de biomineralizar plomo mediante la precipitación de cristales de Calcita.
3. Evaluar la capacidad de una cepa bacteriana ureolítica-Pb-tolerante de biorremediar Pb mediante un sistema de tratamiento biológico.



2. METODOLOGÍA

2.2. Obtención de la muestra

La muestra se obtuvo desde un relave minero producto de la explotación de un yacimiento hidrotermal vetiforme polimetálico (Au, Ag, Zn, Pb y Cu) de Chile.

2.3. Análisis granulométrico

El estudio granulométrico se realizó con ayuda del equipo de difracción láser estática Fritsch ANALYSETTE 22 MicroTec plus, calibrado para mediciones de un rango entre 0,08 - 2.000 μm y que funciona con análisis en húmedo.

Para medir el tamaño de una partícula, mediante este método, primero se irradia con un rayo láser. Luego, la desviación parcial de la luz láser crea una distribución de intensidad característica en forma de anillo detrás de la muestra que se mide con un detector. La distancia de estos anillos se utiliza para calcular el tamaño de las partículas: Las partículas grandes producen anillos muy cercanos entre sí; las partículas más pequeñas producen anillos más separados (Fritsch, s.f.).

2.4. Fluorescencia de rayos X

Se realizó un análisis de espectrometría de fluorescencia de rayos X (FRX) con el fin de conocer elementos mayoritarios, menores y traza presentes de manera semicuantitativa. Esta técnica permite medir elementos presentes exclusivamente en fases sólidas, que van desde el flúor (F) hasta el uranio (U) en la tabla periódica de los elementos químicos. Se utilizó el equipo marca Rigaku modelo ZSX Primus II (WDS), operado con radiación de Rh (sin estandarización).

2.5. Difracción de rayos X

El análisis por DRX, se realizó mediante el método del polvo utilizando un equipo Bruker® D4 Endeavor, operado con radiación de Cu y filtro de radiación $K\beta$ de Ni. Las condiciones de lectura utilizadas fueron las siguientes:

- 2 theta: 3 a 70 ($^{\circ}$)
- Step size: 0,02 ($^{\circ}$)
- Time step: 1 (s)
- Voltaje: 40 (kV)
- Corriente: 20 (mA).

A la muestra se le realizó la lectura por difracción de rayos X (DRX) en la roca total y una identificación de los minerales presentes.

2.6. Análisis químico por ICP-OES

El análisis multi-elemental mediante espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) permite alcanzar límites de detección de hasta partes por billón (ppb). Este se llevó a cabo utilizando un equipo de la marca y modelo Agilent Technologies 5110 con introducción automática de muestra SPS-4.

2.7. Mineralogía Automatizada QEMSCAN

El estudio de Qemscan® se realizó en preparaciones transparente-pulido de briquetas con material particulado. Las preparaciones fueron carbonizadas en su superficie y medidas en la modalidad Particle Mineral Analysis (PMA), utilizando la SIP CuS-1 modificada para la cuantificación de la mineralogía modal de las muestras.

4.6.1. Condiciones analíticas de la mineralogía automatizada

El sistema Qemscan® es un método instrumental no destructivo, de carácter semi-cuantitativo que se basa en la identificación de fases/minerales a través de la combinación de imágenes de electrones retrodispersados (BSE) y de espectros de energía dispersiva de rayos X (EDS) captados punto a punto sobre una malla de muestreo en el mineral. El instrumento instalado en el Instituto de Geología Económica Aplicada (GEA) consta de un microscopio electrónico de barrido Quanta 250 y dos detectores libres de nitrógeno Bruker XFlash 6130 (Silicon Drift Detector).

El análisis PMA efectuado con Qemscan®, consiste en un barrido bidimensional de la superficie de la briketa, midiendo las partículas expuestas utilizando en este caso una malla de muestreo (point spacing) de 5 µm, medida que corresponde a la distancia entre puntos de análisis sucesivos de la microquímica mediante rayos X característicos emitidos por los elementos que conforman la superficie mineral. Este tipo de análisis provee detalles texturales, composición modal y datos granulométricos.

Las condiciones generales de operación del instrumento fueron las siguientes:

Qemscan: Qemscan 650

Plataforma: Idiscover-Imeasure 3.3

SEM Plataforma: Quanta System

SIP: CuS1

Distancia entre puntos: 5 μm

Modo de medición: Particle Mineral Analysis

Tiempo de medición: 8 hrs (en promedio por modalidad de análisis)

Voltaje de aceleración: 25 kV

Detectores: 2 Xflash Bruker N2L Free

Corriente de filamento: 3

Corriente absorbida: 5 nA

Calibración BSE: 3 puntos, Cuarzo (44), Cu (130), Au (232)

Calibración espectrómetros: Cu (La) and Cu (Ka)

Brillo y contraste: 29/91,4

Distancia de trabajo: 10 mm (en promedio)

Tamaño del campo: 2000 μm equivalente a 200x (magnificación)

Vacío estándar: $<5 \times 10^{-5}$ Torr

2.8. Extracción y secuenciación masiva de ADN

El ADN de los microorganismos presentes en el relave se extrajo utilizando el kit de extracción PowerSoil® DNA extration (Quiagen), siguiendo las indicaciones del fabricante.

La región V3-V4 de los genes 16S rRNA se amplificó utilizando los cebadores universales modificados (forward primer 5'-GCACCTAAYTGGGYDTAAAGNG-3' y reverse primer 5'-TACNVGGGTATCTAATCC-3'). Se utilizó la plataforma MiSeq de Illumina para generar lecturas de amplicones V3-V4 en un proceso de secuenciación por pares con una longitud de lectura de 300 pb (León *et al.*, 2018).

Para el análisis bioinformático, la calidad de las secuencias generadas se verificó utilizando el programa FastQC (Babraham Bioinformatics). Posteriormente las secuencias se limpiaron según lo requerido, para lo cual se utilizó el programa PRINSEQ lite (Schmieder & Edwards, 2011), con el cual se eliminaron los extremos de las secuencias, así como las secuencias con una puntuación de calidad (Fhred) inferior a 20. Luego, la calidad de las secuencias se controló nuevamente, repitiendo la limpieza de las librerías en el caso de requerirse. Inmediatamente después de la verificación de calidad y limpieza, las secuencias se ensamblaron utilizando el programa metaSPAdes 3.9.0 assembler (Bankevich *et al.*, 2012), utilizando valores de K de 21, 33 y 55. Los contigs (secuencias ensambladas) obtenidos luego del ensamblaje se anotaron usando el algoritmo contenido en el programa Prokka v.1.12 (Seemann, 2014). Las secuencias

correspondientes al gen 16S rDNA se extrajeron de las secuencias de metagenómica utilizando el programa Metaxa2 (Bengtsson-Palme *et al.*, 2015), que permitió a través de la herramienta diversidad del programa determinar el perfil taxonómico de las muestras a distintos niveles (Phylum, clase, orden, familia, género y especie). Las secuencias obtenidas mediante este programa se verificaron usando el alineador SINA de SILVA (Pruesse *et al.*, 2012), usando la herramienta "search and classify", tomando como valor de corte 97% de identidad. A partir de los resultados obtenidos con el programa Metaxa2, se pudo obtener el número de secuencias de los distintos grupos bacteriano en cada nivel taxonómico, hasta llegar al nivel de especie. Con estos datos se calcularon los índices de diversidad como Shannon y Chao 1, usando el programa PAST3 (Hammer, Ø. *et al.*, 2001).

2.9. Selección de bacterias ureolíticas con capacidad de precipitar Calcita (CaCO_3)

Para evaluar la capacidad ureolítica de las cepas bacterianas aisladas éstas se sembraron en medio Base agar Urea al 40% (un viraje de color amarillo a rojo indicó actividad ureolítica), medio utilizado para diferenciar microorganismos en base a la capacidad de hidrolizar urea, y se incubaron a 30°C por 24 h. Como control negativo se utilizó la cepa *E. coli* 25922 y como control positivo se utilizó la cepa *K. pneumoniae*.

Además, la capacidad de inducir la precipitación de Calcita de las cepas seleccionadas se evaluó mediante la utilización de un medio químicamente definido para precipitación de carbonato de calcio (MQD) (20 g de urea, 2.12 g NaHCO_3 , 10 g NH_4Cl , 3 g de caldo nutritivo, 30 mM CaCl_2), descrito por Hammes *et al.* (2003a). Las cepas seleccionadas crecieron en matraces con 25 mL de caldo R2A por 18 horas a 25°C. Posteriormente, 100 µl de estos cultivos se centrifugaron, se lavaron con una solución salina (0.85% NaCl), se resuspendieron en 100 µl de la misma solución, se inocularon en caldo MQD y se incubaron a 25°C. Después de 5 a 10 días de incubación, las muestras se evaluaron preliminarmente mediante microscopía óptica. La formación de cristales de CaCO_3 de color verde y de forma romboédrica, indicó que la reacción de precipitación de Calcita inducida microbiológicamente fue positiva. Posteriormente, las cepas positivas se analizaron mediante microscopía electrónica de transmisión, microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS). Las muestras previamente incubadas durante 5-10 días, se lavaron varias veces con agua destilada y se fijaron con gluteraldehído al 2,5%. Luego, las muestras se lavaron adicionalmente con solución tampón y se fijaron con 1% de tetróxido de osmio. Se procedió a lavar con una solución tampón, se deshidrató con alcohol y acetona (Marrie & Costerton, 1984) y se secó con CO_2 líquido (método del punto crítico). Por último, las muestras se recubrieron con oro, utilizando un dispositivo de recubrimiento por

pulverización catódica (Edwards S150, Sussex, Reino Unido) y se examinarán en un Etec Austoscan SEM (ETEC Corp., CA).

2.10. Cinética de crecimiento

Las cepas seleccionadas crecieron en caldo R2A durante 24 h a 25°C y se inocularon en un caldo químicamente definido (MQD) descrito por Hammes *et al.* (2003a), suplementado con plomo (0.5 mM), como control se utilizó medio MQD sin Pb. Se tomaron muestras sistemáticamente y los recuentos se realizaron por la técnica de la microgota (Bale *et al.*, 1988).

2.11. Niveles de tolerancia a Pb, Se, Cu, Ni, As y Cd

Para determinar la concentración máxima de plomo, selenio, cobre, níquel, arsénico y antimonio que permitiera el crecimiento de las bacterias se incubaron placas con el medio de cultivo químicamente definido a distintas concentraciones de cada uno de estos elementos (0,5; 1; 2; 4 y 10 mM) considerando las velocidades de crecimiento que se obtuvieron en el paso anterior para definir los tiempos de cultivo. Como control se inocularon bacterias a placas con el medio químicamente definido sin metales.

2.12. Identificación de la cepa seleccionada

El ADN de la cepa bacteriana seleccionada se extrajo mediante el kit comercial Instagene Matrix®. El ADN extraído se utilizó como templado para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificando el gen ARNr 16S utilizando los siguientes partidores universales, EUB I (9-27f) y EUB II (1542r). La amplificación se realizó con un ciclo inicial de denaturación a 94°C por 5 minutos, 30-35 ciclos de denaturación a 94°C por 30 s, alineamiento a 56°C por 45 s, elongación a 72°C por 1,5 minutos y elongación final de 72°C por 10 minutos.

Los productos de PCR se secuenciaron y analizaron mediante BLASTN.

2.13. Biomineralización de Pb en un reactor batch

La biomineralización de Pb se realizó a 25°C, a pH 7.5 en matraces de 250 mL que contenían un medio químicamente definido (MQD) suplementado con 5 mM de Pb. Los matraces se inocularon con una concentración final de 10^6 UFC/mL de la cepa bacteriana seleccionada (Achal *et al.*, 2012) e incubaron durante 7 días a 25°C.

El estudio de la cepa y del precipitado producto de la biomineralización se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS). Las muestras previamente incubadas durante 7 días, se lavaron varias veces con agua destilada ($\text{pH} > 7$) y se fijaron con glutaraldehído al 2,5%. Las muestras se lavaron adicionalmente con solución tampón y se fijaron con 1% de tetróxido de osmio. Luego, se procedió a lavar nuevamente con una solución de tampón, se deshidrató con alcohol y acetona, y se secó con CO_2 líquido (método del punto crítico). Por último, las muestras se recubrieron con oro utilizando un dispositivo de recubrimiento por pulverización catódica (Edwards S150, Sussex, Reino Unido) y se examinaron en un Etec Austoscan SEM (ETEC Corp., CA).

2.14. Detección de Pb

La detección de plomo se realizó mediante un espectrofotómetro de fluorescencia atómica, AFS-640 (fabricado por Beijing Rayleigh Analytical Instrument Corp., China), con un sistema de introducción de muestra de inyección en flujo acoplado a un generador de hidruros. Éste consiste en una bomba peristáltica con dos canales, uno de ellos aspira la solución reductora, mientras que el otro aspira la solución de muestra/carrier; tiene un bucle de almacenamiento de muestra y uno de reacción, así como dos corrientes de argón (auxiliar y principal). La fuente de luz, una lámpara de cátodo hueco se operó a 80 mA en modo de doble pulso a 283.3 nm. El tubo fotomultiplicador R166 se empleó como sistema de detección. Todas las funciones del equipo son controladas por medio de un software en la computadora.

2.15. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las muestras de precipitado de Calcita, se lavaron varias veces con agua destilada ($\text{pH} > 7$) y se fijaron con glutaraldehído al 2,5%. Las muestras se lavaron adicionalmente con solución tampón y se fijaron con 1% de tetróxido de osmio. Luego, se procedió a lavar nuevamente con una solución de tampón, se deshidrató con alcohol y acetona (Marrie & Costerton, 1984), y se secó con CO_2 líquido (método del punto crítico). Por último, las muestras se recubrieron con oro utilizando un dispositivo de recubrimiento por pulverización catódica (Edwards S150, Sussex, Reino Unido) y se examinaron en un Etec Austoscan SEM (ETEC Corp., CA).

3. RESULTADOS

3.1. Obtención de la muestra

La muestra fue obtenida desde un relave minero producto de la explotación de un yacimiento hidrotermal vetiforme polimetálico (Au, Ag, Zn, Pb y Cu) de Chile.

3.2. Análisis granulométrico

En la Figura 3.1 y la Tabla 3.1 se muestran los resultados del análisis granulométrico. El 99% de los granos presenta un tamaño menor a 41 micrómetros, el promedio corresponde a 12,3 micrómetros, la moda consiste en 13 micrómetros y la mediana 8,7 micrómetros.

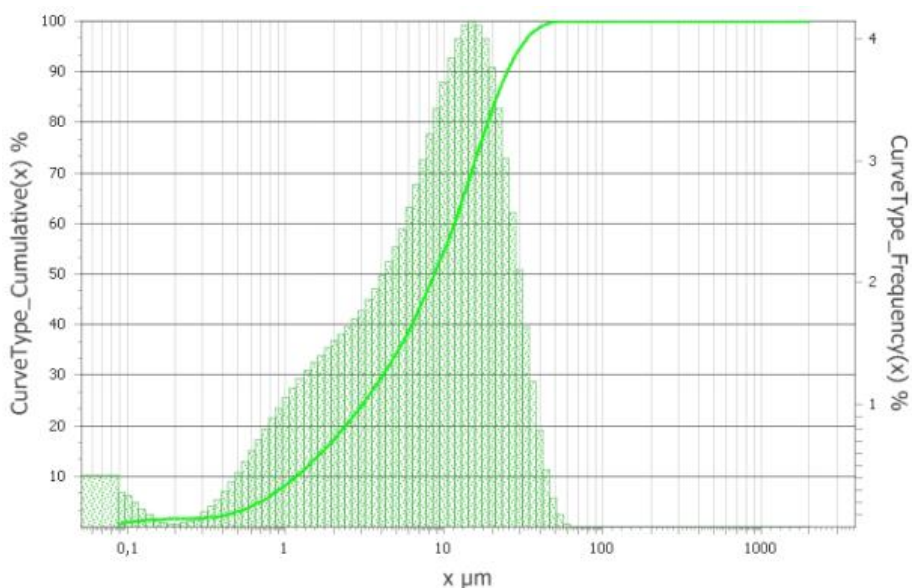


Figura 3.1: Diagrama de distribución de tamaño de grano de las partículas con leve tendencia bimodal.

Tabla 3.1: A la izquierda tabla de porcentaje acumulado y a la derecha tabla de frecuencia.

Q3(x) [%]	x [μm]	Q3(x) [%]	x [μm]
1	0,1	17,3	2
5	0,7	29,5	4
10	1,2	54,9	10
20	2,4	82,7	20
30	4,1	98,4	38
40	6,3	99,3	43
50	8,7	100	61
60	11,4	100	74
70	14,6	100	147
80	18,6	100	351
90	24,8	100	833
95	30,3	100	1.651
99	41	100	2.000

3.3. Fluorescencia de rayos X (FRX)

En la tabla 3.2 se presentan los resultados del análisis de fluorescencia de rayos X, donde para favorecer la interpretación de los mismos, se genera una simbología particular para los datos que no registran porcentaje, pero si se detectó señal en el análisis. De esta manera se identifica la presencia de un elemento de la siguiente manera:

*: Se observa presencia del elemento, se recomienda otra técnica de análisis.

?: Señal de muy baja intensidad.

*?: Existe la posibilidad, pero se observa superposición de peak con otro elemento.

% WO₃: Considerar contaminación por molienda, debido a la utilización de molino planetario de carburo de tungsteno.

Tabla 3.2: Resultados cuantitativos mediante fluorescencia de rayos X en la roca total.

Óxido	Concentración (%)
Na ₂ O	2,59
MgO	2,20
Al ₂ O ₃	13,69
SiO ₂	63,48
P ₂ O ₅	0,25
SO ₃	0,38
Cl	0,02
K ₂ O	4,43
CaO	4,30
TiO ₂	0,68
V ₂ O ₅	0,03
MnO	0,40
Fe ₂ O ₃	6,69
Co ₂ O ₃	0,09
CuO	0,19
ZnO	0,20
Ga ₂ O ₃	?
Rb ₂ O	*
SrO	0,04
ZrO ₂	*
SnO ₂	0,03
BaO	0,11
WO ₃	0,07
PbO	0,08

3.4. Difracción de rayos X (DRX)

Utilizando el software DIFFRACT EVA de Bruker® y la base de datos PDF-4/Minerals 2023 de ICDD®, se realizó la identificación y semicuantificación automática (S-Q) de los minerales identificados, la cual se presenta en la Tabla 3.3. Donde se reconocen los minerales más abundantes como silicatos (Plagioclasas [32,5%], Cuarzo [29,2%]), Feldespatos potásicos [25,9%], Anfíboles [2,8%], Clinocloro [2,6%] y Biotita [2,6%]), Calcita (1,8%), óxidos de Fe (Magnetita [0,6%] y Hematita [0,6%]), sulfuros (Calcopirita [0,6%] y Pirita [0,4%]).

Tabla 3.3. Resultados de la semicuantificación automática (S-Q).

Muestra	Mineralogía semicuantitativa (%)											
	Plagioclasas	Cuarzo	Feldespatos K	Anfíboles	Clinocloro	Biotita	Calcita	Magnetita	Calcopirita	Hematita	Cal	Pirita
MF-01	32,5	29,2	25,9	2,8	2,6	2,6	1,8	0,6	0,6	0,6	0,5	0,4

El difractograma de la muestra analizada se encuentra disponible en la Figura 3.2. donde se muestran los peaks que confirman la información de la Tabla 3.3.

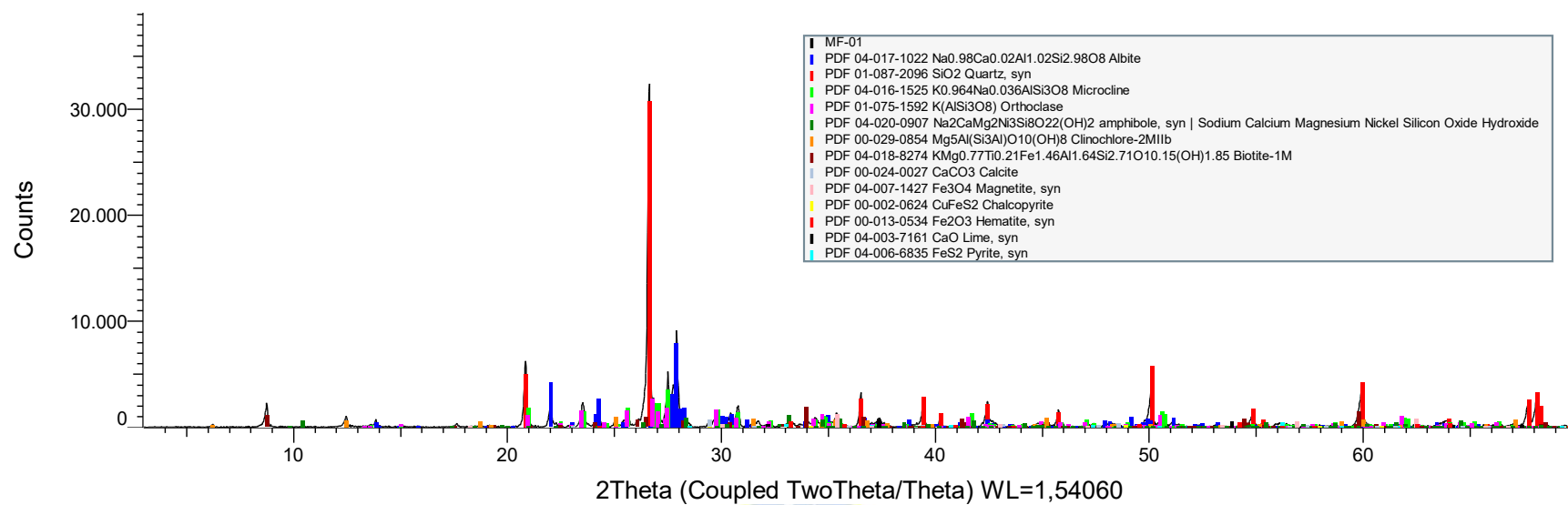


Figura 3.2. Difractograma de la Muestra MF-01.

3.5. Análisis químico por ICP-OES

Los resultados del análisis elemental mediante espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) se muestran en la tabla 3.4. Donde se indica que la muestra de relave minero posee una concentración de 580 ppm de Pb.

Tabla 3.4: Resultados obtenidos mediante ICP-OES en mg/kg para Pb.	
Muestra/elemento (mg/kg)	Pb
MF-01	580

3.6. Mineralogía Automatizada QEMSCAN

3.6.1. Agrupamiento mineral.

Durante el análisis automatizado de Qemscan®, los datos colectados punto a punto ('pixel') son clasificados utilizando una base de datos incorporada en el programa de análisis (Specific Identification Protocol, SIP), que se fundamenta en la química mineral obtenida por análisis de energía dispersiva (EDS) de los minerales de mena y ganga más frecuentes. En el caso de este estudio se utilizó la SIP original del programa denominada CuS-1 Blending 2016 modificada. Las muestras incluyen la fase con predominancia de hierro metálico, probablemente sintética. Dicha fase no estuvo reconocida por el SIP aplicado. Para mejorar el agrupamiento mineral, el SIP estuvo enriquecido con la fase hierro metálico.

El software de interpretación y análisis de datos permite simplificar la gran cantidad de información obtenida en una forma más manejable, creando agrupamientos de minerales, en la llamada Lista Secundaria condensada, la cual agrupa algunas especies minerales y resalta las fases relevantes para el estudio de acuerdo con los requerimientos (Figura 3.3).

 Oxidized Cu Minerals	 Biotite
 Metal Fe	 Epidote
 Pyrite	 Accessory silicates
 Other Sulphides	 Clays
 Quartz	 Anhydrite/Gyps
 K-Feldespar	 Jarosite
 Plagioclase	 Carbonates(Ca-Fe-Mg)
 Pyroxene-Amphibole	 Oxides-Hydroxides Fe
 Chlorite	 Rutile/Anatase
 Muscovite(White Mica)	 Other

Figura 3.3: Lista secundaria utilizada en el análisis de la muestra.

3.6.2. Composición modal.

A continuación, en la Tabla 3.5 se presentan los resultados de la composición modal de la muestra analizada. En la Figura 3.4 de muestra una imagen de falso color de las partículas más típicas en la muestra.

Tabla 3.5: Composición mineralógica (vol. %) de 3 muestras estudiadas con Qemscan® en la modalidad PMA. Se destaca en verde el único mineral reconocido que posee plomo en su fórmula química. En amarillo se muestran fases minerales donde el Pb pudiera encontrarse como elemento sorbido. En rojo se destaca la presencia de posibles minerales muy raros de Pb.

Muestra MF-01 (Minerales)	Composición modal (vol. %)
Minerales oxidados de Cu	0,03
Fe metálico	1,04
Pirita	0,22
Otros sulfuros	0,22
Cuarzo	26,02
Feldespatos potásicos	28,22
Plagioclasas	14,24
Piroxenos/Anfíboles	3,44
Clorita	5,11
Muscovita (Mica Blanca)	0,37
Biotita	7,01
Epidota	7,38
Silicatos accesorios	0,58
Arcillas	0,47
Anhidrita/Yeso	0,09
Jarosita	0,12
Carbonatos (Ca/Fe/Mg)	1,74
Oxidos/Hidroxidos de Fe	1,10
Rutilo/Anatasa	0,32
Galena	0,01
Otros	2,26

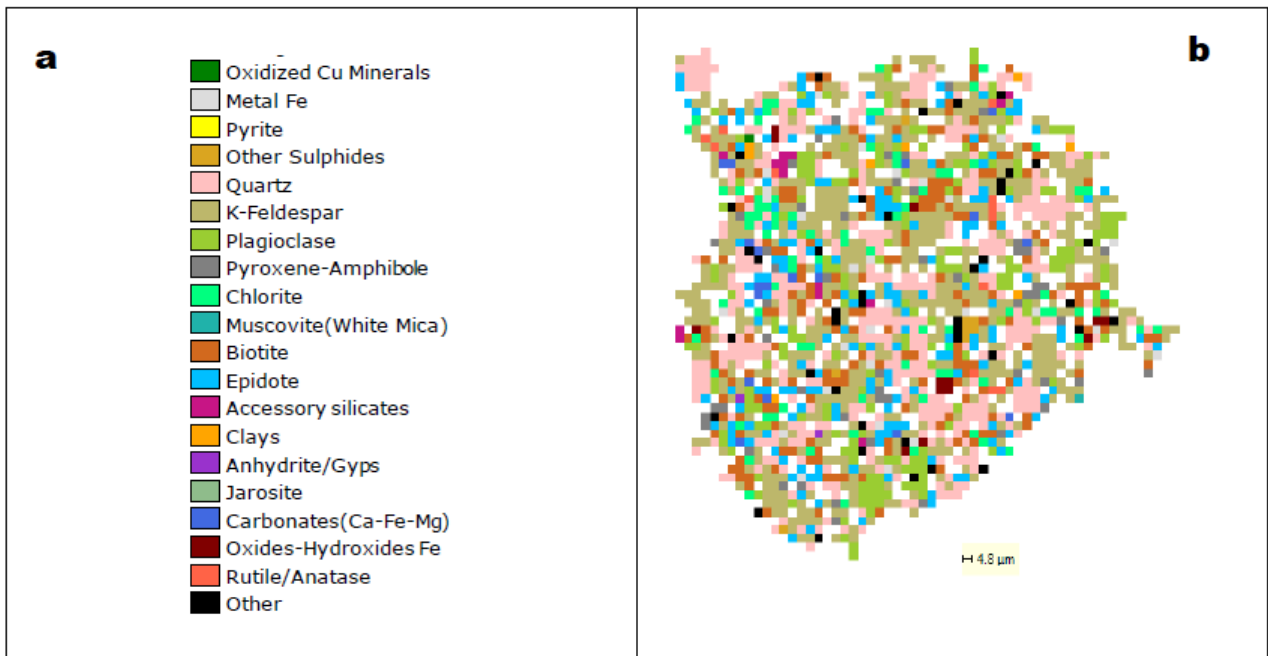


Figura 3.4: Partícula típica de la muestra: (a) Lista secundaria y (b) Muestra MF-01.

3.6.3. Caracterización de la muestra MF-01

Es una muestra con predominancia de feldespatos (42 vol.%) y cuarzo (26 vol.%) y con menor contenido de epidota (7 vol.%), biotita (7 vol.%), clorita (5 vol. %) y anfíbol (3 vol. %). La muestra presenta menor grado de la meteorización [carbonatos (probablemente se forman en las condiciones superficiales) – 2 vol. % y óxidos e hidróxidos de hierro – 1 vol. %]. Presenta 1 vol. % de fase metálico probablemente sintético. No se forma en grandes granos (Figura 3.5). Y por último, se muestran los granos de Pirita en amarillo en la Figura 3.6.

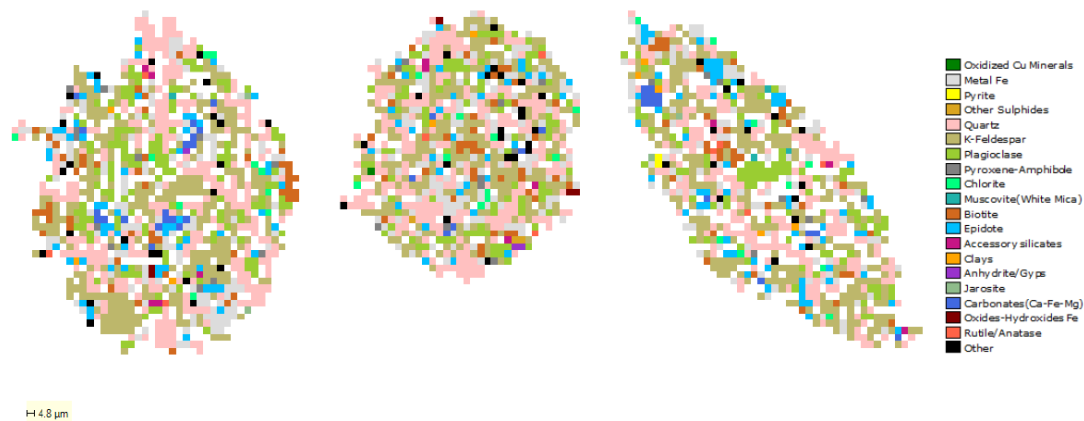


Figura 3.5: Los granos más grandes de la muestra MF-01 (feldespato, cuarzo, hierro metálico, epidota y carbonatos).

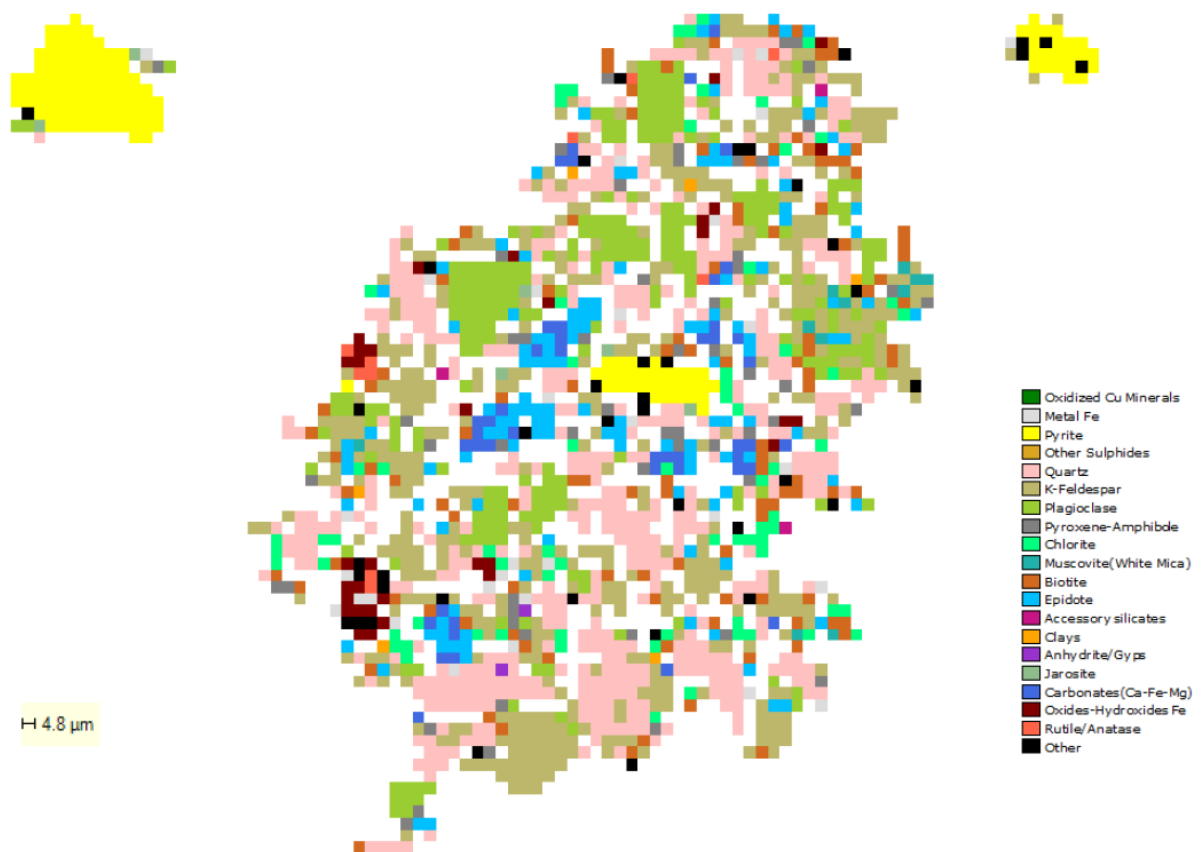


Figura 3.6: Los granos de pirita (amarillo) en la muestra MF-01.

3.7. Extracción y secuenciación masiva de ADN

El análisis metagenómico de las unidades taxonómicas operativas (UTOs) recuperadas del sedimento superficial de los relaves de la mina polimetálica (Au, Ag, Cu, Pb y Zn) mostró la presencia de 14 phyla bacterianos diferentes. Los grupos taxonómicos dominantes (abundancia $\geq 1\%$) se asociaron a *Proteobacteria* (76,73%), *Bacteroidetes* (34,6%), *Firmicutes* (4,72%) y *Actinobacteria* (5,02%) (Figura 3.7). Dentro de *Proteobacteria*, la clase más abundante fue *Gammaproteobacteria* (55,64%), seguida de *Betaproteobacteria* (9,53%), *Alphaproteobacteria* (5,29%), *Deltaproteobacteria* (4,24%) y *Epsilonproteobacteria* (1,43%) (Tabla 3.6).

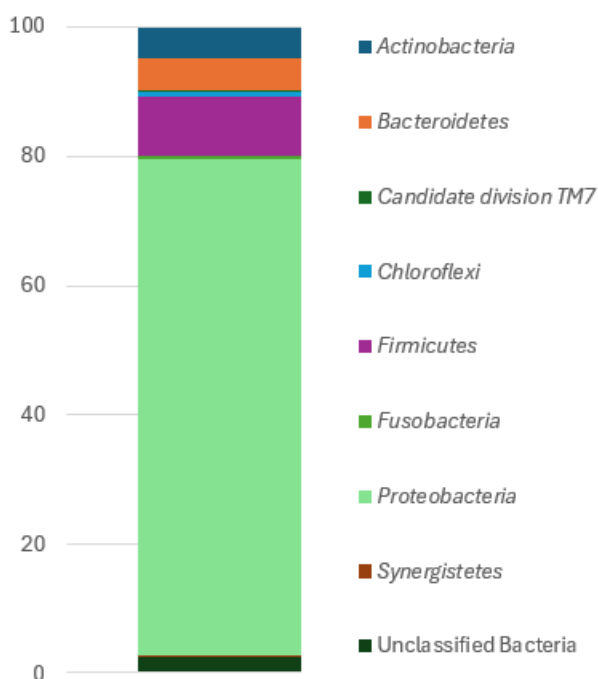


Figura 3.7: Gráfico de barra que muestra la distribución porcentual de los distintos phyla presentes en la muestra de relave mayores a un 0,1%.

Tabla 3.6: Grupos taxonómicos dominantes recuperados de la muestra de relave minero polimetálico.

Grupo filogenético		Abundancia relativa (%)
Grupos taxonómicos dominantes ($\geq 1\%$)	<i>Proteobacteria</i>	76.73
	<i>Alphaproteobacteria</i>	3.29
	<i>Betaproteobacteria</i>	9.53
	<i>Deltaproteobacteria</i>	4.24
	<i>Gammaproteobacteria</i>	53.64
	<i>Epsilonproteobacteria</i>	1.43
	<i>Firmicutes</i>	9.34
	<i>Actinobacteria</i>	5.02
	<i>Bacteroidetes</i>	4.72
Grupos taxonómicos dominantes ($\leq 1\%$)	<i>Acidobacteria</i>	0.06
	<i>Candidate division TM7</i>	0.41
	<i>Chloroflexi</i>	0.57
	<i>Deferribacteres</i>	0.04
	<i>Fusobacteria</i>	0.32
	<i>Nitrospirae</i>	0.07
	<i>Spirochaetes</i>	0.07
	<i>Synergistetes</i>	0.04
	<i>Tenericutes</i>	0.08
	<i>Verrucomicrobia</i>	0.06
	Otras Bacterias	2.09

3.8. Caracterización y selección de bacterias ureolíticas con capacidad de precipitar

Las doce cepas aisladas se caracterizaron según su morfología, su respuesta frente a la tinción de Gram y el cambio de coloración al sembrarlas en agar urea (Tabla 3.7). Las tres cepas que presentaron una mayor actividad ureolítica (RO-01, RO-11 y RO-14) fueron seleccionadas para realizar la técnica de MICP en reactores batch.

Tabla 3.7: Se muestran las características de las distintas cepas estudiadas y su capacidad ureolítica. *E. coli* 25922 se utilizó como control negativo y *K. Neumoniae* como control positivo.

Cepa	Morfología	Tinción Gram	Actividad ureolítica
RO-01	bacilos	-	+++
RO-02	cocos	-	-
RO-03	bacilos	+	-
RO-04	bacilos	+	-
RO-05	cocos	-	++
RO-06	bacilos	+	-
RO-08	cocos	-	+
RO-09	cocos	-	++
RO-10	cocos	-	+/-
RO-11	cocos	-	+++
RO-12	cocos	-	++
RO-14	cocos	-	+++
<i>E. coli</i> 25922			-
<i>K. Neumoniae</i>			+++

3.9. Cinética de crecimiento de la cepa *Sphingobium* RO-01 en presencia de Pb.

Para determinar el efecto del Pb en la cinética de crecimiento de la cepa *Sphingobium* RO-01, se estudió su crecimiento en presencia de 0,5 mM de Pb o en ausencia de Pb, y los resultados se analizaron mediante el modelo de crecimiento de Gompertz (Figura 3.8). El modelo demostró que, tras 120 h de incubación, según el valor k (IC=95%), el tiempo de generación ($t=\ln(2)/k$) de la cepa *Sphingobium* RO-01 fue de 6,8156 h, aumentando a 7,2588 h en presencia de plomo (0,5 mM) ($p>0,05$).

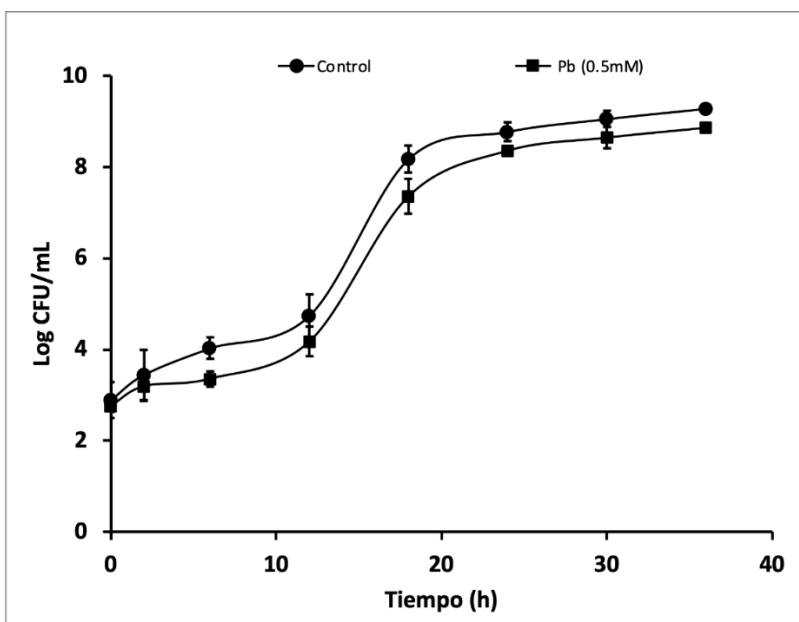


Figura 3.8. Cinética de crecimiento, modelada por Gompertz, en presencia y ausencia de Pb (0.5mM).

3.10. Tolerancia a metales, metaloides y no metales

La Tabla 3.8 muestra los distintos niveles de tolerancia a ciertos metales (Plomo, Cobre, Níquel y Cadmio), metaloides (Arsénico) y no metales (Selenio). Donde se destacan en verde las cepas que se utilizaron para los reactores batch.

La cepa RO-01 es la que presenta un mayor nivel de tolerancia al plomo (hasta 10 mM) por lo que fue seleccionada para su posterior identificación.

Tabla 3.8: Se muestran los niveles de tolerancia a distintos metales, metaloides y no metales de las cepas en estudio en concentraciones de 0,5; 1; 2; 4 y 10 mM. En verde se destacan las cepas seleccionadas para la técnica de MICP. +/- se refiere a que se observó poco crecimiento.

Tolerancia a metales, metaloides y no metales (mM)															
	Plomo					Selenio					Cobre				
Cepa	0,5	1	2	4	10	0,5	1	2	4	10	0,5	1	2	4	10
RO-01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
RO-02	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
RO-03	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
RO-04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/	-
RO-05	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+/	+	+	+	+	-
RO-06	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/	-
RO-08	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
RO-09	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
RO-10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/	+	+	+	+	-
RO-11	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
RO-12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
RO-14	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Tolerancia a metales, metaloides y no metales (mM)															
	Níquel					Arsénico					Cadmio				
Cepa	0,5	1	2	4	10	0,5	1	2	4	10	0,5	1	2	4	10
RO-01	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RO-02	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RO-03	+	+/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RO-04	+	+/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RO-05	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RO-06	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RO-08	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RO-09	+/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RO-10	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RO-11	+	+/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RO-12	+	+	+/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RO-14	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3.11. Identificación de la cepa seleccionada

El ADN de la cepa bacteriana seleccionada fue su extraído y el gen ADNr 16 s fue secuenciado. Las secuencias fueron alineadas y comparadas con secuencias depositadas en el GenBank utilizando BLASTN, determinado que la cepa RO-01 corresponde a la clase *Alphaproteobacteria*, orden *Sphingomonadales*, familia *Sphingomonadaceae* y género *Sphingobium*. Por lo cual, se denominó como cepa *Sphingobium* RO-01.

3.12. Detección de Plomo en los reactores batch

La eliminación de Pb, mediante biomineralización inducida microbiológicamente (MICP), utilizando la cepa *Sphingobium* RO-01 se evaluó mediante espectrometría de absorción atómica (EAA). Esta cepa eliminó el 82 % del Pb total presente en el caldo químicamente definido suplementado con 5 mM de Pb, medido en una muestra de sobrenadante acelular, tras 48 h de incubación a 25 °C (Figura 3.9).

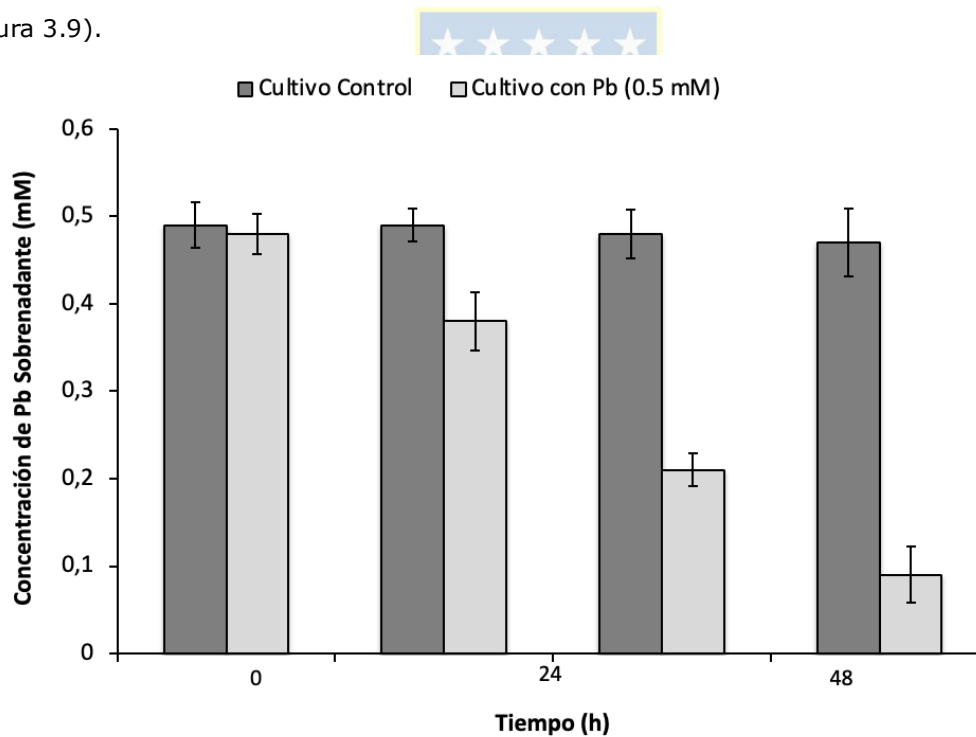


Figura 3.9: Eliminación de Pb por la cepa *Sphingobium* RO-01 en caldo químicamente definido suplementado con 5 mM de Pb a 25 °C en condiciones aeróbicas. Se incluyeron análisis de eliminación de Pb y control abiótico (sin la cepa bacteriana) en condiciones de incubación similares.

3.13. Microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS)

Las observaciones mediante SEM de la cepa *Sphingobium* RO-01 cultivada en caldo MQD-Urea, tanto en presencia como en ausencia de Pb, durante 48 h a 25 °C en condiciones aeróbicas, permitieron detectar la presencia de un precipitado (cristales) alrededor de las células bacterianas (Figuras 3.10B y 3.10C).

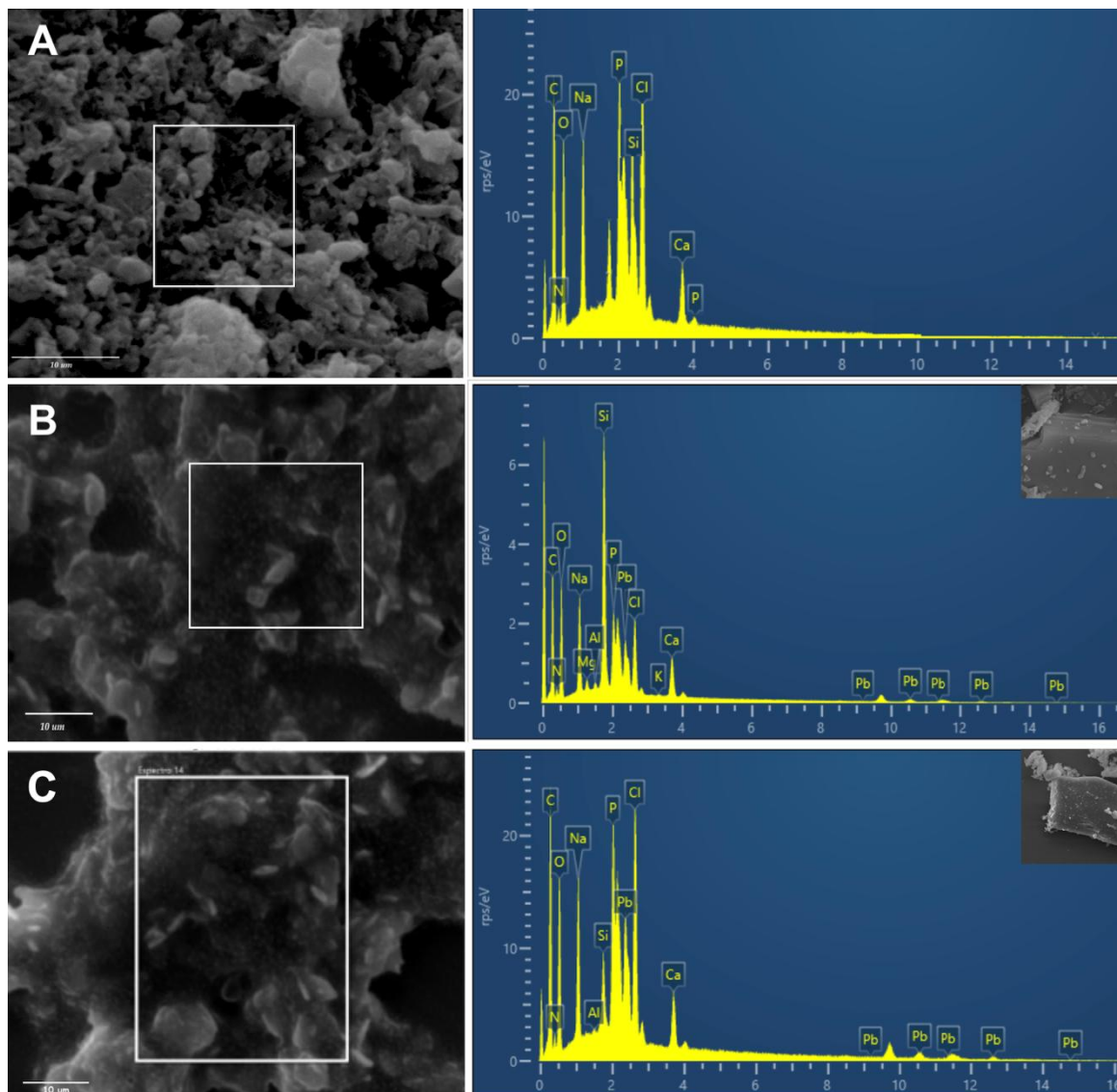
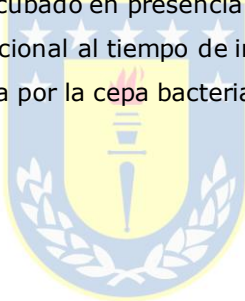


Figura 3.10: Microscopía electrónica de barrido (SEM) (micrografías a la izquierda) y espectroscopía de energía dispersiva (EDS) (imágenes a la derecha) de la cepa *Sphingobium* RO-01 cultivada durante 48 h a 25 °C en condiciones aeróbicas en caldo MDQ-Urea suplementado con 0,5 mM Pb o en ausencia de Pb que muestra los cristales de CaCO_3 obtenidos. A) SEM-EDS de la cepa *Sphingobium* RO-01 cultivada en ausencia

de Pb (control); B) SEM-EDS de la cepa *Sphingobium* RO-01 cultivada en presencia de 0,5 mM Pb, tras 24 h de incubación; C) SEM-EDS de la cepa *Sphingobium* RO-01 cultivada en presencia de 0,5 mM Pb tras 48 h de incubación.

Los análisis mediante SEM-EDS del precipitado, cuando la cepa se cultivó en ausencia de Pb, permitieron detectar la presencia de CaCO_3 (41,57 %), SiO_2 (1,67 %), Albita (0,83 %), Al_2O_3 (1,70 %), Wollastonita (1,45 %) y Feldespato MAD-10 (0,98 %). No se detectó ningún pico de Pb en estas condiciones de cultivo (Figura 3.10A). El análisis SEM-EDS del precipitado cuando la cepa *Sphingobium* RO-01 se cultivó en presencia de Pb, después de 24 h de incubación, mostró la presencia principalmente de CaCO_3 (39,9%), SiO_2 (32,2%) y Pb (7,6%). También se detectaron albita (4,9%), feldespato MAD-10 (2,06%) y wollastonita (2,7%). Después de 48 h de incubación de la cepa *Sphingobium* RO-01 en presencia de Pb, el análisis SEM-EDS del precipitado mostró la presencia principalmente de CaCO_3 (43,45%), SiO_2 (22,9%), Pb (10,1%), Albita (4,9%), Feldespato MAD-10 (2,06%) y Wollastonita (2,7%). La SEM-EDS demostró la presencia de picos de Pb solo en la muestra del cultivo incubado en presencia del compuesto y el aumento de plomo en los cristales es directamente proporcional al tiempo de incubación de la cepa, lo que indica que la biomineralización de Pb fue mediada por la cepa bacteriana objeto del estudio.



4. DISCUSION

La generación de pasivos ambientales, como los relaves mineros, en el mundo actual es inmensa, ya que sólo se extraen onzas o libras de metales por cada tonelada de mineral procesado. En 2022, se estimó que se producían más de 14 mil millones de toneladas métricas de relaves mineros al año en el mundo procedentes de la extracción de metales y minerales (Cacciuttolo & Cano, 2022).

Durante siglos, Chile ha sido un territorio con una importante actividad minera, lo que ha generado beneficios e impactos sociales asociados. Uno de los principales desafíos que enfrenta el país en la actualidad es la presencia de un gran número de relaves mineros que contienen metales pesados, tales como Cu, Cr, Ni, Zn, Pb, As, Cd y Fe, que constituyen un riesgo potencial para la población (Lam *et al.*, 2020).

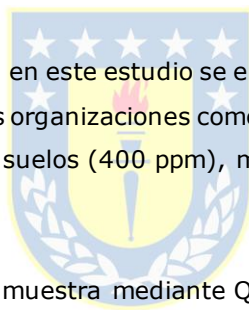
De acuerdo con Kan *et al.* (2021), en relaves mineros afectados por la oxidación a largo plazo y los cambios en el entorno externo, los metales pesados contenidos en los residuos mineros penetran directamente a través del suelo y las aguas subterráneas de las zonas mineras o fluyen hacia los ríos y suelos cercanos a través de la escorrentía superficial y la recarga de las aguas subterráneas; de este modo, el contenido de metales pesados en los entornos circundantes aumenta rápidamente, causando una grave contaminación por metales pesados (Kumar *et al.*, 2020). Los metales pesados no solo provocan contaminación ambiental, sino que también causan daños considerables al cuerpo humano cuando se acumulan en los órganos del cuerpo y en los organismos vivos a través de la cadena alimentaria (Collin *et al.*, 2022; Phaenark *et al.*, 2024).

La predominancia de granulometría fina (media de 12,346 micrómetros) en el relave implica una baja permeabilidad, un alto riesgo de lixiviación y generación de aguas ácidas. Como observaron Liming *et al.* (2017), los relaves finos que estudiaron mostraron mayores coeficientes de compresibilidad y menor permeabilidad en comparación con los relaves gruesos. De acuerdo con Guo *et al.* (2013) el tamaño de las partículas no cambiaría la tendencia de disolución de ciertos metales pesados (Fe, Mn, Cu y Zn). Sin embargo, las concentraciones de metales en el lixiviado de partículas de gran tamaño son considerablemente menores que las de partículas finas. Este comportamiento de lixiviación podría entenderse bien porque las partículas de grano fino tienen una mayor superficie en contacto con la solución que las partículas gruesas.

A diferencia de granulometrías más gruesas, las finas poseen un mayor riesgo de erosión y dispersión de partículas contaminantes, mayor riesgo de inhalación de polvo y enfermedades respiratorias. Esto se debe en parte al clima mediterráneo, que incluye un verano largo y seco con

episodios de viento y fuertes lluvias en el invierno, que expone a los relaves mineros a dos tipos de erosión: la erosión hidráulica con transporte durante eventos de fuertes lluvias y la erosión eólica que induce la dispersión de partículas finas (Boussen *et al.*, 2010).

Si bien en el análisis de fluorescencia de rayos X se determinó la presencia de plomo, es probable que el(los) mineral(es) de plomo no se haya(n) observado en el estudio de difracción de rayos X por encontrarse bajo el límite de detección, por corresponder a fases de plomo sorbido o porque el Pb se encuentre encapsulado en alguna fase amorfa. Como se observó en el trabajo de Y. Liu *et al.* (2019) capas de cemento ricas en Fe que consistían en óxidos de Fe (oxihidratos) acoplados con materiales amorfos de Si, inmovilizaban el Zn (y el Pb) en precipitados similares a la Zn-ferrihidrita $[\text{Fe}^{3+}_{10}\text{O}_{14}(\text{OH})_2]$ en una estructura denominada "hardpan" en relaves sulfídicos de Pb-Zn. Por otro lado, Schaidler *et al.* (2007) estudiando partículas de desechos mineros señalaron que el Pb puede encontrarse como sulfuros amorfos y Pb sorbido o coprecipitado con óxidos férricos hidratados amorfos.



En la muestra de relave que se analizó en este estudio se encontró una concentración de 580 ppm de plomo, lo que la ubica para algunas organizaciones como la EPA y la Bureau of Indian standard sobre los límites recomendables para suelos (400 ppm), mientras que para la OMS estaría justo debajo del límite (600 ppm).

Al observar una partícula típica de la muestra mediante QEMSCAN se reconoce una distribución bastante homogénea de la mineralogía. Solamente se reconoció un 0,01% de Galena lo que sería equivalente a un 0,0087% (87 ppm) de plomo, es decir que, aproximadamente 493 ppm de plomo podrían corresponder a plomo sorbido en pirita, jarosita, óxidos e hidróxidos de Fe u otras fases minerales menos comunes de plomo.

Müller *et al.* (2002) estudiaron granos de pirita recolectados de zonas oxidadas y no oxidadas dentro de relaves mineros utilizando espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente por ablación láser (LA ICP-MS) para determinar la composición elemental (Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Sr, Ag, Cd, Sn, Sb, Cs, Ce, Au, Tl, Pb, Bi, Th y U) de las capas superficiales e interiores de los granos de pirita y descubrieron que las intensidades normalizadas de Cu, Zn, Ag, Sb, Ce, Pb y Bi son mayores en la superficie de cada grano y disminuyen hacia el interior. La adsorción superficial de Cu, Zn y Pb es más pronunciada dentro de la zona no oxidada que dentro de la zona oxidada de los relaves. Las cantidades de Cu y Zn adsorbidas dentro de la zona oxidada son bastante pequeñas, mientras que el Pb muestra una tendencia a una mayor adsorción que el Cu y el Zn dentro de esta zona.

Shi *et al.* (2021) indican que debido a la gran área superficial y a los abundantes ligandos que contienen oxígeno para la mayoría de los (oxihidr)óxidos de hierro, el Pb puede secuestrarse en gran medida mediante adsorción. Comúnmente, el Pb se adsorbe en la superficie de ferrihidrita, goethita, hematita y magnetita, pero también puede ser retenido por (oxihidr)óxidos de hierro mediante la incorporación estructural. Mientras que en la jarosita el Pb puede ocupar un sitio específico en su estructura, en óxidos como la goetita y la hematita, su tamaño iónico lo hace poco propenso a reemplazar al hierro. En cambio, se sugiere que el Pb se adhiere a superficies o se aloja en defectos de la estructura cristalina. Se plantea que la rápida agregación de nanopartículas de ferrihidrita antes de la cristalización puede facilitar la incorporación de Pb en la estructura cristalina de los (oxihidr)óxidos de hierro, aunque esto contradice la teoría convencional de cristalización que indica que una rápida cinética de cristalización puede aumentar la desorción de metales de los cristales.

Los grupos taxonómicos dominantes asociados a los relaves de la mina polimetálica (Au, Ag, Cu, Pb y Zn) fueron *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Actinobacteria*, respectivamente. Resultados similares fueron reportados por Ji *et al.* (2018), quienes estudiaron las características ambientales de varios suelos de relaves de minas de oro y los efectos de las propiedades del suelo y la contaminación por Hg en las comunidades microbianas. Los resultados mostraron que la diversidad biológica y la estructura de la comunidad estaban significativamente correlacionadas con las propiedades físicas y químicas del suelo (profundidad, pH, Hg y Pb). También identificaron las especies microbianas dominantes en el suelo: *Firmicutes*, *Proteobacteria* y *Actinobacteria* eran grupos altamente tolerantes a estos metales pesados.

En el trabajo de J. Liu *et al.* (2019) el phylum *Proteobacteria* es el que predomina en todos los relaves estudiados. Sin embargo, las *Gammaproteobacteria* solo son dominantes para los relaves más antiguos donde el pH era extremadamente ácido (2.6).

El análisis de redundancia (RDA) de Sibanda *et al.* (2019) reveló que la distribución de *Alphaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* estaba positivamente correlacionada con altas concentraciones de Al y K. *Betaproteobacteria* se correlacionó con altas concentraciones de Fe. La distribución de bacterias del filo *Firmicutes* se correlacionó con altas concentraciones de nitrógeno total, mientras que la distribución de bacterias pertenecientes a los filos *Chloroflexi* y *Actinobacteria* se correlacionó con altas concentraciones de Si y Cr respectivamente. Se observaron correlaciones negativas en la distribución de *Alphaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* en relación con las concentraciones de As y Te, *Actinobacteria* en relación a la concentración de Al y *Bacteroidetes* en relación a la concentración de As.

Por otro lado, algunos estudios han demostrado que el Hg antropogénico está relacionado con un predominio de *Gammaproteobacteria Pseudomonas*, como fue observado en el trabajo de Zappellini *et al.* (2015) donde *Gammaproteobacteria* alcanzó un 24% del número total de secuencias y los géneros *Pseudomonas* (72% de las secuencias de *Gammaproteobacteria*) estaban especialmente bien representados en la comunidad del relave. Además, según Zappellini *et al.* (2015) los altos niveles de CaCO_3 y CaO intercambiable en el relave también pueden haber sido un factor determinante en la conformación de la comunidad bacteriana asociada. De hecho, observaron que los sedimentos ricos en Calcita estaban dominados por *Gammaproteobacterias*.

La cepa *Sphingobium* RO-01, ureasa-positiva, tolera hasta 10 mM de Pb y otros metales o semimetales como Cu, Se y Ni. El análisis cinético de crecimiento mediante el modelo de Gompertz reveló que las concentraciones subletales de Pb no inhiben significativamente la proliferación celular, lo que sugiere una tolerancia funcional y una adaptación fisiológica al estrés por Pb.

En este estudio, la cepa *Sphingobium* RO-01 demostró una capacidad sustancial para la biomineralización de Pb. Después de 48 h de incubación en caldo MQD-Urea suplementado con 0,5 mM de Pb, la cepa eliminó aproximadamente el 82% del Pb soluble. No se observó eliminación de Pb en controles abióticos, lo que confirma el papel de los procesos biológicos en el secuestro de metales. La eliminación se atribuye a la precipitación de CaCO_3 impulsada por la ureasa, como se observó con SEM y se confirmó mediante EDS. Estas estructuras biomineralizadas incorporaron Pb de forma creciente con el tiempo, y esta incorporación progresiva destaca el potencial de la cepa RO-01 para inmovilizar Pb dentro de matrices de Calcita mediante un mecanismo de biomineralización dependiente del tiempo. En ausencia de Pb, los precipitados estaban compuestos predominantemente de CaCO_3 y silicatos (como SiO_2 , Albite y Feldespato), mientras que, en presencia de Pb, las estructuras cristalinas mostraron señales de Pb de forma consistente. Esto indica que el Pb no solo se adsorbió, sino que se incorporó a la red cristalina del biomineral, probablemente sustituyendo al Ca dentro de la Calcita o como fases coprecipitadas, lo cual concuerda con los mecanismos propuestos en otros estudios de MICP (Achal *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2022). Sin embargo, como resultado de la liberación de iones CO_3^{2-} en el biorreactor pudo formarse Calcita, una mezcla entre Calcita y Cerusita con alguna fase amorfa o solamente Cerusita, no obstante, se requieren estudios adicionales de DRX para definir esto con certeza.

La precipitación de carbonatos por microorganismos se produce como subproducto de procesos metabólicos comunes, como la fotosíntesis, la hidrólisis de urea y la reducción de sulfato. Estos procesos metabólicos aumentan la alcalinidad (incrementan el pH y el contenido de carbono inorgánico disuelto) del ambiente y, por lo tanto, favorecen la precipitación de CaCO_3 (Altaş *et al.*, 2011; Hammes *et al.*, 2003a, 2003b). Alternativamente, es posible que ciertas bacterias tengan

atributos específicos que promuevan y afecten la precipitación de CaCO_3 . La naturaleza de la carga negativa y los grupos funcionales específicos de las paredes celulares microbianas favorecen la unión de cationes divalentes (Pb, Cd, Zn), lo que convierte a los microorganismos en sitios ideales para la nucleación de cristales (Bravo *et al.*, 2024). Las sustancias poliméricas extracelulares microbianas también son un factor importante en la precipitación, ya sea mediante la captura y concentración de iones de Calcio o como resultado de proteínas específicas que influyen en la precipitación (Hammes *et al.*, 2003b).



5. CONCLUSIONES

La muestra fue obtenida desde un relave minero producto de la explotación de un yacimiento hidrotermal vetiforme polimetálico (Au, Ag, Zn, Pb y Cu) de Chile. El 99% de los granos presentan un tamaño menor a 41 micrómetros, la media corresponde a 12,346 micrómetros, la moda consiste en 13 micrómetros y la mediana 8,7 micrómetros.

El análisis de fluorescencia de rayos X permitió determinar la presencia de óxido de plomo de manera semicuantativa en un 0,08%, mientras que la difracción de rayos X no alcanzó a detectar la presencia de minerales de plomo. No obstante, el estudio de ICP-OES determinó que la concentración exacta de plomo en la muestra es de 580 mg/kg o ppm, es decir; 2,8 mM.

Del estudio realizado mediante mineralogía automatizada QEMSCAN se deducen las siguientes conclusiones:

- a) La muestra se caracteriza por una predominancia de feldespatos (42,46%). De los cuales un 28,22% corresponde a feldespatos potásicos y un 14,24% a plagioclasas. Además de un 26,02% de cuarzo.
- b) Los sulfuros (0,45%) se encuentran en cantidades relativamente elevadas en la muestra. De los cuales un 0,01% corresponde a Galena (PbS), un 0,22% a pirita (posible presencia de Pb sorbido) y un 0,22% a otros sulfuros (donde podría haber una cantidad mínima de algún mineral raro de Pb). Además, hay un 2,26% de otros minerales que pudieran contener una mínima fracción de alguna especie mineral poco frecuente con plomo esencial en su fórmula química.
- c) Otras fases que pueden contener plomo sorbido como la jarosita se encuentra en un 0,12%, mientras que los óxidos e hidróxidos de Fe están presentes en un 1,1%.
- d) La muestra incluye la fase de Fe metálico (1,04%), probablemente sintético con una composición variable.
- e) En la muestra se encuentran las minerales de alteración de baja temperatura: arcillas y óxidos e hidróxidos de Fe (goethita). Silicatos magmáticos y/o metamórficos se reemplazan por arcillas y la fase de Fe metálico por goethita.

El análisis metagenómico del sedimento superficial del relave de la mina polimetálica reveló 14 phyla bacterianos, siendo los más abundantes *Proteobacteria* (76,7%), *Bacteroidetes* (34,6%), *Firmicutes* (4,7%) y *Actinobacteria* (5%). Dentro de *Proteobacteria*, predominó la clase *Gammaproteobacteria* (55,6%), seguida de *Betaproteobacteria* (9,53%), *Alphaproteobacteria* (5,29%), *Deltaproteobacteria* (4,24%) y *Epsilonproteobacteria* (1,43%).

En cuanto a la tolerancia a metales y no metales, la cepa RO-01 fue la que presentó la mayor tolerancia a plomo, creciendo a concentraciones de incluso 10 mM de este metal, mientras que las otras dos cepas seleccionadas (RO-11 y RO-14) solo soportaron hasta 4 mM de Pb. A diferencia del caso anterior, la cepa RO-01 fue la que presentó la menor tolerancia al selenio, creciendo en concentraciones de hasta 4 mM de Se, mientras que RO-11 y RO-14 soportaron concentraciones de 10 mM del no metal. No obstante, para la tolerancia al cobre las tres cepas mostraron un comportamiento similar, creciendo en concentraciones de hasta 4 mM.

Los niveles de tolerancia al níquel fueron los más diferentes entre las tres cepas: RO-01 creció hasta en concentraciones de 4 mM, RO-11 logró desarrollarse con dificultad a concentraciones de 1 mM y RO-14 solo creció en concentraciones de 0,5 mM de este metal. Finalmente, no se observó crecimiento a ninguna concentración de arsénico ni cadmio de ninguna de las cepas en estudio.

La morfología de la cepa seleccionada (*Sphingobium* RO-01) corresponde a un bacilo Gram negativa, que corresponden a bacterias didermas, y presenta una fuerte actividad ureolítica.

Sphingobium RO-01 tolera hasta 10 mM de Pb y otros metales o semimetales como Cu, Se y Ni. El análisis cinético de crecimiento mediante el modelo de Gompertz reveló que las concentraciones subletales de Pb no inhiben significativamente la proliferación celular, lo que sugiere una tolerancia funcional y una adaptación fisiológica al estrés por Pb.

En este estudio, la cepa *Sphingobium* RO-01 mostró una alta eficiencia en la biomineralización de Pb, removiendo alrededor del 82% del Pb soluble tras 48 h en caldo MQD-Urea con 0,5 mM de Pb. SEM y EDS confirmaron la incorporación progresiva de Pb en matrices de Calcita, evidenciando un mecanismo de inmovilización dependiente del tiempo. En ausencia de Pb, los precipitados fueron principalmente CaCO_3 y silicatos; en presencia de Pb, se detectaron señales consistentes de este metal en las estructuras cristalinas.

Varios estudios han utilizado urea para promover la precipitación biogénica de CaCO_3 como estrategia de remediación. Los resultados sugieren que *Sphingobium* RO-01 posee una valiosa combinación de características para aplicaciones biotecnológicas en entornos contaminados con metales: alta tolerancia al Pb y al Se, robusta actividad ureasa y una capacidad demostrable para precipitar e inmovilizar el Pb mediante MICP. Estos hallazgos no solo enriquecen la creciente literatura sobre la biorremediación mediada por MICP, sino que también resaltan el potencial de biorremediación sin explotar de las comunidades bacterianas de relaves minas polimetálicas (Au, Ag, Cu, Pb y Zn).

REFERENCIAS

- Achal, V., Pan, X., Zhang, D., Fu, Q. (2012). Bioremediation of Pb-contaminated soil based on microbially induced calcite precipitation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22: 244-7.
- Arifiyanto, A., Apriyanti, F., Purwaningsih, P., Kalqutny, S., Agustina, D., Surtiningsih, T., Shovitri, M., Zulaika, E. (2017). Lead (Pb) Bioaccumulation; Genera *Bacillus* Isolate S1 and SS19 as a Case Study. AIP Conference Proceedings, 1854: 020003.
- Bale, M., Fry, J., Day, M. (1988). Transfer and occurrence of large mercury resistance plasmids in river epilithon. *Applied and Environmental Microbiology*. 54(4):972-8.
- Bengtsson-Palme, J., Hartmann, M., Eriksson, K., Pal, C., Thorell, K., Larsson, DG., Nilsson, R. (2015). METAXA2: improved identification and taxonomic classification of small and large subunit rRNA in metagenomic data. *Molecular Ecology Resources*. Nov;15(6):1403-14.
- Bao, Z., Al, T., Couillard, M., Poirier, G., Bain, J., Shrimpton, H., Finfrock, Y., Lanzirrotti, A., Paktunc, D., Saurette, E., Hu, Y., Ptacek, C., Blowes, D. (2021). A cross scale investigation of Galena oxidation and controls on mobilization of lead in mine waste rock. *Journal of Hazardous Materials*. 412: 125130.
- Boussen, S., Sebei, A., Soubrand-Colin, M., Bril, H., Chaabani, F., Abdeljaouad, S. (2010). Mobilization of lead-zinc rich particles from mine tailings in northern Tunisia by aeolian and run-off processes. *Bulletin de la Société Géologique de France*. 181(5): 459-471.
- Bravo, F., Moraga, R., Valenzuela, C., Aguayo, P., Smith, C. T., Contreras, F., Gugliandolo, C., Zammuto, V., Campos, V. L. (2024). Arsenic biomineralization and selenium nanoparticles biosynthesis by Halomonas boliviensis strain H-10 isolated from the high-altitude Salar de Huasco salt flat (Chile). *Environmental Technology & Innovation*. 34:103575.
- Cacciuttolo, C., Cano, D. (2022). Environmental Impact Assessment of Mine Tailings Spill Considering Metallurgical Processes of Gold and Copper Mining: Case Studies in the Andean Countries of Chile and Peru. *Water*. 14: 3057.
- Campos, V., Valenzuela, C., Alcorta, M., Escalante, G., Mondaca, M. (2007). Aislamiento de bacterias resistentes a arsénico desde muestras de rocas volcánicas de la quebrada camarones, Región Parinacota: Chile. *Gayana (Concepción)*. 71(2):150-155.

Chaparro-Acuña, S., Becerra-Jiménez, M., Martínez-Zambrano, J., Rojas-Sarmiento, H. (2018). Soil bacteria that precipitate calcium carbonate: Mechanism and applications of the process. *Acta Agronómica*. 67: 277-288.

Coffey, B., Anderson, G. (2014). Biofilm formation in the 96-well microtiter plate. In: Filloux, A., Ramos, J. (eds), *Pseudomonas Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. 1149:631-41. Humana.

Collin, M. S., Venkatraman, S. K., Vijayakumar, N., Kanimoshi, V., Arbaaz, S. M., Stacey, R. G. S., Anusha, J., Choudhary, J., Lvov, V., Tovar, G. I., Senatov, F., Koppala, S., Swamiappan, S. (2022). Bioaccumulation of lead (Pb) and its effects on human: A review. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 7, 100094.

Fritsch. (s.f.). Principio de dispersión del láser. <https://www.fritsch.es/medicion-de-particulas/conocimientos-de-fritsch/dispersion-de-la-luz-estatica/>

Guo, Yao., Huang, P., Zhang, W., Yuan, X., Fan, F., Wang, H., Liu, J., Wang, Z. (2013). Leaching of heavy metals from Dexing copper mine tailings pond. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*. 23: 3068-3075.

Hammer, Ø., Harper, D., Ryan, P. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*. 4: 1-9.

Hammes, F., Boon, N., De Villiers, J., Verstraete, W., Siciliano, S. (2003). Strain-specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 4901-4909.

Hammes, F., Seka, A., Van Hege, K., Van de Wiele, T., Vanderdeelen, J., Siciliano, S. D., Verstraete, W. (2003). Calcium removal from industrial wastewater by bio-catalytic CaCO_3 precipitation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 78(6): 670-677.

Hayes, S., Webb, S., Bargar, J., O'Day, P., Maier, R., Chorover, J. (2012). Geochemical weathering increases lead bioaccessibility in semi-arid mine tailings. *Environmental Science and Technology*. 46(11): 5834-5841.

Heidari, P., Sanaeizade, S. (2020). Optimization and characterization of lead bioremediation by strains of *Microbacterium oxydans*. *Soil and Sediment Contamination*. 29(8):901–13.

Ibarra-Trujillo, C., Villar-Vidal, M., Gaitán-Cepeda, L., Pozos-Guillen, A., Mendoza-de Elias, R., Sánchez-Vargas L. (2012). Ensayo de formación y cuantificación de biopelículas mixtas de *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 29(4):214–222.

Jagetiya, B., Kumar, S. (2020). Phytoremediation of Lead: A Review. In: Gupta, D., Chatterjee, S., Walther, C. (eds), *Lead in Plants and the Environment: Radionuclides and Heavy Metals in the Environment*. 171–202. Springer.

Ji, H., Zhang, Y., Bararunyeretse, P., Li, H. (2018). Characterization of microbial communities of soils from gold mine tailings and identification of mercury-resistant strain. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 165: 182-193.

Kalita, D., Joshi, S. (2017). Study on bioremediation of Lead by exopolysaccharide producing metallophilic bacterium isolated from extreme habitat. *Biotechnology reports*. 16: 48–57.

Kan, X., Dong, Y., Feng, L., Zhou, M., Hou, H. (2021). Contamination and health risk assessment of heavy metals in China's lead–zinc mine tailings: A meta–analysis. *Chemosphere*. 267: 128909.

Kang, C., Oh, S., Shin, Y., Han, S., Nam, I., So, J. (2015). Bioremediation of lead by ureolytic bacteria isolated from soil at abandoned metal mines in South Korea. *Ecological Engineering*. 74:402–407.

Klein, C., Hurlbut, C. (1997). *Manual de Mineralogía*. Editorial Reverté.

Krauskopf, K., Bird, D. (1994). *Introduction to Geochemistry*. McGraw-Hill International Editions.

Lam, E., Montofré, I., Álvarez, F., Gaete, N., Poblete, D., Rojas, R. (2020). Methodology to Prioritize Chilean Tailings Selection, According to Their Potential Risks. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 17(11): 3948.

Kumar, V., Sharma, A., Cerda, A. (2020). *Heavy Metals in the Environment: Impact, Assessment, and Remediation*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier 2020.

Lam, E., Montofré, I., Álvarez, F., Gaete, N., Poblete, D., Rojas, R. (2020). Methodology to Prioritize Chilean Tailings Selection, According to Their Potential Risks. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 17(11):3948.

Leon, C., Moraga, R., Valenzuela, C., Gugliandolo, C., Lo Giudice, A., Papale, M., Vilo, C., Dong, Q., Smith, C., Rossello-Mora, R., Yañez, J., Campos, L. (2018). Effect of the natural arsenic gradient on the diversity and arsenic resistance of bacterial communities of the sediments of Camarones River (Atacama Desert, Chile). *PLoS One* 13(5): e0195080.

Li, M., Cheng, X., Guo, H. (2013). Heavy metal removal by biomineralization of urease producing bacteria isolated from soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 76: 81–85.

Liming, H., Hui, W., Lin, Z., Pengwei, Z., Qingbo, W. (2017). Geotechnical Properties of Mine Tailings. *Journal of Materials in Civil Engineering*. 29(2): 04016220.

Liu, J., Hua, Z., Chen, L., Kuang, J., Li, S., Shu, W., Huang, L. (2014). Correlating Microbial Diversity Patterns with Geochemistry in an Extreme and Heterogeneous Environment of Mine Tailings. *Applied and Environmental Microbiology*. 80: 3677-3686.

Liu, J., Yao, J., Wang, F., Min, N., Gu, J., Li, Z., Sunahara, G., Duran, R., Sölevic-Knudsen, T., Hudson-Edwards, K., Alakangas, L. (2019). Bacterial diversity in typical abandoned multi-contaminated nonferrous metal(loid) tailings during natural attenuation. *Environmental Pollution*. 247: 98-107.

Liu, Y., Wu, S., Southam, G., Nguyen, T., Kopittke, P., Paterson, D., Huang, L. (2019). Zinc and lead encapsulated in amorphous ferric cements within hardpans in situ formed from sulfidic Cu-Pb-Zn tailings. *Environmental Pollution*. 252: 1106-1116.

Marrie, T., Costerton, J. (1984). Scanning and transmission electron microscopy of in situ bacterial colonization of intravenous and intraarterial catheters. *Journal of Clinical Microbiology*. 19(5):687-93.

Meena, V., Dotaniya, M., Saha, J., Das, H., Patra, A. (2020). Impact of Lead Contamination on Agroecosystem and Human Health. In: Gupta, D., Chatterjee, S., Walther, C. (eds), *Lead in Plants and the Environment: Radionuclides and Heavy Metals in the Environment*. 67–82. Springer.

Müller, B., Axelsson, M., Öhlander, B. (2002). Adsorption of trace elements on pyrite surfaces in sulfidic mine tailings from Kristineberg (Sweden) a few years after remediation. *Science of The Total Environment*. 298: 1-16.

Ostergren, J., Brown, G., Parks, G., Tingle, T. (1999). Quantitative Speciation of Lead in Selected Mine Tailings from Leadville, CO. *Environmental Science & Technology*. 33(10): 1627–1636.

Pande, V., Pandey, S., Sati, D., Bhatt, P., Samant, M. (2022) Microbial Interventions in Bioremediation of Heavy Metal Contaminants in Agroecosystem. *Frontiers in Microbiology*. 13:824084.

Phaenark, C., Phankamolsil, Y., Sawangproh, W. (2024). Ecological and health implications of heavy metal bioaccumulation in Thai Fauna: A systematic review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 285, 117086.

Qiao, W., Zhang, Y., Xia, H., Luo, Y., Liu, S., Wang, S., Wang, W. (2019). Bioimmobilization of lead by *Bacillus subtilis* X3 biomass isolated from lead mine soil under promotion of multiple adsorption mechanisms. *Royal Society Open Science*. 6(2): 181701.

Root, R., Hayes, S., Hammond, C., Maier, R., Chorover, J. (2015). Toxic metal(loid) speciation during weathering of iron sulfide mine tailings under semi-arid climate. *Applied Geochemistry*. 62: 131-149.

Sevak, P., Pushkar, B., Kapadne, P. (2021). Lead pollution and bacterial bioremediation: a review. *Environmental Chemistry Letters*. 19: 4463–4488.

Schaider, L., Senn, D., Brabander, D., McCarthy, K., Shine, J. (2007). Characterization of Zinc, Lead, and Cadmium in Mine Waste: Implications for Transport, Exposure, and Bioavailability. *Environmental Science & Technology*. 41: 4164-4171.

Schmieder, R., Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*. Mar 15;27(6):863-4.

Sharma, B., Shukla, P. (2021). Lead bioaccumulation mediated by *Bacillus cereus* BPS-9 from an industrial waste contaminated site encoding heavy metal resistant genes and their transporters. *Journal of Hazardous Materials*. 401: 123285.

Shi, M., Min, X., Ke, Y., Lin, Z., Yang, Z., Wang, S., Peng, N., Yan, X., Luo, S., Wu, J., Wei, Y. (2021). Recent progress in understanding the mechanism of heavy metals retention by iron (oxyhydr)oxides. *Science of The Total Environment*. 752: 141930.

Shivani Gupta., Surendran, A., JosephThattheyus, A. (2020). Biosorption of Lead Using the Bacterial Strain, *Bacillus subtilis* (MTCC 2423). *Journal of Biotechnology and Biomedical Science*. 2(3):1-14.

Sibanda, T., Selvarajan, R., Msagati, T., Venkatachalam, S., Meddows-Taylor, S. (2019). Defunct gold mine tailings are natural reservoir for unique bacterial communities revealed by high-throughput sequencing analysis. *Science of The Total Environment*. 650: 2199-2209.

Sri Chandana, P. (2015). Maggie Instant Noodles: Instantly famous-Instantly Notorious. *Engineering and science Focus::AITK*. July 2015: 1-4.

Stocks-Fischer, S., Galinat, J., Bang, S. (1999). Microbiological precipitation of CaCO_3 . *Soil Biology and Biochemistry*. 31(11): 1563–1571.

Takeno, N. (2005). *Atlas of Eh-pH diagrams - Intercomparison of thermodynamic databases*. Geological Survey of Japan Open File Report N° 419.

Universidad de Chile., Servicio Agrícola y Ganadero. (2005). *CRITERIOS DE CALIDAD DE AGUAS O EFLUENTES TRATADOS PARA USO EN RIEGO INFORME FINAL*. División de Recursos Hídricos y Medio Ambiente Departamento de Ingeniería Civil Universidad de Chile.

Valencia, Y., Camapum de Carvalho, J., Lara, L. (2014). Carbonatogénesis inducida en un perfil de suelo tropical. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*. 72: 229-240.

Wei, T., Yashir, N., An, F., Imtiaz, S., Li, X., Li, H. (2022). Study on the performance of carbonate-mineralized bacteria combined with eggshell for immobilizing Pb and Cd in water and soil. *Environmental Science and Pollution Research*. 29: 2924–2935.

Zappelini, C., Karimi, B., Foulon, J., Lacercat-Didier, L., Maillard, F., Valot, B., Blaudez, D., Cazaux, D., Gilbert, D., Yergeau, E., Greer, C., Chalot, M. (2015). Diversity and complexity of microbial communities from a chlor-alkali tailings dump. *Soil Biology and Biochemistry*. 90: 101-110.

Zhang, J., Shi, X., Chen, X., Huo, X., Yu, Z. (2021). Microbial-Induced Carbonate Precipitation: A Review on Influencing Factors and Applications. *Advances in Civil Engineering*. 2021: 9974027.



ANEXOS

Mapas mineralógicos en falso color (QEMSCAN)

