

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica**



**ESTUDIO DEL MECANISMO DE GENERACIÓN DE DRENAJES  
ÁCIDOS EN UNA PRESA DE ESTÉRILES PIRÍTICOS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

Camino García Balboa

Bajo la dirección de los doctores

Antonio Ballester Pérez  
Felisa González González

**Madrid, 1998**

**ISBN: 84-669-2400-0**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS**  
Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería  
Metalúrgica

**CAMINO GARCIA BALBOA**

**ESTUDIO DEL MECANISMO DE  
GENERACION DE DRENAJES ACIDOS  
EN UNA PRESA DE ESTERILES  
PIRITICOS**



**DIRECTORES: Dr. ANTONIO BALLESTER PEREZ**  
**Dra. FELISA GONZALEZ GONZALEZ**

**Madrid, Febrero de 1998**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS**  
Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería  
Metalúrgica

**ESTUDIO DEL MECANISMO DE  
GENERACION DE DRENAJES ACIDOS  
EN UNA PRESA DE ESTERILES  
PIRITICOS**



\* 5 3 0 9 8 3 9 5 5 2 \*

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

Memoria para optar al grado de Doctor  
en Ciencias Químicas, presentada por  
CAMINO GARCIA BALBOA

DIRECTORES: Dr. ANTONIO BALLESTER PEREZ  
Dra. FELISA GONZALEZ GONZALEZ

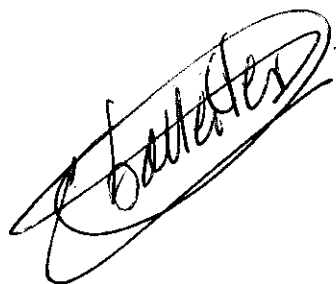
MADRID, 1998

ANTONIO BALLESTER PEREZ Y FELISA GONZALEZ GONZALEZ,  
CATEDRATICO Y PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE  
CIENCIA DE LOS MATERIALES E INGENIERIA METALURGICA DE  
LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS DE LA UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE DE MADRID, HACEN CONSTAR:

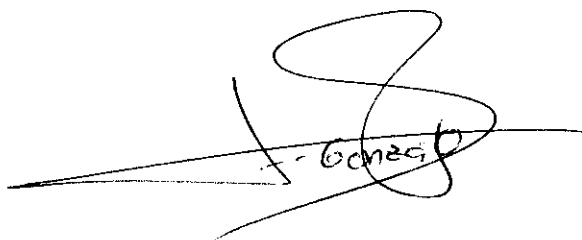
1º.- QUE CAMINO GARCIA BALBOA HA REALIZADO EL TRABAJO  
TITULADO **“ESTUDIO DEL MECANISMO DE GENERACION DE  
DRENAJES ACIDOS EN UNA PRESA DE ESTERILES PIRITICOS”**  
EN LOS LABORATORIOS DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE LOS  
MATERIALES E INGENIERIA METALURGICA DE LA CITADA  
UNIVERSIDAD

2º.- QUE COMO DIRECTORES DEL TRABAJO, AUTORIZAN SU  
PRESENTACION EN LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS DE LA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE, PARA QUE QUIEN LO HA  
REALIZADO PUEDA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR.

Y PARA QUE ASI CONSTE, A LOS EFECTOS DE CUMPLIR LOS  
TRAMITES LEGALES QUE PROCEDAN, FIRMAMOS EL PRESENTE EN  
MADRID, A 15 DE FEBRERO DE MIL NOVECIENTOS NOVENTA Y  
OCHO.



Fdo: Dr. Antonio Ballester Pérez



Fdo: Dra. Felisa González González

## AGRADECIMIENTOS

Todas las cosas que uno hace en la vida son el resultado de la participación (o interacción, como dirían los bioquímicos), de un conjunto de personas que de una manera o de otra se han involucrado con uno mismo. Por eso, cuando se termina algo, es positivo echar una mirada atrás y hacer un poco de balance acerca de lo que ha supuesto una etapa. Necesariamente en esa búsqueda recordatorio, aparecen personas que han hecho que las cosas hayan transcurrido así y no de otra manera. Justo es, por tanto, que después del trabajo en la tesis se reconozca la colaboración de muchas personas que tanto a nivel personal como profesional han ido participando en el día a día de muchos días.

Quiero agradecer en primer lugar al Dr. Antonio Ballester Pérez, catedrático del departamento en el que he realizado la tesis, y codirector del presente trabajo, la posibilidad que me brindó al incorporarme a su grupo de investigación. Agradezco su confianza, el margen de libertad en que me permitió desenvolver y el empujón de moral y decisión en algún momento. Asimismo le agradezco la orientación científica y profesional que me enseñó durante este tiempo, y el ánimo y estímulo personales.

En el mismo ámbito de trabajo, las doctoras M<sup>a</sup> Luisa Blázquez y Felisa González colaboraron y me animaron en todo momento. A ellas también agradezco su ayuda profesional y el ambiente de confianza en el que siempre nos desenvolvimos.

Al Dr. Jose Luis Mier, que durante los primeros años de trabajo pertenecía al departamento, y con el que trabajé durante un tiempo en el “famoso tema de los sulfitos”, le agradezco su amabilidad y el tiempo prestado.

La colaboración de D. Manuel Acosta Fernández, Jefe de la Planta de Flotación en Minas de Almagrera S.A. fué imprescindible para la realización de esta tesis. A él quiero agradecer la confianza depositada en nosotros para investigar una problemática relativa a su empresa. Y también, la ayuda prestada durante los sucesivos muestreos y análisis, para los que también contamos con la buena disposición de su equipo del laboratorio químico, D. Gonzalo Delgado Ponce y demás colaboradores. A todo ellos, gracias igualmente por dedicarnos su tiempo.

El primer contacto con la microbiología, los sucesivos “pases”, y casi todo de lo aprendido en este campo, se lo debo a la Dra. Ana Isabel López. Tengo que agradecerle además la discreción, paciencia y el ánimo prestados durante los meses que estuve en el laboratorio del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, así como a los Dres. Ricardo Amils e Irma Marín, que me prestaron su apoyo y ayuda, haciéndome sentir verdaderamente cómoda cuando trabajé en su laboratorio.

El Dr. Diego Moreno, profesor en la E.T.S.I.I.M., fué otro de mis “apoyos” durante este tiempo. También quiero que quede reflejada la ayuda amistosa y cordial, las entretenidas charlas, y toda la colaboración profesional relacionada con el tema de las BRS.

Y a todos, en general, los que han hecho posible este trabajo, les agradezco el haberme ofrecido su apoyo. Y en esta escena han estado mis compañeros de la Universidad Complutense, y ahora mis compañeros de la Universidad Alfonso X el Sabio.

Pero el agradecimiento más entrañable, y que quiero destacar especialmente es para mi hermana Beatriz y para mis padres. Ellos son los que me han ayudado siempre ofreciéndome su cariño para todos mis problemas.

A mis padres, Antonio y Agueda

Pero, ¿qué soy yo entonces?. Una cosa que piensa.  
¿Qué es una cosa que piensa?. Es una cosa que  
duda, entiende, afirma, niega, quiere, rehúsa  
y que también imagina y siente.

*Meditaciones Metafísicas. René Descartes*

# **TITLE: STUDY OF THE MECHANISM OF THE GENERATION OF ACID MINE DRAINAGES IN A PYRITIC TAILINGS POND**

## **Abstract**

The present work was based on the study of a pond for pyritic tailings from the flotation of a complex polymetallic sulphide concentrate from the southwest of Spain. This study was performed in five stages:

1) In the first, the chemical and microbiological characterization of the tailing's pond took place. The chemical characterization of the pond waters was carried out by controlling pH, redox potential, conductivity and metals in solution. From a microbiological point of view, the study focused on screening those microorganisms directly related with oxidation and reduction processes: iron and sulphur oxidizing bacteria and sulphate reducing bacteria.

2) In the second stage of the study, the influence of the factors affecting the transformation of the pyritic tailing was analyzed. For this, three weathering tests were performed. The tests were: one static test (ABA test) and two kinetic test (shake flask tests and tests in columns). Shake flask tests were carried out to determine the behaviour of the tailing under the influence of two factors: bacteria catalysis and the reducing conditions induced by the presence of sulfite ions in the system. The study of the chemical oxidation of the sulphite ion and its influence on effluent quality was very important because this ions produces reducing conditions in the system, which influence the chemical characteristics of the water: pH, metals in solution, etc.

3) The third objective of the study was to simulate the evolution of the tailings in the pond with a column model. The actual situation in the industrial site was reproduced by a model consisting of two columns: one (column S) was the part of the ore under water; and the other (column H-S) was the part of the ore subject to humidity and dryness cycles.

4) In connection with the transformation of mineral compounds, the activity of the microorganisms can occur in association with either oxidative or reductive processes. The microbiological selection and succession were determined by means of the column model selected.

5) Finally, the potential of a mixed population of SRB, isolated from the bottom of the pond was investigated, with the main objective of treating the effluent generated in the own mine.

## **Keywords**

weathering; column model; microbial succession

## **TÍTULO: ESTUDIO DEL MECANISMO DE GENERACIÓN DE DRENAJES ÁCIDOS EN UNA PRESA DE ESTÉRILES PIRÍTICOS**

### **Resumen**

El presente trabajo se centró en el estudio de una presa de decantación de residuos piríticos procedentes de una planta de procesamiento de sulfuros polimetálicos situada en la Faja Pirítica del suroeste español. El estudio se realizó en cinco etapas. En la primera de ellas se llevó a cabo la caracterización de la presa de residuos. La caracterización química del agua de la presa se llevó a cabo a través del control del pH, potencial redox, conductividad y la medida de la concentración de metales y sulfatos en solución. Desde un punto de vista microbiológico, el estudio se centró en la búsqueda de microorganismos directamente relacionados con los procesos de oxidación y reducción: bacterias hierro y azufre oxidantes y bacterias reductoras de sulfatos. En la segunda etapa del estudio se analizó la influencia de los distintos factores que afectan a la transformación del residuo pirítico, para lo cual se realizaron tres ensayos de meteorización. Dichos ensayos fueron los siguientes: un ensayo estático (ABA) y dos ensayos cinéticos (ensayos en erlenmeyer con agitación y en columna, respectivamente). Los ensayos en matraz agitado se realizaron para determinar el comportamiento de los residuos bajo la influencia de dos factores: catálisis bacteriana y las condiciones reductoras inducidas por la presencia de iones sulfito en el sistema. El estudio de la oxidación química del ión sulfito y su influencia en la calidad del efluente fue de gran importancia porque este ión provoca unas condiciones reductoras en el sistema, que influyen en las características químicas del agua: pH, metales en solución, etc. El tercer objetivo del estudio fue reproducir la evolución de los residuos en la presa con un modelo en columna. La situación del sistema real se reprodujo a través de un modelo consistente en dos columnas: una de ellas (columna S) reproducía la parte del mineral bajo el agua; la otra (columna H-S), representaba a aquella parte del sistema en la que el mineral estaba sometido a ciclos de humedad y sequedad. En íntima conexión con la transformación del mineral, la actividad de los microorganismos puede aparecer asociada a los procesos oxidativos o a las reacciones de reducción. La selección y sucesión microbiológicas se estudiaron a través del modelo en columna elegido. Finalmente, se investigó el potencial de una población mixta de bacterias reductoras de sulfatos (BRS) aisladas del fondo de la presa de residuos para el tratamiento del efluente generado en la propia mina.

**TITLE: STUDY OF THE MECHANISM OF THE GENERATION OF ACID MINE DRAINAGES IN A PYRITIC TAILINGS POND**

***Keywords***

weathering; column model; microbial succession

**TÍTULO: ESTUDIO DEL MECANISMO DE GENERACIÓN DE DRENAJES ÁCIDOS EN UNA PRESA DE ESTÉRILES PIRÍTICOS**

***Palabras clave***

Meteorización; modelo en columna; sucesión microbológica

*Indice*

## INDICE

## 1.- INTRODUCCION

1.1.- ABANDONO DE RESIDUOS EN MINERIA: PRESAS DE DECANTACION.....	1
1.1.1.- Características de los residuos vertidos por las plantas de flotación .....	1
1.1.2.- Legislación ambiental relativa a aguas de mina.....	2
1.2.- EL SO <sub>2</sub> Y LA FLOTACION .....	5
1.2.1.- Aplicación del SO <sub>2</sub> como reactivo en plantas de flotación.....	5
1.2.2.- Propiedades químicas de las especies SO <sub>2</sub> , HSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> y H <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> .....	7
1.2.3.- Sales del SO <sub>2</sub> .....	8
1.2.3.a.- Estructura.....	8
1.2.3.b.- Reactividad.....	8
1.2.4.- Cinética de oxidación del ión sulfito.....	9
1.2.4.a.- Mecanismo de oxidación.....	9
- <i>Mecanismo de reacción</i> .....	10
1.2.4.b.- Catálisis .....	11
1.2.4.c.- Orden de reacción.....	11
1.2.4.d.- Influencia del pH.....	12
- <i>Variación del pH asociada a la reacción</i> .....	12
- <i>Influencia del pH inicial en el curso de la oxidación</i> .....	12
1.3.- TRANSFORMACION DE RESIDUOS ABANDONADOS.....	14
1.3.1.- La generación de aguas ácidas .....	15
1.3.1.a.- Etapas en la formación y evolución de drenajes ácidos de mina (DAM).....	16
1.3.1.b.- Reacciones químicas y microbiológicas en la formación de drenajes ácidos de mina.- La oxidación de la pirita.....	17
1.3.1.c.- Participación microbiológica en la generación de drenajes ácidos de mina.....	19
1.3.1.d.- Factores que influyen en la velocidad de generación de acidez.....	21
- <i>pH y temperatura</i> .....	21

- <i>Oxígeno</i> .....	21
- <i>Población bacteriana y nutrientes</i> .....	21
- <i>Factores mineralógicos</i> .....	22
1.3.2.- Concepto de meteorización.....	22
1.3.3.- El papel de los microorganismos en la transformación de residuos de mina.....	25
1.3.3.a.- Microorganismos asociados a procesos de oxidación .....	26
1.3.3.b.- Microorganismos asociados a procesos de reducción.....	30
1.3.3.c.- Sucesión de microorganismos en la generación de aguas ácidas .....	32
1.4.- APLICACION DE LA REDUCCION BIOLOGICA AL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE MINA.....	34
1.4.1.- Bacterias anaerobias reductoras de sulfatos (BRS).- Bioreactores .....	35
1.4.2.- Participación de las BRS en métodos pasivos de tratamiento: humedales .....	37
1.5.- JUSTIFICACION Y OBJETIVOS DEL TRABAJO .....	39
<b>2.- MATERIALES Y METODOS</b>	
2.1.- MUESTREOS .....	42
2.1.1.- Descripción del area de estudio.....	42
2.1.1.a.- La mina.....	42
2.1.1.b.- Geología .....	43
2.1.1.c.- Hidrogeología.....	44
2.1.1.d.- La planta de flotación.....	44
2.1.2.- Descripción de los puntos y las condiciones de muestreo .....	45
2.1.2.a.- Condiciones de muestreo.....	46
2.2.- CARACTERIZACION QUIMICA Y MINERALOGICA.....	47
2.2.1.- Muestras sólidas.....	47
2.2.1.a.- Distribución granulométrica.....	47
2.2.1.b.- Composición mineralógica.....	47
2.2.1.c.- Composición química.....	49
2.2.2.- Muestras líquidas .....	49

2.2.2.a.- pH y temperatura .....	49
2.2.2.b.- Concentración de metales.....	49
2.2.2.c.- Concentración de sulfatos.....	50
2.3.- CARACTERIZACION MICROBIOLOGICA.....	52
2.3.1.- Medios y técnicas de cultivo .....	52
2.3.1.a.- Microorganismos aerobios .....	52
2.3.1.b.- Microorganismos anaerobios .....	53
2.3.1.c.- Esterilización .....	54
2.3.2.- Presencia y recuento de microorganismos .....	54
2.3.2.a.- Microorganismos aerobios .....	54
- <i>Recuento de microorganismos oxidantes de Fe y S</i> .....	54
- <i>Recuento de microorganismos heterótrofos</i> .....	55
2.3.2.b.- Microorganismos anaerobios .....	56
2.3.3.- Aislamientos .....	57
2.3.3.a.- Enriquecimiento de cultivos .....	57
2.3.3.b.- Concentración por filtración.....	57
2.3.3.c.- Aislamiento en placa .....	58
2.3.4.- Identificación .....	58
2.3.4.a.- Caracterización morfológica.....	58
- <i>Morfología en placa</i> .....	58
- <i>Morfología estructural</i> .....	58
• <i>Microscopía óptica</i> .....	58
• <i>Microscopía electrónica de transmisión</i> .....	59
2.3.4.b.- Tinciones .....	59
2.3.4.c.- Caracterización fisiológica y cultural .....	59
- <i>Microorganismos aerobios</i> .....	59
• <i>Crecimiento sobre distintos sustratos</i> .....	59
- <i>Microorganismos anaerobios</i> .....	60
• <i>Crecimiento en presencia de molibdeno</i> .....	60
• <i>Crecimiento en aerobiosis</i> .....	60
• <i>Crecimiento en medio sin sulfato</i> .....	60
2.3.5.- Modelo en columna.....	60
2.3.5.a.- Descripción del modelo: muestreos y parámetros de seguimiento.....	60
2.3.5.b.- Desmontaje de la columna: criterio de selección y procesamiento de muestras. Ensayos de actividad .....	62

- <i>Ensayos de actividad oxidante de hierro</i> .....	63
- <i>Actividad reductora de sulfatos</i> .....	63
2.4.- ESTUDIO CINETICO DE LA OXIDACION DEL ION SULFITO .....	64
2.4.1.- Ensayos de oxidación química.....	64
2.4.2.- Ensayos de oxidación bacteriana .....	64
2.4.3.- Análisis de iones sulfito mediante potenciometría .....	65
- <i>Normalización de la disolución de tiosulfato sódico, 0,1 N</i> .....	65
2.5.- ENSAYOS DE METEORIZACION.....	66
2.5.1.- Ensayo ABA .....	67
2.5.2.- Ensayo en matraz agitado .....	69
2.5.3.- Ensayos de meteorización en columna .....	69
2.5.3.a.- Descripción del modelo.....	70
- <i>Columnas pequeñas de meteorización</i> .....	73
• <i>Influencia de la actividad bacteriana (L y Li)</i> .....	73
• <i>Mineral sumergido (S)</i> .....	74
• <i>Recirculación de líquidos (R)</i> .....	74
- <i>Influencia de la altura de lecho</i> .....	75
- <i>Columnas grandes de meteorización</i> .....	75
2.5.3.b.- Seguimiento de variables .....	77
2.5.3.c.- Desmontaje de las columnas: cuantificación microbiológica y ensayos de actividad.....	78
- <i>Columnas pequeñas de meteorización</i> .....	78
- <i>Columna M</i> .....	78
2.5.3.d.- Ensayos de actividad .....	79
- <i>Ensayos de actividad hierro-oxidante</i> .....	79
- <i>Ensayos de actividad reductora de sulfatos</i> .....	80
2.6.- ENSAYOS DE TRATAMIENTO DE DRENAJES ACIDOS DE MINA CON BACTERIAS REDUCTORAS DE SULFATOS .....	80
2.6.1.- Cultivos y condiciones experimentales.....	80
2.6.2.- Reducción biológica de sulfatos .....	81
2.6.3.- Precipitación de metales y rango de pH óptimo de crecimiento.....	81

### 3.- RESULTADOS Y DISCUSION

3.1.- EVOLUCION DEL RESIDUO EN LA PRESA: CUANTIFICACION DE LA TRANSFORMACION.....	82
3.1.1.- Muestreos.....	82
3.1.1.a.-Evolución del pH en el sistema.....	82
- <i>Muestreo en planta</i> .....	82
- <i>Muestreo en el recorrido de la pulpa</i> .....	84
- <i>Muestreo en presa: fondo y superficie</i> .....	85
3.1.1.b.-Del residuo inicial al vertido final.....	86
3.1.2.-Caracterización de las muestras sólidas.....	89
3.1.2.a.- Distribución granulométrica.....	89
3.1.2.b.- Composición mineralógica.....	92
3.1.2.c.- Composición química.....	93
3.1.3.- Caracterización de las muestras líquidas.....	94
3.1.3.a.- Análisis químico.....	94
3.1.3.b.- Vertido inicial y residuo final.....	97
3.1.4.- Caracterización microbiológica.....	98
3.1.4.a.- Distribución y variabilidad de microorganismos en el sistema planta-presa.....	99
- <i>Distribución de microorganismos aerobios</i> .....	103
• <i>Heterótrofos</i> .....	103
• <i>Bacterias litoautótrofas</i> .....	104
- <i>Distribución de microorganismos anaerobios</i> .....	106
• <i>Bacterias reductoras de sulfato</i> .....	106
3.1.4.b.- Aislamiento y caracterización.....	114
- <i>Bacterias litoautótrofas</i> .....	115
• <i>Morfología de colonia</i> .....	115
• <i>Morfología celular</i> .....	116
• <i>Tinciones</i> .....	116
• <i>Características culturales</i> .....	116
a) <i>Crecimiento en distintos sustratos</i> .....	116
b) <i>pH final de cultivo</i> .....	117
- <i>Bacterias anaerobias reductoras de sulfato</i> .....	118
3.1.4.c.- Cuantificación de microorganismos.....	122

3.2.- ESTUDIO DE LOS FACTORES IMPLICADOS EN LA TRANSFORMACION DEL RESIDUO .....	125
3.2.1.- Cinética de oxidación del ión sulfito.....	126
3.2.1.a.- Ensayos de oxidación química .....	126
- <i>Orden de reacción</i> .....	128
- <i>Influencia del pH</i> .....	130
3.2.1.b.- Ensayos de oxidación bacteriana.....	134
3.2.1.c.- Ensayos de oxidación en agua de mina .....	137
3.2.1.d.- “Planta activa” y “presa abandono” .....	141
3.2.2.- Ensayos de meteorización.....	145
3.2.2.a.- Ensayo ABA .....	145
3.2.2.b.- Ensayo en matraz agitado.....	147
- <i>Influencia de las bacterias y del ion sulfito en la generación de acidez.- Ensayos preliminares</i> .....	148
- <i>Influencia de la catálisis bacteriana en la meteorización de la pulpa residual</i> .....	150
- <i>Influencia del ion sulfito en la meteorización del residuo en la presa</i> .....	158
3.2.2.c.- Ensayos de meteorización en columna.....	160
- <i>Evolución del drenaje</i> .....	161
• <i>Columnas de humedad-sequedad (H-S) y mineral sumergido (S): estudio del comportamiento del residuo sumergido bajo agua</i> .....	161
• <i>Columnas L y Li: influencia de la oxidación bacteriana</i> .....	166
• <i>Columnas h-s y R</i> .....	170
• <i>Influencia de la altura de lecho en la meteorización del residuo: columnas h33 y h66</i> .....	173
• <i>Columnas grandes de meteorización (M y M2)</i> .....	180
• <i>Influencia de los ciclos largos de sequedad</i> .....	188
• <i>Cinética de oxidación del ion ferroso en las muestras drenadas</i> .....	190
a) <i>Estabilidad química teórica de las especies Fe<sup>2+</sup> y Fe<sup>3+</sup> en solución acuosa</i> .....	191
b) <i>Cinética de oxidación del ion ferroso</i> .....	191

• <i>Conclusiones generales relativas a los ensayos de meteorización en columna</i> .....	193
- <i>Desmorte: distribución microbiológica y mineralógica</i> .....	199
• <i>Columna M</i> .....	199
a) <i>Distribución microbiológica</i> .....	200
b) <i>Análisis mineralógico de las muestras</i> .....	202
• <i>Columnas H-S, S, L y Li</i> .....	204
- <i>Ensayos de actividad</i> .....	206
• <i>Actividad oxidante: oxidación bacteriana del ion ferroso</i> .....	207
• <i>Actividad reductora: reducción biológica de sulfatos</i> .....	209
3.2.3.- <i>Transformación química y sucesión microbiológica: modelo en columna</i> .....	211
3.2.3.a.- <i>Transformación química</i> .....	211
3.2.3.b.- <i>Sucesión microbiológica</i> .....	216
3.2.3.c.- <i>Algunas consideraciones sobre los resultados de la columna de sucesión microbiológica</i> .....	220
3.2.3.d.- <i>Desmorte de la columna SM: caracterización micro y mineralógica de las muestras</i> .....	221
- <i>Distribución microbiológica</i> .....	222
- <i>Caracterización mineralógica</i> .....	223
- <i>Ensayos de actividad</i> .....	226
• <i>Actividad oxidante</i> .....	226
• <i>Actividad reductora</i> .....	228
3.3.- <b>TRATAMIENTO DE DAM MEDIANTE BRS</b> .....	230
3.3.1.- <i>Alcalinización del drenaje ácido</i> .....	233
3.3.2.- <i>Precipitación biológica de metales</i> .....	236
- <i>Eliminación biológica del cobre.- Ensayos preliminares</i> .....	237
- <i>Eliminación biológica del cobre.- Ensayos definitivos</i> .....	241
3.3.3.- <i>Reducción biológica de sulfatos</i> .....	246
- <i>Aplicación de las BRS al tratamiento del agua de la presa de estériles</i> .....	250
<b>4.- CONCLUSIONES</b> .....	253
<b>5.- BIBLIOGRAFIA</b> .....	257

## ***Introducción***

## **1.1.- ABANDONO DE RESIDUOS EN MINERIA: PRESAS DE DECANTACION**

Los procesos mineralúrgicos generan cantidades importantes de residuos de difícil ubicación. Antiguamente era frecuente que los residuos producidos en las plantas de flotación fueran abandonados a la intemperie o incluso vertidos directamente al cauce de los ríos. Una mentalidad a nivel industrial cada vez más solidaria con la preservación del medioambiente, el progresivo deterioro de éste y la promulgación de medidas gubernamentales estrictas sobre la evacuación de vertidos, han llevado a las empresas al establecimiento de sistemas de control de dichos vertidos, así como a la disminución en la cantidad de los mismos. Como fruto de esta mentalidad “conservacionista” surge la necesidad de confinar los residuos mineros en presas de decantación.

En un principio, estas presas se concibieron para la decantación de estériles, sin otra consideración que el almacenamiento y la retención de estos residuos de mina. En algunos casos, los residuos procedían de las actividades propiamente mineras y, en otros, de las actividades de procesamiento del mineral, es decir, de las plantas de flotación.

La mayoría de estas presas fueron diseñadas sin prever la evolución y los cambios que estos residuos iban a experimentar durante su almacenamiento, dado que el mineral queda expuesto a condiciones ambientales cambiantes y, por tanto, a la acción del agua, el oxígeno, la temperatura, los microorganismos, etc.

Como consecuencia del deterioro en la calidad de los efluentes de muchas de estas presas, surge la necesidad, y la obligación, de estudiar la evolución de los residuos durante su confinamiento, de caracterizarlos y de evaluar el potencial contaminante que puedan adquirir con el tiempo.

Así, durante los últimos quince años han proliferado los estudios sobre lo que se ha dado en llamar “drenajes ácidos de mina” (*Acid Mine Drainage, AMD*) y se han tratado de mejorar las condiciones tanto de manipulación como de disposición de residuos, especialmente en aquellos casos en los que se espera un potencial contaminante importante.

### **1.1.1.- Características de los residuos vertidos por las plantas de flotación**

La naturaleza de los residuos procedentes de plantas de flotación, que son descargados en presas de decantación, varía mucho en función del mineral y del tratamiento al que ha sido

sometido éste. En el caso concreto de la minería de sulfuros, la característica más general es que se trata de residuos con un tamaño de partícula muy pequeño, del orden de micrómetros. Esta situación difiere de la de los residuos generados en las operaciones mineras, los cuales tienen tamaños de varios centímetros, lo cual es importante desde el punto de vista de su susceptibilidad a la oxidación, que a su vez es inversamente proporcional al tamaño de partícula (Fernández-Rubio, 1986) y presenta especial relevancia en la oxidación catalizada por bacterias. La velocidad de oxidación aumenta al aumentar la superficie de sólido que es expuesta a los agentes naturales, es decir, al disminuir el tamaño de partícula, lo cual favorece la “accesibilidad” de la bacterias al sustrato (Lundgren y Silver, 1980).

Acompañan al mineral, y en concentración muy pequeña, restos de reactivos orgánicos de flotación: xantatos, amilxantatos y otros productos químicos industriales utilizados como depresores, colectores o activadores.

Uno de los aditivos utilizado en algunas plantas de flotación es el dióxido de azufre,  $\text{SO}_2$ . Este se disuelve en la fase acuosa y aparece en el agua residual en forma de ion sulfito, el cual tiene un efecto ambiental muy negativo: además de disminuir el pH, es sumamente tóxico para la vida acuática en general, creando una fuerte demanda química de oxígeno (*Standard methods for the examination of water and wastewater, 1985*).

El pH del residuo variará en función del tratamiento que se le haya dado al mineral durante el proceso pero, en general, las llamadas “colas de flotación” poseen un pH alcalino y salen de la planta de flotación en forma de pulpa.

### **1.1.2.- Legislación ambiental relativa a aguas de mina**

La industria minera, por sus especiales características, requiere una normativa ambiental específica y acorde con los residuos que genera. Las leyes de protección de las aguas tratan de que el minero ponga los medios necesarios para que su actividad no afecte a la calidad del agua. Esto ha llevado a una doble acción por parte de la administración:

- a) actuación preventiva, consistente en un estudio hidrogeológico muy completo de cada mina para establecer, en función del mismo, los impactos tolerables o no por el medioambiente, y
- b) actuación sancionadora, para obligar a los mineros a cumplir las normativas.

En todos los países desarrollados existen normas que marcan los máximos niveles de contaminantes en los efluentes de mina que se vierten al medioambiente. En la Tabla I se reflejan estas cifras de acuerdo a distintas legislaciones.

Tabla I: Máximos contaminantes permitidos en agua potable (mg/l) según distintos organismos (Sinh y Rawat, 1985)

Parámetro	EPA (1976)	WHO (1971)	USPS (1962)
pH	6,0-8,5	6,0-8,5	6,0-8,5
Sulfatos	250	400	250
Dureza (como mg/l de CaCO <sub>3</sub> )	-	500	-
Sólidos disueltos	500	1500	500
As	0,05	0,05	0,05
Cd	0,01	0,01	0,01
Cr	0,05	-	-
Cu	1,0	1,5	0,2
Hg	0,002	0,001	-
Pb	0,05	0,1	0,05
Zn	5,0	15	5
Mn	0,05	0,5	0,05
Al	-	-	-
F <sup>3+</sup>	0,3	1,0	0,3
Fe <sup>2+</sup>	0,3	1,0	0,3

Como puede apreciarse, las normas que rigen el vertido de aguas de mina son, en general, menos estrictas que las que regulan otros vertidos, ya que sería inviable para las empresas, en muchos casos, depurar el agua hasta cumplir dichas normas de calidad (Fernández-Rubio, 1986).

En Estados Unidos, país donde mejor documentada está la normativa de vertidos de aguas de mina, y donde más estrictamente se obliga al cumplimiento de la misma, éstos quedan regulados por la *Federal Water Pollution Control Act* de 1972. Esta ley exige que las aguas vertidas por minas activas tengan la siguiente calidad:

- pH comprendido entre 6 y 9,
- contenido de hierro inferior a 3,5 ppm como media y de 7 ppm como máximo,

- contenido de manganeso menor de 2 ppm como media y de 4 ppm como máximo, y
- total de sólidos en suspensión inferior a 70 ppm.

Las minas abandonadas en el pasado no quedan sujetas a esta normativa de calidad, que sí afecta a las minas que serán abandonadas en el futuro.

En el Reino Unido, los vertidos de agua de mina están regulados por la Ley de Control de la Contaminación de 1974, la cual establece criterios similares a la de EE.UU para la calidad del agua.

En Canadá, existen estrategias de regulación dirigidas específicamente hacia el control de aquellas áreas en las que el proceso de generación de acidez está en etapa de desarrollo. Las medidas que se aplican en cada caso dependen de la jurisdicción regional a la que pertenezca una determinada mina. Así, existen provincias en las que se exige a la empresa minera la realización de los correspondientes ensayos de predicción de generación de acidez de sus propios residuos y otras en las que simplemente se establece el cumplimiento de la normativa.

La *Metal Mining Liquid Effluent Regulations and Guidelines (MMLEER)* de 1977 recoge las medidas de regulación exigibles a los efluentes de minas, tanto a las que se encuentran activas como a las que tienen prevista su apertura (Tabla II).

Tabla II: Regulación de los efluentes líquidos de minas metálicas según normativa canadiense de 1977 (Reinchenbach, 1994)

Parámetro	Máximo valor medio mensual	Máximo valor medio en una muestra
pH	6,0	5,5
Sólidos en suspensión	25,0	37,5
Ar	0,5	0,75
Cu	0,3	0,45
Pb	0,2	0,3
Ni	0,5	0,75
Zn	0,5	0,75
Ra 226 (pCi/l)	10	20,0

\*Todas las unidades son ppm salvo que se especifique lo contrario

El *British Columbia Reclamation Advisory Committee (RAC)* ha desarrollado una serie de reglas y procedimientos que guían y orientan en la comprensión de los procesos de generación y vertido de aguas ácidas. Abarcan aspectos que van desde la fase de exploración, los ensayos de predicción, los métodos de prevención, el criterio de selección en la toma de muestras, etc.

Como parte de la regulación de la industria minera, todas las propuestas de apertura, así como los planes de cierre son examinados por los *Regional Mine Development Review Committees (RMDRC)*.

Los principios fundamentales que rigen las actividades de explotación minera están establecidos de modo que minimicen el riesgo ambiental. Como la predicción del drenaje ácido no es una ciencia exacta, las medidas de tratamiento y control tienen que ser objeto de los planes de investigación de las empresas implicadas. A pesar de que la tecnología actual tiene capacidad para reducir y prevenir la generación de aguas ácidas en un porcentaje importante, no puede absorber o tratar todos los problemas que generan las minas abandonadas. De acuerdo con la normativa canadiense, son los gobiernos los que deben incentivar y promover programas de recuperación y mejora en la calidad de los efluentes mineros, así como de actualizar la normativa y las medidas de regulación relacionadas con el drenaje ácido.

En Suecia, la normativa ambiental relacionada con la problemática de los residuos mineros está regulada por la *Swedish EPA*. La legislación ambiental sueca es clara en el sentido de las responsabilidades exigibles a aquellas empresas que generan un problema de contaminación ambiental, pero no tiene un criterio definido en cuanto a los problemas producidos por explotaciones antiguas. Uno de los aspectos que más destaca de esta normativa es el compromiso social y ético que se reclama a los ciudadanos en cuanto beneficiarios de la riqueza que la industria minera genera, para que se impliquen, incluso desde un punto de vista económico, en la problemática de recuperación ambiental (Lindahl L, 1991).

## **1.2.- EL SO<sub>2</sub> Y LA FLOTACION**

### **1.2.1.- Aplicación del SO<sub>2</sub> como reactivo en plantas de flotación**

La clasificación moderna de los reactivos de flotación se hace en función del papel que éstos desempeñan dentro del proceso de concentración del mineral. Así, la actual

clasificación de reactivos distingue entre colectores, espumantes, activadores, depresores, reguladores y floculantes (*Handbook on mining chemicals, 1986*).

Los reactivos reguladores son en general compuestos inorgánicos cuya función es la de regular el pH del medio. Su clasificación aparece en la Figura 1 (Dudenhov y col, 1980).

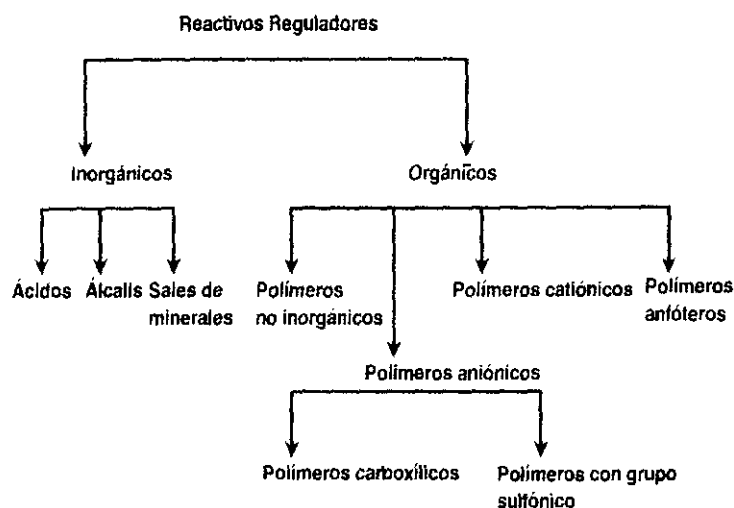


Figura 1: Clasificación de los reactivos reguladores de flotación

Dentro del grupo de los ácidos se encuentra el ácido sulfuroso, y dentro del grupo de las sales se encuentra el sulfito sódico.

El ácido sulfuroso se utiliza como agente activador y regulador del pH del medio. Suele ser empleado en la flotación de la bornita, la calcopirita y la calcosina. Perteneció a los ácidos de fuerza media. En la actualidad, su uso en flotación está bastante limitado debido a la dificultad para obtenerlo en estado deshidratado, y a las dificultades técnicas que supone utilizarlo.

El sulfito sódico, y en general los sulfitos metálicos ( $\text{MeSO}_3$ ), los tiosulfatos ( $\text{MeS}_2\text{O}_3$ ), los politionatos ( $\text{Me}_2\text{S}_x\text{O}_6$ ), los ditionitos, los hiposulfatos ( $\text{Me}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) y los piro-sulfatos ( $\text{Me}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ), son reductores fuertes capaces de evitar la influencia negativa de la excesiva oxidación de la superficie de los minerales en el proceso de flotación. Entre ellos, el primero es el que tiene una mayor aplicación.

En la Tabla III se reflejan las características más importantes, así como las concentraciones en las que suelen utilizarse algunos de estos reactivos en los procesos de flotación.

Tabla III: Principales reactivos activadores y reguladores de flotación y su aplicación en el proceso

Reactivo	Forma	Dosis habitual g/t	Método alimentación	Acción más característica
SO <sub>2</sub>	gas	250 - 2000	3% solución	Deprime los sulfuros de Zn y de Fe. Con cianuros, deprime los sulfuros de Cu. Muy útil en flotación selectiva de sulfuros de Cu frente a sulfuro de Pb
sulfitos alcalinos	polvo	250-5000	5% solución ó pulpa	Deprime los sulfuros de Zn. Los bisulfitos son más útiles que los sulfitos

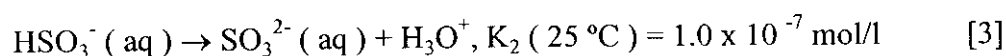
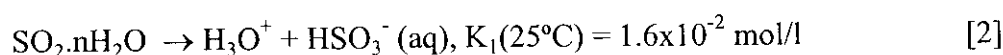
### 1.2.2.- Propiedades químicas de las especies SO<sub>2</sub>, HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> y H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>

El SO<sub>2</sub> es bastante soluble en agua (a 15°, 45 vol SO<sub>2</sub>/1vol H<sub>2</sub>O). Esta disolución da una complicada “mezcla de reacción”. Tradicionalmente a esta “mezcla” se la ha llamado “ácido sulfuroso”, sin haberle sido asignada una composición concreta.

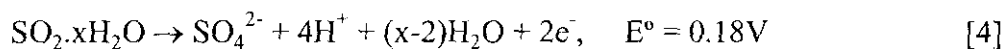
Actualmente, se sabe que dicha “mezcla” está formada por un conjunto de especies cuyas proporciones relativas son muy dependientes de la temperatura, el pH y la concentración, o mejor de la presión parcial de SO<sub>2</sub> en agua. Entre estas especies podemos encontrar: SO<sub>2</sub> disuelto (que estaría débilmente hidratado), HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> y SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, principalmente.

Por tanto, el “ácido sulfuroso” puede ser considerado una especie intermedia, de vida muy corta, que aparece también en la acidificación de sulfitos a bajas temperaturas.

Las disoluciones acuosas del SO<sub>2</sub> poseen propiedades ácidas, de ahí su empleo como regulador de pH en los procesos de flotación. Los equilibrios de disociación que se establecen son los siguientes (Cotton y Wilkinson, 1988; Greenwood, 1984):

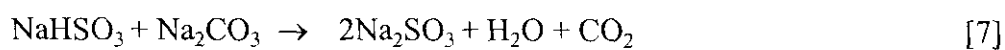


Otra propiedad del  $\text{SO}_2$ , que se aprovecha en las plantas de flotación, es su poder reductor. Sulfitos e hidrogenosulfitos son agentes reductores moderadamente fuertes y producen bien ditionato o bien sulfato, según las condiciones de reacción. Las ecuaciones correspondientes a la oxidación a sulfatos en medio alcalino son las siguientes:



### 1.2.3.- Sales del $\text{SO}_2$

El  $\text{SO}_2$  posee dos series de sales bien caracterizadas: las del anión  $\text{SO}_3^{2-}$  y las del anión  $\text{HSO}_3^-$ . Las sales del anión sulfito se preparan, normalmente, en dos etapas, de acuerdo con las siguientes reacciones:



El ion  $\text{HSO}_3^-$  es estable únicamente en disolución acuosa.

#### 1.2.3.a.- Estructura

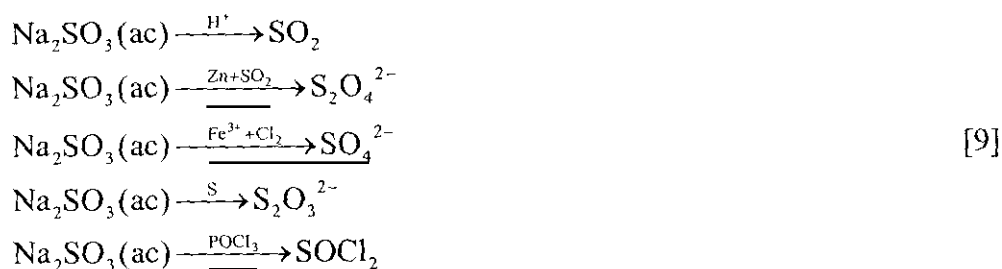
El anión  $\text{HSO}_3^-$  posee una estructura asimétrica, con el átomo de hidrógeno unido directamente al átomo de azufre. La estructura del ion sulfito en disolución y en estado sólido es piramidal.

#### 1.2.3.b.-Reactividad

A diferencia de lo que sucede con las soluciones acuosas de  $\text{SO}_2$ , las cuales poseen propiedades ácidas en virtud de la presencia mayoritaria del anión  $\text{HSO}_3^-$ , las soluciones del ion sulfito son claramente alcalinas:



Algunas de las reacciones más características del ion sulfito son las siguientes:



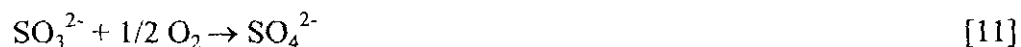
#### 1.2.4.- Cinética de oxidación del ion sulfito

El oxígeno del aire puede oxidar fácilmente especies de S(IV) a especies de S(VI) a través de una reacción que es extraordinariamente dependiente del pH y que está sometida tanto a la influencia de distintos factores activadores como inhibidores.

De un modo muy general, se escribe la reacción de oxidación del ion sulfito del siguiente modo:



Esta ecuación redox da además información sobre la evolución del pH como consecuencia de la oxidación. También se puede describir la oxidación del ion sulfito mediante la siguiente ecuación empírica:



Sin embargo, estas ecuaciones dan muy poca información acerca del mecanismo, velocidad, o influencia que otros iones o moléculas tienen en el proceso oxidativo. Como se verá a continuación, el mecanismo de reacción de la oxidación del ion sulfito en disolución acuosa por el oxígeno disuelto en el medio, es una reacción en cadena extremadamente complicada en la que intervienen multitud de compuestos intermedios.

##### 1.2.4.a.- Mecanismo de oxidación

La oxidación química del ion sulfito transcurre a través de un mecanismo de reacción en cadena en el que intervienen compuestos que son radicales. Esta oxidación está sometida a

catálisis, principalmente, por cationes metálicos.

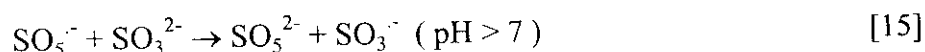
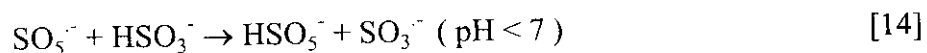
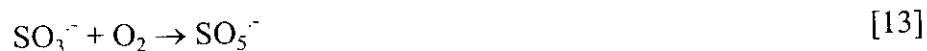
-Mecanismo de reacción

Ya a principios de siglo, en 1927, Backström proponía que la oxidación del ion sulfito transcurría a través de compuestos radicales oxígeno-azufre. De acuerdo a este mismo planteamiento, Hegg y Hobbs (Hegg y Hobbs, 1978) han propuesto el siguiente mecanismo que, como puede apreciarse, transcurre a través de radicales:

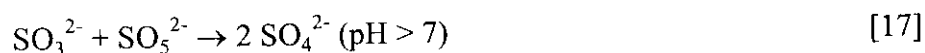
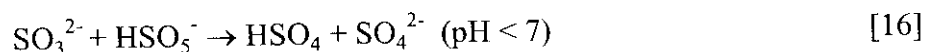
Iniciación:



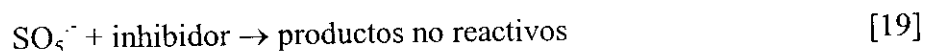
Propagación:



La oxidación transcurre a través de las siguientes reacciones:



La reacción termina cuando:



El inhibidor puede ser cualquiera de entre una gran cantidad de productos orgánicos o inorgánicos (Schroeter, 1966). Otros autores, como Pasiuk-Bronikowska (Pasiuk-B, 1988), en su estudio sobre la cinética de oxidación de especies de azufre tetravalente, o Wisniewski (Wisniewski, 1990), han corroborado el mecanismo descrito.

### 1.2.4.b.- Catálisis

Los procesos que tienen lugar a través de radicales son extraordinariamente sensibles a pequeñas cantidades de compuestos que pueden actuar catalizando ó inhibiendo la reacción (Schroeter, 1963). El curso de la misma dependerá de la clase y la concentración del catalizador, así como del pH al que transcurra (Wisniewski, 1990).

La oxidación del ion sulfito, al tratarse de una reacción que ocurre a través de un mecanismo en el que participan radicales, está, por tanto, sometida a catálisis. Dentro de los catalizadores positivos, los cationes metálicos son los que más importancia tienen. El papel que juegan los metales puede ser, bien iniciando la reacción, como aparece en el mecanismo anteriormente descrito, o bien acelerándola (Hegg y Hobbs, 1978). Fuller y Crist (Fuller y Crist, 1941) realizaron estudios sobre la cinética de oxidación en presencia del ion cobre como catalizador. Para concentraciones de catalizador inferiores a  $10^{-9}$  M, la cinética sigue respondiendo a una ecuación de primer orden. Para concentraciones superiores, la cinética no es sólo dependiente del ion sulfito sino que el orden de reacción depende también de la concentración de ion cobre.

### 1.2.4.c.- Orden de reacción

Los autores Fuller y Crist (Fuller y Crist, 1941) hicieron un cuidadoso estudio de la cinética de oxidación del ion sulfito empleando técnicas manométricas para el seguimiento del oxígeno, y contrastando estos valores con el método yodométrico de determinación de sulfitos. Asimismo, utilizaron sulfito sódico sometido a distintas recristalizaciones, y tuvieron extremadas precauciones con todos los reactivos utilizados.

Experimentalmente, comprobaron que las reacciones de soluciones saturadas de oxígeno a una atmósfera de presión son de primer orden respecto a la concentración del ion sulfito, ajustándose a la siguiente ecuación cinética:

$$\frac{-d[\text{SO}_3^{2-}]}{dt} = K_1 \cdot [\text{SO}_3^{2-}] \quad [20]$$

Se debe destacar que éste es el orden que se obtiene a partir de datos obtenidos experimentalmente y no el que resultaría de cálculos matemáticos obtenidos a partir de las ecuaciones asociadas a un mecanismo teórico.

La ecuación [20] es válida siempre que la presión parcial de oxígeno sea igual a la presión atmosférica y que el oxígeno disuelto en el agua se mantenga constante.

Si la presión parcial de oxígeno fuera demasiado pequeña, no habría suficiente cantidad del gas como para poder reaccionar con el ion sulfito, y se obtendría otro orden experimental de reacción. Pero este resultado no se debería a que varíe el orden, sino a que los reactivos no se encuentran en la proporción adecuada. Para concentraciones superiores habría que considerar también la velocidad de disolución del oxígeno.

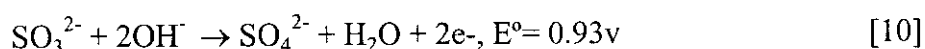
Schroeter (Schroeter, 1963) obtuvo también una cinética de primer orden para la oxidación de disoluciones de ion sulfito de distintas concentraciones.

#### 1.2.4.d.- Influencia del pH

El pH es una variable muy importante en el transcurso de la reacción. Las consideraciones que pueden hacerse son dos. Por un lado, la variación intrínseca del pH como consecuencia de la propia oxidación y, por otro, el efecto que tiene en la cinética de oxidación.

##### -Variación del pH asociada a la reacción

Como quedó expuesto en el comienzo de este apartado 1.2.4., la oxidación del ion sulfito se ajusta a la ecuación:



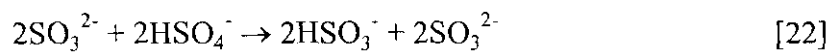
La variación del pH asociada a la oxidación del ion sulfito puede explicarse en base a la participación del ion hidroxilo. Experimentalmente, Fuller y Crist (Fuller y Crist, 1941), en sus cuidadosos ensayos de oxidación, describen como a medida que el ion sulfito es oxidado a ion sulfato, la solución se hace menos básica. Asimismo, Schroeter (Schroeter, 1966) observó que el cambio en el pH que acompaña a la oxidación del ion sulfito es del orden de 8,2 a 4,8.

##### -Influencia del pH inicial en el curso de la oxidación

Experimentalmente, se ha comprobado que el curso de la oxidación del ion sulfito viene determinado por el pH inicial del medio (Schroeter, 1963): un aumento en la concentración de protones va acompañado de una disminución en la velocidad, existiendo un intervalo de

pH intermedio (3,2-6,0) en el cual la velocidad parece invariable respecto a la concentración de protones. Para explicar este hecho varios autores acuden al mismo planteamiento: el pH inicial determina la concentración de especies susceptibles de ser oxidadas (Figura 2), y de un modo grosero se podría decir que no todas las especies son igualmente “oxidables”; o lo que es lo mismo, que la oxidación transcurre preferencialmente a expensas del ion  $\text{SO}_3^{2-}$ . Esto no quiere decir que el  $\text{HSO}_3^-$  no llegue a oxidarse, pero mientras ambos estén presentes en equilibrio, será el  $\text{SO}_3^{2-}$  el que se oxide antes y más deprisa.

En realidad, el curso de la reacción depende de la fuerza de los dos ácidos ( $\text{HSO}_3^-$  y  $\text{HSO}_4^-$ ) de acuerdo a las siguientes reacciones:



$$\frac{K_{\text{HSO}_3^-}}{K_{\text{HSO}_4^-}} = \frac{[\text{SO}_3^{2-}] \cdot [\text{HSO}_4^-]}{[\text{SO}_4^{2-}] \cdot [\text{HSO}_3^-]} = \frac{6,24 \times 10^{-8}}{2 \times 10^{-2}} = 3,12 \times 10^{-6} \quad [24]$$

Schroeter plantea que la oxidación de una solución que contenga ambos iones, sulfito y bisulfito, transcurre a expensas del ion sulfito (Schroeter, 1963). Fuller concide en esta misma idea: la reacción es dependiente de la concentración del anión sulfito e independiente de la del anión bisulfito (Fuller, 1941). Esto no quiere decir que las especies bisulfito no sean susceptibles de oxidación; lo son, pero a tiempos más largos, y mientras sucede la oxidación del ion sulfito la concentración del ion bisulfito se puede considerar constante. La velocidad es independiente del pH en intervalos comprendidos entre 8,0 y 8,2 donde es el ion sulfito el que está presente. En el intervalo comprendido entre pH 3,2 y 6,0, la especie que predomina es el  $\text{HSO}_3^-$  y por eso la oxidación transcurre a menor velocidad.

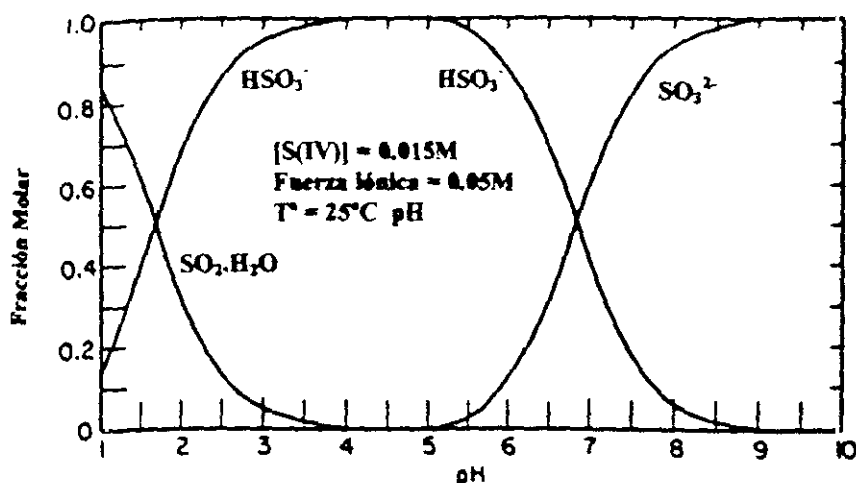


Figura 2 : Distribución de especies de S(IV) en función del pH según Davies (Huss y col. 1982)

### 1.3.- TRANSFORMACION DE RESIDUOS ABANDONADOS

El problema ambiental de la generación de residuos de cualquier proceso no se limita exclusivamente a los aspectos derivados de la confinación de los mismos, como el volumen de ocupación, o los riesgos de contención, etc. El problema añadido a la generación de residuos, y en particular a los de la industria minera, es la transformación de los mismos y la problemática adicional que esto conlleva.

Los residuos de los procesos mineros y metalúrgicos, una vez vertidos, quedan expuestos a las cambiantes condiciones ambientales. La acción del agua, el oxígeno, las bacterias, la temperatura, etc, sobre estos residuos, y las transformaciones a las que ello da lugar, constituye lo que se conoce con el nombre de meteorización o *weathering*. La evolución o degradación de un determinado residuo dependerá de la intensidad, frecuencia y, en general, de la presencia o no de cada uno de los posibles factores. Así, por ejemplo, no tendrán igual evolución un residuo abandonado en una zona seca y otro que pueda estar sometido a ciclos de sequedad y humedad.

Es importante poder predecir la evolución de un residuo en función de todos estos aspectos, con el fin de establecer medidas que prevengan las negativas consecuencias de la meteorización del mismo. Se han desarrollado muchos trabajos de investigación en relación a la elaboración de ensayos que predigan lo que le sucederá a un residuo cuando se

abandone. Básicamente, estos ensayos consisten en someter al residuo a condiciones lo más parecidas a las que se va a encontrar cuando sea abandonado. Para ello, se hacen estudios climatológicos previos consultándose el régimen estacional habitual en la zona (lluvias, temperaturas, etc). El resultado dará una idea aproximada de la calidad de agua que dejará el residuo cuando sea abandonado y meteorizado.

Cuando el residuo que se abandona es un mineral sulfurado sometido a la acción del oxígeno y del agua, éste será “lixiviado”, y la consecuencia inmediata será la generación de aguas ácidas. Esta situación tiene lugar cuando concurren cuatro factores fundamentales: un sulfuro en presencia de agua, oxígeno y un catalizador de las reacciones, aunque este catalizador no es imprescindible para el proceso de generación.

### 1.3.1.- La generación de aguas ácidas

Como consecuencia de la explotación de los yacimientos mineros de carbón, sulfuros metálicos, uranio y otros, grandes cantidades de materiales piríticos quedan expuestos a la meteorización. Estas piritas, y los sulfuros asociados a ellas, se oxidan espontáneamente cuando concurren las siguientes circunstancias:

- a) existencia de cantidades suficientes de agua y oxígeno
- b) presencia de bacterias catalizadoras del proceso, de las cuales *Thiobacillus ferrooxidans* es la fundamental.

Los sulfuros se oxidan a sulfatos de hierro solubles, los cuales forman costras salinas ocre-amarillentas en la superficie de las rocas meteorizadas. Éstas serán disueltas e hidrolizadas, por ejemplo, por aguas de lluvia, generándose aguas ácidas. Los cationes ferroso se oxidan, a su vez, para producir hidróxido férrico insoluble, produciéndose así más acidez. La acidez, con el descenso del pH del agua, tiene como consecuencia que el agua se hace fuertemente corrosiva, que el ecosistema fluvial se degrada, y que la solubilidad de muchos metales pesados aumenta, con lo que las aguas pueden llegar a ser extremada y peligrosamente tóxicas.

Las aguas ácidas de mina se caracterizan por su bajo pH (normalmente entre 2 y 5), por sus altos contenidos en sulfatos (a veces hasta 3500 ppm), y por los elevados contenidos en metales. Ejemplos característicos de aguas ácidas se reflejan en la Tabla IV.

Tabla IV: Ejemplos de calidad de aguas ácidas (*British Columbia ...*, 1989)

Parámetro	Filtración de mina de uranio abandonada	Filtración de una presa de residuos de una mina de plata activa	Agua de drenaje de una mina de cobre subterránea
pH	2,0	2,8	3,5
sulfatos	7440	7650	1500
Fe	3200	1,19	10,6
Mn	5,6	78,3	6,4
Cu	3,6	89,8	16,5
Al	588	359	-
Pb	0,7	2	0,1
Cd	0,05	0,5	0,14
Zn	11,4	53,2	28,5
Ar	0,7	25	0,05
Ni	3,2	8,0	0,06

Las unidades están expresadas en mg/l

De todos los factores que intervienen en la formación de aguas ácidas, el agua es el elemento principal. Actúa como reactivo en la oxidación de la pirita, como medio en el cual se desarrollan las reacciones y como elemento de transporte de los productos formados.

Antes de desarrollarse las actividades mineras en un determinado lugar, es muy reducida la cantidad de pirita expuesta a las condiciones bajo las cuales se producen aguas ácidas. Las operaciones de minería implican la exposición de la pirita a la acción de las aguas superficiales o subterráneas, y permiten, por tanto, su oxidación.

### 1.3.1.a.- Etapas en la formación y evolución de drenajes ácidos de mina (DAM)

El mecanismo de degradación de la calidad del agua es el siguiente:

- a) Oxidación de la pirita (el más reactivo de los sulfuros) y consiguiente generación de acidez.
- b) Oxidación y disolución de otros sulfuros “menos oxidables” por la acción del oxígeno y de las aguas ácidas generadas anteriormente.
- c) Lixiviación de arcillas, carbonatos y feldspatos por las aguas ácidas formadas.

- d) Deposición de los iones disueltos formando masas y costras de sulfato.
- e) Disolución de los sulfatos, una vez que el drenaje ha dejado de actuar y el agua circula de nuevo por la roca.

El resultado de todos estos procesos es que las aguas adquieren bajos valores de pH y elevadas concentraciones de metales y sulfatos disueltos.

No todas las aguas contaminadas son necesariamente ácidas. Ésto se explica por la acción neutralizadora de dolomías o de rocas carbonatadas en las que se desarrolla la mineralización o que el agua ácida pueda encontrar en su discurrir.

La cantidad y calidad de agua ácida que se produce en los desechos piríticos depende de factores como la cantidad de pirita que esté presente, del tamaño de grano, de la profundidad de penetración del oxígeno, de la humedad, de la temperatura, de las características hidrogeológicas del lugar y de la presencia, o no, de posibles catalizadores de la oxidación como son las bacterias.

#### **1.3.1.b.- Reacciones químicas y microbiológicas en la formación de drenajes ácidos de mina.- La oxidación de la pirita.**

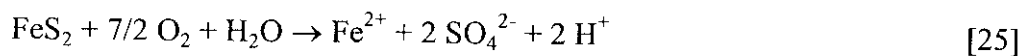
La solubilidad de los sulfuros metálicos es bastante baja en medio acuoso pese a la presencia de agentes oxidantes como el ion férrico o el oxígeno disuelto que suelen aparecer en los ambientes asociados a los sulfuros (Moses y col., 1987).

El principal compuesto implicado en la generación de acidez es la **pirita**. Pese a que el valor económico de este mineral es casi nulo, e incluso su presencia asociada a otros minerales es negativa por los problemas colaterales que genera, la pirita es el sulfuro del que más información se tiene y del que más se ha estudiado su mecanismo de oxidación. Los problemas ambientales que se derivan de su presencia, tanto cuando se encuentra asociada a la materia prima (sulfuros polimetálicos y carbones), como cuando se encuentra asociada a los residuos de mina, han sido justificación suficiente para que se genere tanta investigación.

El **mecanismo de oxidación de la pirita** ha sido ampliamente discutido. Desde el punto de vista de la generación de DAM, interesa la oxidación natural de la pirita o, lo que es lo mismo, el modelo de oxidación acuosa de la pirita. En un sistema natural, la pirita utiliza

tanto el oxígeno como el  $\text{Fe}^{3+}$  en la oxidación. Singer y Stumm caracterizaron las reacciones de oxidación de la pirita en un sistema natural, y propusieron el siguiente mecanismo (Singer y Stumm, 1970):

- Inicialmente se produce la oxidación del sulfuro a sulfato:



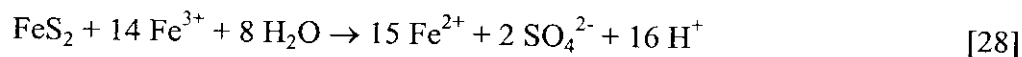
La presencia de iones  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  y, sobre todo,  $\text{H}^+$ , disueltos en el agua, suponen un incremento en la acidez del medio. Si no existe ningún factor ambiental que neutralice de inmediato esta acidez, la oxidación progresa de modo que una parte importante del ion ferroso se oxidará a ion férrico:



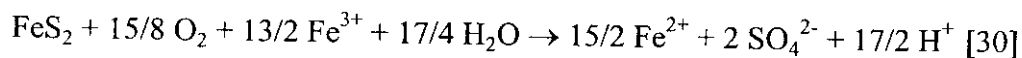
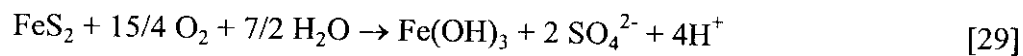
A valores de pH por encima de 2,3, y hasta 3,5, el ion férrico precipitará como hidróxido, dejando poco  $\text{Fe}^{3+}$  en solución y generándose un incremento en la concentración global de  $\text{H}^+$ :



El  $\text{Fe}^{3+}$  que existe en solución puede contribuir a la oxidación de la pirita:



Estas reacciones se pueden resumir en las siguientes reacciones globales:



Otros sulfuros y otros posibles oxidantes interaccionarán de forma diferente, con diferente estequiometría y con diferente velocidad de reacción. Así, la pirita es más reactiva que la blenda, y ésta más que la galena. La marcasita es nueve veces más reactiva que la pirita.

### 1.3.1.c.- Participación microbiológica en la generación de drenajes ácidos de mina

Ciertas bacterias pueden catalizar el proceso de generación de DAM provocando un incremento en la velocidad global del proceso. El papel de las bacterias está asociado a las reacciones [26] y [30] catalizando la transferencia electrónica entre el oxígeno y la pirita. De todas ellas, la bacteria más ampliamente conocida es el *Thiobacillus ferrooxidans* por su relación con la oxidación del ion ferroso, aunque esta bacteria puede acelerar también la velocidad de la reacción [25].

En apartados posteriores, se describirá con más detalle el metabolismo de las bacterias implicadas en la generación de acidez; se destaca aquí, sin embargo, que además del *Thiobacillus ferrooxidans* existen otras bacterias implicadas en la oxidación de compuestos inorgánicos, que se hallan también ampliamente distribuidas en estos ambientes de desechos mineros. Bacterias como *Metallogenium*, *Thiobacillus thiooxidans* y *Ferrobacillus ferrooxidans* tienen una participación importante en la generación de aguas ácidas.

Se ha discutido mucho el mecanismo químico/microbiológico de oxidación de los sulfuros, y especialmente controvertido ha sido el aspecto de la participación directa de las bacterias en dicha oxidación, ya que, como enseguida se verá, este mecanismo exigiría un contacto físico entre la bacteria y el mineral. En general, en un proceso de generación de aguas ácidas, la participación bacteriana varía en cada etapa de acuerdo con el pH y las condiciones químicas del momento. Una vez que el hierro ferroso es liberado en la etapa de iniciación, reacción [25], se inicia un ciclo en el que el  $\text{Fe}^{2+}$  se oxida a  $\text{Fe}^{3+}$ , reacción [26], éste es reducido por la pirita liberándose más  $\text{Fe}^{2+}$  y generándose más acidez, reacción [28]. El proceso de generación de acidez estará por tanto condicionado por la disponibilidad de ion férrico en el sistema, y ya que la velocidad de la reacción [26] es mucho más lenta que la de la [25], la velocidad de oxidación del ion ferroso se convierte en la etapa determinante de la velocidad global del proceso de generación de DAM (Singer y col, 1970).

La velocidad de oxidación *química* del ion ferroso es función del pH. A valores de pH superiores a 4,5, la velocidad se ajusta a la ecuación [31], mientras que a valores de pH por debajo de 3,5, la velocidad queda representada por la ecuación [32]:

$$\frac{-d[\text{Fe}^{2+}]}{[dt]} = k_1 \cdot [\text{Fe}^{2+}] \cdot p\text{O}_2 \cdot [\text{OH}^-]^2 \quad [31]$$

$$\frac{-d[\text{Fe}^{2+}]}{[dt]} = k_2 \cdot [\text{Fe}^{2+}] \cdot p\text{O}_2 \quad [32]$$

En condiciones naturales, la velocidad de oxidación del ion ferroso es muy superior a la observada en el laboratorio en condiciones abióticas controladas. En el medio natural están presentes muchos factores que ejercen un efecto catalítico en esta reacción. Entre ellos se encuentra la presencia de sulfatos,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ , ..., y sobre todo el poderoso efecto catalítico de la microflora presente en las aguas.

Dos son los mecanismos descritos para explicar la participación bacteriana en la oxidación de los sulfuros: uno es el mecanismo indirecto, que explicaría la oxidación del ion ferroso anteriormente descrita por la acción de las bacterias, y en el que el verdadero oxidante de la pirita es el catión férrico. El número total de bacterias presentes en el medio no sería el factor limitante de la reacción. En el mecanismo directo, la bacteria actúa directamente sobre la superficie del mineral, siendo la velocidad independiente de la concentración de férrico, y siendo el número de bacterias adheridas a la superficie del mineral, en este caso, el factor limitante de la velocidad.

Existen evidencias experimentales de ambos mecanismos, y probablemente ambos actúen simultáneamente, pero, en general, el mecanismo indirecto ha sido más ampliamente comprobado y aceptado. Recientes estudios acerca del mecanismo de oxidación de las bacterias durante el proceso de formación de aguas ácidas ponen de manifiesto que la oxidación de la pirita es básicamente un mecanismo químico catalizado por la oxidación bacteriana de ferroso a férrico, siendo éste el que actúa sobre el sulfuro generando acidez. Esta conclusión se basa en el hecho de que a pH próximos a 4,0, en los que las bacterias mostraban actividad importante, fueron sin embargo incapaces de oxidar la pirita puesto que a este pH el mecanismo químico de oxidación de sulfuros está bastante limitado (Nyavor y col., 1996).

En general, el proceso de oxidación de la pirita, en un ambiente natural en el que existe participación bacteriana, es un proceso que se regula por sí mismo, y en el que a medida que la reacción progresa tienden a generarse unas condiciones de pH y temperatura óptimas para el crecimiento microbiano (Hiskey y col., 1981), resultando por tanto un incremento en la velocidad de reacción (Filion y col., 1992).

### 1.3.1.d.- Factores que influyen en la velocidad de generación de acidez

Como ya se apuntó anteriormente, la velocidad de formación de aguas ácidas se puede ver incrementada por la influencia de los siguientes factores:

#### - pH y temperatura

El pH influye básicamente en la actividad bacteriana, y por ello la velocidad de generación y progresión de acidez será máxima cuando el pH esté comprendido entre los valores 2,5 y 3,5, que es el intervalo de pH óptimo de crecimiento de las principales bacterias implicadas en este proceso.

La temperatura repercute igualmente en la actividad bacteriana, siendo óptimo el valor comprendido entre 30 y 35°C. En cualquier mina europea, la temperatura media del interior del estéril apilado no será superior a los 10°C durante muchos meses del año. Esto condiciona la actividad bacteriana, y por tanto es de esperar una producción de ácido inferior a la que realmente se registra en la mayor parte de las minas abandonadas no restituídas.

#### - Oxígeno

El oxígeno es imprescindible en la oxidación de la pirita. La velocidad de la reacción [25] depende mucho de la cantidad de oxígeno disponible, siendo importantes tanto la cantidad de oxígeno presente en la fase gaseosa, si la saturación es inferior al 100%, como la concentración de oxígeno en la fase acuosa.

#### - Población bacteriana y nutrientes

La presencia de bacterias en condiciones óptimas de crecimiento es un factor esencial en la catálisis del proceso. Elementos como el magnesio, el azufre, el fósforo y, sobre todo, el nitrógeno, son esenciales para el crecimiento celular. También el CO<sub>2</sub> es un compuesto necesario al tratarse de la única fuente de carbono asimilable por parte de las bacterias litoautótrofas, principales responsables de la oxidación.

### - Factores mineralógicos

El tamaño de los granos de mineral expuestos a las condiciones oxidativas influye en el proceso, de modo que cuando el mineral se encuentra finamente dividido, la superficie expuesta es superior y, por tanto, la velocidad de oxidación aumenta.

Un sulfuro abandonado puede ir acompañado de otras especies mineralógicas que sean consumidoras de ácido, con lo que la calidad final del agua que drene será distinta en función de la roca encajante que acompañe al sulfuro vertido.

En algunos casos, se deposita sobre la superficie de los granos de sulfuro atacado una fina capa de goetitas (hidróxidos de hierro) y jarositas (sulfatos básicos de hierro), que se forman a partir de los productos de oxidación superficial del grano. Estas capas protegen al mineral impidiendo que la oxidación continúe.

#### **1.3.2.- Concepto de meteorización**

La contaminación por acidez y metales pesados de las aguas superficiales y subterráneas a partir de los desmontes y relaves que contienen sulfuros minerales, es un problema frecuente a nivel mundial que se presenta en la mayoría de las operaciones mineras, requiriendo a menudo soluciones muy costosas. Una predicción precisa y una prevención exitosa son aspectos claves en la minimización del impacto ambiental de las operaciones mineras.

Como ya se ha dicho anteriormente, un residuo minero (estéril), una mina abandonada, cualquier excavación o apilamiento de mineral expuestos a las condiciones ambientales cambiantes (lluvia, aire, temperatura, etc), sufren importantes transformaciones bajo la acción de estos factores que se conocen con el nombre de meteorización.

El impacto ambiental que ocasiona el abandono de estos residuos o instalaciones da lugar, además de a otros aspectos colaterales, a lo que se ha denominado previamente drenaje ácido de mina (DAM).

Con objeto de poder predecir la magnitud de la contaminación, que bien tratará de prevenirse bien habrá de tratarse, se ha desarrollado mucha investigación dirigida a la simulación del efecto de la meteorización. Por ello, se han puesto a punto muchos métodos

de “meteorización simulada” que tratan de prever el efecto que tendrá la transformación de un residuo cuando se abandone.

Buena parte de las explotaciones de carbón y sulfuros a cielo abierto que se están desarrollando actualmente, constituyen, por su magnitud y una vez abandonada la mina, una grave amenaza para la calidad de las aguas. Los gobiernos de muchos países están promulgando normas cada vez más estrictas relativas a la preservación de la calidad del agua, lo cual obliga a las empresas mineras a restituir, de un modo cada vez más perfecto, los terrenos afectados por su actividad. Las técnicas de restitución más eficaces -y a la larga las más baratas-, son las que consisten en diferenciar diversos materiales en el estéril, para darles uno u otro tratamiento en función de su capacidad de producción de ácido.

De todo esto se desprende que es muy necesario conocer, antes de comenzar la explotación de una mina, los efectos que ésta va a tener en la calidad del agua, para diseñar, en consecuencia, las labores de restitución que reduzcan al mínimo el impacto negativo. Esto exige disponer de técnicas de predicción fiables y lo más sencillas posibles.

Actualmente, se exige que toda empresa minera presente, al solicitar una concesión, la previsión detallada del impacto que su actividad tendrá sobre la calidad de las aguas tras su abandono. La previsión deberá ser interpretada por el operador, por consultores especializados y por las autoridades reguladoras, y esta previsión constituye una parte importante de cara a la viabilidad final del proyecto.

Básicamente, la evaluación del potencial contaminante se desarrolla en las siguientes etapas: (1) comparación de la problemática con otras situaciones similares sucedidas en zonas parecidas; (2) diseño de un programa de muestreo a partir del cual se disponga de muestras representativas de las distintas zonas; (3) ensayos estáticos; (4) ensayos cinéticos basados en las condiciones conocidas; y (5) modelización.

Los ensayos estáticos sirven para determinar el balance entre los minerales potencialmente generadores de acidez y los minerales con potencial para neutralizarla. Los ensayos estáticos tienen la ventaja de que son sencillos y rápidos, pero no sirven para predecir la calidad de drenaje que emanará de una muestra a lo largo del tiempo. El proceso de generación de acidez y, por tanto, la calidad del drenaje son aspectos que dependen del tiempo, y son función de un número complicado y amplio de variables. Por ello, los ensayos estáticos sólo deben tenerse en cuenta como métodos de predicción cualitativa.

Los ensayos dinámicos sirven para confirmar la previsión de los ensayos estáticos, para determinar la velocidad de generación de acidez, de oxidación de sulfuros, de neutralización, y para evaluar la eficacia de las técnicas de control/tratamiento. Esta información es crítica porque en ocasiones la velocidad de generación de acidez puede ser insignificante, o sólo importante bajo extremas y puntuales circunstancias, de modo que no sería necesario implantar técnicas de control a largo plazo.

Los datos aportados por los ensayos cinéticos permiten diseñar técnicas de prevención de acidez muy específicas para cada caso concreto, lo que, a su vez, optimiza los costes de tratamiento.

Un objetivo que se pretende alcanzar es seleccionar y diseñar la disposición de los residuos de modo que, por un lado, la oxidación sea mínima y, por otro, los procesos de “autoneutralización” se puedan potenciar como resultado del apilamiento de los residuos.

La *British Columbia Acid Mine Drainage Task Force* ha elaborado una guía amplia en la que se detallan los distintos métodos de predicción de DAM, y en la que se discuten también distintas técnicas de control de drenaje ácido (*British Columbia Acid Mine Task Force*, 1989).

También el *U.S. Bureau of Mines* (Pittsburg, EE.UU) desarrolló una línea de investigación en el estudio de los factores que influyen en la disolución y transporte de los metales procedentes de los residuos mineros. Aspectos como la composición de los minerales presentes en los residuos, la disponibilidad de oxígeno, el pH, la fuerza iónica, las condiciones de almacenamiento de residuos, la influencia del tiempo de contacto entre residuo y agua, la influencia del apilamiento de montones, etc, son factores estudiados en profundidad por el grupo de investigación del *Bureau of Mines* (Doepker, 1991).

Otro organismo con experiencia de años en la investigación en estos temas es *CANMET* (Canadá).

La *EPA* ha publicado reglas muy estrictas para regular la actuación de la minería metálica (*Resource Conservation and Recover Act - RCRA*). Los planes de cierre y post-cierre son aspectos fundamentales en las consideraciones de la *EPA*. Con objeto de diseñar estos planes, y de un modo previo al desarrollo de la mina, los residuos mineros previstos deberán ser evaluados y analizada su capacidad potencial para generar acidez.

Los datos existentes acerca del comportamiento de residuos de minas parecidas, próximas incluso geográficamente, sometidas a parecidas condiciones ambientales, serán de gran interés y aportarán una información muy fidedigna. Ahora bien, normalmente no hay disponibilidad de estos datos, y por esto es tan necesaria la información que aportan los resultados de los ensayos estáticos y especialmente de los ensayos dinámicos. Aún así, se debe ser muy cuidadoso en la interpretación de resultados, pues puede ocurrir que un determinado material no genere acidez en las condiciones a las que se le ha sometido en el laboratorio y, sin embargo, bajo determinadas condiciones ambientales sí que la genere.

Del mismo modo, y como se ha apuntado anteriormente, la meteorización de un sulfuro metálico, y particularmente la pirita, no siempre genera acidez debido a que este sulfuro expuesto a las condiciones ambientales estará sometido a la capacidad de tamponamiento del medio natural a través de procesos químicos y biológicos, tales como la disolución de carbonatos o la reducción biológica de sulfatos (Moses, 1987).

### **1.3.3.- El papel de los microorganismos en la transformación de los residuos de mina**

La transformación de diferentes especies minerales a través de procesos microbiológicos es un aspecto común a todas las formas de vida, pero la transformación de cantidades significativas desde un punto de vista cuantitativo está restringida exclusivamente a un pequeño grupo de microorganismos. Todas las células vivas transforman elementos a través de sus reacciones enzimáticas, pero además, cierto grupo de microorganismos son capaces de transformar cantidades lo suficientemente representativas como para influir en la distribución geológica terrestre (Silverman y col., 1964). Como seguidamente se verá, bacterias, algas, hongos y protozoos pueden participar en estos procesos.

La actividad de estos microorganismos, en relación con la transformación de compuestos minerales, puede darse tanto asociada a procesos oxidativos como a procesos de reducción. Los microorganismos autótrofos quimiosintéticos oxidan minerales para obtener la energía necesaria para asimilar la fuente de carbono: el CO<sub>2</sub>. La reducción de compuestos minerales por parte de ciertos heterótrofos les aporta el poder necesario para la oxidación anaerobia de compuestos orgánicos y la obtención de la energía correspondiente.

Debido a la importante magnitud de la energía requerida por parte de estos microorganismos para disponer de dicho poder oxidante o reductor, importantes cantidades de minerales deberán ser transformadas.

### 1.3.3.a.- Microorganismos asociados a procesos de oxidación

Como ha quedado descrito en el apartado 1.3.2., la exposición de los sulfuros a condiciones ambientales cambiantes supone el desencadenamiento de una serie de reacciones que terminan con la generación de aguas ácidas. También ha quedado descrito en el mecanismo de oxidación de la pirita, que la etapa determinante de la velocidad del proceso es la etapa de oxidación del ion ferroso. La oxidación de ferroso a férrico es muy lenta a pH inferior a 4,5 y es por esto que la catálisis bacteriana es necesaria para alcanzar un elevado valor de la relación  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$  (Kleinmann y Crerar, 1979). La bacteria *Thiobacillus ferrooxidans*, acidófila y quimiolitótrofa, es la principal responsable de dicho proceso de oxidación.

Los residuos recién vertidos pueden tener valores de pH que oscilan entre 6,5 y 9. Sin embargo, las filtraciones, esorrentías o cualquier corriente que emigre de estos estériles alcanza valores de pH de entre 2 y 3 (Ritcey y Silver, 1982).

Esta acidez, como se ha explicado anteriormente, se debe a la oxidación química y microbiológica de los sulfuros. Sin embargo, es importante destacar que mediante una oxidación química sólo pueden alcanzarse valores de pH próximos a 4, siendo necesaria la participación de bacterias para llegar a valores por debajo de 3.

Es decir, que asociados a la generación de acidez se encuentran todos aquellos microorganismos que, de un modo u otro, colaboran o están relacionados con los procesos oxidativos, bien implicados directamente en la oxidación de minerales bien como microbiota asociada a éstos.

Diferentes tipos de microorganismos pueden estar relacionados con los procesos de generación de aguas ácidas, y ello, al menos, de cuatro formas diferentes (Dugan,1975):

- a) en la producción de ácido debida a la actividad metabólica de bacterias acidófilas del grupo de los *Thiobacillus*,
- b) en el efecto inhibitor del ácido sobre los microorganismos presentes en los acuíferos en los que puedan ser descargadas estas aguas,
- c) en el crecimiento de microorganismos tolerantes a medio ácidos, y
- d) en el desarrollo de bacterias reductoras de sulfatos, las cuales tienen la capacidad de reducir estos iones con la consiguiente precipitación de sulfuros.

Desde los primeros estudios de generación de aguas ácidas, se ha relacionado a las bacterias acidófilas del grupo *Thiobacillus* (*Thiobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus thiooxidans*, *Ferrobacillus ferrooxidans*) con los procesos de oxidación de la pirita y de otros sulfuros, y con la consiguiente producción de acidez. Estas bacterias obtienen su energía metabólica de la oxidación del ion ferroso y de compuestos reducidos de azufre (ambos presentes en los residuos de mina), siendo su fuente de carbono el CO<sub>2</sub>. Asimismo, tienen su pH óptimo de crecimiento en el intervalo comprendido entre 2,8 y 3,5. Se desarrollan en ausencia de compuestos orgánicos siempre que se mantenga una fuente inorgánica adecuada. Se entiende así que el valor óptimo de pH para el desarrollo de este tipo de bacterias se encuentre por debajo de 4, debido a la rápida oxidación del ion ferroso a valores de pH superiores y la consiguiente precipitación de hierro férrico.

Como todos los organismos vivos, estas bacterias son muy sensibles al ambiente que las rodea y aunque microorganismos como el *Sulfolobus* sean capaces de vivir en condiciones extremas de temperatura, las condiciones para la oxidación bacteriana de la pirita son muy restrictivas.

Particularmente importantes son las limitaciones impuestas por el pH, la temperatura y la concentración de iones presentes en el medio. Como se ha mencionado anteriormente, para los microorganismos del género *Thiobacillus* las condiciones óptimas de crecimiento se sitúan entre 25 y 45 °C de temperatura, y el valor óptimo de pH en torno a 2,5. Valores de pH inferiores a éste hacen que la cinética de disolución de la pirita disminuya, deteniéndose prácticamente cuando se alcanza el valor de 1 (Hiskey y col., 1981). Por otro lado, valores de pH superiores a 5-6, inhiben el crecimiento de la bacteria.

A pesar de sus limitaciones fisiológicas, las bacterias pueden iniciar su actividad en condiciones ambientales que no sean necesariamente sus condiciones óptimas de crecimiento, y de este modo conseguir que la velocidad de la reacción [26] sea considerablemente más rápida en condiciones naturales (agua de mina) que en un medio sintético en el que sólo se produzca la oxidación química (Hiskey y col., 1981).

En la Tabla V aparecen algunas especies bacterianas potencialmente implicadas en la generación de aguas ácidas.

Tabla V: Algunos microorganismos potencialmente implicados en la oxidación/reducción de compuestos de hierro y/o azufre

Organismo	Metabolismo
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	S y Fe oxidante
<i>T. thiooxidans</i>	S oxidante
<i>T. novellus</i>	S oxidante
<i>T. thioparus</i>	S oxidante
<i>T. denitrificans</i>	S oxidante
<i>Arthrobacter sp.</i>	S oxidante
<i>Bacillus sp.</i>	S oxidante
<i>Flavobacterium sp.</i>	S oxidante
<i>Pseudomonas sp.</i>	S oxidante
<i>Desulfovibrio sp.</i>	S reductora
<i>Desulfatamaculum sp.</i>	S reductora
<i>Salmonells</i>	S reductora
<i>Proteus sp.</i>	S reductora
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	Fe y S oxidante
<i>Metallogenium</i>	Fe oxidante
<i>Siderocapsa</i>	Fe oxidante
<i>Leptothrix spp.</i>	Fe oxidante
<i>Gallionella spp.</i>	Fe oxidante
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	Fe oxidante
<i>Aerobacter aerogenus</i>	Fe oxidante

Aunque en un principio se consideró a la bacteria *Thiobacillus ferrooxidans* como la principal implicada en la oxidación de sulfuros (Dugan, 1975; Kleinman y Crerar, 1979), con el desarrollo de la ecología microbiana se ampliaron los estudios relativos a ambientes ácidos y se llegó a la conclusión de que existe una amplia variedad de otras bacterias directamente relacionadas con la oxidación de intermedios inorgánicos, así como una gran variedad de microorganismos presentes en estos ambientes, que si bien no están directamente implicados en la oxidación, posibilitan, de alguna manera, el hábitat de los anteriores (Groudev y col., 1993).

Además de las diferentes especies de microorganismos litoautótrofos y lithoheterótrofos encontrados en ambientes mineros (Harrison, 1984; Carlson, 1980; Johnson, 1992; Kuenen y col., 1991), en la literatura científica se refleja el aislamiento de una amplia variedad de géneros encontrados en aguas de drenaje de minas, lo que viene a corroborar que la vida no es exclusiva de los “ambientes naturales del hombre”, sino que en ambientes extremos existe también abundancia y variedad de formas de vida (Johnson, 1992).

Así, en 1963 Ehrlich aisló levaduras y amebas de las aguas de drenaje de una mina. Levaduras del género *Rhodotorula* (Tuttle y col., 1968; Coto, 1994; López, 1994) han sido aisladas a partir de aguas ácidas de mina, las cuales crecieron a expensas de los metabolitos orgánicos excretados al medio por las bacterias autótrofas. Estas relaciones de simbiosis

permiten que el proceso general se vea favorecido por la coexistencia de varias especies de microorganismos (Gómez, 1993). Este es el caso de bacterias heterótrofas acidófilas del género *Acidiphilium* y *T. acidophilus*, que pueden utilizar como fuente de energía sustancias orgánicas que perjudican al *Thiobacillus ferrooxidans*. Aunque pueden existir también algunos microorganismos heterótrofos, consumidores de oxígeno, que excreten al medio productos inhibitorios para estos *Thiobacilli* (Groudev y col. 1978).

Asimismo, una amplia variedad de hongos, bacterias heterótrofas, algas, protozoos, artrópodos, etc, han sido aisladas en aguas con condiciones ácidas extremas (López, 1994).

El papel que puedan tener, en la transformación directa de compuestos, toda esta variedad de microorganismos presentes en ambientes ácidos extremos aún no está bien descrito. Es posible que muchas de estas formas de vida estén inactivas in situ (Cooke, 1966), como comprobó Cooke con una gran proporción de hongos que había aislado de aguas ácidas de mina. Sin embargo, también es cierto que de la variada comunidad microbiana presente en estos ambientes, muchos microorganismos viven en “consorcio”, de modo que, como ya se ha mencionado anteriormente, la actividad metabólica de los autótrofos estrictos presentes sea aprovechada por los heterótrofos. Así, las bacterias acidófilas y heterótrofas *T. acidophilus* y *T. organoparus*, son oxidantes de azufre pero también utilizan gran cantidad de compuestos orgánicos, tales como azúcares y ácidos orgánicos como electro-donantes. Por su parte, la especie *Acidiphilium* es exclusivamente dependiente de la materia orgánica para su crecimiento (Kelley, 1988).

Paradójicamente, el mismo tipo de microorganismos que causa el problema ambiental de la generación de aguas ácidas, es el que también se aprovecha biotecnológicamente para la extracción de metales a través del proceso de biolixiviación. Al potencial económico de estos microorganismos se debe el que se hayan buscado, y continúen buscándose, nuevas especies en ambientes mineros que sean capaces de mejorar la cinética de estos procesos.

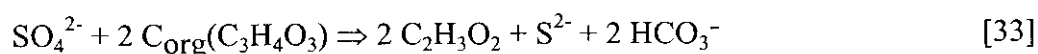
Sin embargo, el drenaje ácido ha sido sigue siendo, un aspecto incontrolado en minería. A pesar de que los residuos sólidos son confinados en áreas específicamente diseñadas para ello, es difícil controlar el efecto de la lluvia y su flujo a través de los estériles apilados. En caso de que los residuos sean depositados en presas, puede darse el peligro de las filtraciones. Por tanto, existen muchas corrientes incontroladas que van a acuíferos o torrentes naturales.

Además, el drenaje ácido tiene un efecto muy negativo sobre el medio natural en el cual se descarga. De hecho, éste causa una pérdida muy importante de la microflora de los ríos circundantes a los ambientes mineros, la cual es extremadamente sensible a medios tan ácidos. Las bacterias heterótrofas, tanto aerobias como anaerobias que se desarrollan en estos ríos, son uno de los grupos que más se ve afectado por el drenaje ácido. La razón de ello se encuentra en que las condiciones de acidez terminan por eliminar los compuestos orgánicos presentes en el medio, los cuales constituyen la base de su metabolismo. Por lo que se refiere a la anaerobiosis, ésta se ve alterada por los elevados potenciales que se dan en las aguas ácidas como consecuencia de la elevada concentración de especies oxidadas en disolución.

### 1.3.3.b- Microorganismos asociados a procesos de reducción

Un grupo importante de microorganismos relacionados con la transformación de compuestos presentes en las aguas de mina son las bacterias reductoras de sulfato. Estas bacterias son capaces de crecer en ambientes moderadamente ácidos y, siempre que exista una fuente de carbono en el medio, son capaces de reducir sulfatos provocando una disminución del potencial en su entorno. Son obligadamente anaerobias y, aunque no se trata de microorganismos acidófilos, son tolerantes a la acidez. Los dos géneros que más frecuentemente se encuentran en estos ambientes son el *Desulfovibrio* y el *Desulfatamaculum*. El crecimiento y desarrollo de ambos géneros ocasiona un incremento del pH además de la reducción de los sulfatos y la consiguiente precipitación de sulfuros.

Bajo condiciones anaerobias, las bacterias reductoras de sulfatos (BRS) son capaces de acoplar la oxidación de compuestos orgánicos a la reducción de sulfatos, en un mecanismo en el que el sulfato actúa como aceptor de electrones y el compuesto orgánico como dador (Dvorak, 1991):



El H<sub>2</sub>S formado reacciona de inmediato con los cationes metálicos presentes en el medio:



donde M: Fe, Zn, Ni, Cd, Cu, Pb...

Los iones bicarbonato consumen protones y de este modo se incrementa el pH:



La precipitación de metales inducida por el metabolismo de estas bacterias se aprovecha, como veremos en el apartado 1.4., para el tratamiento de aguas ácidas de mina.

La eficacia en la eliminación de metales está asegurada siempre que haya suficiente  $\text{H}_2\text{S}$  en el medio, lo cual, a su vez, viene condicionado por la cantidad de materia orgánica disponible. Por tanto, para poner a punto un método de tratamiento de drenaje ácido de minas mediante BRS deberá tenerse en cuenta que puede ser un factor limitante importante la cantidad de sustrato orgánico oxidable.

La velocidad de reducción de los sulfatos depende mucho del pH, y el valor óptimo oscila entre 7 y 7,5. En ocasiones, estas bacterias pueden acoplar la reducción de sulfatos a la oxidación del hidrógeno a través de unas enzimas denominadas hidrogenasas que les confieren esta capacidad de vivir en autotrofia.

Los hábitats más frecuentes en los que se encuentran distribuidas las BRS son aquellos en los que existen condiciones anaerobias. Normalmente, las BRS que se utilizan para el tratamiento de DMA se aíslan de los propios medios mineros. También, en los sedimentos de lagunas, en el fondo de presas de residuos y, en general, en los sistemas anaerobios de desechos industriales.

Aunque, las especies más frecuentes que se aíslan del DAM, y de las que más amplia información se recoge en la bibliografía, pertenecen a los géneros *Desulfovibrio* y *Desulfobacter*, sin embargo, en la mayoría de los casos tienden a utilizarse cultivos mixtos aislados en los ambientes mineros, ya que se ha comprobado que se adaptan mejor a las condiciones de las aguas a tratar.

Como características generales de las BRS se deben mencionar:

- el requerimiento de condiciones anaerobias para su crecimiento,
- la necesidad de una fuente de carbono; y
- un intervalo de pH óptimo de crecimiento que oscila entre 6,5 y 7,5.

La reducción de sulfatos es, por tanto, el proceso opuesto a los procesos de oxidación catalizados por los *Thiobacilli* y otras bacterias litoautótrofas (Arnsen y col., 1991).

### 1.3.3.c.- Sucesión de microorganismos en la generación de aguas ácidas

Se ha dicho anteriormente que como resultado de las operaciones mineras, los sulfuros son expuestos a la acción del agua, el oxígeno y especies químicas disueltas, desencadenándose los procesos que aceleran la oxidación del mineral. Bajo las condiciones ambientales naturales, la degradación de este material mineral es un proceso dinámico que supone la sucesión de poblaciones microbianas (Kelley, 1988).

La disolución oxidativa de un sulfuro mineral está asociada comúnmente con una importante acidificación en el entorno. Este hecho condiciona la sucesión de especies que se van a desarrollar en un determinado rango de pH. En condiciones ambientales, la degradación de un sulfuro mineral se ve afectada por una complicada interacción de parámetros físico-químicos como la disponibilidad de oxígeno, de dióxido de carbono, de agua y de nutrientes. Las condiciones climatológicas también juegan un papel importante, especialmente la temperatura y la lluvia. La composición mineralógica del residuo también influye en las condiciones de disolución-oxidación y determina las especies bacterianas que se vayan a establecer (Dave y col., 1987; Kelley, 1988): la presencia de ganga con una elevada concentración de materia de naturaleza básica hace que se consuma una parte importante del ácido, lo cual desplazará a algunos microorganismos. Asimismo, la presencia de metales como arsénico, plata o molibdeno, asociados a la ganga, puede ser tóxica para algunas especies de bacterias quimioautótrofas (Lundgren y Silver, 1980).

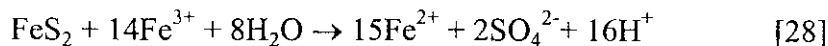
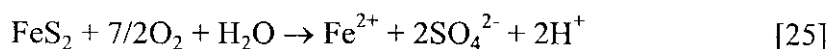
En presas de residuos y depósitos en general, se dan unas condiciones ambientales extremadamente complejas y variadas. Estas variaciones vendrán determinadas, por un lado, por las diferentes “categorías” minerales que se envían a la presa de residuos en función del ciclo de producción; por otro lado, por las diferentes condiciones físico-químicas (disponibilidad de oxígeno, agua, etc) que se establezcan. El tiempo de residencia también es otro parámetro a tener en cuenta.

Muchos investigadores son escépticos al relacionar a las bacterias con los procesos de oxidación del mineral. El argumento que utilizan es que especies acidófilas como el *T. ferrooxidans* son incapaces de oxidar ion ferroso a pH por encima de 3,5 ó 4,0, no pudiéndose explicar, entonces, lo que sucede con los residuos recién vertidos que tienen valores de pH básicos o neutros .

En definitiva, es difícil explicar cómo bacterias del género *Thiobacillus*, que requieren condiciones extremas de acidez para su crecimiento, puedan imponerse como población dominante y condicionar el ambiente en los entornos de los vertidos mineros.

Los cambios químicos que se producen desde el momento en que un residuo se abandona van acompañados de cambios microbiológicos, de modo que aparece una mutua interrelación: ciertos cambios químicos favorecen el desarrollo de ciertos microorganismos y, por otro lado, el desarrollo de determinados microorganismos implica modificaciones químicas como consecuencia de su metabolismo.

Se ha comprobado cómo la generación de acidez asociada a los residuos mineros es el resultado de la oxidación de los sulfuros, principalmente pirita, contenidos en dichos residuos y que la velocidad de degradación está relacionada con la velocidad de oxidación del ion ferroso. Como se ha mencionado anteriormente, la oxidación de la pirita sucede a través de las siguientes reacciones:



La segunda reacción es mucho más rápida que la primera, pero sólo tiene importancia cuando la relación  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  es superior a 2. La oxidación química del ion ferroso transcurre rápidamente a pH por encima de 4,5, pero en el intervalo entre 2,5 a 4,5 es extremadamente lenta. Es por esto que la catálisis bacteriana se hace necesaria para aumentar la velocidad de oxidación del ferroso.

Los investigadores Walsh y Mitchell (Walsh y Mitchell, 1972) dieron una explicación de cómo sucede la generación de acidez en ambientes naturales. En estas condiciones, el fenómeno comienza con la oxidación química, la cual transcurre a través de las reacciones [25] y [28]. Esto deja el pH ambiental en torno a 4,5. A este pH la bacteria *Metallogenium* es capaz de oxidar ion ferroso y consigue disminuir el pH hasta 3,5. En este punto, *T. ferrooxidans* es capaz ya de intervenir disminuyendo entonces el pH hasta valores próximos a 2,5 o inferiores.

Cuando las condiciones químicas del medio son cercanas a la neutralidad, tienden a predominar las especies heterótrofas (Harrison, 1978). Bacterias, algas, hongos y levaduras

se desarrollan bien en estas condiciones. A medida que las condiciones van cambiando, unas poblaciones desplazan a las otras. *El Thiobacillus ferrooxidans* es capaz de colonizar y acidificar un ambiente cercano a la neutralidad mediante el establecimiento previo de una sucesión de bacterias dependientes del pH (Kleinman y Crerar, 1979). Fruto del estudio acerca del papel que distintas bacterias juegan en la oxidación del ion ferroso en distintos intervalos de pH, los investigadores Walsh y Mitchell (Walsh y Mitchel, 1972) aislaron la bacteria *Metallogenium* y comprobaron que dicha bacteria era capaz de oxidar el hierro ferroso ocasionando un descenso importante del pH y posibilitando de este modo que especies acidófilas empezaran a desarrollarse. Cuando las condiciones del medio se habían hecho más extremas, predominaron las poblaciones acidófilas quedando desplazadas las anteriores.

#### **1.4.- APLICACION DE LA REDUCCION BIOLOGICA AL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE MINA**

Las técnicas que tradicionalmente se han utilizado para el tratamiento de aguas residuales de mina se han basado en métodos químicos de neutralización-precipitación. Estas técnicas, si bien proporcionan métodos rápidos y eficaces de tratamiento, presentan bastantes inconvenientes como el elevado coste de los reactivos químicos empleados, la necesidad de montar plantas adicionales de tratamiento y la generación de una importante cantidad de lodos que necesitan ser reubicados.

Los métodos pasivos de tratamiento biológico constituyen una alternativa importante a los clásicos métodos de tratamiento (Kalin y col., 1995; Gazea y col., 1996). El planteamiento en el que se basan es el siguiente: si la microbiota asociada a los residuos tiene capacidad suficiente para degradarlos, por qué no aprovechar esta circunstancia para tratarlos. La metodología de trabajo pasaría por potenciar la actividad metabólica de aquellas especies que se encuentran “in situ”, asociadas al residuo, y que pueden permitir la restauración del sistema.

Como alternativa a los métodos de bioacumulación y bioadsorción aplicables al tratamiento de efluentes de mina (Raraz, 1995), la bioprecipitación es el que tiene una aplicabilidad más directa. La diversidad microbiológica que se desarrolla asociada a ambientes mineros ha quedado patente en el apartado 1.3. Una de las comunidades microbianas que aparecen en estos ambientes es la de microorganismos anaerobios (Dugan, 1975; Babij y col, 1980). Dentro de éstos, las bacterias anaerobias reductoras de sulfatos (BRS) aparecen como una alternativa a los métodos de tratamiento convencionales.

Por tanto, del mismo modo que se aprovecha el potencial de las bacterias litoautótrofas que se encuentran asociadas a los residuos minerales para la disolución y obtención de metales, se podrá aprovechar el potencial de las BRS, que son también microflora presente espontáneamente en estos ambientes, para el tratamiento del DMA. De hecho, la “remineralización” de metales tiene lugar de modo natural en los sedimentos de los océanos, en los lagos y en los humedales (*wetlands*). El reto de la reducción biológica de sulfatos está en optimizar estas condiciones de remineralización en el contexto de las áreas mineras de residuos (Kalin y col., 1993).

#### 1.4.1.- Bacterias anerobias reductoras de sulfatos (BRS).- Bioreactores

*Mine waste* y *mine reclamation* son dos términos muy utilizados en la minería mundial que se relacionan con problemas medioambientales muy importantes y que preocupan especialmente tanto a las industrias mineras como a los organismos de regulación de vertidos. Con las características propias de cada vertido y de cada caso en particular, el problema ambiental relacionado con la minería pasa por la solución de dos aspectos fundamentales: la neutralización de los efluentes y la eliminación de los sulfatos y metales disueltos.

La aplicación de las BRS al tratamiento de drenaje de minas supondría no sólo la generación de alcalinidad, sino también, la precipitación de los metales y sulfatos presentes. Los lodos adicionales que se originarían por la aplicación de este tipo de tecnología serían significativamente menores que en el caso de los tratamientos químicos (Bechard, 1990).

Las BRS requieren condiciones anaerobias y bajos Eh para su crecimiento. En las presas de residuos mineros las aguas superficiales son muy pobres en nutrientes y presentan elevada acidez, así como elevadas concentraciones de metales y sulfatos. Sin embargo, estas condiciones son significativamente diferentes en los sedimentos, donde la generación de alcalinidad, en parte promovida por la acción de las propias BRS, tiene lugar de un modo natural (Kalin, 1991). Estas condiciones pueden darse en la franja próxima a los sedimentos de las presas de residuos mineros, así como en las capas más profundas de los depósitos de sedimentos. Entre los géneros de BRS más abundantes se encuentran: *Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Desulfatomaculum*, *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfobulbus*, *Desulfococcus*, *Desulfonema*, *Desulfosarcina* y *Thermodesulfobacterium*. Se ha determinado que la actividad reductora de estas especies puede variar entre las 0,29

y las 846 ppm/día de eliminación de sulfatos en condiciones naturales, pudiéndose alcanzar hasta un 48% de eficacia en sistemas naturales que reciben directamente agua de mina. La reducción biológica de sulfatos puede además potenciarse por medio de la adición continua de una fuente de carbono que permita el mantenimiento de la actividad biológica de la comunidad microbiana en condiciones óptimas (Bechard, Rajan, Saley y McCready, 1990).

La reducción biológica de sulfatos no es el único proceso de reducción biológica que tiene lugar en los depósitos anaerobios de ambientes mineros residuales. La reducción de hierro y manganeso, la metanogénesis y la reducción de nitratos son procesos que tienen lugar siempre que existan especies microbianas que dispongan de fuentes de carbono para hidrolizar y fermentar (Cairns y col., 1991). Por eso, se insiste en que un parámetro fundamental para controlar los procesos de remineralización es el mantenimiento de un flujo adecuado de una fuente de carbono orgánica (Kalin y col., 1993).

Un aspecto de bastante controversia respecto a la aplicabilidad de las BRS para el tratamiento de DAM es que estas bacterias requieren unas condiciones de acidez de al menos pH 4. Para que las BRS presentes en un ecosistema puedan continuar activas, aún en condiciones extremas (por ejemplo, en presencia de aguas ácidas), es necesario que las comunidades microbianas estén adaptadas (Kalin y col., 1993), o que previamente al paso del tratamiento biológico, se diseñe a nivel industrial un proceso de neutralización suave y, por tanto, menos costoso.

Aún así, se han conseguido muy buenos resultados a nivel de laboratorio mediante la aplicación de un sistema en continuo de reducción biológica. Se han conseguido alcalinizar aguas artificiales de mina desde valores de 3,5 hasta 6, lo que fue acompañado por una substancial eliminación de hierro y sulfatos (Bechard, Rajan y McCready, 1990).

La bioprecipitación o el tratamiento biológico de aguas de mina es también aplicable a la eliminación de compuestos especialmente tóxicos, como es el caso del arsénico. Se han conseguido buenos resultados a nivel de laboratorio en la conversión de complejos solubles de arsénico en sulfuros insolubles (Belin y col., 1993). La ventaja de la inmovilización y retención del arsénico en los lodos es que evita el peligro de la migración y contaminación consiguiente de los acuíferos.

La experimentación relacionada con la reducción biológica de sulfatos ha llegado al nivel de planta piloto. En distintos bioreactores, en los que se aporta una fuente de carbono de muy diverso origen (serrín, turbas, hojas de plantas, paja, etc., -Kalin y col., 1993; Béchard

y col., 1993-), se ha conseguido la adaptación de poblaciones de BRS, obteniéndose rendimientos del 95% en la precipitación de Fe, Zn, Mn, Ni y Cd (Dvorak, 1991). El diseño de estos reactores necesita la eliminación del oxígeno, una fuente de sulfatos y una fuente de materia orgánica.

Como se ha dicho, valores de pH inferiores a 5 inhiben el crecimiento de las BRS e incrementan la solubilidad de los sulfuros formados. Es por esto que se necesita diseñar reactores de tal modo que se genere la alcalinidad suficiente para aumentar el pH de los influentes (Dvorak, 1991).

En general, los métodos convencionales de reducción biológica de sulfatos utilizan bioreactores en los que las bacterias entran en contacto directamente con la corriente que se va a tratar. Esto supone una pérdida importante de efectividad en el tratamiento debido a que, como se ha dicho anteriormente, estas poblaciones bacterianas son sensibles a los bajos valores de pH y también a elevadas concentraciones de metales. Con objeto de mejorar las condiciones de la reducción biológica de sulfatos convencional, se ha desarrollado el *Biosulfide process*. La novedad principal que aporta este proceso consiste en que la reducción biológica de sulfatos se separa físicamente de la etapa de precipitación química. Sólo pasa al bioreactor una fracción determinada y seleccionada de la corriente, cuya elección ha sido previamente establecida en función de sus características. Los metales precipitados y la biomasa están separados físicamente, lo que puede permitir la separación de los metales selectivamente e, incluso, su recuperación para la venta (Rowley y col., 1994).

Basándose en esta idea se han diseñado bioreactores y sistemas con los que se han conseguido alcalinizar efluentes con valores de pH en torno a 2, y se ha conseguido llevar a 0,1g/l la concentración de metales, partiendo de valores del orden de 550 mg/l de Fe, 140 mg/l de Al, 92 mg/l de Cu y 60 mg/l de Zn (Hammack y col., 1994).

#### **1.4.2.- Participación de las BRS en métodos pasivos de tratamiento: humedales**

Anteriormente, se han definido las tecnologías pasivas de tratamiento de aguas contaminadas como aquellas que aprovechan procesos químicos y/o biológicos naturales para mejorar las condiciones del agua contaminada. La base de los sistemas de tratamiento pasivo es la de crear condiciones físico-químicas que promuevan procesos que eliminen los contaminantes.

En un sistema de tratamiento pasivo se potenciarán aquellas reacciones químicas que interesen y se adecuarán las condiciones para que también se promueva el crecimiento de los microorganismos que favorezcan el proceso.

El concepto de tratamiento pasivo se aprovecha en el diseño de los *pantanales* o *humedales* (*wetlands*) para el tratamiento del DAM (Kleinmann y col., 1991). En realidad, en los pantanales se tratarán de reproducir, de un modo controlado, muchas reacciones y procesos que suceden de modo natural, a veces con consecuencias indeseables. Por ejemplo, cuando un agua ácida generada como consecuencia de un proceso de oxidación de residuos mineros alcanza un cauce natural, se produce espontáneamente una neutralización y, consiguientemente, una precipitación de los metales disueltos, ocasionando la formación de lodos (óxidos, hidróxidos y oxihidróxidos) que recubren en muchas ocasiones los cauces de los ríos contaminados por efluentes mineros (Mansferrer, 1994).

Los pantanales o humedales son remansos de agua en los que se desarrolla un ecosistema capaz de variar las características del agua que se le hace llegar. En él tienen lugar los siguientes procesos:

- precipitación de hidróxidos
- **reducción de sulfatos y precipitación de sulfuros**
- bioretención de metales
- intercambio catiónico
- adsorción de materia orgánica

En la parte anaerobia del humedal, los procesos químicos y microbiológicos que tienen lugar difieren de los observados en los ambientes aerobios. Cuando el agua residual fluye a través de un ambiente anaerobio que contiene un sustrato orgánico, la química del agua se ve afectada por la reducción bacteriana de los sulfatos, observándose experimentalmente que la concentración de éstos disminuye en el agua con la profundidad, es decir, en aquellas zonas donde estas bacterias se muestran activas (Calabrese y col., 1991).

Se han conseguido buenos resultados en el tratamiento de DAM mediante humedales. Así, se han alcanzado valores de pH en torno a 6-6,5 partiendo de efluentes con valores de pH de 2-3,5 (Calabrese y col., 1991; Hendricks, 1991).

El tiempo de retención y la extensión de un humedal son dos parámetros fundamentales con los que se debe jugar para optimizar las condiciones de tratamiento del agua. Aunque

existen publicadas ciertas reglas o pautas que relacionan el pH del agua influente con el número de metros cuadrados que se requieren para su tratamiento (Norton, 1993), es difícil hacer una predicción. La planificación deberá realizarse tomando en cuenta todas las consideraciones relativas a la calidad del agua a tratar y la del agua a producir.

### **1.5.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL TRABAJO**

Uno de los costes con el que inexcusablemente deben contar actualmente las empresas mineras es el relacionado con el impacto ambiental de sus operaciones. Dentro de éste se engloban aspectos tan diversos como el impacto de las labores de extracción (polvo, ruidos, impacto visual, etc) y los relacionados con el tratamiento de los residuos generados en el proceso.

Las empresas con intereses en la minería de sulfuros invierten cantidades de dinero muy importantes en el tratamiento de sus residuos y tienen que solucionar problemas de contaminación medioambiental relacionados no sólo con la propia naturaleza del residuo sino también con los productos de las transformaciones que éste experimenta durante su almacenamiento. Un mayor conocimiento de los mecanismos por los cuales el residuo sufre esta degradación permitiría aplicar estrategias previas orientadas a la prevención en lugar de al tratamiento de los efluentes generados. Esto posibilitaría la aplicación de medidas de control más económicas y flexibles que podrían acomodarse a los cambios que eventualmente pudiera sufrir el vertido.

Un caso bastante representativo de este tipo de empresas mineras es el de las que se dedican al tratamiento de sulfuros complejos polimetálicos, que en realidad son piritas masivas con contenidos apreciables de otros sulfuros metálicos con interés económico. Entre ellos, calcopirita, esfalerita y galena son los más importantes, aportando cobre, cinc y plomo, que en conjunto suponen algo más del 5% del mineral.

Estas menas son sometidas, después de realizadas las labores mineras y una adecuada reducción de tamaño para liberar las distintas fases minerales, a una etapa de concentración por flotación. Como es fácil suponer, el residuo de esta operación está formado esencialmente por piritita con un grado de pureza muy apreciable y por tanto con un potencial de generación de drenajes ácidos muy considerable.

La situación de partida que generó el presente trabajo fue el estudio de un sistema del cual se tenía la siguiente referencia: a un dique de estériles se vertía una pulpa desde una

planta de flotación, la cual tenía unas características de pH alcalino y de baja concentración de metales; sin embargo, el agua de rebose de la presa en la que se almacenaban estos residuos piríticos, presentaba una acidez elevada y un incremento considerable en la concentración de metales. El ion sulfito presente en las colas de flotación tenía inicialmente una concentración aproximada de 100 ppm, y aparecía en el residuo final en una concentración en torno a las 3-5 ppm.

Partiendo de esta situación, el objetivo fundamental del presente estudio fue el de evaluar la magnitud de las transformaciones que afectaban a la pulpa residual pirítica desde que se abandonaba a la salida de la planta de flotación hasta que llegaba a la presa, y cuando se almacenaba en la propia presa. Para ello, el trabajo experimental se planificó de acuerdo a alcanzar tres objetivos fundamentales:

#### 1º.- Valoración de la situación real y cuantificación de las transformaciones

Esta primera etapa supone un muestreo exhaustivo del sistema, así como su caracterización química, mineralógica y microbiológica. A partir de los datos anteriores se debe valorar la magnitud de la transformación, la distribución microbiológica y la caracterización química del sistema. Todo ello para definir un conjunto de “zonas” o “ambientes” de características concretas dentro de la presa de estériles a estudiar y más concretamente en referencia a los residuos sólidos y líquidos que contenía.

#### 2º.- Estudio de los factores implicados en las transformaciones microbiológicas y químicas de la presa

En esta segunda etapa se deben evaluar los distintos factores que puedan contribuir a las transformaciones. Se estudiará la oxidación química del ion sulfito y la posible participación microbiológica en la misma.

Para evaluar la oxidación química y/o microbiológica del residuo se realizarán ensayos de meteorización, mediante los cuales se podrá seguir la evolución de la pulpa bajo condiciones controladas que tratarán de simular los distintos ambientes o zonas encontrados en la presa.

A partir de estos ensayos se concretarán los factores más determinantes que contribuyen al deterioro del residuo almacenado.

## ***Materiales y Métodos***

## 2.1.- MUESTREOS

### 2.1.1.- Descripción del área de estudio

El sistema objeto de estudio fue una presa de decantación de estériles que retenía el residuo generado en el circuito de flotación de un mineral sulfurado. A esta presa eran conducidas las llamadas “colas de flotación” mediante un sistema de caída por gravedad a través de un recorrido de aproximadamente 2,3 kms, invirtiéndose en torno a 30 minutos en realizarlo. La ubicación de esta presa, así como el recorrido de las “colas de flotación”, están detallados en la Figura 3.

El residuo que se vertía desde la planta de flotación (“colas de flotación”) la abandonaba en forma de pulpa con una densidad en sólidos de entre el 25 y el 30 %. El caudal de salida era de 80 t/h de sólidos, lo que suponía un aporte diario a la presa de 700 toneladas; por su parte, el caudal de agua era de 193 m<sup>3</sup>/h. El pH que poseía la pulpa a la salida de la planta oscilaba entre 9 y 10. La deposición del sólido de la pulpa en la presa era mediante sedimentación. Una vez en la presa, la propia deposición de la pulpa hacía que se establecieran distintas zonas o “ambientes” de acuerdo a las siguientes características: una parte del mineral quedaba expuesto superficialmente, depositándose en forma de lenguas (A); la mayor parte del sólido quedaba en el fondo (C), sumergido bajo agua superficial clara (B). Esta distribución de la pulpa en la presa está ilustrada en la Figura 4.

El balance de aguas en una presa de estériles es muy importante, de ahí que sea necesario controlar todos los aportes que puedan acabar en ella (lluvia, escorrentía, etc). Para ello, se construyó en torno a la presa un canal perimetral que bordeaba el dique.

Las condiciones climatológicas de la zona presentaban unos valores anuales medios de evotranspiración (ETP) superiores a la precipitación anual. Este factor unido a la existencia de canales perimetrales hizo que el balance de aguas fuera positivo.

#### 2.1.1.a.-La mina

Los residuos que se vertían en la presa anteriormente descrita procedían de una planta de flotación diferencial que procesa sulfuros polimetálicos. El término de “sulfuro complejo”, también llamado “pirita compleja” o “sulfuro polimetálico”, se aplica a minerales de matriz pirítica en la que se encuentran finamente disseminados sulfuros de otros metales no féreos, principalmente de Cu, Pb, y Zn.

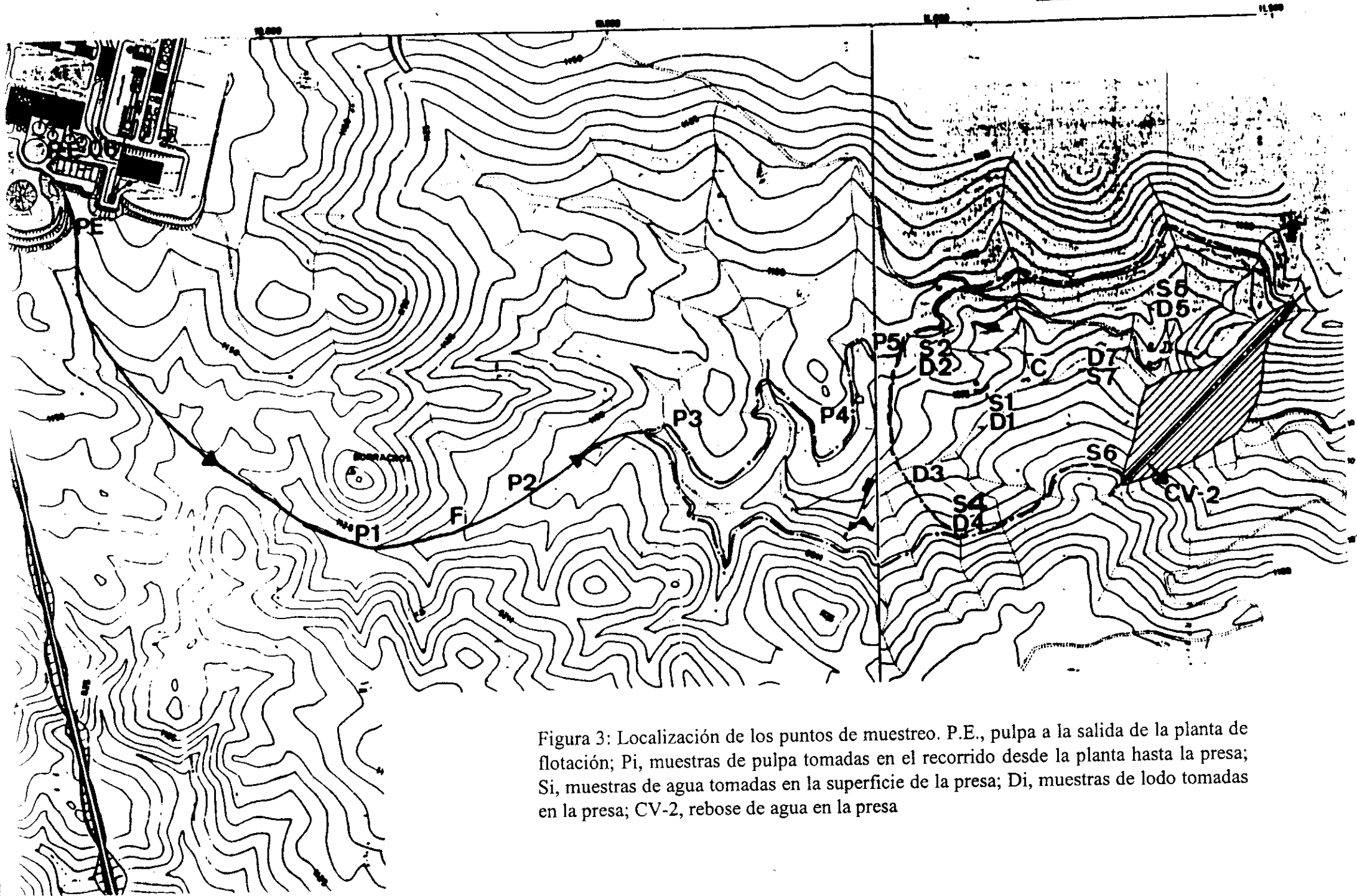


Figura 3: Localización de los puntos de muestreo. P.E., pulpa a la salida de la planta de flotación; Pi, muestras de pulpa tomadas en el recorrido desde la planta hasta la presa; Si, muestras de agua tomadas en la superficie de la presa; Di, muestras de lodo tomadas en la presa; CV-2, rebose de agua en la presa

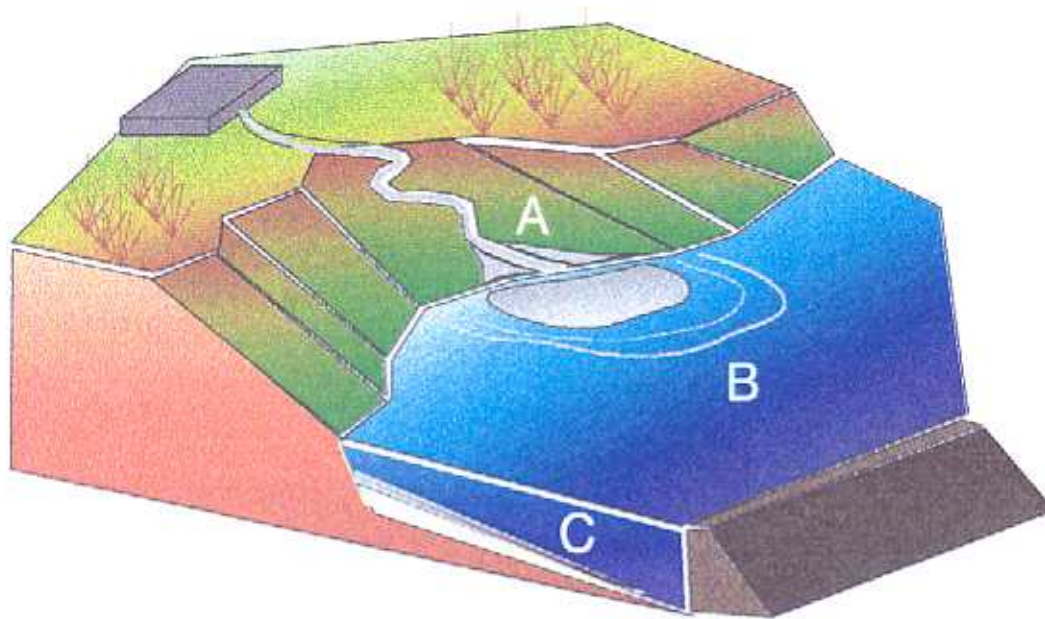


Figura 4: "Ambientes" en la presa de estériles

El yacimiento se encuentra en una región metalogenética bien conocida, la denominada Faja Piritica, la cual se extiende a lo largo del suroeste de España y sur de Portugal (Figura 5).

La riqueza del mineral es del 0,6% en Cu, 1,6% en Pb, 4,5% en Zn y 42% en S. Los productos vendibles son concentrados metálicos de Cu, Pb, Zn, ácido sulfúrico-oleum producido al tostar la piritita residual, y sulfato de cobre extraído de las cenizas de tostación. En la actualidad, se tratan 720.000 toneladas/año, con una producción vendible de 70.000 t de concentrados, de las cuales 60.000 lo son de Zn. La capacidad de producción de ácido sulfúrico - óleum es de 345.000 t y de sulfato de cobre de 2.000 t.

#### 2.1.1.b.- Geología

La comarca del Andévalo, dentro de la cual se encuentra la mina citada, está constituida geológicamente por rocas muy antiguas de carácter ácido en su mayoría. Se trata de pizarras del Devónico Superior, y al norte y sur de esta formación predomina el Carbonífero que determina la existencia de suelos arcillosos pobres y poco desarrollados.

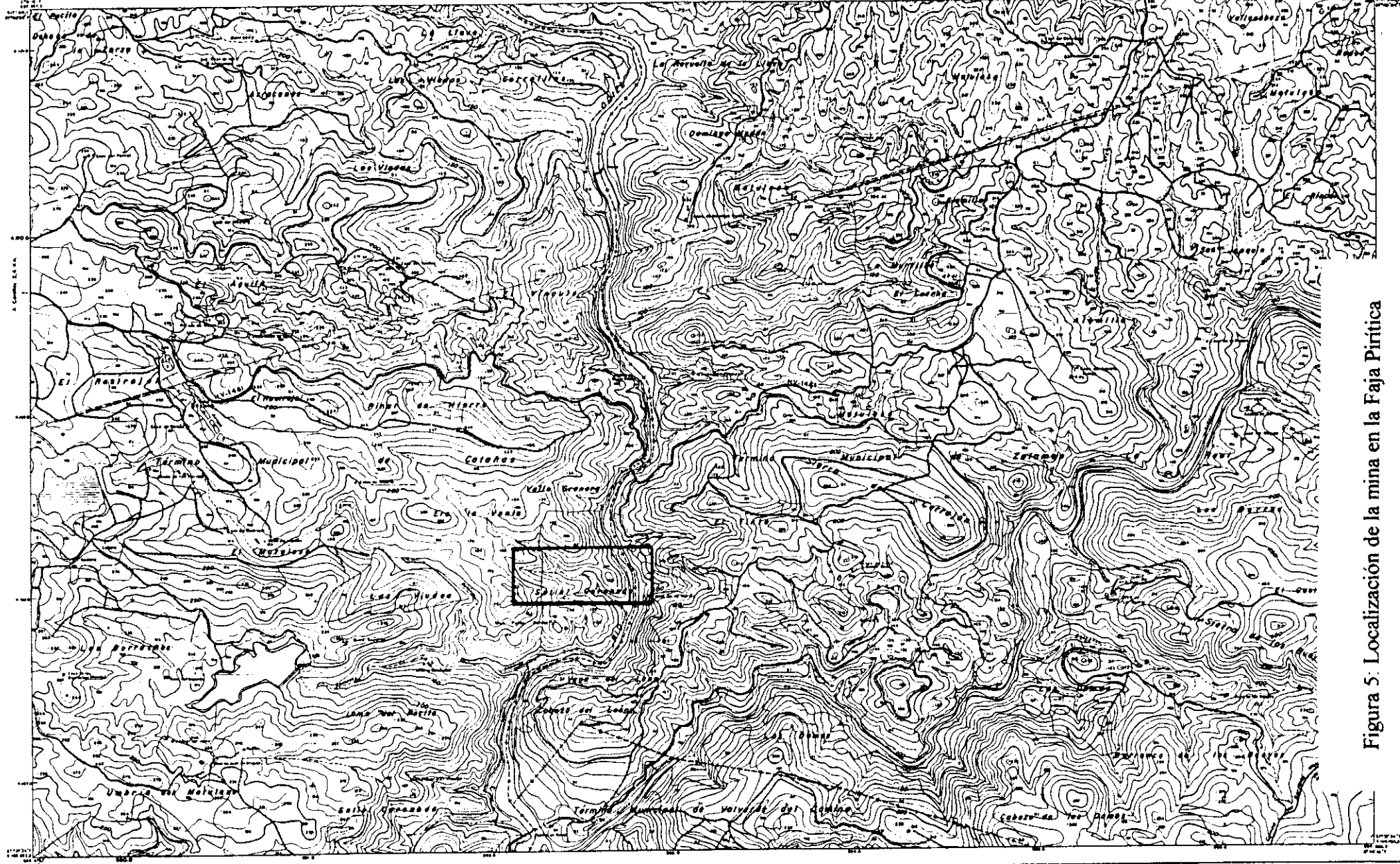
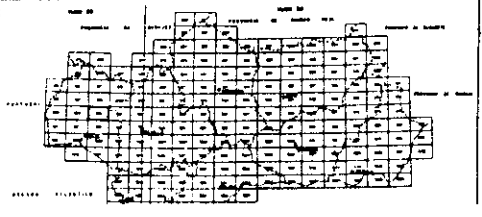
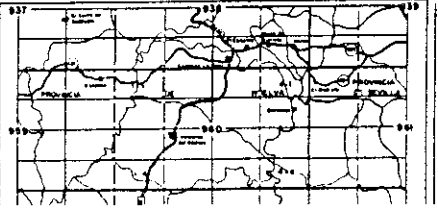


Figura 5: Localización de la mina en la Faja Pirítica

SIGNOS CONVENCIONALES	USOS DEL SUELO

INFORMACION
<p>Elaborado en las oficinas de Nivel y Levantamiento</p> <p>Fecha: 1960</p> <p>Escala: 1:10.000</p> <p>Proyecto: 10.000/60</p>



MAPA TOPOGRAFICO DE ANDALUCIA

ESCALA 1:10.000

(960) 1-1

AMBITO ZALAMEA LA REAL, CALAÑAS, VALVERDE DEL CAMINO. (HUELVA)

### **2.1.1.c.-Hidrogeología**

Los materiales que afloran en el área afectada por la presa pertenecen a una serie de rocas volcánicas, en las que se intercalan pizarras, tufitas y tobas. La fracturación se encuentra poco desarrollada, encontrándose las fracturas existentes rellenas de material arcilloso procedente de la alteración de las rocas de la zona.

Es necesario destacar que dadas las características generales de impermeabilidad de estos materiales, no existen acuíferos subterráneos aprovechables de importancia. Las captaciones de agua subterránea más importantes, a una distancia de varios kilómetros de la planta, se encuentran totalmente desligadas hidrológicamente de la zona.

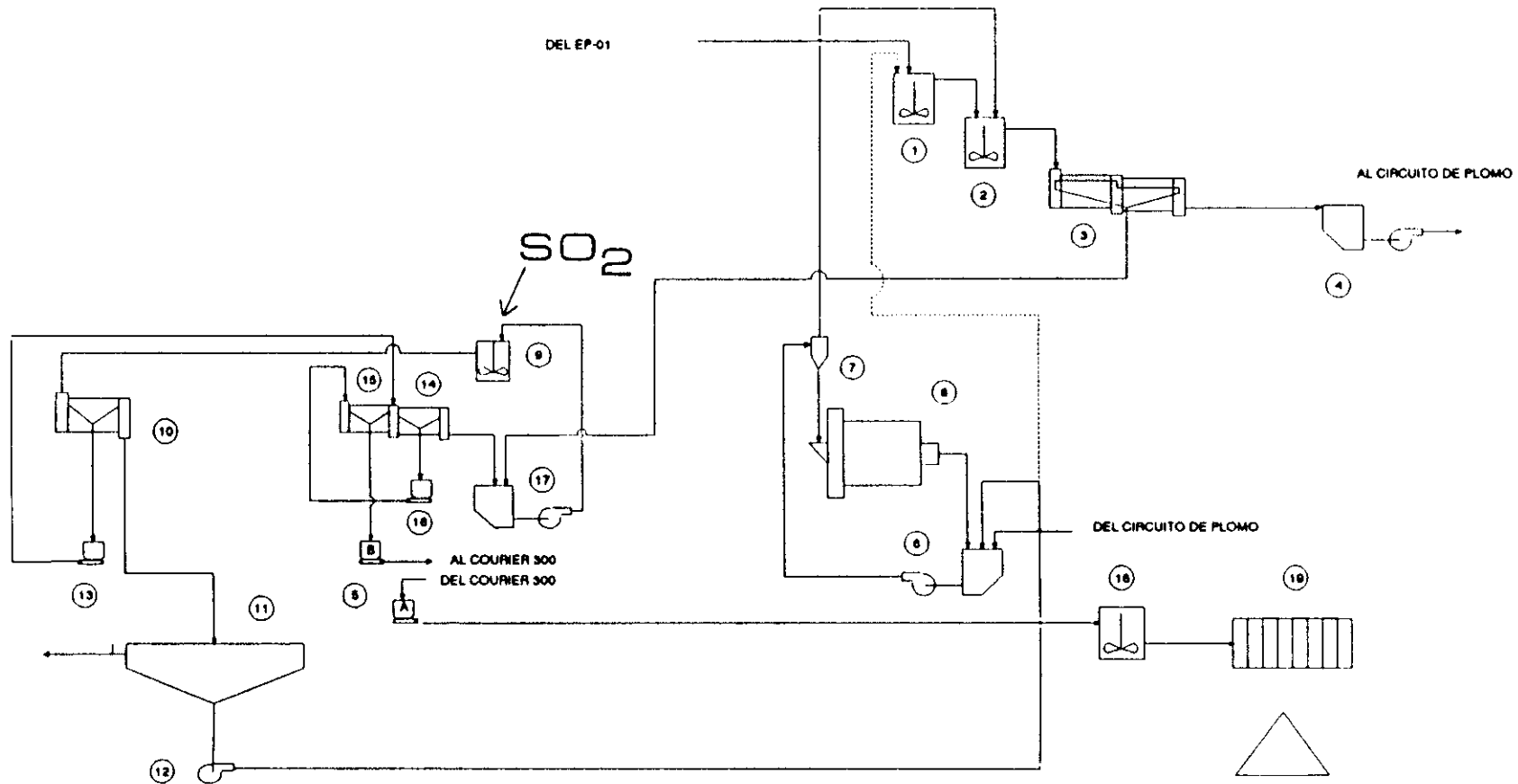
### **2.1.1.d.- La planta de flotación**

El primer paso para transformar el mineral extraído de la mina es convertir el mismo en concentrados vendibles a las fundiciones. Esto se realiza mediante el proceso de flotación diferencial, que a su vez, previamente, requiere una preparación granulométrica del mineral. Entonces, el proceso mineralúrgico se lleva a cabo en dos plantas diferenciadas: la planta de trituración secundaria y terciaria, y el concentrador.

Es en el concentrador donde se realiza la flotación diferencial y donde se obtienen los concentrados de cobre, plomo y cinc, y además pirita. Es también en el concentrador donde tiene lugar la adición de los distintos reactivos de flotación, así como del  $\text{SO}_2$ , el cual rápidamente pasa a disolución y aparece en el residuo final en forma de ion sulfito. En la Figura 6 se ilustra el proceso de flotación del cobre indicándose el punto en el que tiene lugar la adición de ácido sulfuroso, así como la generación de los estériles que serán enviados al dique.

Además del residuo mineral estéril propiamente dicho, a esta pulpa residual acompañan en su vertido a la presa los reactivos de flotación empleados, que estarán en bajísima concentración. En la Tabla VI se describe la distribución de los distintos reactivos que se adicionan en el proceso de flotación y que pueden aparecer minoritariamente acompañando al residuo.

La propia naturaleza del proceso de flotación obliga a la utilización de la vía húmeda como soporte del proceso y genera en consecuencia pulpas de sólidos. Estas se retienen en la



- |                                     |                                     |
|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 1 ACONDICIONADOR 1. 1.2 x 3.5       | 11 ESPESADOR DE COLA 15 m           |
| 2 ACONDICIONADOR 2. 2.4 x 3.5       | 12 BOMBA 5X4                        |
| 3 CELDAS DE DESBASTE (7-300FT3) 3+4 | 13 BOMBA 8" VERTICAL                |
| 4 BOMBA 6X6                         | 14 CELDAS DE 2do. RELAVO (3-100FT3) |
| 5 BOMBA 3" VERTICAL                 | 15 CELDAS DE 3er. RELAVO (2-100FT3) |
| 6 BOMBA 10X10                       | 16 BOMBA 4" VERTICAL                |
| 7 CICLONES 100mm (12)               | 17 BOMBA 6X6                        |
| 8 MOLINO DE REMOLINADA 2.1 x 3.06   | 18 TANQUE DE ALMACENAJE 4 X 4       |
| 9 ACONDICIONADOR 4. 2.4 X 3.5       | 19 FILTRO PRENSA 50 X 0.6 X 0.8     |
| 10 CELDAS DE 1er. RELAVO (3-300FT3) |                                     |

Figura 6: Adición de SO<sub>2</sub> en el circuito del cobre dentro del proceso de flotación

presa de residuos, objeto del presente estudio, en la cual se produce la decantación de los sólidos hasta que se alcanza la humedad de equilibrio, liberando cantidades sustanciales de agua. Este agua tiende a recircularse al proceso en la mayor extensión posible, como medio de reducir costes operativos y el impacto ambiental, pero en general existe un excedente que es necesario verter.

Tabla VI: Distribución de reactivos en el proceso de flotación (g/tm)

Reactivo	Acondicionador	1 <sup>er</sup> desbaste	2 <sup>o</sup> desbaste	Apure	1 <sup>er</sup> relavo	4 <sup>o</sup> relavo
<b>CIRCUITO DEL COBRE</b>						
pH (cal)	10					
AXK	80					
LSB			40			
pH (SO <sub>2</sub> )					4,8	
<b>CIRCUITO DEL PLOMO</b>						
Orfom		60	60			
pH (cal)						12
<b>CIRCUITO DEL CINc</b>						
pH (cal)	11,5					12
AXK	80		60	60		
CuSO <sub>4</sub>	500			300		

\*AXK, LSB, Orfom son reactivos orgánicos comerciales y patentados

La distribución de los metales al final del proceso metalúrgico se indica en la Tabla VII.

Tabla VII : Balance metalúrgico del proceso de flotación diferencial

		Recuperaciones %			Leyes %		
		Cu	Pb	Zn	Cu	Pb	Zn
<b>Cdo, Cu</b>	1,2	40,0	2,0	1,0	19,5	3,5	3,5
<b>Cdo, Pb</b>	1,9	2,8	41	3,0	0,9	45	7,5
<b>Cdo, Zn</b>	7,6	8,9	6,5	79,5	0,7	1,8	49
<b>Estéril</b>	89,3	48,3	50,5	16,5	0,33	1,20	0,88
<b>Alimentac,</b>	100	100	100	100	0,60	2,10	4,71

### 2.1.2.- Descripción de los puntos y las condiciones de muestreo

Para llevar a cabo el estudio propuesto se realizaron seis muestreos, cinco de ellos en semejantes condiciones de procesamiento del mineral, y un sexto en condiciones más particulares, motivadas por la parada de la planta, que duró un periodo de seis meses. Las condiciones de la presa en esa ocasión fueron bien diferentes, como se explicará más adelante, y así en lo sucesivo se hará referencia a condiciones de “planta activa” y de “presa abandono” para distinguir estas situaciones.

La descripción de los muestreos realizados, la justificación de los puntos de muestreo seleccionados, las variables químicas medidas y la descripción de las muestras que fueron seleccionadas para la caracterización microbiológica, se reflejan en la Tabla VIII. Los distintos muestreos se realizaron en tres zonas diferenciadas: en la planta de flotación, en el recorrido de la pulpa desde la salida de la planta hasta la llegada a la presa y en la propia presa, tanto en el fondo como en la superficie.

Los puntos seleccionados en la *planta de flotación* correspondieron al rebose y hundido de los espesadores (R.EP-x y H.EP-x, respectivamente, donde x corresponde a la numeración del espesador). El rebose de los espesadores fue de agua clara y se muestreó superficialmente. El hundido correspondió a los lodos sedimentados en el fondo del espesador. Se muestrearon a través de trampillas diseñadas en el espesador para la toma de muestras correspondiente al control del proceso. La pulpa residual que salía de proceso, para ser vertida en la presa, recibe el nombre de pulpa estéril (P.E). La localización en planta de todos estos puntos se refleja en la Figura 7.

El *recorrido de la pulpa* se siguió desde la salida de la planta hasta la presa, y se tomaron muestras secuencialmente (Pi). La pulpa se conducía mediante caída por gravedad a través de un recorrido de 2.3 Kms. El desnivel era importante y por tanto la circulación rápida, aunque existieron ciertos lugares en los que, debido a la orografía del terreno, el agua se remansaba (F-1 y F-2). Estos puntos de muestreo aparecen reflejados en la Figura 3.

La última de las zonas muestreadas correspondió a la *presa*. Se realizó un barrido en toda su extensión en el que se fue controlando el pH. Se tomaron muestras de superficie (Si) y muestras de fondo (Di) en aquellos puntos en los que se observaban variaciones de pH importantes o algún otro cambio apreciable en el sistema (color, temperatura, conductividad, etc). Los distintos puntos de muestreo se reflejan en la Figura 8.

#### **2.1.2.a.- Condiciones de muestreo**

La toma de muestras se realizó en frascos estériles que se sumergían boca abajo y se invertían rápidamente hasta llenarlos con el fin de alterar lo menos posible las condiciones de dichas muestras. En cada punto se tomaban dos muestras: una para los análisis químicos y mineralógicos, y otra para el aislamiento microbiológico. Éstas eran guardadas en nevera de campo para su traslado al laboratorio. En el muestreo realizado para la búsqueda de microorganismos anaerobios, los frascos se llenaron totalmente y se cerraron con precinto.

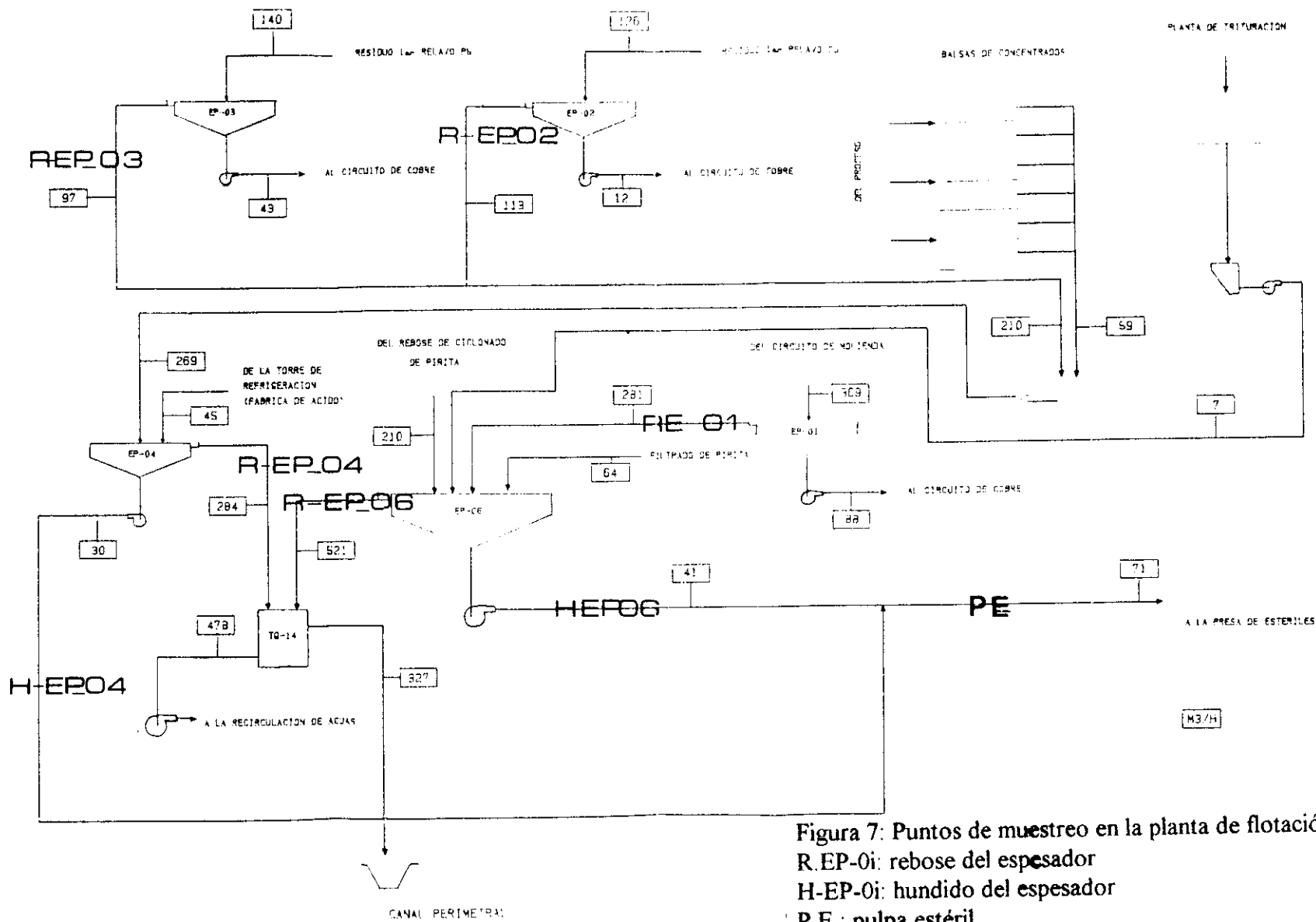


Figura 7: Puntos de muestreo en la planta de flotación  
 R-EP-0i: rebose del espesador  
 H-EP-0i: hundido del espesador  
 P.E.: pulpa estéril

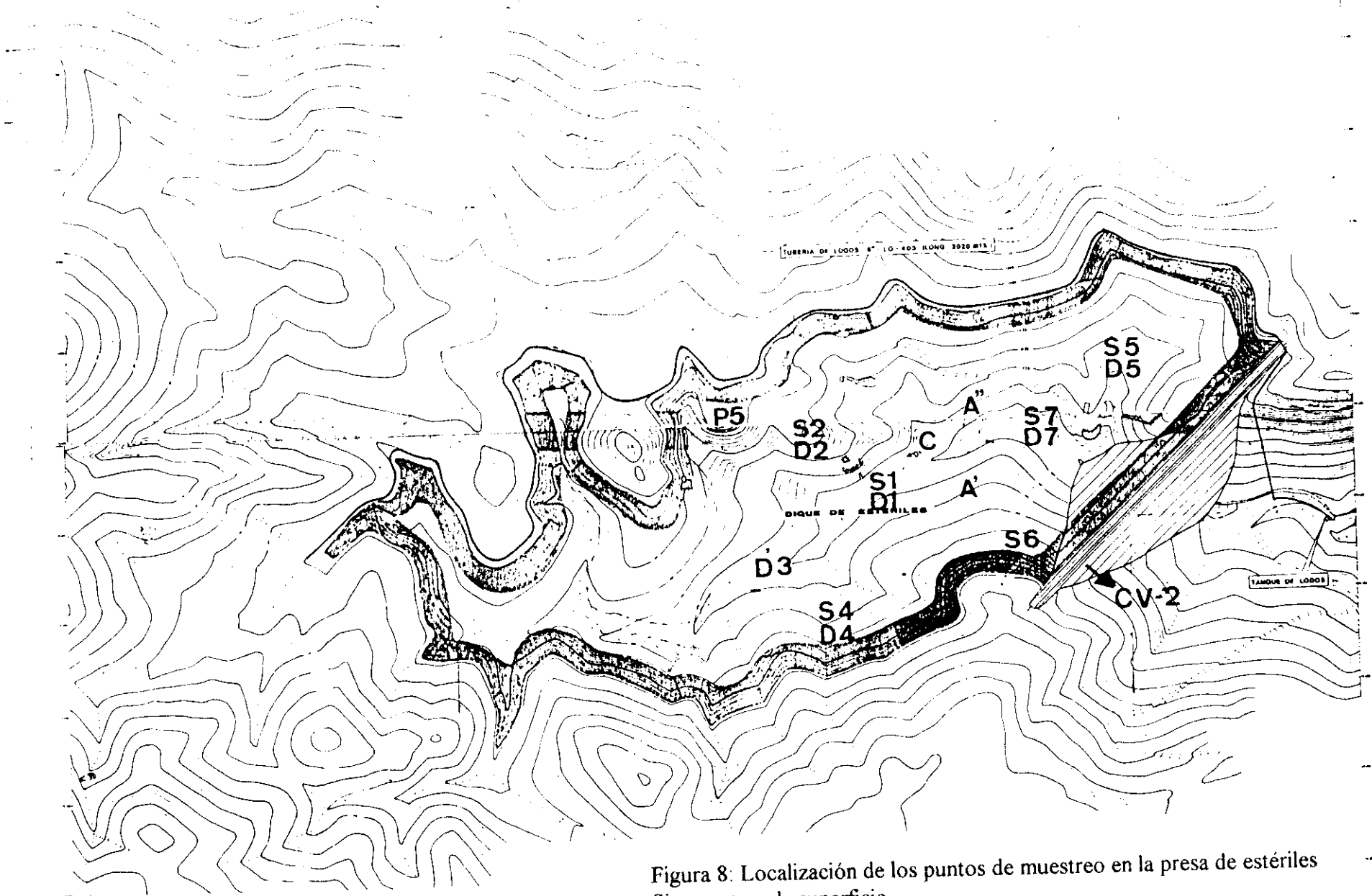


Figura 8: Localización de los puntos de muestreo en la presa de estériles  
 Si, muestras de superficie  
 Di, muestras de fondo  
 C, Á y A'', muestras de lodo para aislamiento de bacterias anaerobias

El muestreo de los lodos del fondo de la presa se realizó empleando un muestreador Ballcheck KB 0414. Este tipo de muestreador es el más indicado para aquellos casos en los que se requiere que la interfase de la superficie del fondo y el agua se altere lo menos posible. Consiste en un tubo de acero de 2 pulgadas de diámetro y 50 cm de longitud. Para acceder a los distintos puntos de la presa se dispuso de una pequeña embarcación que permitió hacer un barrido total del dique.

Para la determinación “in situ” del pH, Eh y la temperatura de todas las muestras, se dispuso de una sonda portátil.

Las muestras recién tomadas, se trasladaban al laboratorio de la empresa en el que se volvía a medir el pH y se realizaba la determinación de la concentración de sulfatos, sulfitos, metales, así como la granulometría de los sólidos.

## **2.2.- CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y MINERALÓGICA**

### **2.2.1.- Muestras sólidas**

La denominación de “muestras sólidas” corresponde en nuestro caso a la fase sólida de las muestras de pulpa o de lodo.

#### **2.2.1.a.- Distribución granulométrica**

El análisis granulométrico de las muestras sólidas se realizó mediante un equipo Microtac FRA.

#### **2.2.1.b.- Composición mineralógica**

Se empleó la técnica de difracción de rayos-X tanto para la caracterización del mineral como para la identificación de los compuestos (sulfatos, hidróxidos y demás precipitados) que aparecieron fruto de la transformación del mismo.

El equipo que se utilizó fue un difractómetro Philips X’Pert-MPD. Previamente a la realización del análisis, las muestras fueron secadas y debidamente pulverizadas.

Tabla VIII : Descripción de los muestreos realizados (los puntos de muestreo y las muestras se corresponden con lo indicado en la Figura 3)

Fecha	Condiciones de la presa*	Puntos de muestreo	Muestras seleccionadas para su caracterización microbiológica	Medidas realizadas	Objetivo
Junio 1993	activa	pulpa a la salida (P.E.) y rebose de la presa (CV-2)	P.E. CV-2	pH, concentración de metales y sulfatos	Primer acercamiento. Evaluar presencia de microorganismos y calidad de residuo vertido y transformado**
Noviembre 1993	activa	planta , recorrido pulpa y presa	R.EP-06 S.2. D.2. D.4. P.E. S.6.	pH, T°, concentración de sulfatos, sulfitos y metales, y análisis granulométrico de sólidos	Seguimiento de la pulpa. Determinar la posible presencia de microorganismos en la planta. Muestrear exhaustivamente la presa. Recuento de bacterias hierro y azufre oxidantes
Julio 1994	abandono	presa	CV-2	pH, concentración de metales, sulfatos y sulfitos	Evaluar las transformaciones químicas de la presa tras su abandono. Estudiar su incidencia en la microbiología. Relacionar cambios microbiológicos y químicos
Noviembre 1994	activa	P.E. y CV-2	-	pH, concentración de metales, sulfatos y sulfitos	Estado de la presa en las condiciones de vertido. Recuperación de variables químicas y microbiológicas
Marzo 1995	activa	fondo presa (lodo) P.E. CV-2	Lodo	pH, granulometría, concentración de metales, sulfatos y sulfitos	Evaluar la presencia de bacterias reductoras de sulfato
Mayo 1996	activa	P.E. Si Di	P.E. Si Di	pH, Eh, concentración de metales y sulfatos	Recuento de heterótrofos, bacterias azufre y hierro oxidantes y recuento además de anaerobios en la muestra Di

\*Se denomina "presa activa" a la presa en condiciones de producción y "presa abandono" al estado de la presa en condiciones de planta de flotación parada

\*\* Se denomina "residuo vertido" a la pulpa de flotación en el momento de su vertido. Se denomina "residuo transformado" al efluente de la presa que ha sufrido algún tipo de transformación

### 2.2.1.c- Composición química

Para determinar la composición de las muestras sólidas se tomaron 0,5 g de muestra y se trataron con 5 ml de medio ácido ( $\text{HNO}_3/\text{HCl}$  en la proporción 3:1), durante 20 minutos, en placa calefactora. Tras el periodo de digestión, y después de diluir a un volumen de 250 ml, los metales se determinaron mediante espectrofotometría de absorción atómica. El espectrofotómetro utilizado fue de la marca Perkin-Elmer, modelo 1100B. El atomizador fue un mechero de llama de aire-acetileno y como fuente de radiación primaria se utilizó una lámpara de cátodo hueco con argón a baja presión.

Para la determinación de S total se utilizó un aparato Leco SC32. El S total se determinó a partir de la medida del sulfuroso desprendido tras la combustión de la muestra.

### 2.2.2.- Muestras líquidas

#### 2.2.2.a.- pH y temperatura

En todas las muestras, se realizó una medida “in situ” del pH y la temperatura mediante una sonda portátil. La evolución del pH con el tiempo se siguió, en varias de las muestras seleccionadas, con objeto de tener una referencia aproximada de la velocidad de cambio de esta variable. Las medidas se realizaron con un medidor marca Crison 2001.

#### 2.2.2.b.- Concentración de metales

La concentración de metales en solución se determinó mediante espectrofotometría de absorción atómica utilizando las condiciones descritas en el apartado 2.2.1.c.

El  $\text{Fe}^{2+}$  se determinó mediante fotolorimetría empleando ortofenantrolina como reactivo colorimétrico en medio acético (Herrera y col., 1989; *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 1985; Mier, 1993). Sobre un volumen conocido de muestra se añadían 5 ml de disolución reguladora (acético/acetato), 5 ml de NaF y 1 ml de clorhidrato de ortofenantrolina. Una vez transcurrido el tiempo suficiente para el desarrollo del color, se procedía a enrasar los matraces hasta un volumen final de 50 ml. El método se puso a punto de acuerdo a las condiciones descritas en el *Standard methods for the examination of water and wastewater*, para lo que se trazó una recta de calibrado con parámetros de ajuste:  $R= 0.99952$ ;  $SD= 0.0226$  (Figura 9). El equipo utilizado fue un

fotocolorímetro Metrohm 662. La longitud de onda elegida fue de 510 nm. La concentración de  $Fe^{3+}$  se determinó por diferencia entre el Fe total y el  $Fe^{2+}$ .

La concentración de  $Fe^{2+}$  se determinó a partir de la recta de calibrado de ecuación:

$$Fe^{2+} (ppm) = \frac{Abs(510nm) + 0,03933}{0,31008} \quad [36]$$

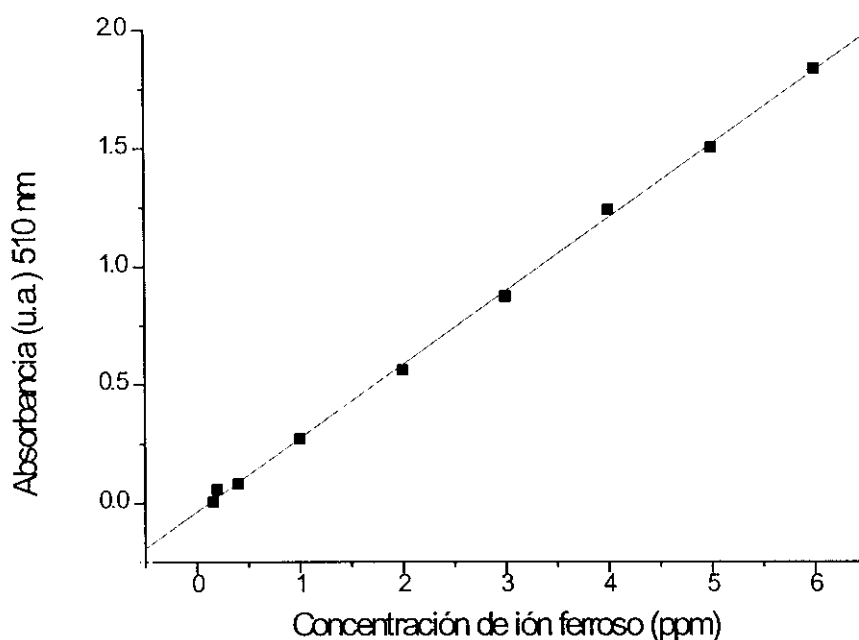


Figura 9: Recta de calibrado para la determinación de  $Fe^{2+}$

### 2.2.2.c.- Concentración de sulfatos

La concentración de sulfatos en solución se determinó mediante turbidimetría (*Standard methods for the examination of water and wastewater*, 1985). Por tratarse de un método turbidimétrico, la formación del precipitado coloidal debe realizarse en las condiciones óptimas y asegurarse que en el momento de la lectura el precipitado se ha desarrollado adecuadamente, intentando evitar el posible sobrecrecimiento de los cristales por envejecimiento del precipitado. La turbidez se generó haciendo reaccionar 1 ml de la muestra con 1 ml del reactivo cloruro de bario 0,1 M. Una vez formado el precipitado, los matraces eran enrasados hasta un volumen final de 50 ml, procediéndose entonces a realizar la determinación turbidimétrica. El equipo empleado fue el mismo que el descrito

en el apartado 2.2.2.b para la determinación de ion ferroso, pero en este caso la longitud de onda empleada fue de 410 nm.

Este método proporcionó buenos resultados para todas las medidas realizadas en muestras ácidas. Pero cuando se trató de aplicar a la determinación de sulfatos en muestras alcalinas (véase experimentación con BRS, apartado 3.6.), el método no resultó ser el adecuado al no conseguirse medidas reproducibles.

Por ello, el método se adaptó para el análisis de muestras básicas, según las condiciones siguientes (Amandola y col., 1967; Williams, 1979): un volumen conocido de muestra se diluía dentro del intervalo recomendado de 5-40 ppm y se disponía en matraz de 100 ml. Sobre este volumen, se adicionaban 20 ml de una disolución 4 M de NaCl en 20 ml de HCl. El matraz se enrasaba entonces y se procedía a generar el precipitado para la cuantificación de los sulfatos. Este paso se realizaba meticulosamente y de acuerdo a la siguiente secuencia: la muestra en medio HCl servía como blanco para hacer el cero en el equipo (la absorbancia elegida ahora fue de 420 nm, que resultó ser la óptima después de la comprobación de distintas longitudes de onda); se añadía entonces una punta de espátula de BaCl<sub>2</sub> que se dejaba agitar durante un minuto (tiempo suficiente para favorecer la formación del precipitado coloidal); transcurrido este tiempo, se dejaba reposar el precipitado durante 4 minutos y se procedía a la posterior lectura, que se realizaba en reposo y sin agitación. De este modo, se evitaba que los cristales aumentasen excesivamente de tamaño. La recta patrón obtenida en estas condiciones (Figura 10) tenía estos parámetros de ajuste de: R= 0,99922; SD= 0,00975.

La concentración de sulfatos se determinó a partir de la ecuación:

$$SO_4^{2-} (ppm) = \frac{Abs(420nm) + 0,09961}{0,02005} \quad [37]$$

Tanto para la determinación de sulfatos como para la determinación de ion ferroso, fue necesario centrifugar las muestras de pulpa, o las que llevaban algo de sólido en suspensión, para evitar interferencias en la lectura.

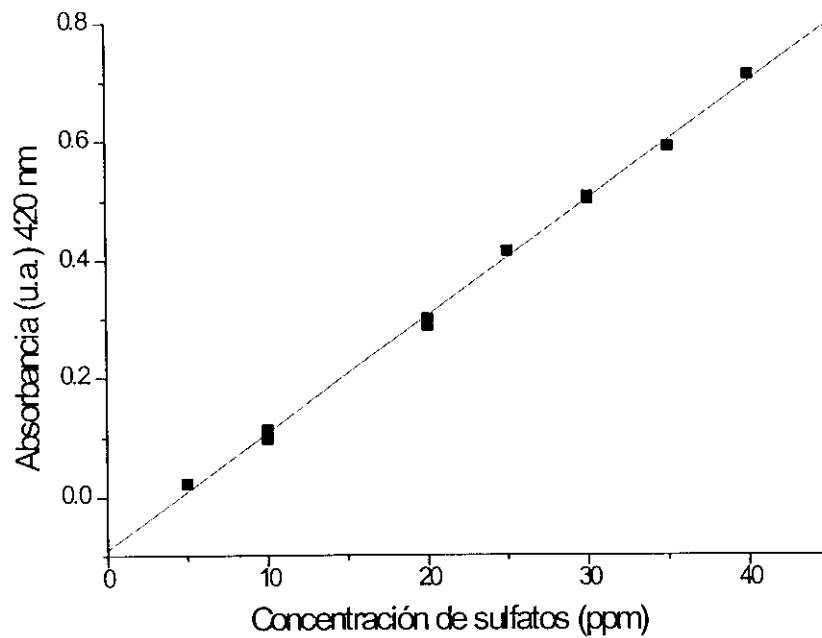


Figura 10: Recta de calibrado para la determinación de  $\text{SO}_4^{2-}$

## 2.3.- CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA

### 2.3.1.- Medios y técnicas de cultivo

#### 2.3.1.a.- Microorganismos aerobios

A) Medio para bacterias litoautótrofas:

- MEDIO 9K (Silverman y Lundgren, 1959):

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3 g
KCl	0,1 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0,618 g
$\text{MgSO}_4$	0,5 g
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,013 g
$\text{H}_2\text{O}$ destilada	hasta 1 l

A este medio, según el caso, se le añadió una de las siguientes fuentes de energía:

FeSO <sub>4</sub>	33,3 g/l a pH 2
Tetrionato sódico	5 g/l a pH 3
Tiosulfato sódico	5 g/l a pH 6,5 y 3,5
Azufre elemental	10g/l a pH 3

- Placas de tiosulfato, tetrionato y sulfato ferroso en agarosa

Se prepararon del siguiente modo: el medio salino y la agarosa se esterilizaron en autoclave, mientras que la fuente energética se esterilizó por filtración mediante filtro Millipore de 0,22 µm con el fin de prevenir la oxidación. Cuando el medio salino y la agarosa estuvieron suficientemente fríos, se mezclaron con la solución correspondiente a la fuente energética.

## B) Medios para microorganismos heterótrofos

### - MEDIO A

Glucosa	10 g	
Extracto de levadura	15 g	
Agar o agarosa	15 g	Medio 9K a pH 3 hasta 11

### - MEDIO I

Bactotripton	0,5 g	
Extracto de malta	1 g	
Glucosa	10 g	
Agar o agarosa	15 g	Medio 9K a pH 3 hasta 11

## 2.3.1.b.- Microorganismos anaerobios

### - MEDIO C (POSTGATE) (ASTM D 4412-84)

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
NH <sub>4</sub> Cl	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,06 g
Lactato sódico (70%)	3,5 g
Extracto de levadura	1,0 g

CaSO <sub>4</sub>	1,0 g	
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01 g	
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,5 g	
CaCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,06 g	
Citrato sódico	0,3 g	(todo ello para un volumen de 1 l)

El pH se ajustó a 7 con NaOH al 10% en peso.

Se empleó también el medio C con molibdato sódico en concentración 0,01M.

- MEDIO AGAR NUTRITIVO: Osoid CM3

### 2.3.1.c.-Esterilización

Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave (Auster - E. Selecta) a una atmósfera de presión durante 20 minutos. Para los medios con glucosa se utilizaron condiciones más suaves: 0,5 atmósferas durante 30 minutos.

Los medios con hierro, tetrionato y tiosulfato se esterilizaron mediante filtración con filtro Millipore de 0,2 µm de diámetro de poro.

El azufre elemental se esterilizó mediante el método de tindalización consistente en la esterilización en autoclave a 0,5 atmósferas, durante 30 minutos, transcurridos los cuales se incubaba durante una noche en estufa a 37 °C. Este proceso se repitió tres veces.

### 2.3.2.- Presencia y recuento de microorganismos

#### 2.3.2.a.- Microorganismos aerobios

##### -Recuento de microorganismos oxidantes de Fe y S

Para el recuento de bacterias litoautótrofas se utilizó el método del número más probable (NMP) (Collings, 1969; Pochon y col., 1974; *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 1985). Se eligió este método debido a que el crecimiento de este tipo de microorganismos en medio sólido no es bueno y por tanto el recuento podría dar resultados engañosos.

El fundamento del método reside en la presunción de que las bacterias se hallan “normalmente” distribuidas en un medio líquido, esto es, que muestras repetidas del mismo volumen de un mismo cultivo debe esperarse que contengan el mismo número de gérmenes como promedio. La cifra media es el *número más probable*.

Para determinar el NMP se prepararon tubos con 4,5 ml de medio (9K + Fe para el recuento de microorganismos Fe-oxidantes y 9K+S para el recuento de microorganismos S-oxidantes. En algún caso se eligió tiosulfato para esta misma determinación). Inicialmente, se inoculó el primer tubo con 0,5 ml de muestra; 0,5 ml del primero se inocularon en el segundo y así, consecutivamente, el resto de tubos hasta 10 diluciones. Las series se repitieron cinco veces con cada muestra. Los tubos se incubaron en estufa a 30 °C entre 25 y 30 días.

Para el recuento de microorganismos de las muestras procedentes de los ensayos de meteorización y del demuestre de las columnas, se utilizaron placas multipocillo. Los cultivos se prepararon tomando 0,5 g de muestra (pulpa o sólido según el caso) en 1,5 ml de medio. Los recuentos se realizaron en medio hierro y medio tiosulfato (apartado 2.3.1). Los inóculos se realizaron por triplicado y las placas multipocillo se mantuvieron en estufa, a 30°C, durante al menos 25 días. Se eligieron estas placas porque permiten mantener un volumen importante de muestras en poco espacio. El crecimiento se detectó por la turbidez de los tubos en el caso de los microorganismos S-oxidantes (debido al crecimiento celular y a la disgregación del azufre), por la coloración pardo-amarillenta para el caso de los Fe-oxidantes (debida a la precipitación de hidróxidos de hierro o de jarositas) y por el cambio de color inducido por la presencia del indicador azul de bromofenol en el caso de los microorganismos crecidos en medio tiosulfato.

El crecimiento se comprobó, además, mediante la observación al microscopio de algunos de los cultivos crecidos en los correspondientes tubos o pocillos.

#### -Recuento de microorganismos heterótrofos

Como se ha dicho anteriormente, el objetivo del estudio se centró en los microorganismos directamente implicados en los procesos de transformación del mineral, pero también se consideró importante evaluar la presencia de microorganismos heterótrofos en algunos puntos significativos del sistema como un modo de completar la caracterización microbiológica.

La presencia de bacterias heterótrofas, levaduras, algas y hongos se detectó mediante inóculos en placa en los medios A e I (ver apartado 2.3.1.), así como en placas preparadas a partir del agua de mina y agar al 1,5 %. La observación de las colonias al microscopio permitió diferenciar unos y otros.

El recuento de bacterias heterótrofas se realizó a partir de la siembra en placa en presencia de los medios A o I. Se preparon diluciones de la muestra hasta del orden de  $10^{-10}$  en medio líquido, y 100  $\mu$ l de cada una de ellas sirvieron para inocular por duplicado las placas preparadas con los medios sólidos A e I. Además, se inocularon 100  $\mu$ l de la muestra directa y 100  $\mu$ l de la muestra doblemente concentrada.

### **2.3.2.b.- Microorganismos anaerobios**

Para detectar la presencia de bacterias anaerobias reductoras de sulfato, se realizaron inóculos del 10 % en medio C, para muestras sólidas, y en medio C doblemente concentrado, para muestras líquidas. Los frascos se llenaron, se cerraron herméticamente para evitar la presencia de oxígeno y se mantuvieron en estufa a 30°C.

El crecimiento de las bacterias reductoras de sulfato se detectó por el aspecto negruzco que apareció en los cultivos, así como por los precipitados negros y brillantes que se depositaron en las paredes de los frascos y sobre la interfase sólido-líquido. Estos sólidos eran precipitados de sulfuros originados por la reacción del ácido sulfhídrico liberado en la reducción del ion sulfato con los metales del medio.

Con objeto de confirmar la acción bacteriana y de asegurar que el desprendimiento de ácido sulfhídrico, y la consiguiente precipitación de sulfuros, eran debidos exclusivamente a la presencia de microorganismos y no a cualquier otra posible reacción química, se realizaron los mismos inóculos en medio C + Mo. La adición de molibdeno se debe a que inhibe una enzima del metabolismo de las bacterias reductoras de sulfato. La aparición de precipitados en el caso del cultivo en medio Mo descartaría a las bacterias como únicas responsables de la reducción.

Para el recuento de bacterias anaerobias se utilizó también la técnica del NMP. Para ello, se pesaron 5g de mineral (o pulpa húmeda) y se dispusieron en frascos de 30 ml de volumen. Posteriormente, se añadía medio C hasta llenar completamente los frascos. 10 ml de este primer cultivo se inoculaban de nuevo en otra botella de 30 ml y así sucesivamente hasta completar el banco de diluciones ( $10^{-10}$ ) necesario para efectuar el recuento. Este proceso

se realizó hasta cinco veces para cada muestra. Las botellas cerradas herméticamente se incubaron en estufa a 30°C durante unos 30 días. El resultado positivo del crecimiento se observó claramente por el color negro de los cultivos.

### **2.3.3.- Aislamientos**

#### **2.3.3.a.- Enriquecimiento de cultivos**

Para el aislamiento de microorganismos de las muestras tomadas en la presa se realizaron enriquecimientos previos en medios específicos con el fin de potenciar el crecimiento selectivo de especies. Estos enriquecimientos se hicieron en matraces de 250 ml con agitación mecánica en un incubador orbital marca *New Brunswick Scientific* a 30 °C. Sobre 100 ml de medio, se hicieron inóculos del 10%. Los enriquecimientos se realizaron en medio con hierro o azufre para seleccionar aquellos microorganismos oxidantes de uno u otro elemento respectivamente. Una vez que se detectaba crecimiento en estos medios líquidos, se procedía a la siembra en placa con el fin de obtener colonias aisladas. El cultivo en placas, así como el mantenimiento de cultivos, se realizó en una estufa Selecta, Mod. 207, a 30°C.

#### **2.3.3.b.- Concentración por filtración**

Si el número de células presentes en las muestras es pequeño, puede utilizarse el método de concentración por filtración. Mediante este método, se favorece la concentración de microorganismos de forma previa al inóculo, lo cual es particularmente útil cuando se trata de aislar microorganismos de aguas de drenaje de minas, en las cuales no se encuentran distribuidos en gran proporción y presentan además dificultades de aislamiento (Coto Pérez, 1994).

Por ello, en algunos casos, se filtraron 50 ml de muestra mediante un filtro Millipore de 0,22 µm. Los filtros se lavaron con el menor volumen posible de agua ácida estéril (1,3 ml aproximadamente) y de aquí se inocularon directamente en las placas.

Para la concentración de células de microorganismos anaerobios, se filtraron las muestras de lodo utilizando dos prefiltros de 20 y 15 µm de tamaño de poro. Debajo de éstos se colocó el filtro de 0,22 µm, que se inoculó directamente en el medio. La utilización de prefiltros permitió eliminar el mineral de las muestras de pulpa y lodo que podría terminar por saturar el filtro.

### 2.3.3.c.- Aislamiento en placa

El método de aislamiento utilizado tanto para los microorganismos litoautótrofos estrictos, como para los heterótrofos, fue el de aislamiento en placa.

Mientras que para los microorganismos heterótrofos las muestras se sembraron directamente en los medios A e I, para los litoautótrofos se utilizó una doble metodología: siembra directa y siembra a partir de los cultivos de enriquecimiento en los medios con Fe y con S. A partir de las colonias aisladas, se realizó un crecimiento en medio líquido y, posteriormente, se dieron pases sucesivos en medio sólido con el fin de confirmar la pureza de los microorganismos aislados. Esto, en ocasiones, presenta dificultades debido a que en los cultivos de microorganismos litoautótrofos aparecen asociados con frecuencia microorganismos heterótrofos (Arkesteyn y Bont, 1980; Harrison, 1984). Esta asociación es algunas veces “física”, de modo que unas colonias crecen sobre otras siendo difícil su aislamiento. Tal es el caso del *T. acidophilus* y el *T. ferrooxidans*. Así, en estudios realizados por Arkesteyn y Bont sobre la oxidación de la pirita en presencia de *T. ferrooxidans*, se encontró que invariablemente en todos los cultivos ambas especies aparecían asociadas.

### 2.3.4.- Identificación

#### 2.3.4.a.- Caracterización morfológica

##### -Morfología en placa

Las colonias obtenidas y seleccionadas para la identificación fueron observadas con lupa binocular con el objeto de determinar su tamaño aproximado, pigmentación, forma, elevación, etc.

##### -Morfología estructural

- *Microscopia óptica*

La observación mediante microscopio óptico con contraste de fases (Olympus BX-40) se utilizó para la identificación de heterótrofos (algas, levaduras y hongos), así como para la observación de las tinciones y el seguimiento de los cultivos.

- *Microscopía electrónica de transmisión*

La microscopía electrónica de transmisión se utilizó como herramienta para la observación de la pureza de los cultivos, para la caracterización morfológica (forma y tamaño) y para determinar la variedad de especies presentes en las muestras.

Se utilizó un microscopio JEOL Jem 1200 EX. La preparación de las muestras se realizó mediante el siguiente procedimiento: sobre una gota de la muestra depositada en papel de parafina se colocaba una rejilla de Cu (400 Hx) durante 2 ó 3 minutos. Este tiempo resultó ser suficiente para conseguir la adsorción de las células a la rejilla. A continuación, se procedía a la tinción con acetato de uranilo al 2 % durante un minuto. Transcurridos unos minutos más, para el secado de la muestra, se procedía a su observación microscópica.

En algunos casos fue necesario reducir el tiempo de tinción a medio minuto con el fin de mejorar la calidad de las observaciones.

#### **2.3.4.b.- Tinciones**

Sobre algunos cultivos aislados de bacterias, se realizaron las tinciones de Gram y de esporas. No obstante, debido a que las bacterias litoautótrofas se tiñen con gran dificultad, su observación fue engañosa .

#### **2.3.4.c.- Caracterización fisiológica y cultural**

##### -*Microorganismos aerobios*

- *Crecimiento sobre distintos sustratos*

Dentro del amplio grupo del género *Thiobacillus*, una de las características fisiológicas que diferencia a las distintas especies es la capacidad para oxidar diferentes fuentes de energía. Con el fin de identificar las cepas de bacterias litoautótrofas aisladas, éstas fueron inoculadas en medio 9K con las diferentes fuentes energéticas indicadas en el apartado 2.3.1.

El pH final del cultivo fue otro criterio de caracterización.

### -Microorganismos anaerobios

- *Crecimiento en presencia de molibdeno*

Como quedó indicado en el apartado 2.3.2.b., la presencia de molibdeno en los cultivos mixtos de bacterias anaerobias reductoras de sulfato impide su crecimiento. Una comprobación que permitió identificar a dichas bacterias fue el inóculo en medio con molibdeno. Se comprobó que la concentración de 0,01M en molibdeno era suficiente para aplicar este criterio con fiabilidad. La sal que se empleó fue el molibdato sódico.

- *Crecimiento en aerobiosis*

Otro criterio de confirmación para la identificación de las bacterias anaerobias fue su cultivo en medio agar nutritivo. Este medio proporciona el sustrato orgánico necesario para una bacteria heterótrofa. Pero si un cultivo identificado como anaerobio fuera capaz de crecer en estas condiciones, se debería o bien a que no ha sido identificado adecuadamente, o bien a que se trataba de un cultivo mixto en el que crecían también bacterias heterótrofas aerobias que se desarrollan en estas condiciones.

- *Crecimiento en medio sin sulfato*

Para comprobar la reducción de sulfatos, los cultivos de BRS se inocularon en medio C sin sulfatos. El criterio de identificación para bacterias anaerobias reductoras de sulfatos sería de crecimiento negativo en estas condiciones.

### **2.3.5.- Modelo en columna**

#### **2.3.5.a.- Descripción del modelo: muestreos y parámetros de seguimiento**

La evolución microbiológica de la pulpa, en condiciones controladas, se siguió a través de un modelo en columna. En la bibliografía se pueden encontrar diferentes trabajos relativos al estudio de las variaciones químicas y microbiológicas que acompañan a la transformación de un residuo abandonado. Harrison (Harrison, 1978) utilizó un modelo en “montones” para describir lo que sucedía a un lodo de carbón. Bajo condiciones controladas de laboratorio, comprobó cómo asociados a este lodo se desarrollaron una variedad importante de microorganismos que fueron cambiando y sucedándose de un modo paralelo a las condiciones químicas del sistema.

En nuestro caso, se utilizó un modelo similar, pero en columna, para simular las condiciones de la pulpa en la presa. Puesto que mediante esta columna se trató de evaluar la sucesión microbológica que acompaña a los cambios químicos que suceden a la pulpa, se la denominó SM (sucesión microbiológica). Se diseñó una columna de metacrilato de 150 cm de altura y 15 cm de diámetro. La pulpa que se dispuso en ella procedía del vertido en el punto inicial del sistema (P.E., Figura 3), manteniéndose la misma relación sólido/líquido que presentó en la presa.

Una vez que se estableció el reparto de fases en la columna, la altura final de lecho que alcanzó el mineral fue de 50 cm. Sobre él quedó una columna de agua de 60 cm. Se utilizó un lecho de piedras de cuarzo de 20 cm para soportar el mineral. La columna estuvo termostatazada a 30°C durante los **nueve meses** que duró el experimento. La reposición de la evaporación se realizó con agua destilada. Se aireó artificialmente a través de un sistema intermitente que burbujeaba aire a 10 cm sobre la superficie del mineral. La distribución final del sistema se ilustra en la Figura 11.

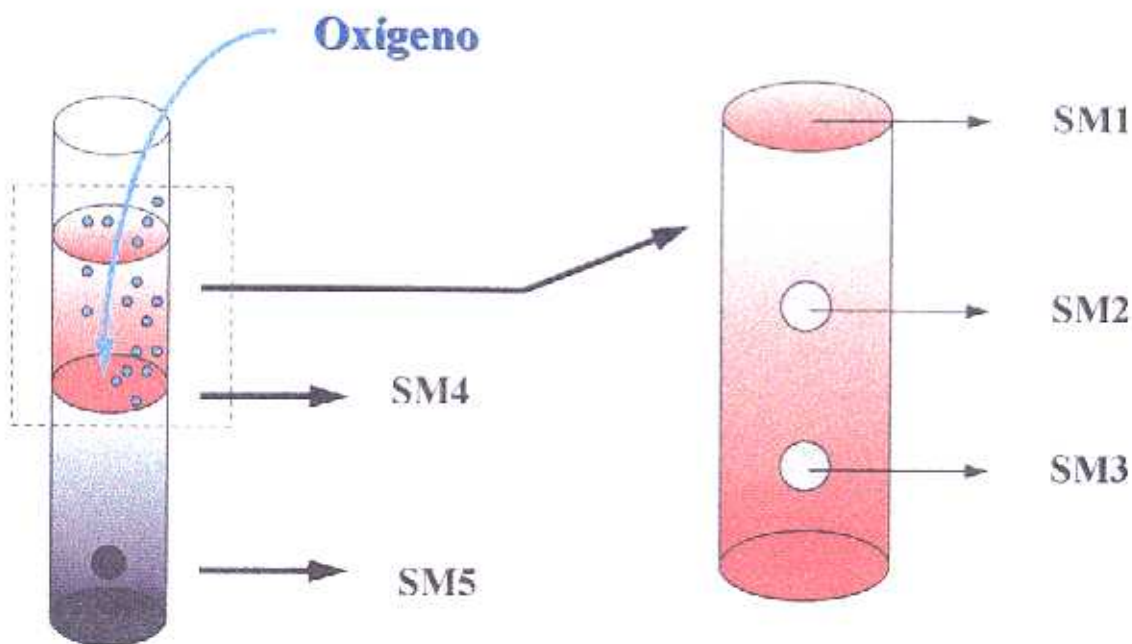


Figura 11: Diseño de a columna de sucesión microbológica. SM1, SM2 y SM3, muestras de agua; SM4: muestra de sólida tomada en la interfase sólido-líquido; SM5: lodo en el fondo

Para el seguimiento de la columna se diseñaron cinco puntos de muestreo (Figura 11): SM1, para el muestreo del agua superficial; SM2 y SM3, muestras de agua a dos alturas

distintas sobre la capa de mineral; SM4, muestra de la interfase sólido-líquido; y SM5, muestra profunda de mineral. La muestra SM1 se tomaba superficialmente; las muestras SM2, SM3 y SM4 se tomaban a través de los puntos de drenaje. La muestra SM5 se tomaba a través de un “cajetín” diseñado en un lateral del fondo de la columna. Para las muestras líquidas se tomaba un volumen aproximado de 30 ml, que era recogido en frascos estériles. La muestra SM5 se tomaba con una espátula que previamente se había flameado con alcohol, recogiéndose aproximadamente 10 g de muestra, que también era transferida a un frasco estéril. Se tomaron muestras con una periodicidad mensual en los cinco puntos citados.

A cada una de estas muestras (excepto a la SM5) se les hacía una determinación inmediata de pH, Eh y sulfatos, y se guardaban (siempre aciduladas, para prevenir la oxidación) hasta la posterior determinación de metales (Fe, Cu y Zn, apartados 2.2.1. y 2.2.2.). A su vez, en cada una de las muestras, se hacía un recuento de microorganismos oxidantes de S, oxidantes de Fe, herótrofos totales y bacterias anaerobias reductoras de sulfato. La metodología utilizada en este caso aparece descrita en el apartado 2.3.2.

La composición química, mineralógica y microbiológica de la pulpa se determinó en el momento de iniciarse el experimento siguiendo las pautas descritas en los apartados 2.2.1., 2.2.2. y 2.3.2.

#### **2.3.5.b.- Desmontaje de la columna: criterio de selección y procesamiento de muestras. Ensayos de actividad**

Una vez finalizado el experimento, cuando la evolución de las variables elegidas para su seguimiento mostró una cierta estabilización, se procedió al desmontaje de la columna. Se realizó una caracterización final del residuo, y se analizó la transformación del mineral en sus distintas capas; para ello se tomaron cinco muestras distribuidas a lo largo de la columna y separadas entre sí diez centímetros aproximadamente (SMh1, SMh2, SMh3, SMh4 y SMh5). Estas muestras se caracterizaron química, microbiológica y mineralógicamente.

La determinación de la presencia de microorganismos genera una información limitada, pues no aporta datos acerca del estado de **actividad** en el que éstos se encuentran. En principio, un mismo tipo de microorganismo presentará más o menos actividad según sean más o menos favorables las condiciones físico-químicas del ambiente en el que se encuentre. Por ello, se quiso comprobar si en la columna se establecían condiciones químicas diferentes que condicionaran una diferente actividad microbiológica. Se eligieron

para ello ensayos de *actividad oxidante de hierro y de actividad reductora de sulfatos* como criterio representativo de la actividad microbiológica transformadora del mineral.

#### -Ensayos de actividad oxidante de hierro

Para evaluar la actividad oxidante de hierro se tomaron 5 g de muestra de cada uno de los puntos elegidos en el desmontaje de la columna y se inocularon en matraces estériles de 250 ml sobre 100 ml de medio 9K+Fe a pH 2 (ver apartado 2.3.1.). Estos matraces se mantuvieron con agitación orbital a 30°C durante aproximadamente 1 mes. Periódicamente, se tomaban 10 ml de muestra para las determinaciones analíticas. La evaporación se reponía con agua destilada estéril.

Las variables elegidas para el seguimiento del experimento fueron el pH y la concentración de  $\text{Fe}^{2+}$ , además de la observación al microscopio óptico de los cultivos.

#### -Actividad reductora de sulfatos

Para seguir la actividad anaerobia reductora de sulfatos se tomaron 20 g de mineral que se inocularon sobre 100 ml de medio C a pH 7 (ver apartado 2.3.1.). Estos cultivos se crecieron en frascos estériles cerrados herméticamente que se mantuvieron a 30°C. Los experimentos duraron aproximadamente 1 mes. Periódicamente, se tomaban muestras de 10 ml con pipeta estéril para lo que se hacía necesario abrir los frascos. Para evitar el posible daño de los cultivos debido a la presencia de oxígeno, sobre estos frascos se burbujeara nitrógeno durante diez minutos una vez tomada la muestra. Ésta se hacía pasar a través de un filtro Millipore de 0,22  $\mu\text{m}$ , que se acopló a una goma en cuyo extremo se disponía una punta, también estéril, que era la que se introducía en el frasco. De este modo, se conseguía mantener la esterilidad de los cultivos.

Las variables que se eligieron, en este caso, para el seguimiento de la actividad bacteriana fueron: pH, Eh y concentración de sulfatos (ver apartado 2.2.2.). Para el análisis de sulfatos, las muestras eran previamente centrifugadas durante 10 minutos a 20.000 rpm, con el fin de que la turbidez no influyera en la lectura. Asimismo, las muestras se diluían convenientemente para que la concentración estuviese en el rango óptimo de lectura recomendado para la determinación de sulfatos (apartado 2.2.2.).

## 2.4.- ESTUDIO CINÉTICO DE LA OXIDACION DEL ION SULFITO

### 2.4.1.- Ensayos de oxidación química

Para los ensayos cinéticos de oxidación química del ion sulfito las disoluciones de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  se prepararon en agua destilada. Los experimentos se realizaron dejando evolucionar estas disoluciones a temperatura y presión ambiente, sin agitación y abiertas a la atmósfera. Periódicamente, se tomaban 10 ml de muestra para la determinación de la concentración del ion sulfito. El pH se medía en la propia disolución. Se ensayaron las concentraciones de 0,5; 5 y 10 g/l de ion  $\text{SO}_3^{2-}$ .

Para estudiar la influencia del pH inicial en la oxidación del ion sulfito, se prepararon disoluciones a distintos valores de pH. Una vez disuelta la sal de sulfito, el pH se ajustaba con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1M. Se ensayaron los valores de pH de 4,0; 3,0 y 12,0.

Se realizaron también ensayos en los que se empleó agua de mina en lugar de agua destilada para la preparación de las disoluciones. En ellos se procedió con semejante metodología.

### 2.4.2.- Ensayos de oxidación bacteriana

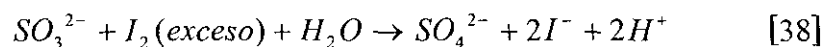
Con el fin de estudiar la posible influencia que la oxidación bacteriana pudiera tener en la oxidación del ion sulfito, se realizaron ensayos en presencia de bacterias. Para ello, se utilizaron matraces erlenmeyer de 250 ml, sometidos a agitación orbital en incubador a 35°C. Se eligieron estas condiciones por ser las óptimas para el crecimiento de los microorganismos utilizados. Como inóculos se emplearon los siguientes cultivos de bacterias aisladas del agua de mina:

- D.2. : Bacteria oxidante de Fe y S de la especie *T. ferrooxidans*
- S.2.(TTT): Bacteria oxidante de azufre, tiosulfato y tetrionato de la especie *T. thiooxidans*
- Cultivo mixto procedente del agua de mina

Se realizaron inóculos del 10% . En estos ensayos con bacterias, se utilizó medio 9K, en lugar de agua destilada, para la preparación de las disoluciones de ión sulfito. Estas se prepararon a dos valores de pH diferentes: 3, por ser el pH óptimo para el desarrollo de las bacterias, y 8, por ser el pH que da una disolución de ión sulfito pura.

### 2.4.3.- Análisis de iones sulfito mediante potenciometría

El seguimiento de la cinética de oxidación del ion sulfito de los experimentos descritos en los apartados 2.4.1. y 2.4.2., se llevó a cabo mediante determinación potenciométrica. Para ello, se utilizó un titropcesador automático Metrohm 670. El método que se empleó fue la valoración del ion sulfito con yodo (Bhaskara y Rao, 1955; *Standard Methods*, 1985) utilizando un exceso de éste, que a su vez era valorado con tiosulfato, el cual había sido normalizado previamente. Esta técnica se conoce como “valoración por retroceso”. Con ella se consigue mayor precisión que con la valoración ordinaria y se emplea cuando el compuesto a determinar se encuentra en baja concentración. En el caso del análisis del ion sulfito es particularmente favorable ya que éste se oxida fácilmente. Las reacciones que tienen lugar son las siguientes:



El método de análisis fue el siguiente: sobre 20 ml de agua destilada se añadían 10 ml de HCl (5 mol/l) y 10 ml de la disolución de yodo; se emplearon dos disoluciones de yodo de concentraciones 0,1N y 0,01 N, en función de la concentración de ión sulfito de las muestras. En el momento del análisis se añadían 10 ml de la muestra de ión sulfito a determinar. Tras unos segundos de agitación, para permitir la reacción entre el ion sulfito y el yodo, se procedía a valorar el exceso de éste con ión tiosulfato. La determinación del punto final de la valoración se obtuvo a partir de la medida del potencial de oxidoreducción, que el equipo detectaba automáticamente.

#### -Normalización de la disolución de tiosulfato sódico 0,1 N

La utilización del ión tiosulfato como reactivo valorante requiere su normalización previa, para lo cual se utiliza yodo molecular que se genera “in situ” a partir de KIO<sub>3</sub>.

La forma de proceder fue la siguiente: se pesaron 0,15 g de KIO<sub>3</sub> (previamente desecado a 120°), se disolvieron en 75 ml de agua y se añadieron 3 g de KI. Al añadir posteriormente 10 ml de HCl a esta disolución, se liberó I<sub>2</sub> de acuerdo con la siguiente reacción:



El yodo liberado fué posteriormente reducido por el ión tiosulfato que se quería valorar. Como indicador se utilizaron 2 ml de disolución de almidón.

## 2.5.- ENSAYOS DE METEORIZACION

Los ensayos de meteorización tratan de reproducir, bajo condiciones controladas de laboratorio, los cambios que afectan a un residuo abandonado. En concreto, cuando el residuo es un mineral sulfurado, las transformaciones que le afecten darán lugar, probablemente, a la generación de DAM. Para el diseño de los ensayos de meteorización es necesario conocer previamente diversos factores geológicos y climatológicos, como el régimen de lluvias, las fluctuaciones de temperatura, etc, con el fin de poder decidir los experimentos adecuados y específicos para el seguimiento del deterioro de un determinado residuo. Aunque no existen normas absolutas que resuelvan esta experimentación, sí se han diseñado distintos experimentos que marcan la pauta y definen en términos generales la capacidad productora/neutralizadora de ácido de un residuo.

Se han descrito muchos métodos para realizar los ensayos de meteorización simulada (Orava y col., 1996), entre los que se incluyen ensayos estáticos y dinámicos. La secuencia experimental empieza siempre por la realización de los estáticos y, en función de los resultados que éstos vayan aportando, se decide la necesidad de completarlos con los dinámicos, que son más o menos complejos.

En nuestro caso, se decidió realizar ensayos de meteorización que reprodujeran las condiciones a las que está sometido el residuo en cada uno de los distintos “ambientes” definidos en el sistema (ver Figura 4), de tal modo que se diseñó un modelo para simular cada una de estas situaciones.

Por otro lado, se quiso evaluar también el potencial contaminante del residuo y compararlo con los datos correspondientes a las condiciones ambientales reales.

Para todo ello, se realizaron tres tipos de ensayos de meteorización: el ensayo ABA, el ensayo en matraz agitado y un ensayo de meteorización en columna. El ensayo ABA (*acid-base account*) se eligió por ser un ensayo estático que proporciona resultados rápidos y da una primera idea de la calidad de agua que dejará el residuo cuando se abandone. Se eligió el ensayo en matraz agitado (*shake flask test*), porque permite hacer ensayos controlados para el seguimiento de variables concretas. Por ejemplo, permite estudiar la influencia de la temperatura, de la actividad microbiológica, etc. Finalmente, se utilizó el modelo en

columna con distintas modificaciones para reproducir las situaciones o ambientes en los que permanece el residuo una vez que se abandona.

### 2.5.1.- Ensayo ABA

Gran parte de la atención de los programas de meteorización está dirigida a la predicción del comportamiento de un residuo a lo largo del tiempo; sin embargo, la “lixiviación a corto plazo” de los residuos debe ser tomada en cuenta con especial atención. Para tal fin, en 1989, la EPA introdujo el Método 1312, en el que se definen las condiciones experimentales del ensayo ABA.

El ensayo ABA (*Acid-Base Account*, Sobek y col., 1978) es un ensayo de predicción de drenaje ácido utilizado con mucha frecuencia (Brady, 1994; Ferguson y col., 1991; Miller y col., 1994) debido a que, como se apuntaba más arriba, es un ensayo rápido y sencillo que sirve como primera aproximación para la identificación de un problema de generación de acidez.

Se basa en comparar el potencial máximo de acidez que puede generar una muestra (que se calcula a partir de su contenido en S total) con la capacidad neutralizadora de ácido (determinada a partir de la digestión en medio ácido y posterior valoración):

$PNN$  (Potencial Neto Neutralizante) =  $PN$  (Potencial Neutralizante) -  $PA$  (Potencial Acido)

$PNN$ ,  $PN$  y  $AP$  se expresan en unidades de kg de  $CaCO_3$  equivalentes/t de material.

Para llevar a cabo este experimento, se tomaron 2 g de muestra. Ésta debe triturarse previamente si el tamaño de partícula excede los 75  $\mu m$ , algo que en nuestro caso no fue necesario puesto que el tamaño del mineral utilizado en los experimentos estuvo siempre por debajo de este margen, en el orden de 10-30  $\mu m$ . La muestra se dispuso en un erlenmeyer de 250 ml y a continuación se añadió ácido para su digestión. El método recomienda que éste debe estar en la proporción adecuada de volumen y concentración para que el pH final, tras la digestión, esté comprendido entre los valores de 1,0 a 1,6.

Inicialmente, se ensayó con 75 ml de HCl 0,1 N, manteniéndose la mezcla en agitación orbital durante 24 horas. Transcurrido este periodo, se procedió a la lectura del pH. Con la proporción de ácido utilizada, el valor de pH obtenido fue de 2,94, excediendo por tanto el valor recomendado por el método, por lo que se hizo necesario utilizar otra proporción de

ácido. Después de ensayar distintas condiciones, se optó por utilizar 80 ml de HCl 0,5 N con agitación orbital durante 48 horas.

Una vez digerida la muestra, el ácido remanente se valoró con hidróxido sódico 2N hasta pH 8,3.

Todos los reactivos empleados fueron normalizados previamente. La disolución de NaOH 2N se normalizó con ftalato ácido de potasio (Kolthoff y col., 1976). El HCl se valoró a partir de la NaOH recién normalizada.

El cálculo del PN fue entonces inmediato a partir de la fórmula:

$$PN = \frac{50a[x - (b/a)y]}{c} \quad [41]$$

donde:

PN = potencial de neutralización, kg de CaCO<sub>3</sub>/t mineral

a = normalidad del ácido

b = normalidad de la base

c = peso de la muestra

x = ml de ácido añadidos

y = ml de base añadidos hasta pH 8,3

El PA se calculó a partir del análisis de S total realizado con un aparato Leco.

La determinación del PNN se realizó por duplicado.

Existe mucha controversia acerca de la fiabilidad de los resultados aportados por el ensayo ABA, especialmente si éstos no se analizan con detalle (Miller y col., 1991). De hecho, el método descrito es ya una modificación al método propuesto inicialmente por Sobek (Sobek y col., 1978). Las mejoras propuestas suponen que la digestión ácida sea más moderada, con el fin de no sobreestimar la capacidad neutralizadora de la muestra. El límite inferior de pH en la digestión se fija de modo que se prevenga la sobre-reacción, mientras que el límite superior asegura que la digestión ha transcurrido durante un tiempo suficiente.

### 2.5.2.- Ensayo en matraz agitado

Otro tipo de ensayos de meteorización son los que se realizan en matraz agitado (*shake flask test*). Este tipo de ensayos corresponde al grupo de los ensayos dinámicos, que se caracterizan porque además de confirmar los resultados aportados por los ensayos estáticos, permiten determinar la *velocidad* de oxidación de un residuo. Mediante estos ensayos se podrá determinar, por ejemplo, si la velocidad de generación de acidez es importante o si es insignificante, qué etapas requieren un mayor control, o qué periodo es el más determinante en la generación de acidez.

Se prepararon ensayos de meteorización en matraz agitado para estudiar el comportamiento del residuo con el tiempo, así como para evaluar la influencia de la oxidación bacteriana y la influencia de la oxidación química del ion sulfito en dicha meteorización.

Para realizar estos ensayos, se pesaron 25 g de mineral previamente seco y triturado y se añadieron 250 ml de agua destilada (ó del medio 9K a pH 2 -descrito en el apartado 2.3.1.- para los ensayos con bacterias). En los ensayos estériles se añadieron, además, 20 ml de una solución de timol al 2 %. Los cultivos se mantuvieron con agitación orbital, a 35 °C, durante aproximadamente un mes. Periódicamente, se tomaban 2 ml de muestra para la determinación del pH, concentración de metales (Fe, Cu y Zn) en solución y la concentración de ion sulfato, así como para la observación al microscopio del estado de los cultivos. En los ensayos realizados con ion sulfito, se añadieron 0,1 g/l de  $\text{SO}_3^{2-}$  en forma de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ .

Se estudió también el comportamiento de la pulpa tal y como sale de la planta, disponiéndose en este caso 100 g de lodo en los matraces de 250 ml como mineral de partida.

### 2.5.3.- Ensayos de meteorización en columna

Otro tipo de ensayos cinéticos de meteorización son los ensayos en columna. Mediante este tipo de ensayos se puede seguir no sólo la evolución de la calidad del agua que deja un determinado residuo cuando se meteoriza, sino que también se pueden identificar las pequeñas variaciones temporales que van sucediendo a lo largo del proceso de generación de aguas ácidas. Estos mismos modelos se pueden utilizar para ensayar posibles métodos de tratamiento de los drenajes.

### 2.5.3.a.- Descripción del modelo

Existen muchas posibilidades en el diseño de los experimentos de meteorización en columna y no existen reglas establecidas para el desarrollo de los mismos, ya que los experimentos suelen planificarse de acuerdo con las características concretas tanto del residuo como del tipo de información que se quiera obtener.

Aún así, en la experimentación descrita en la bibliografía, existen ciertos tamaños de columnas y formas de tratar el mineral que han sido los empleados con más frecuencia (Hood, 1984, Ritcey y Silver, 1982; Sullivan, 1982; Doepker, 1991, Ritcey, 1991). Tomando como base estos modelos, se diseñaron las columnas de meteorización para el desarrollo de estos experimentos.

Básicamente, el diseño de las columnas de meteorización está concebido de modo que pueda analizarse el drenaje de agua que ha percolado a través del mineral. La columna se riega por la parte superior y el agua se recoge a través de un tubo de drenado situado en la parte inferior (Figura 12)

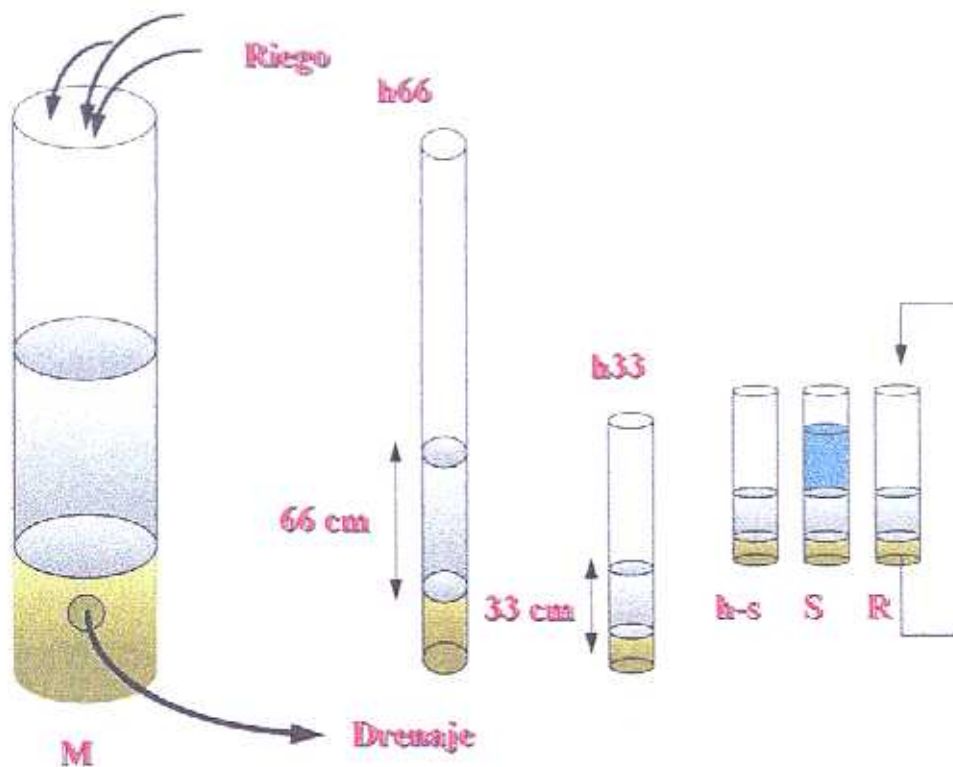


Figura 12: Diseño experimental de las columnas de meteorización

En el presente estudio, se utilizó un montaje de este tipo en el que el mineral se soportó sobre un lecho de cuarzo de modo que el agua de riego que se infiltraba a través del residuo atravesara finalmente la capa de cuarzo y el efluente final fuera claro. El riego se efectuó siempre con agua destilada (Hood y col., 1984; Silver, 1985; Lapakko, 1990; Doepker, 1991; Rose y col., 1994), así como la reposición de la evaporación en aquellas columnas en que fue necesario.

En todas las columnas se empleó mineral procedente del mismo punto de muestreo del sistema, que fue el correspondiente al punto de salida de la pulpa de la planta de flotación (ver Figura 3, punto P.E.). Para el desarrollo de la experimentación se recogieron dos muestras de pulpa de 30 litros cada una (P1 y P2). Ambas muestras fueron semejantes en su composición, pero mostraron algunas diferencias que se reflejan en los datos correspondientes a la caracterización química de las mismas (Tablas IX y X).

La pulpa P1 tuvo un tamaño de partícula medio de 22,90  $\mu\text{m}$  y la P2 de 41,86  $\mu\text{m}$ . Ambas correspondieron a pirita cuya composición fue la expresada en la Tabla IX.

Tabla IX: Composición química de los sólidos correspondientes a las pulpas P1 y P2

Pulpa	Cu (%)	Pb (%)	Zn (%)	Fe (%)	S (%)	Ag (g/Tm)	Sb (g/Tm)
P1	0,5	2	2	38	37	45	970
P2	0,2	1,3	1,4	36	38	25	448

Tabla X: Composición química del agua de las pulpas P1 y P2

Pulpa	Eh (mV)	pH	Fe (ppm)	Cu (ppm)	Zn (ppm)	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (ppm)	SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> (ppm)
P1	892	6,9	0,2	0,2	4,0	2940	246
P2	52	9,2	0,4	0,1	0,8	1800	180

Ambas pulpas mostraron una composición química comparable: eran básicas, con una baja concentración de metales en la fase acuosa y con una composición en sólidos semejante. Las diferencias observadas se debieron a que fueron tomadas en días distintos. De hecho, el mineral de partida que se estaba tratando en la planta de flotación era diferente en ambos casos. Por otro lado, el análisis de P1 no se realizó de forma inmediata como el de P2, de ahí que el pH fuera ya algo más bajo y el Eh más oxidante (pudo haber transcurrido el tiempo suficiente para que hubieran tenido lugar ciertas transformaciones químicas de cinética rápida en cuanto a los iones en disolución).

El recuento de microorganismos presentes en las muestras de pulpa, en las condiciones iniciales, dió el resultado que se muestra en la Tabla XI.

Tabla XI: Recuento inicial de microorganismos en las pulpas P1 y P2

Pulpa	Fe-oxtes (cél/ml)	S-oxtes (cél/ml)	Heterótrofos <sub>t</sub> (cél/ml)	BRS (cél/ml)
P1	-	183,25 x 10 <sup>2</sup>	806,3 x 10	-
P2	50	20 x 10 <sup>3</sup>	734 x 10	-

-:crecimiento negativo; BRS: bacterias reductoras de sulfato

Además del recuento de microorganismos mediante el método del NMP, se prepararon cultivos de enriquecimiento en distintos medios. Este método se utiliza para favorecer y potenciar el crecimiento de un determinado tipo de microorganismo que crece selectivamente en un medio de cultivo determinado. Para ello, se filtraron 500 ml de pulpa mediante filtro Millipore de 0,22  $\mu\text{m}$  (método de concentración por filtración, ver apartado 2.3.3.b.) El filtro se lavó con 10 ml de agua destilada acidulada, de los cuales se tomaron alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  para inocular en 100 ml de los medios líquidos 9K y Fe, 9K y S y medio I. Estos cultivos se mantuvieron en matraz agitado durante al menos un mes, con agitación continua y a 35 °C.

El crecimiento fue positivo en todos los casos, incluso en el cultivo de P1 en medio con hierro, lo que pudo comprobarse por el color ámbar del matraz, por la precipitación de jarositas y por la observación de las células al microscopio. También fue positivo el crecimiento en medio de azufre y en el medio I para heterótrofos, tanto en P1 como en P2.

10 g de pulpa se inocularon en 75 ml de medio C (ver apartado 2.3.1.), con el fin de determinar la presencia de bacterias reductoras de sulfatos. Tanto en P1 como en P2, el resultado fue negativo.

Por tanto, la caracterización microbiológica inicial de las pulpas puso de manifiesto que asociados al mineral de partida aparecieron microorganismos con potencial oxidante y que existió también una presencia abundante de heterótrofos.

Utilizando este mineral de partida, se prepararon los distintos ensayos de meteorización que a continuación se detallan.

### -Columnas pequeñas de meteorización

Para el seguimiento de la meteorización del residuo y para el estudio de la influencia de distintas variables, se montaron seis columnas de cristal de 30 cm de altura y 6 cm de diámetro. En cada una de ellas se dispusieron 300 g de mineral. El mineral que se utilizó fue pulpa desecada al aire, la cual se disgregó finamente y se colocó en las columnas sobre un lecho de cuarzo de 5 cm (Fig 12). El riego de estas columnas se efectuó periódicamente con 200 ml, utilizando, como en todos los experimentos de meteorización, agua destilada (Hood, 1984; Silver y col., 1985; Doepker, 1991). Las columnas se mantuvieron en estufa a 30 °C para acelerar los procesos químicos y biológicos.

La meteorización del residuo se llevó a cabo mediante riegos intermitentes, permitiendo que el agua percolara a través del mineral, recogiéndose finalmente el efluente por la base de la columna a través de una canal de drenaje (Figura 12). El régimen de riego elegido fue el de ciclos de humedad-sequedad (Hood, 1984; Lapakko, 1990 y Doepker, 1991). Tomando como base la experiencia de Hood, se adoptó la siguiente metodología: la columna se regaba con 200 ml de agua destilada que se dejaban en contacto con el mineral durante un periodo de 48 horas (periodo de humedad). Transcurrido este tiempo, se drenaba la columna iniciándose entonces un periodo de sequedad (120 horas). La duración de los ciclos de humedad/sequedad fue constante, aunque también se estudió la influencia de ciclos largos de sequedad, la influencia de periodos largos de humedad, la influencia del tiempo de contacto agua/mineral, etc.

El sistema permitió adaptaciones para el estudio de variables concretas y para simular cada una de las zonas o “ambientes” que se encuentran en el sistema real. Para ello, se establecieron las modificaciones adecuadas a cada objetivo concreto en cada experimento. Los modelos ensayados fueron los siguientes:

- *Influencia de la actividad bacteriana (L y Li)*

Se montaron dos columnas (L y Li) utilizando 300 gramos de mineral seco y finamente disgregado procedente de la pulpa P1. Se añadieron 250 ml de agua para humedecer el mineral y se drenaron posteriormente. Una de ellas (Li), se inoculó con 20 ml de un cultivo mixto de bacterias azufre- y hierro-oxidantes obtenido a partir de un cultivo de enriquecimiento de la propia pulpa en medio de hierro y azufre. Para la meteorización del mineral, ambas columnas se regaron de modo intermitente como ha quedado descrito al comienzo del apartado.

- *Mineral sumergido (S)*

La disposición de residuos mineros bajo agua es uno de los métodos que se han planteado para la prevención del drenaje ácido (Doepker y Drake, 1991; Ritcey, 1991; Lapakko, 1994). En el sistema real que se estudió, la mayor parte del mineral se encontraba bajo agua. Con el fin de reproducir la evolución del residuo en esta zona y compararlo con la evolución en la zona de mineral expuesto al aire, se prepararon dos columnas: una con el mineral sumergido (S) y otra con el sistema de ciclos de humedad/sequedad (H-S).

La columna de mineral sumergido (S), se mantuvo con un nivel de líquido constante que fue el alcanzado tras la adición de 500 ml de agua destilada. Primero, se añadieron lentamente 250 ml para mojar el mineral, y los 250 ml restantes se añadieron para mantener el mineral completamente sumergido. La evaporación se repuso con agua destilada. Por su parte, en la columna H-S se establecieron ciclos de humedad-sequedad con el sistema de riego descrito anteriormente.

En ambas columnas se utilizaron 300 gramos de mineral seco procedente de la pulpa P1.

- *Recirculación de líquidos (R)*

Existen ciertas zonas en el sistema real objeto de estudio, donde el mineral queda expuesto superficialmente, no sólo al riego eventual del agua de lluvia (lo que se simuló mediante los ciclos de humedad-sequedad), sino también a la acción constante del propio agua de la presa, que a su vez puede proceder de la meteorización del residuo. La lixiviación del mineral debida al efecto del agua de la presa (con pH ácido y un contenido importante de metales y sulfatos disueltos) se trató de reproducir a través de un experimento en el que la columna se regó con agua recirculada.

Para realizar este ensayo, se montaron dos columnas: la de recirculación (R), que se comparó con otra sometida a ciclos de humedad-sequedad (h-s).

Para el diseño de la columna R (Figura 12), se utilizó pulpa en lugar de mineral seco, con la misma relación agua/mineral que tenía la muestra de partida utilizada (pulpa P2 caracterizada anteriormente). La razón fue aprovechar el propio agua de la muestra para la recirculación. La cantidad de pulpa que se utilizó fue el equivalente a 250 gramos de mineral seco. El riego de la columna R fue de 40 ml/día, volumen de agua elegido tras

comprobar que mediante este régimen el mineral se humedecía pero no se empapaba (en cuyo caso la haría semejante a S). El riego se efectuaba cada 24 horas mediante una bomba peristáltica. Este tiempo resultó ser suficiente para que percolara el agua añadida cada día sin inundar el mineral. La evaporación se repuso con agua destilada.

La columna h-s fue semejante a H-S, esto es, con sistema de ciclos.

#### -Influencia de la altura de lecho

Con la misma filosofía de ciclos de riego descrita en el caso 1, se montaron dos columnas de cristal de 50 cm de altura y 15 cm de diámetro (h33) y de 100 cm de altura y 15 cm de diámetro (h66), respectivamente, para estudiar la influencia de la altura de lecho en la meteorización del mineral (Figura 12). Se utilizaron 700 y 1.400 g de mineral, respectivamente. Éste se dispuso como pulpa sobre una capa de cuarzo. El riego establecido fue de 150 ml en h33 y de 300 ml en h66. La altura de lecho que se alcanzó en cada una de ellas fue de 33 y 66 cm, respectivamente. El tiempo de contacto y el régimen de ciclos elegido fue el mismo que en el caso descrito anteriormente. El mineral utilizado fue la pulpa P1. En este caso, las columnas no estuvieron termostatizadas a 30 °C sino que se mantuvieron a temperatura ambiente.

#### -Columnas grandes de meteorización

Los experimentos de meteorización se realizaron también a mayor escala con el fin de aproximar el modelo a condiciones más reales. Para ello, se montaron dos columnas de metacrilato de 150 cm de altura y 15 cm de diámetro con el diseño habitual de los ensayos de meteorización en columna, esto es, el mineral se dispuso como pulpa sobre un lecho de 20 cm de cuarzo, el riego se efectuó por la parte superior y el drenado se recogió a través de un tubo situado en la parte inferior (Figura 12).

Se utilizaron en cada una de las columnas 30 Kg de pulpa con un 30 % de sólidos. La duración de los ensayos fue de nueve meses. En una de las columnas de meteorización (M), se utilizó la pulpa P1 y en la otra (M2), la pulpa P2. La altura final de lecho que se alcanzó en las columnas, una vez sedimentado el sólido, fue de 65 y 50 cm, respectivamente. Las columnas estuvieron termostatizadas a 30 °C, para lo cual se utilizó una caja metálica a la que se había acoplado una turbina que recirculaba el aire, y un termostato que controlaba la temperatura. Ésta se mantuvo entre 28 y 33 °C durante el tiempo que duró el experimento.

Se utilizaron 2.000 ml de agua destilada para el riego de cada columna, en cada ciclo.

El resumen de las características de todas las columnas empleadas en el estudio del sistema aparece descrito en la Tabla XII.

Tabla XII: Variables de las columnas utilizadas en los experimentos de meteorización

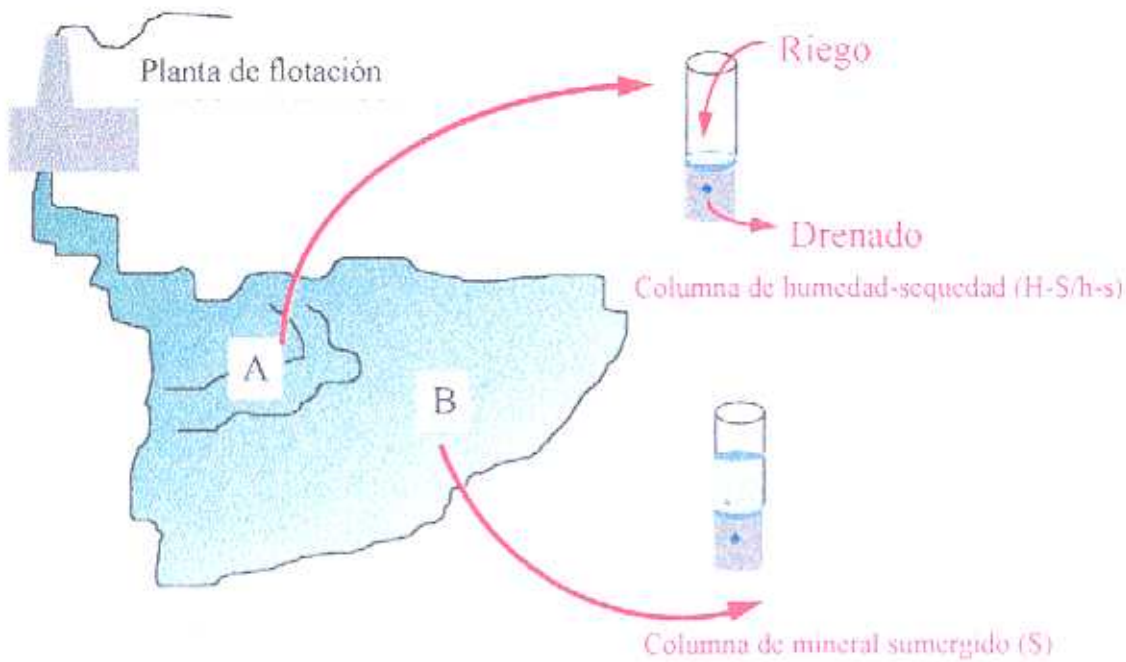
Columna	Ø (cm)	h <sub>lecho</sub> (cm)	V <sub>lecho</sub> (cm <sup>3</sup> )	Mineral (g)	V <sub>agua añadida</sub> (ml/ciclo)	V <sub>agua drenada</sub> (ml/ciclo)
M	15	65	11486,45	9000 (P1)	2000	1800
M2	15	50	8836	7000 (P2)	2000	1800
h33	6	33	933	731 (P1)	150	135
h66	6	66	1781	1396 (P1)	300	270
R	6	11	311	244 (P2)	40 ml/día	-
h-s	6	11	311	244 (P2)	280ml/semana	160
S	6	13,5	381,70	300 (P1)	200	150
H-S	6	13,5	381,70	300 (P1)	200	150
L	6	13,5	381,70	300 (P1)	200	150
Li	6	13,5	381,70	300 (P1)	200	150

En general, el riego de todas las columnas se realizó con un volumen de agua proporcional al volumen de lecho del mineral.

En la Tabla XII se puede observar que el volumen de agua añadido no coincide con el volumen de agua drenado (recogido), esto se explica por el hecho de que parte del agua se evaporó durante el tiempo que duró el ciclo de humedad (tiempo de contacto sólido-líquido).

Semanalmente, el volumen de agua añadido en h-s (280 ml) se correspondió con el volumen de agua añadido en R (40ml x 7 días = 280 ml).

En definitiva, con cada una de estas columnas se trató de reproducir cada uno de los “ambientes” que se dieron en el sistema. En la Figura 13 se especifican éstos, así como la columna-modelo utilizada para cada caso específico.



A: Lenguas de pirita superficial  
 B: Pirita Sumergida

Figura 13. Modelización del sistema

### 2.5.3.b.- Seguimiento de variables

Los experimentos de meteorización se siguieron a partir del análisis de distintas variables medidas en los drenajes de las columnas. Las variables químicas elegidas fueron pH, Eh, concentración de hierro, de cobre, de cinc, de ion ferroso y de iones sulfatos. También se realizaron observaciones al microscopio óptico de los efluentes para detectar la posible presencia de bacterias.

Los análisis siempre se realizaron en el volumen total de drenado, esto es, en el volumen recogido una vez que la columna se drenaba completamente. Se observó que en algunos casos la muestra se transformaba (aparición de cierta coloración rojiza) con bastante rapidez, por lo que se decidió proceder de la siguiente manera: una vez recogida la muestra, se separaba una parte que se acidulaba con  $H_2SO_4$  para prevenir la oxidación y la consiguiente precipitación de metales, que en algunas muestras, y dado que el pH era crítico, se producía con mucha rapidez. Sobre estas muestras aciduladas, se realizaba el

análisis de metales. La lectura del pH y Eh, así como el análisis de iones sulfato, se realizaban de inmediato sobre la muestra recién drenada.

En el caso de las columnas R y S, se tomaron 10 ml para realizar las correspondientes medidas.

### **2.5.3.c.- Desmontaje de las columnas: cuantificación microbiológica y ensayos de actividad**

Una vez finalizados los experimentos de meteorización, las columnas se descargaron y se procedió al estudio y caracterización de las muestras de mineral representativas de cada nivel en cada columna. Este estudio consistió básicamente en el análisis mineralógico y en el estudio de la microbiología asociada a cada muestra. Para la caracterización microbiológica se realizó un recuento de bacterias litoautótrofas, azufre y hierro oxidantes, y de bacterias reductoras de sulfatos (BRS) de acuerdo con el criterio del número más probable (NMP) descrito en el apartado 2.3.2.. También se realizó un recuento en placa de heterótrofos totales (apartado 2.3.2.).

La selección de muestras se realizó de acuerdo a los siguientes criterios:

#### -Columnas pequeñas de meteorización

En el caso de las columnas pequeñas, y dado que la altura de lecho era de 6 cm, se eligieron sólo dos muestras: una superficial y otra profunda (se empleará la notación Xs y Xp, donde X indica el nombre de la columna y s y p, indican la localización de la muestra en la columna, superficial y profunda, respectivamente).

#### -Columna M

En el desmonte de la columna M se hizo un muestreo vertical y radial de acuerdo al siguiente criterio: verticalmente, dado que la altura de lecho era de 65 cm, se tomaron muestras cada 20 cm. Para una misma altura, se tomaron también dos muestras: una interior y otra exterior (Figura 14). La razón para esta selección radial de muestras fue que, como consecuencia de la meteorización en la columna, se habían formado canales preferenciales que mostraban el mineral más oxidado exteriormente de lo que cabría esperar para el interior. Se consideró interesante analizar esta diferencia.

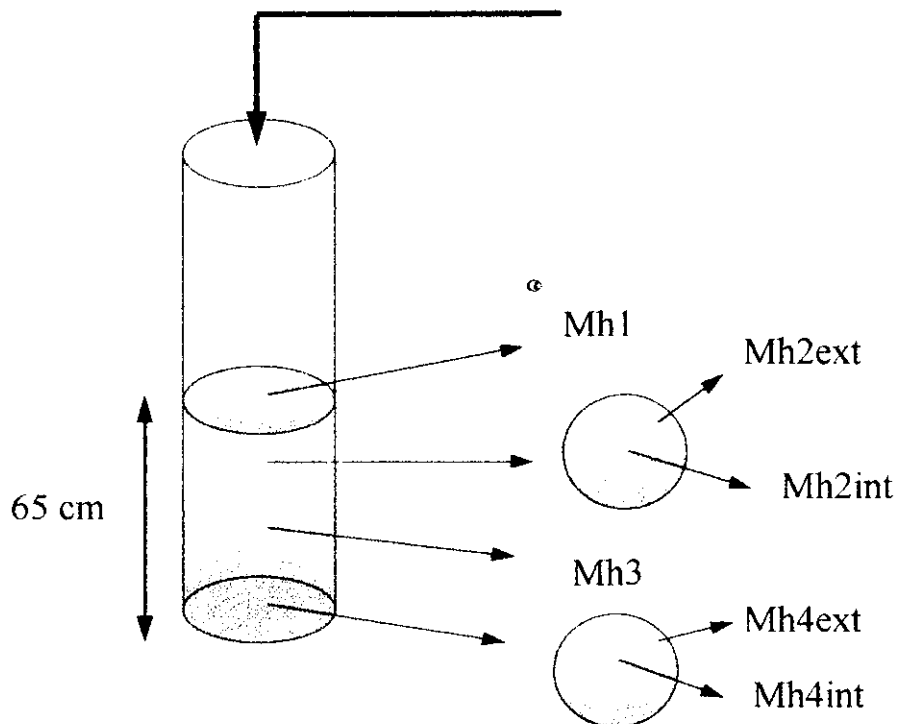


Figura 14: Muestras seleccionadas en el desmontaje de la columna M

#### 2.5.3.d.- Ensayos de actividad

Como se ha indicado anteriormente, la presencia de microorganismos no es el único factor determinante en la caracterización microbiológica de un sistema. De hecho, más importante que la presencia de microorganismos es el estado de actividad en el que se encuentran.

Debido a ello, además de realizar la cuantificación microbiológica, interesaba comprobar en que estado de actividad fisiológica se encontraban las bacterias presentes en los distintos niveles de la columna; para ello, se prepararon dos tipos de ensayos:

- *Ensayos de actividad hierro-oxidante*

La actividad hierro-oxidante de las bacterias asociadas al mineral, se cuantificó a partir de la evolución de la concentración de ion ferroso con el tiempo, en ensayos preparados con 5 g de muestra de mineral (de cada uno de los niveles seleccionados en el desmonte de las columnas) y 100 ml de medio 9K a pH 2, conteniendo 33,3 g/l de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . El parámetro determinante en el seguimiento de estos cultivos fue la concentración de hierro ferroso, pero también se midió la evolución del pH y Eh como un testigo indirecto de la actividad microbiológica.

Los valores de pH y Eh se midieron directamente sobre el matraz. Para determinar la concentración de hierro (según el método descrito en 2.2.2.b.), se tomó periódicamente 1 ml de muestra. Los ensayos se realizaron en matraz con agitación orbital a 35 °C. La evaporación se repuso, previa pesada, con agua destilada estéril.

- *Ensayos de actividad reductora de sulfatos*

La actividad de las bacterias anaerobias reductoras de sulfatos se siguió a partir de la medida de la concentración de sulfatos (apartado 2.2.2.c.) en ensayos preparados sobre medio C a pH 7 (apartado 2.3.1.). Para ello, se tomaban 20 g de mineral (o pulpa) y se añadía medio C (aproximadamente 100 ml) hasta llenar los frascos, que se cerraban herméticamente. Los ensayos se realizaron a 30°C. Periódicamente, se hacía una determinación de pH y Eh, y se tomaba 1 ml para el análisis de ión sulfato. Para conservar la anaerobiosis, se burbujeara nitrógeno durante unos minutos a través de una goma a la que se le acopló un filtro Millipore de 0,22 µm, antes de volver a cerrar los frascos para evitar la contaminación de los cultivos.

## **2.6.- ENSAYOS DE TRATAMIENTO DE DRENAJES ACIDOS DE MINA CON BACTERIAS REDUCTORAS DE SULFATOS**

### **2.6.1.- Cultivos y condiciones experimentales**

Los ensayos con bacterias reductoras de sulfatos se prepararon mediante inóculos al 10 % en el medio correspondiente (ver apartado 2.3.1.). Para estos ensayos, se utilizaron frascos estériles cerrados herméticamente y llenos en su totalidad. Periódicamente, estos frascos se abrían para tomar una muestra y, antes de cerrarlos, el oxígeno que hubiera entrado se desplazaba mediante el burbujeo de nitrógeno, el cual se hacía pasar a través de un filtro Millipore estéril de 0,22 µm, tal y como ha sido descrito anteriormente.

Para algunos experimentos, se utilizaron viales estériles. En éstos, la toma de muestra se realizaba pinchando el tapón con una jeringuilla estéril a través de la cual se succionaba la muestra, no haciéndose necesario, en este caso, el burbujeo de nitrógeno.

Todos los cultivos se mantuvieron a 30 °C.

Una vez tomadas las muestras, se centrifugaban de inmediato antes de realizar los correspondientes análisis. La determinación de sulfatos, por tratarse de un método turbidimétrico (apartado 2.2.c.), es especialmente sensible a sólidos en suspensión y requiere que en la lectura no existan interferencias. Por esto, las muestras procedentes de los cultivos de bacterias reductoras de sulfatos pueden suponer una fuente de error importante ya que presentan muchos precipitados procedentes de los sulfuros originados en la reducción biológica.

### **2.6.2.- Reducción biológica de sulfatos**

Se prepararon ensayos para el seguimiento de la concentración de sulfatos en los cultivos. Éstos se realizaron en los frascos y viales descritos en el apartado 2.6.1.. Se estudió la reducción biológica en medio C a pH 7 y 5. Sobre las muestras tomadas periódicamente, se hacía una lectura inmediata de pH y Eh y el correspondiente análisis de sulfatos, para lo cual las muestras eran previamente centrifugadas.

### **2.6.3.- Precipitación de metales y rango de pH óptimo de crecimiento**

Para los ensayos de precipitación de metales, se utilizó medio C con cobre en un rango de concentraciones desde 25 a 200 ppm. El pH del medio se ajustó a 5, dado que la solubilidad del cobre es muy baja a valores de pH superiores.

Previamente, se realizaron ensayos de crecimiento bacteriano a distintos valores de pH con el fin de determinar el límite inferior de acidez en el que las bacterias se mostraban activas. Para ello, se preparó medio C a valores de pH comprendidos entre 4 y 7 y se ensayó el crecimiento de las bacterias en las mismas condiciones descritas en 2.6.1.

El seguimiento de los ensayos de precipitación de metales se realizó a partir de la medida de la concentración en solución del metal correspondiente. Sobre las muestras tomadas periódicamente, se hacía una determinación inmediata de los valores de pH y Eh. Después, se centrifugaban y se procedía a medir la concentración del metal mediante absorción atómica.

De un modo paralelo a la concentración de cobre, se siguió también la evolución de la concentración de hierro. El hierro se incorporaba con el medio C en forma de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en una concentración inicial de aproximadamente 30 ppm.

## *Resultados y Discusión*

### 3.1.- EVOLUCION DEL RESIDUO EN LA PRESA: CUANTIFICACION DE LA TRANSFORMACION

El estudio del sistema, y de las transformaciones que afectan a los residuos sólidos, pasa necesariamente por la caracterización previa del mismo. Por este motivo, la primera tarea a desarrollar fue el “reconocimiento” de la presa de estériles y el seguimiento del residuo en todo su recorrido. Se conocían las características químicas de la pulpa a la salida de la planta de flotación, así como las del agua en el rebose de la presa, pero faltaban muchos aspectos por concretar; entre ellos, el estado en el que se encontraba la pulpa a lo largo de su recorrido, qué sucedía en la presa o cual era la distribución del pH y demás variables químicas en el sistema.

El primer acercamiento al problema consistió en el estudio de la evolución del pH de la pulpa desde la salida de la planta hasta el rebose en la presa. Para ello, se realizaron los muestreos descritos en el apartado 2.1.2., cuyo análisis se expone a continuación.

#### 3.1.1.- Muestreos

##### 3.1.1.a.- Evolución del pH en el sistema

###### -Muestreo en planta

Como punto de partida, el muestreo en la planta de flotación se realizó con el objeto de conocer si existían microorganismos que pudieran estar presentes acompañando al mineral desde el momento de su vertido, qué microorganismos aparecían en este caso, o si por el contrario los microorganismos se sucedían, seleccionaban y aparecían cuando las condiciones eran óptimas para su crecimiento. Esta caracterización microbiológica de las muestras tomadas en planta se completó con el estudio de las variables químicas de distintas muestras de pulpa representativas del proceso de flotación.

Las muestras se tomaron en los distintos puntos de la planta de flotación indicados anteriormente (Figura 7). A estas muestras se les hizo un análisis químico general. Los valores de pH en las muestras, tanto en el momento de ser tomadas ( $pH_0$ ) como al cabo de cinco días ( $pH_5$ ), se reflejan en la Tabla XIII.

Tabla XIII: Muestreo en planta de flotación

Muestra	Descripción	Eh <sub>s</sub> (mV)	T* (°C)	pH <sub>0</sub>	pH <sub>s</sub>
R-EP-01	Rebose de agua clara de espesador	133	23.8	8.6	4.3
R. EP-06	"	153	23.2	8.5	3.6
R. EP-04	"	-67	19.3	12	11.4
R. EP-03	"	151	19.8	6.4	-
R. EP-02	"	104	20.6	5.7	3.9
Salida Arqueta	-	101	20.1	6.2	4.3
H. EP-04	Lodo espesador	-51	19.1	11.7	10.9
H. EP-06	"	76	22.8	9.2	6.3
P.E.	Pulpa	-12	21.9	10.1	5.3

R. EP. - : rebose espesador; H. EP. - : hundido espesador; P. E. : pulpa estéril

La muestra R. EP-06 se seleccionó para hacer el estudio microbiológico, debido a que su pH había evolucionado mucho (de 8,5 a 3,6) y además por su localización en la planta al tener una relación más directa con la pulpa final. Esta muestra correspondió al rebose del espesador 06. La procedencia de R. EP-06 se muestra en el diagrama de flotación de la Figura 7 y, de un modo más esquemático, en la Figura 15.

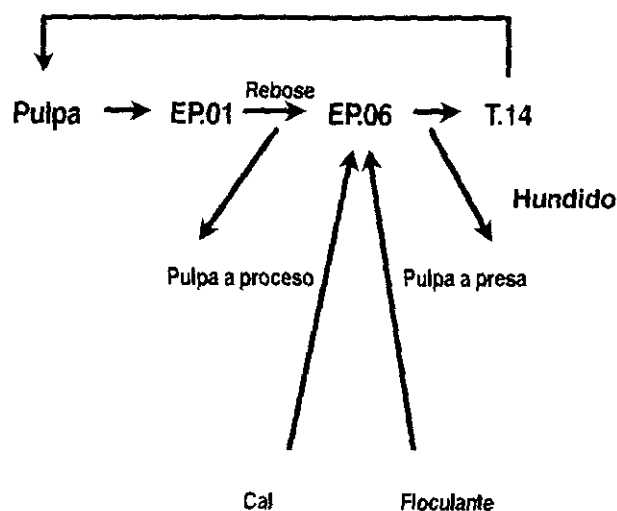


Figura 15: Localización de la muestra R. EP.06 en el esquema de flotación

En el espesador 06 se clarifica el agua que se va a recircular al proceso. Por ello, se adiciona cal para aumentar el pH y precipitar los metales en forma de hidróxidos.

-Muestreo en el recorrido de la pulpa

Se hizo un seguimiento del recorrido de la pulpa desde la salida de la planta hasta la presa. A lo largo de este recorrido, se midió el pH y se tomaron muestras en distintos puntos representativos del mismo. El muestreo de la pulpa a lo largo de este recorrido nos permitiría comprender en qué momento suceden los cambios que afectan al residuo: si éstos ocurren durante el trayecto de la pulpa hasta la presa, debido a la fuerte aireación a lo largo del mismo, o bien una vez en la presa durante su estancamiento. Hay que tener en cuenta que el desnivel entre la planta y la presa es importante y, por tanto, la pulpa hace este recorrido bastante rápidamente y sometida a una importante aireación. El esquema del recorrido se refleja en la Figura 3, en la que se indican, además, los puntos en que fueron tomadas las muestras.

En ciertos lugares en los que debido a la orografía del terreno el agua se remansaba, ésta presentaba un aspecto diferente. aparecía el clásico color rojo de las aguas oxidadas y en las orillas podían observarse precipitados rojo-amarillentos. Mientras que el agua remansada tenía un valor de pH de 2,5, el agua que circulaba inmediatamente a su lado lo hacía a pH 6 (Figura 16).

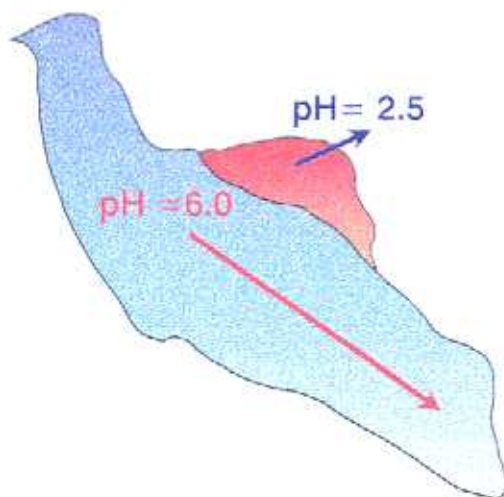


Figura 16 : Remansamiento de la pulpa en su recorrido hacia la presa

Los valores de pH correspondientes a las muestras tomadas durante el trayecto planta-presa se reflejan en la Tabla XIV.

Tabla XIV: Muestreo en el recorrido de la pulpa

Muestra	Descripción	Eh <sub>s</sub> (mV)	T <sup>a</sup> (°C)	pH <sub>0</sub>	pH <sub>5</sub>
P.1.	pulpa	-16	21,2	11,1	9,2
P.2.	pulpa	-22	20,7	10,6	9,0
P.3	lodo en el margen	250	-		4,0
P.4	pulpa	-70	16,9	6,5	6,9
P.5	canalillo de agua a unos 5m de la orilla que circula sobre la pulpa ya sedimentada en su llegada a la presa.	23	17,5	6,0	5,7
F-1	precipitado amarillento en remansamiento	553	13,3	3,2	-
F-2	agua roja	450	13,0	2,4	-
Canal perimetral	agua clara	132	20,4	7,7	-

Como puede observarse, los valores de pH alcalino se mantuvieron a lo largo del recorrido de la pulpa, lo que vino a demostrar que las transformaciones que condujeron a la acidificación del agua no tuvieron lugar durante el recorrido. La caída de la pulpa hasta la presa fue demasiado rápida y, a pesar de la fuerte aireación, el residuo no llegó a modificarse. Este hecho se puede apoyar además en el dato de potencial redox, que se mantuvo reductor durante este recorrido.

*-Muestreo en presa : fondo y superficie*

La presa fue la parte del sistema que más exhaustivamente interesó muestrear. Por un lado, porque fue el lugar donde el residuo se estancó y, por ello, donde los tiempos de reacción fueron mayores. Por otro, porque fue donde existió un gradiente de oxígeno con la profundidad y donde, por tanto, las posibilidades de variabilidad química y microbiológica fueron mayores.

Los puntos de muestreo en la presa se recogen en la Figura 8. Los valores de pH correspondientes a las muestras tomadas están reflejados en la Tabla XV. Las muestras que aparecen sombreadas corresponden a aquellas que fueron seleccionadas para realizar la caracterización microbiológica.

Mediante el análisis de las muestras tomadas en la presa, se comprobó que existía un gradiente de pH con la profundidad, que iba desde los valores más ácidos correspondientes a las muestras de agua superficial (pH en torno a 3), que se mantenían además en toda la extensión de la presa, hasta los valores de pH ligeramente alcalino (pH en torno a 7) correspondientes a las muestras de fondo. La baja solubilidad del oxígeno en el agua hizo que en el fondo de la presa se mantuvieran condiciones anaeróbicas (Eh<0).

Tabla XV: Muestreo en presa

Muestra	Descripción	profundidad aprox.(m)	Tª (°C)	Eh <sub>5</sub> (mV)	pH <sub>0</sub>	pH <sub>5</sub>
S.1	Agua clara superficial	0	14	271	3,6	3,0
D.1.	Lodo superficial	4	13,5	-	5,8	5,5
S.2.	Agua clara superficial	0	14,2	263	4,6	3,8
D.2.	Lodo	1	12,3	298	7,2	7,1
S.4.	Agua clara superficial	0	13,2	154	3,2	2,8
D.3.	Lodo	5	-	-	-	4,7
D.4.	Lodo	1	-	-	-	-
S.5.	Agua clara superficial	0	13,1	292	3,4	2,9
D.5.	Lodo	9	-	-	-	-
S.6.	Agua clara superficial	0	13,0	281	3,5	2,9
D.7.	Lodo	6	13,0	-	-	-
S.7.	Agua clara superficial	-	15	281	3,4	2,9
C (BRS)	Lodo	fondo	13,2	-32	7,4	-
A (BRS)	Lodo	-	12,9	-30	-	-
À (BRS)	Lodo	fondo	13	-45	-	-

BRS: muestras tomadas para el aislamiento de bacterias anaerobias reductoras de sulfatos

### 3.1.1.b- Del residuo inicial al vertido final

Los datos aportados por el “primer reconocimiento” del sistema confirmaron que efectivamente el residuo que se vertía desde la planta sufría una transformación que se reflejaba claramente en la evolución del pH. La imagen descriptiva general de la evolución del pH de la pulpa se ilustra en la Figura 17.

Los puntos del sistema correspondientes al vertido a la salida de planta (pulpa P.E.) y al rebose final del agua en la presa (CV-2), son los puntos inicial y final de referencia en cuanto a la transformación que sufrió el residuo.

Como puede deducirse de los valores de pH obtenidos en los distintos muestreos, la situación general del sistema fue la siguiente (Figura 18): la planta de flotación generó un residuo de naturaleza básica A. Éste se abandonó en la presa de estériles (sistema C), y fue aquí donde tuvieron lugar una serie de transformaciones que condujeron a un residuo de naturaleza distinta B. Los procesos (D) a través de los cuales tuvo lugar esta transformación pueden ser varios y deben ser identificados y cuantificados.

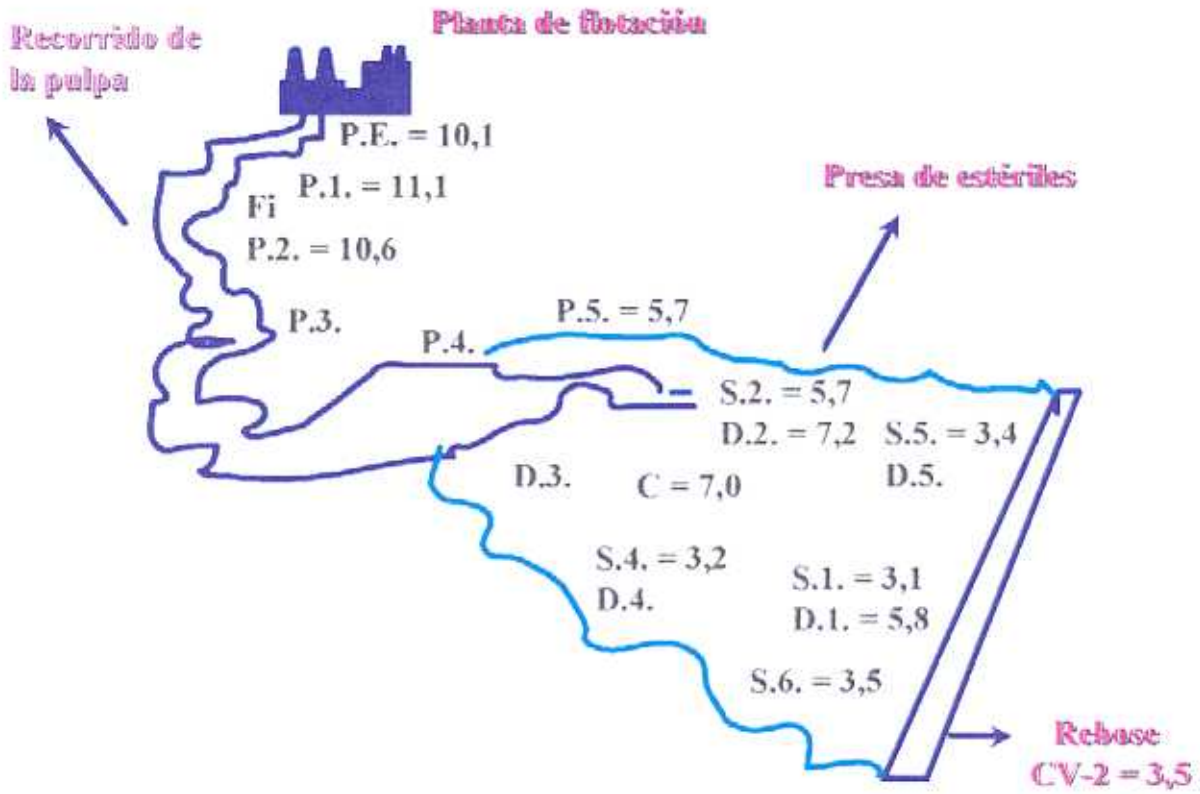


Figura 17: Evolución del pH en el sistema

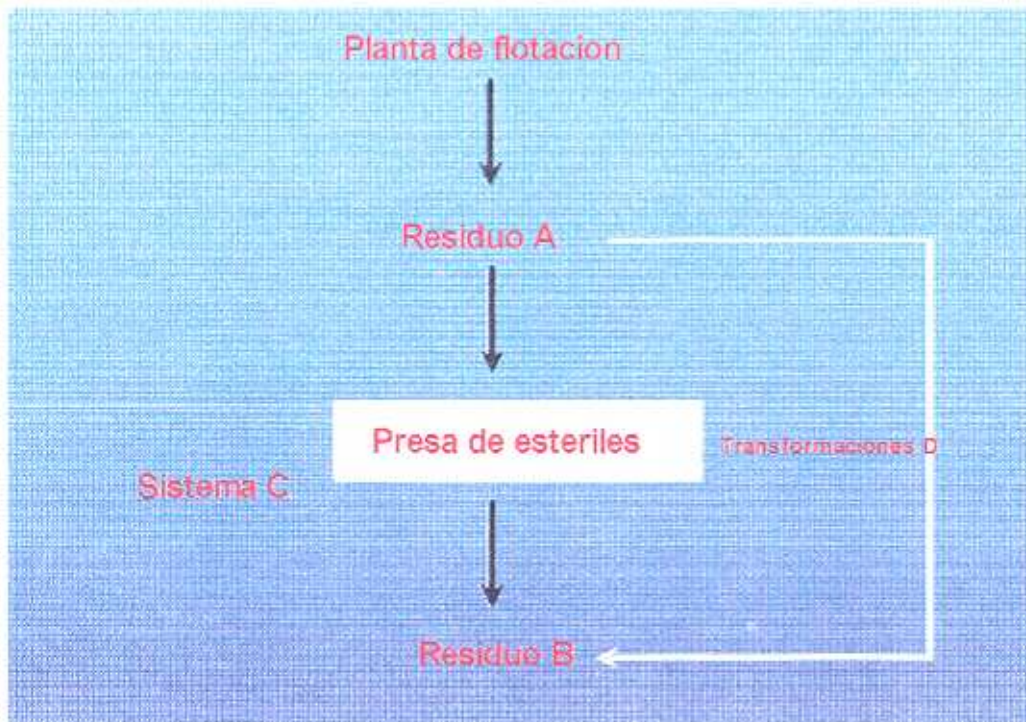


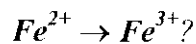
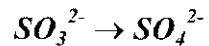
Figura 18: Planteamiento del problema

A través de la experimentación que se describe a continuación, se evaluó la naturaleza de los residuos A y B y se investigaron los posibles factores responsables de la transformación D. En este sentido, se trató de dar respuesta a cuestiones como:

*¿Qué tipo de transformaciones cabe considerar?*

*¿Cuáles de estas transformaciones fueron posibles **generadoras de acidez**:*

***Pirita** → **sulfatos***



*¿Intervinieron las bacterias en alguna/as de estas transformaciones?*

Todas estas preguntas trataron de resolverse a partir de los resultados obtenidos de la caracterización química, microbiológica y mineralógica del sistema.

Las variaciones observadas en algunos parámetros medidos en A y en B permitieron proponer distintas hipótesis acerca de los posibles factores potencialmente implicados en la transformación. Así, por ejemplo, la observación de que el ion sulfito desapareció en el sistema C llevó a evaluar la influencia de su cinética de oxidación; el incremento en la concentración de metales y sulfatos medido en B se trató de relacionar con la oxidación de la pirita vertida en A; etc.

La evolución del residuo, así como la influencia de todos estos factores en su transformación, se investigaron a través de un sistema en columna con el que se modelizó el comportamiento del residuo A.

Anteriormente, se ha definido la “meteorización” como la transformación que sufre un residuo abandonado. La situación en el dique de estériles fue intermedia entre lo que sería un residuo recién vertido y un residuo “meteorizado”. El continuo aporte de pulpa, la aireación y el aporte de reactivos procedentes de la flotación hicieron que el residuo no se “abandonara” totalmente sino que permaneciera en una situación “dinámica”. Más adelante, se describirá cómo este hecho pudo comprobarse claramente cuando la planta sufrió una parada durante un periodo de varios meses. La presa evolucionó entonces a lo que podríamos considerar condiciones de “abandono”, siendo las condiciones físico-químicas de esta nueva situación considerablemente distintas.

### 3.1.2.- Caracterización de las muestras sólidas

#### 3.1.2.a- Distribución granulométrica

Para llevar a cabo este estudio, se seleccionaron una serie de muestras representativas del sistema correspondientes a los vertidos inicial y final y a distintos puntos del fondo de la presa de estériles. En concreto, se seleccionaron las muestras D.1. (lodo a 4 m de profundidad en la presa), P.E. (pulpa a la salida de la planta), C (lodo del fondo de la presa a partir del cual se aislaron las bacterias anaerobias) y D.5. (lodo a 9 m de profundidad en la presa). Como es bien conocido, el tamaño de partícula de un mineral influye decisivamente en la velocidad de oxidación del mismo, de tal manera que ésta se ve favorecida cuando aquel se encuentra finamente dividido, esto es, cuanto mayor es la superficie de reacción expuesta al medio (Lundgren y Silver, 1980; Fdez-Rubio, 1986).

Los correspondientes diagramas de distribución de tamaños de las muestras sólidas aparecen en las Figuras 19, 20, 21 y 22.

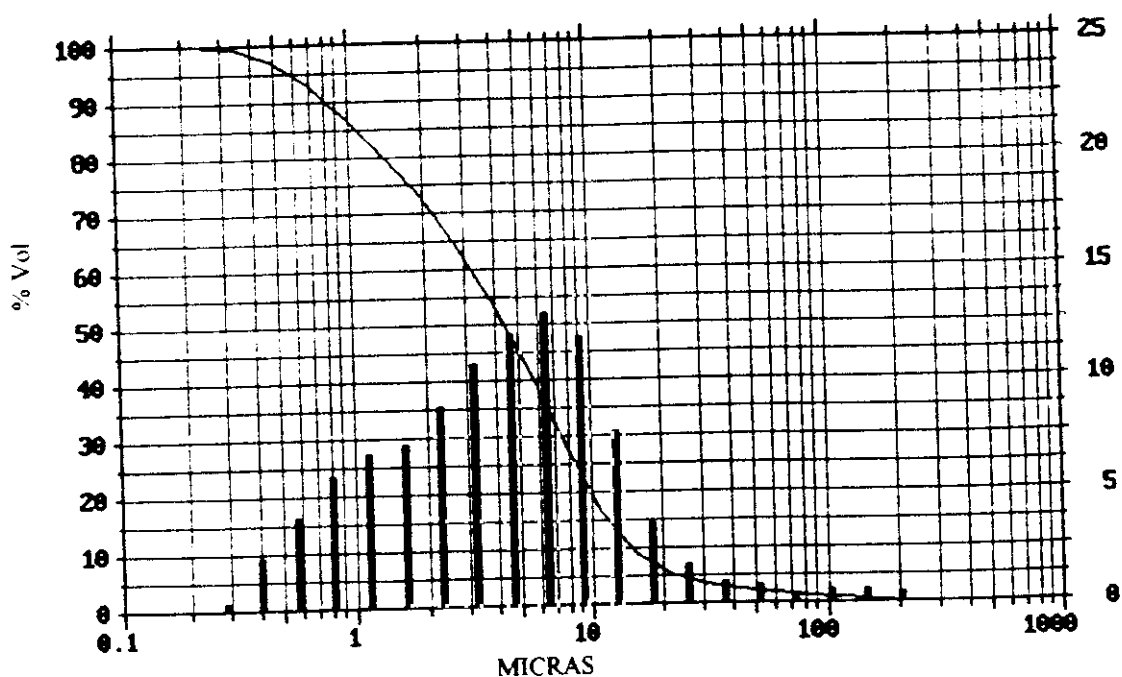


Figura 19: Análisis granulométrico correspondiente a la muestra D.1.

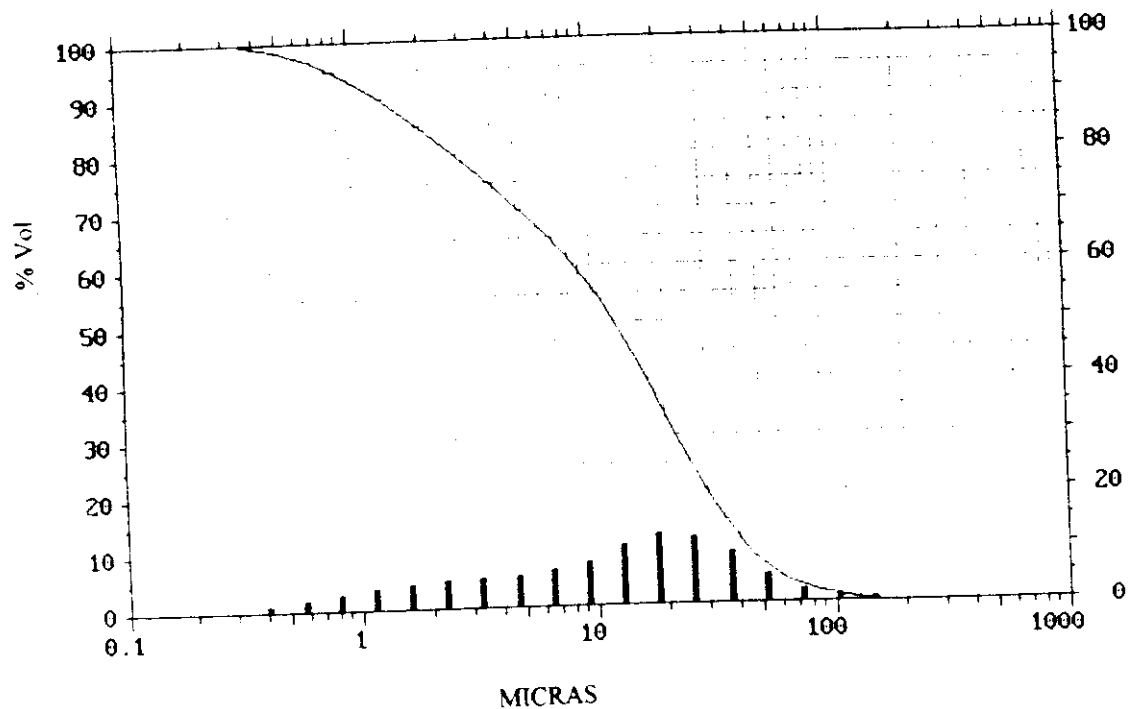


Figura 20: Análisis granulométrico correspondiente a la muestra P.E.

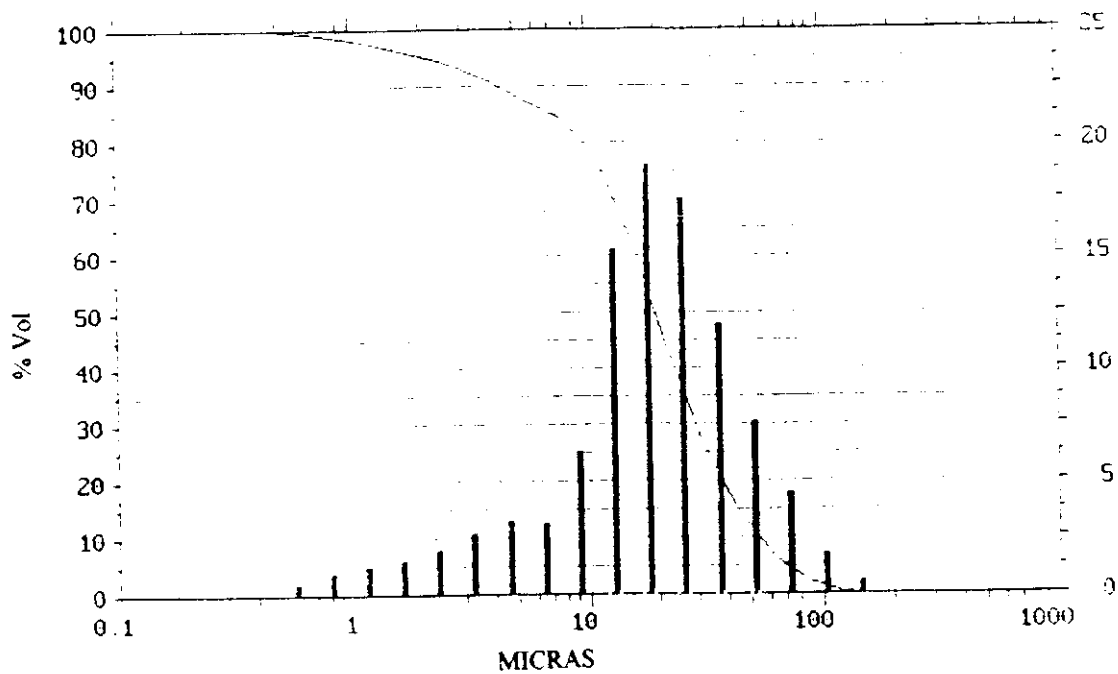


Figura 21: Análisis granulométrico correspondiente a la muestra C

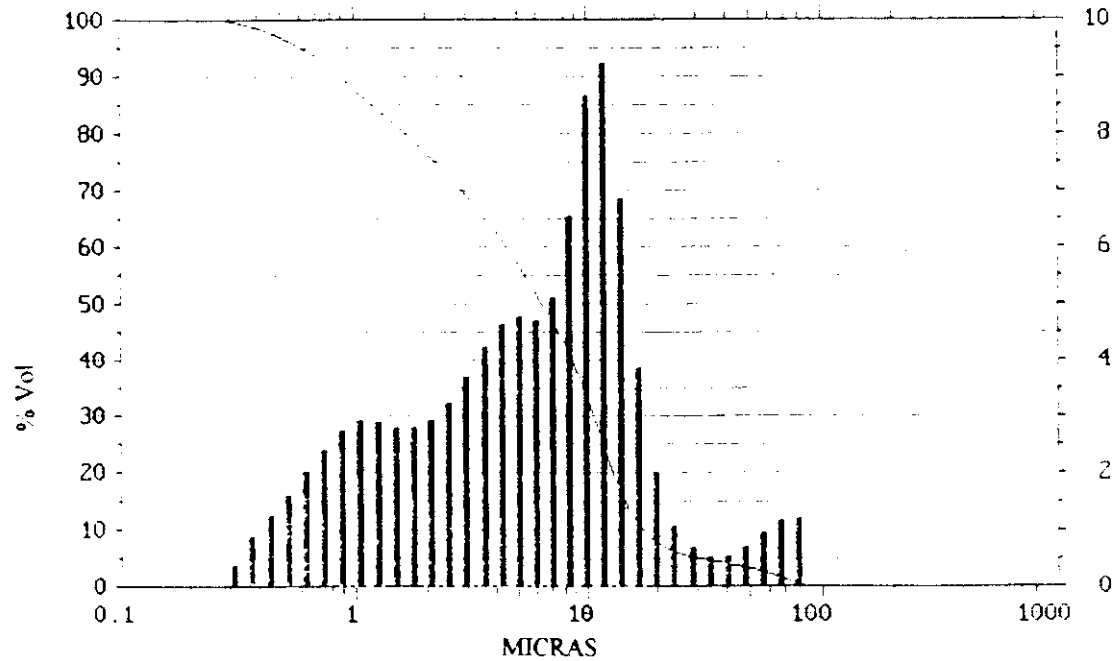


Figura 22: Análisis granulométrico correspondiente a la muestra D.5.

Finalmente, la Tabla XVI resume los resultados obtenidos en relación al tamaño de partícula de las distintas muestras, indicando los valores correspondientes, en cada caso, al porcentaje (80, 50 y 10 %) de sólido por debajo de un determinado tamaño.

Tabla XVI: Tamaño de partícula de las muestras sólidas (en  $\mu\text{m}$ )

Muestra	D-80	D-50	D-10
D.1.	12.98	6.34	0.898
P.E.	9.94	4.35	0.839
C (lodo BRS)	29.62	12.75	1.39
D.5.	36.65	19.73	4.36

El tamaño de partícula de las muestras resultó ser muy fino, como corresponde a las características de un residuo flotado, y bastante homogéneo. Las diferencias de tamaño que se apreciaron en las distintas muestras se debieron a que éstas fueron tomadas en momentos distintos y, por tanto, el tamaño del mineral que salía del proceso podía variar según las condiciones de molienda. Por otro lado, el mineral sedimentado en la presa pudo haber sufrido una selección de tamaño con la decantación, lo que explicaría las variaciones encontradas en las dos muestras tomadas en el fondo de la presa. En definitiva, puede

considerarse que el tamaño de todas las muestras estuvo comprendido entre 10 y 30  $\mu\text{m}$ , con las variaciones atribuibles al proceso de producción.

### 3.1.2.b.- Composición mineralógica

El análisis por difracción de rayos-X de las muestras sólidas reveló que la pirita es su constituyente principal. Estos resultados fueron consistentes con los datos facilitados por la empresa referidos a la naturaleza del vertido correspondiente a la muestra P.E., los cuales indicaban que los residuos sólidos originados en el proceso estaban constituidos fundamentalmente por este mineral. La composición del vertido fue la siguiente:

Calcopirita : 1,44% ( equivalente a 0,5% de Cu )  
Blenda : 0,77 % ( equivalente a 0,45 % de Zn )  
Galena: 0,46 % ( equivalente a 0,4 % de Pb )  
Pirita : 63,37 % ( equivalente a 34,7 % de S )  
Carbohidratos y silicatos : 33,95 %

En la Figura 23 se refleja el difractograma correspondiente a la muestra P.E. en el que puede identificarse a la pirita como único compuesto mayoritario en la muestra, apareciendo bien definidos todos sus picos característicos. Lo mismo sucedió con los análisis de las muestras de lodo del fondo de la presa, obteniéndose idénticos resultados. Estos resultados sobre la caracterización mineralógica indican claramente que la pirita sumergida en la presa no se transformó, puesto que su composición no varió respecto a la vertida en la planta de flotación.

Como contraste, el análisis por difracción de rayos-X de la muestra F-1 (precipitado pardo-amarillento encontrado en un remanso del canal de vertido) reveló que la muestra contenía una jarosita de hierro y amonio, lo que indicaba, además, que en este punto la pirita sí se había transformado. Este resultado estuvo de acuerdo con el bajo valor de pH medido (Figura 16), el cual fue consecuencia de la oxidación de la pirita. Como se indicó anteriormente, el punto F-1 correspondía a un estancamiento de la pulpa en su recorrido hacia la presa y aquí sí existieron condiciones para la oxidación: un intercambio de oxígeno importante y tiempo de reacción suficiente.

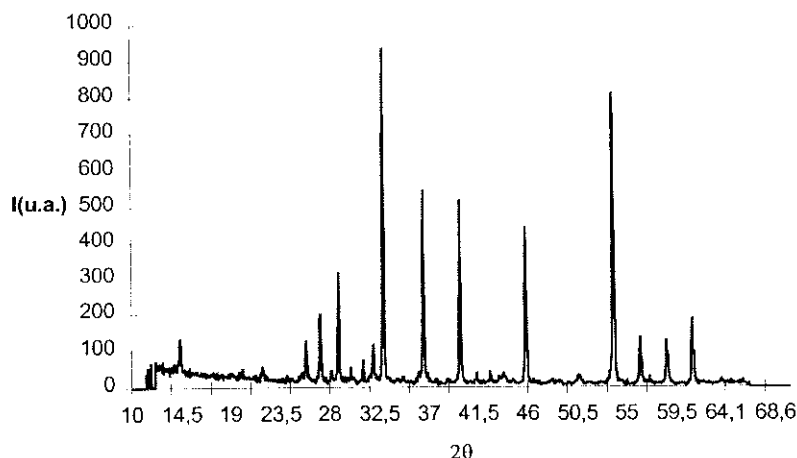


Figura 23: Difractograma correspondiente a la muestra P.E.

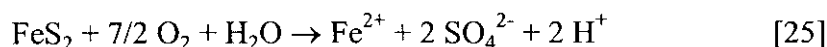
### 3.1.2.c- Composición química

Las muestras P.E. y D.1. se seleccionaron para realizar el correspondiente análisis químico, pues se consideraron representativas de los puntos de vertido y del lodo en la presa, respectivamente. También se realizó un análisis químico de la muestra C (lodo del fondo a partir del cual se aislaron las bacterias reductoras de sulfatos) y F-1 (precipitado en el estancamiento de la pulpa en su recorrido hacia la presa). Los resultados se reflejan en la Tabla XVII.

Tabla XVII: Composición química de cuatro muestras sólidas representativas del sistema

Muestra	Cu(%)	Pb(%)	Zn(%)	Fe(%)	Mn(%)	Ca(%)	Mg(%)	S (%)
D.1.	0,69	1,23	0,70	46,5	0,25	0,17	0,35	43,70
P.E.	0,50	2,83	0,05	38,8	-	-	-	37,60
F-1	0,03	0,04	0,02	46,3	0,00	0,01	0,01	8,35
C (srb)	0,45	1,70	0,10	39,0	0,12	0,01	0,23	39,30

Los análisis de las muestras correspondientes a la pulpa de salida (P.E.), a la pulpa superficial (D.1) y a la pulpa depositada en el fondo de la presa tras el proceso de sedimentación (C), presentaron características similares, lo que confirmó de nuevo que la pulpa que permaneció bajo agua no sufrió alteración. La profundidad de la presa fue suficiente para impedir que el oxígeno difundiera y pudiera alcanzar al mineral del fondo. El oxígeno es imprescindible para la oxidación de los sulfuros y la cinética de la reacción es muy dependiente de la cantidad de oxígeno disponible:



Tal es así, que la disposición de estériles de mina bajo agua se plantea como un método de prevención de drenaje ácido (Ritcey, 1991).

La muestra D.1. correspondiente al lodo superficial regado por el propio agua del sistema tampoco se oxidó. Más adelante se analizará el por qué de esta situación.

La composición de las muestras D.1., P.E. y C coincidió con la de la pirita, lo que confirmó los resultados correspondientes a los análisis de difracción de rayos-X. Se ha destacado especialmente en la Tabla XVII el contenido en S, pues es el parámetro fundamental a la hora de evaluar el potencial de drenaje ácido de una muestra (*British Columbia Acid Mine Drainage Task Force*, 1989), tal y como se ha descrito en el apartado 2.5.1..

Como también se ha indicado anteriormente, F-1 correspondió a una muestra tomada en un remansamiento de la pulpa en su caída. En estas condiciones, todos los factores que pudieron contribuir a oxidar y transformar el mineral, como fueron el agua, las bacterias y el oxígeno, tuvieron tiempo suficiente para actuar, lo cual también se aprecia en la Tabla XVII por la disminución importante de su contenido respecto a otras muestras en las que la pirita no se transformó. Por otro lado, la formación de jarositas ya comentada originó la precipitación del hierro oxidado, de ahí que el porcentaje de este elemento en el sólido se mantuviera elevado.

### **3.1.3.- Caracterización de las muestras líquidas**

#### **3.1.3.a- Análisis químico**

En la tabla XVIII se reflejan los valores de pH, Eh, concentración de metales más representativos, y concentración de iones sulfato y de sulfito (expresadas en ppm) de las muestras líquidas.

Como revelan los datos de la Tabla XVIII, las condiciones químicas del sistema se hicieron extremas en la superficie de la presa (CV-2). Fué aquí donde el pH se mostró más ácido y donde se observó una mayor concentración de metales y sulfatos en solución, mientras que el ión sulfito prácticamente desapareció.

En la presa, se observó además un gradiente químico con la profundidad: mientras que en la superficie los valores de pH fueron ácidos y la concentración de metales fué importante, en el fondo, el pH fué ligeramente alcalino y no existió concentración significativa de

metales en solución. La distribución de las distintas variables químicas se refleja en la Figura 24.

Tabla XVIII: Composición química de las muestras líquidas

Muestra	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ppm	SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> ppm	pH	Eh (mV)	Cu ppm	Pb ppm	Zn ppm	Fe ppm	Ca ppm	Mn ppm	Mg ppm
P.E.	686	88	8,5- 10	10	<0,1	<0,1	<0,1	0,4	495	0,0	15
R.EP-06	853	96	8,46	+140	<0,1	1,2	0,5	0,6	530	1,2	20
R.EP-01	1071	112	8,66	+140	<0,1	0,3	0,0	0,2	560	2,0	35
H.EP-06	877	76	9,20	+142	<0,1	0,6	0,2	0,8	520	1,0	25
R.EP-04	405	128	12,0	-15	<0,1	0,5	0,0	0,0	460	0,0	0,6
Canal P.	718	102	7,77	+108	<0,1	0,3	0,4	0,0	450	1,0	20
CV-2	1850	3-10	2,94	220	0,3	5,7	30	50	470	15	50
P.1.	653			-16	<0,03	1,135	0,022	0,25			
F-1				553	1,52	1,36	32	51,52			
F-2				450	11,45	1,56	191,2	1218			
P.2.	742			-22	<0,03	0,68	0,033	1,65			
Dj	440		7,07	-32	0,3	9,5	26	13,1			
C	450		7,0	-4	0,6		0,1	3,3			

La explicación a estos resultados estuvo en el hecho de que en la superficie de la presa las condiciones fueron claramente oxidantes (Eh 220 mV) lo que favoreció que se generase acidez (pH 3) y la consiguiente liberación de metales al medio. Estas condiciones se mantuvieron de un modo uniforme en toda la superficie acuosa, salvo junto a la zona de descarga, donde el pH presentaba valores comprendidos entre 5,5 y 6,0, que fueron medidos en la interfase agua-mineral.

El hierro merece una atención particular ya que la relación Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup> puede ser un indicativo de la posible actividad bacteriana. El hierro presente en las muestras superficiales de la presa se encontraba en forma de hierro férrico fundamentalmente (de 50 mg/l de hierro presentes en la muestra CV-2, sólo 1,72 mg/l correspondieron al hierro ferroso), lo cual puso de manifiesto que pudiera existir contribución microbiológica a las oxidaciones superficiales que en el agua de la presa, ya que la oxidación química del ión ferroso a pH ácido es un proceso súmamente lento.

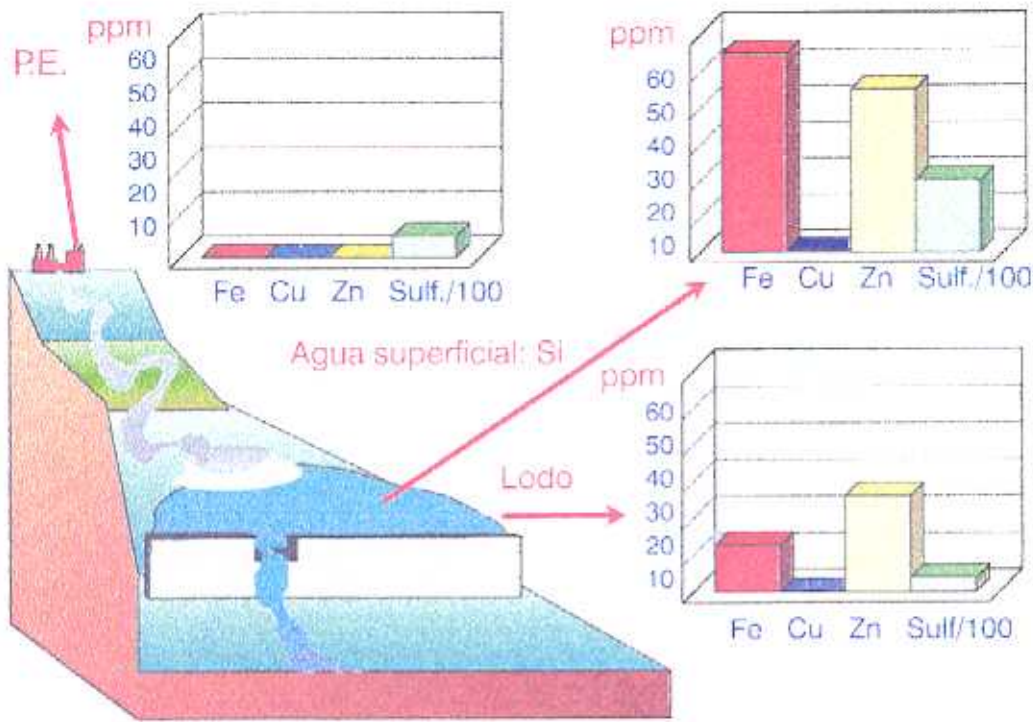


Figura 24: Caracterización de las muestras líquidas (sulf., concentración de sulfatos; Si, muestras de agua superficial; P.E., muestra tomada a la salida de planta)

En el fondo de la presa la situación fué bien distinta: la baja difusión del oxígeno en el agua hizo que las condiciones fueran reductoras ( $Eh < 0$ ). El pH se incrementó haciéndose ligeramente alcalino o neutro (pH 7) y la concentración de metales encontrada fué mucho menor que en superficie. Esta situación se pudo observar incluso a bajas profundidades: a unos 80 cm de profundidad ya empezó a apreciarse la elevación en el pH.

Eventualmente, se pudo observar en la presa la presencia de un precipitado blanquecino de tipo coloidal cuya aparición pareció estar relacionada con los ciclos de luz (temperatura) en la presa. Con el fin de identificarlo se realizaron distintos análisis. Por un lado, se realizó un análisis completo de las muestras tomadas antes y después de la aparición de esta turbidez, encontrándose que la concentración de metales y sulfatos, y el pH prácticamente no mostraban diferencias. Por otro lado, se filtraron 1.500 ml de agua de la presa tomados en condiciones de máxima turbidez, utilizándose un filtro Millipore de  $0,22 \mu m$ . El precipitado fué analizado mediante fluorescencia de rayos-X. El resultado que se obtuvo fué la aparición de dos elementos mayoritarios: el azufre y el plomo, lo que hizo pensar que el precipitado analizado pudiera ser un sulfato de plomo. La formación de este precipitado debe estar controlada por pequeños cambios en las variables de la presa, tales como

variaciones de temperatura, concentración de sulfatos en solución, etc. En función de todos estos parámetros, los equilibrios de precipitación se desplazarían en un sentido u otro haciendo que apareciera y desapareciera la turbidez observada en la presa.

### 3.1.3.b.- Vertido inicial y residuo final

Los análisis comparados de las muestras correspondientes a la pulpa de salida y al rebose en la presa se reflejan en la Tabla XIX.

Tabla XIX: Análisis químico del vertido inicial y el residuo final

	P.E. (agua)	CV-2
pH	9-10	2,5-3,5
Sulfatos	500-650	1800-2000
Sulfitos	88-120	2-3
Cu	0,1-0,2	0,4-0,8
Fe	0,4-2	50-55
Zn	0,1-2	30-50
Pb	0,1-0,2	5-6
Ca	400	400-450
Mn	-	10-15
Cd	-	<0,1
Mg	15	50
mg O <sub>2</sub> / l D.Q.O.*	-	210
Eh (mV)	10	220

\* D.Q.O., demanda química de oxígeno

Las concentraciones de metales, sulfatos y sulfitos vienen dadas en ppm

Las muestras P.E. y CV-2 corresponden a los residuos A y B (Figura 18) que se trataban de caracterizar como primer paso para el acercamiento al problema. Con los resultados obtenidos hasta el momento, se pudo cuantificar la naturaleza de la transformación en la presa y además se pudieron comprobar qué factores eran los más afectados por ésta.

Al comparar los análisis de las muestras P.E. y CV-2 cabe destacar dos aspectos fundamentales: por un lado, que el agua se acidifica mucho y, por otro, que la concentración de metales y sulfatos se incrementa considerablemente. Por su parte, el ión sulfito prácticamente desaparece en la muestra final.

Para tratar de explicar estos valores analíticos, se estudiaron los siguientes factores: la posible oxidación de la pirita y la influencia de la catálisis bacteriana en dicha oxidación; la oxidación del ión sulfito y su efecto en la disminución del pH.

#### **3.1.4.- Caracterización microbiológica**

Uno de los objetivos prioritarios del presente trabajo fue detectar la posible presencia de microorganismos en la presa de estériles y determinar en qué medida éstos influyen en la transformación del residuo allí vertido. La información bibliográfica es abundante en relación con el aislamiento y la caracterización de microorganismos procedentes del drenaje de aguas de mina, aislados generalmente en condiciones de elevada acidez y alta concentración de metales. Así, se ha identificado una amplia variedad tanto de microorganismos heterótrofos como autótrofos en este tipo de ambientes (Hutchinson K. y col., 1969; Tuttle J. y col., 1968) y se ha establecido la relación directa que existe entre cierto tipo de microorganismos y la producción de acidez (Silverman y Ehrlich, 1964).

El primer acercamiento al estudio microbiológico del sistema consistió en determinar en qué punto del mismo comenzaba a detectarse la presencia de microorganismos, para así poder establecer si éstos acompañan al mineral desde el momento en el que sale de la planta, o si por el contrario aparecen cuando las condiciones físico-químicas del medio son las óptimas.

También se quiso comprobar si existía una selección de microorganismos en función de la evolución del residuo y en qué medida contribuían a la oxidación del mineral o de algún compuesto presente en el residuo de P.E..

Las características de una presa de decantación de estériles son algo distintas a las de otros sistemas generadores de drenaje ácido. De hecho, en una presa, parte del mineral, si no todo, queda sumergido bajo el agua y, como se acaba de describir en el apartado 3.1.3.a., en la presa de estériles que se está estudiando existió un gradiente químico condicionado por la presencia de oxígeno.

En función de la distribución de las distintas variables químicas medidas en la presa (Tabla XVIII) y discutidas en el apartado 3.1.3.a., y en relación con el gradiente químico encontrado (Figura 25), se estudió una posible selección microbiológica: en la superficie se buscaron microorganismos acidófilos aerobios y en el fondo se evaluó la presencia de bacterias anaerobias reductoras de sulfatos.

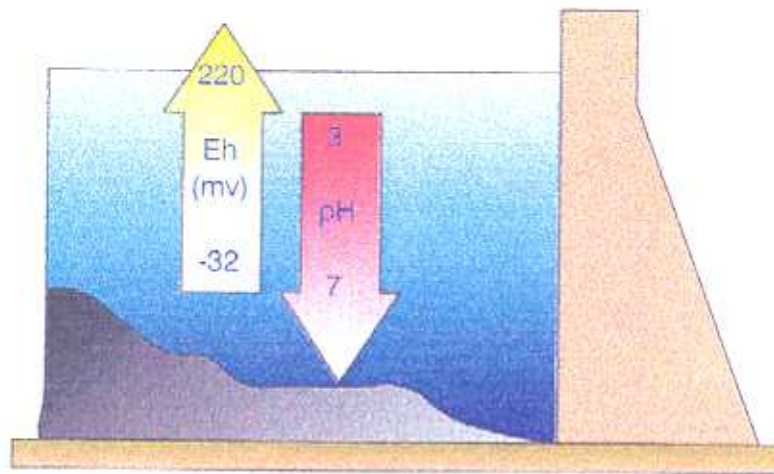


Figura 25: Gradiente químico en la presa de estériles

### 3.1.4.a.- Distribución y variabilidad de microorganismos en el sistema planta-presa

Para la caracterización microbiológica se seleccionaron las siguientes muestras que se consideraron representativas de los distintos puntos del sistema:

- **R.EP-06**, tomada en la planta de flotación. Fue seleccionada por tratarse de una muestra que había sufrido un descenso acusado de pH (Tabla XIII). Serviría para evaluar la posible presencia de microorganismos que pudieran estar asociados al mineral durante el propio proceso de flotación.
- **P.E.**, punto de referencia del vertido inicial.
- **S.2., S.6., D.2. y D.4.**, muestras de superficie y de fondo en distintos puntos de la presa.
- **C, A' y A''**, lodos profundos de la presa que sirvieron para la búsqueda de bacterias anaerobias reductoras de sulfatos
- **CV-2**, vertido final de la presa

El estudio de la microbiología asociada a las muestras empezó siempre por la observación directa de las mismas a través de los microscopios óptico y electrónico. Fruto de esta observación inicial se comprobó la presencia de microorganismos asociados al mineral en la propia planta de flotación. En concreto, en la Figura 26a se puede ver la imagen correspondiente a una bacteria que estuvo presente en la muestra R. EP-06. Posteriormente, se determinó que también existían en este punto bacterias azufre-oxidantes y microorganismos heterótrofos (bacterias y levaduras) asociados al mineral.

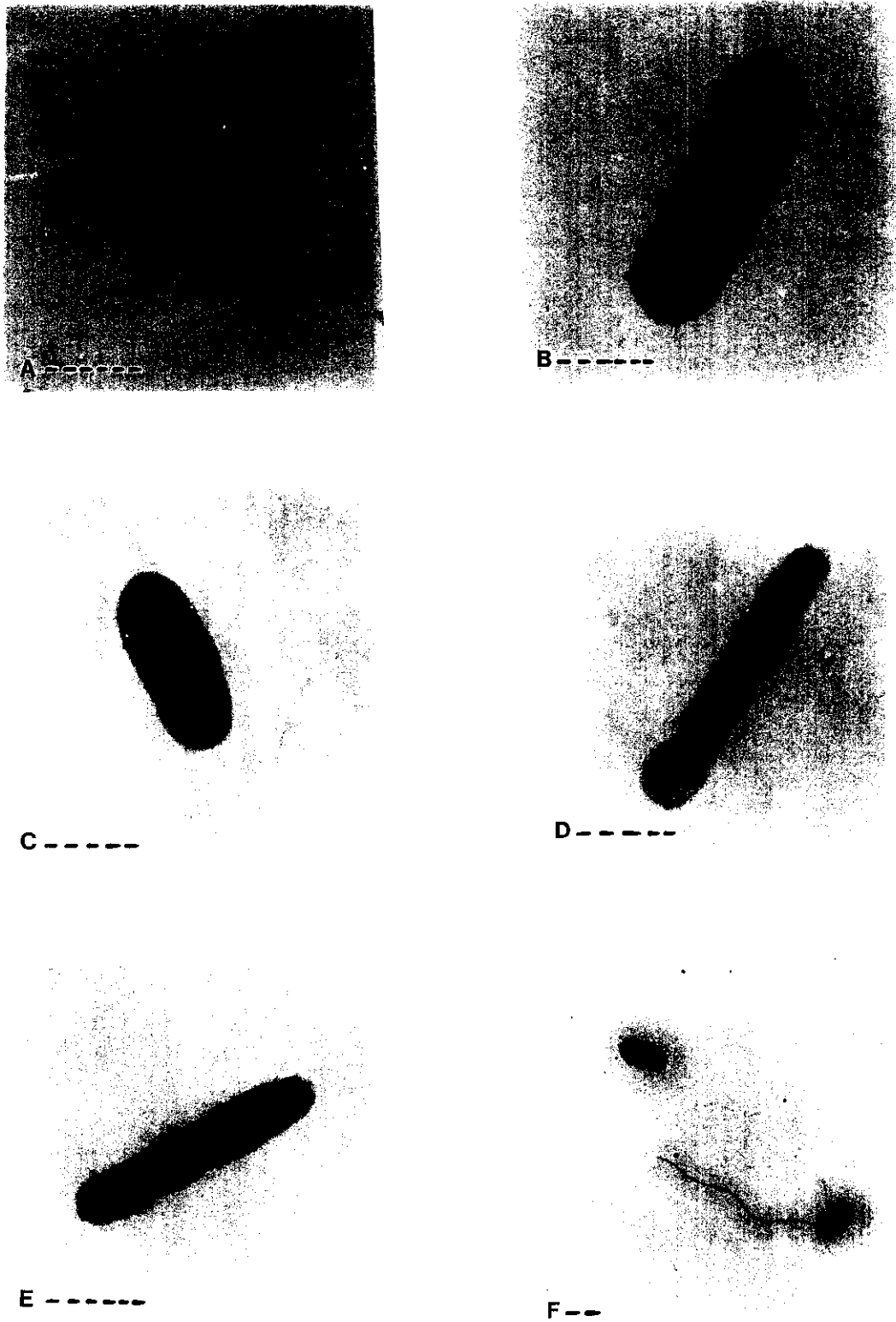


Figura 26: Micrografías (TEM) realizadas sobre muestras directas de agua de mina correspondientes a los puntos: a) R.EP-06; b) S.6.; c) D.2.; d) D.2.; d) D.2.; f) CV-2  
Barras, 1μm

Con relación a la presa, tanto en las muestras de superficie como de fondo, se detectó la presencia de distintos tipos de bacterias. Las imágenes b, c, d, e y f de la Figura 26 corresponden a la observación directa de las muestras mediante microscopía electrónica de transmisión.

Las bacterias predominaron en todas las muestras observadas, y en general fueron frecuentes los bacilos cortos que en ocasiones presentaban zonas internas de distinta permeabilidad a los electrones. También se detectó la presencia de espirilos (Figura 27) que pudieron corresponder a la especie *Leptospirillum ferrooxidans*. Esta especie aparece descrita en la bibliografía en relación a ambientes mineros y en general en sistemas con valores de pH ácidos. Es oxidante de hierro exclusivamente, y en nuestro caso, sólo se detectó en condiciones de “presa abandono”, esto es, cuando las condiciones fueron más extremas.

Se detectó también la presencia de bacterias neutrófilas heterótrofas asociadas a los lodos del fondo. Estas bacterias crecieron en medio agar nutritivo.

En las muestras de fondo de la presa se comprobó la presencia de bacterias anaerobias reductoras de sulfato.

Después de la observación directa de las muestras al microscopio, se procedió a su inóculo en medios específicos para el crecimiento selectivo de especies. En concreto, se buscaron microorganismos implicados en procesos de oxidación o de reducción de compuestos inorgánicos. Dada la importancia que ciertos microorganismos heterótrofos pueden tener en estos sistemas, en relación con la degradación de compuestos orgánicos perjudiciales al crecimiento de los litoautótrofos, las muestras también se inocularon en medios orgánicos con el fin de realizar su seguimiento.

Para realizar esta búsqueda de microorganismos se inoculó sembrando en placas con hierro, tetrionato, tiosulfato, hierro + extracto de levadura y en los medios orgánicos A e Y. Estos inóculos se realizaron directamente a partir de las muestras o bien a partir de las muestras concentradas tras la filtración de 50 ml de las mismas, como quedó descrito en el apartado de Materiales y Métodos (2.3.3.b.). En algunos casos, se prefirió precrecer en medios líquidos específicos de hierro o de azufre y posteriormente sembrar en medio sólido.

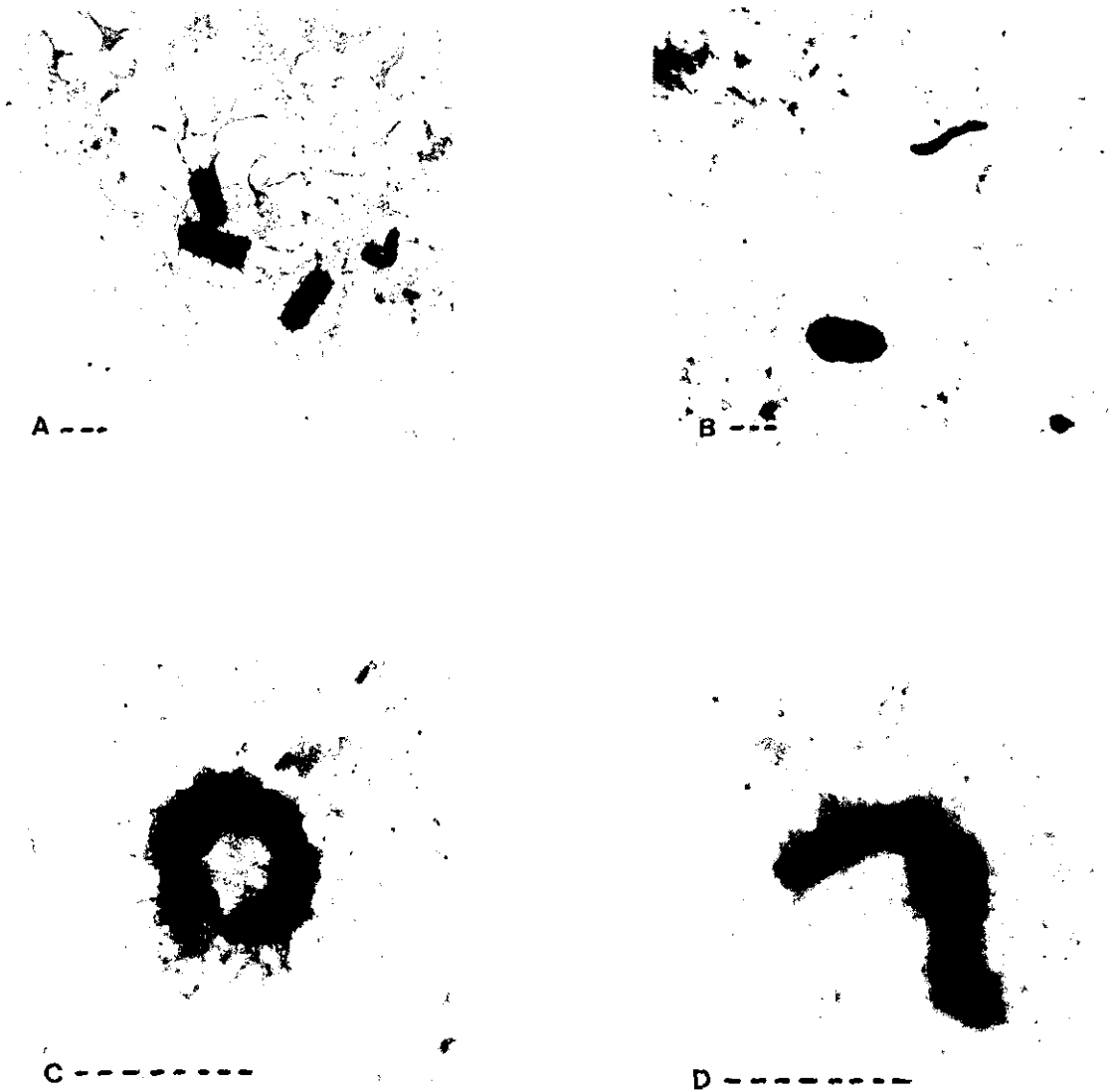


Figura 27: Micrografías (TEM) de bacterias presentes en el agua de mina  
Barras, 1μm

Para el crecimiento de los microorganismos anaerobios, las muestras se inocularon en frascos conteniendo los medios C y C+Mo. Una vez llenos, éstos eran cerrados herméticamente para evitar la presencia de oxígeno en los cultivos.

Todos los cultivos se mantuvieron en estufa a 30°C.

#### -Distribucion de microorganismos aerobios

- *Heterótrofos*

En todas las muestras cultivadas de todos los puntos del sistema, se detectó el crecimiento de microorganismos heterótrofos: bacterias, levaduras y hongos. Incluso en la muestra R.EP-06, que se tomó en el espesador de la planta (pH 8,5 in situ, pH 3,6 en el momento del inóculo), se comprobó la presencia de este tipo de bacterias.

Hongos, levaduras y dos tipos diferentes de bacterias heterótrofas (denominadas 2 y 3) aparecieron en la muestra P.E. correspondiente al vertido de la pulpa a la salida de planta. Se aislaron ambos tipos de bacterias heterótrofas en placa sobre medio I (Figura 28).

En este mismo medio, se aisló una **levadura** procedente de la muestra (P.E.). Esta levadura apareció repetidamente en diversos cultivos de muestras de todo el sistema. Al crecer en medio sólido formaba colonias rojas de bordes enteros, con un tamaño de colonia superior a 0,5 mm (Figura 29). No se llevaron a cabo pruebas de caracterización de levaduras pero las características que ésta presentó fueron comunes a las de la levadura *Rhodotorula*, que aparece descrita con frecuencia en relación a ambientes mineros (Lorenzo, 1990; López, 1994; Coto, 1994), pudiendo por tanto situarla dentro del grupo *Rhodotorula sp.*

También se detectó la presencia de levaduras en cultivos líquidos y sólidos sobre medio tiosulfato.

La bacteria 2 presentó particular interés ya que creció exclusivamente en la muestra P.E. (a diferencia de lo que sucedió con la levadura anteriormente descrita y la bacteria 3 que se encontró en otras muestras tales como la CV-2). Formó colonias de pigmentación amarilla (Figura 28a) con un tamaño superior a 0,5 mm. Su observación al microscopio óptico reveló que la bacteria formaba cadenas enmarañadas. La tinción de Gram dió resultado negativo. Tras sucesivos pases en medios sólido y líquido se perdieron sus cultivos, no continuándose su identificación.

La bacteria 3 formó colonias blancas, cóncavas, de borde liso y tamaño inferior a 5 mm (Figura 28b). Se trató de un bacilo Gram negativo que se encontró ampliamente distribuido en el sistema.

También despertó interés una bacteria (D.2.C) (Figuras 30a y 31) aislada de la muestra D.2 tomada a 1 cm de profundidad en la presa. Esta bacteria se aisló en un medio para heterótrofos y mostró capacidad para oxidar ion ferroso, lo que la hacía interesante por las ventajas que tiene el crecimiento en medio orgánico de un microorganismo con capacidad para oxidar ion ferroso y, por tanto, con potencial biolixiviante. Sin embargo, con el tiempo, sólo se consiguió mantener en cultivos en presencia de ion ferroso y dejó de crecer en heterotrofia, presentando características propias de bacterias litoautótrofas estrictas. Posiblemente, la primera conclusión fue un error y se trataba de especies distintas que crecían asociadas.

Sobre las placas en medio de hierro se encontró que crecían con frecuencia colonias pequeñas (<1mm), blanquecinas (Figura 32a), que resultaron ser bacilos cortos. Estas bacterias, que crecieron en medio de hierro, eran, sin embargo, incapaces de oxidarlo y crecían bien en un medio orgánico, así como en medio de azufre. Aunque no se hicieron más pruebas para su identificación, bien pudiera tratarse de bacterias de la especie *Thiobacillus acidophilus*, ya que estas bacterias crecen asociadas a cultivos de *Thiobacillus ferrooxidans* (Arkesteyn G. y Bont J., 1980; Harrison A., 1984) y presentan estas mismas características.

- *Bacterias litoautótrofas*

Detectar la presencia de bacterias litoautótrofas era de particular interés debido a su capacidad para oxidar compuestos inorgánicos. Estas bacterias se presentaban como uno de los posibles factores causantes de la oxidación del mineral y, por tanto, como uno de los factores que influían en la transformación del residuo A en B (ver apdo. 3.1.1.b.).

Se detectó crecimiento de bacterias con capacidad para oxidar azufre (o compuestos intermedios de este elemento) y/o hierro principalmente en las muestras correspondientes a la superficie del agua de la presa, aunque también exhibieron crecimiento en medio Fe y S las muestras D.2. y D.4., tomadas a un metro de profundidad, así como la muestra P.E.\* correspondiente al canalillo de agua que circulaba sobre la pirita sedimentada a su llegada a la presa (interfase agua-mineral).

Aunque en los inóculos directos de la muestra P.E. sobre medio líquido o sólido de hierro y tetrionato no se detectó crecimiento (a diferencia de lo que sucedió con la muestra CV-2), sí se consiguió, sin embargo, potenciarlo a partir del cultivo de la muestra de pulpa en matraz agitado a 35°C. Mediante este procedimiento se consiguió detectar la presencia de bacterias litoautótrofas S- y Fe-oxidantes asociadas a la pulpa de salida (P.E.).

El crecimiento sobre medio sólido de hierro presentó bastantes dificultades (Lorenzo, 1990; López, 1994) debido a la precipitación de hidróxidos básicos de hierro. Sin embargo, se consiguió obtener colonias a partir de las que se pudieron aislar bacterias Fe-oxidantes (Figura 32b).

El crecimiento en medio sólido tanto de tetrionato como de tiosulfato presentó una mayor eficacia. En estas placas se pudo verificar la presencia de distintos tipos de bacterias oxidantes de especies intermedias del azufre, lo que pudo observarse por la variedad de colonias que crecieron en ambos medios. Unas colonias fueron blancas, esféricas, de tamaño inferior a 1mm; otras, tenían un aspecto estrellado. Algunas de ellas se identificaron posteriormente. La diversidad morfológica encontrada en dichos cultivos, sobre medio sólido de tetrionato y de tiosulfato, puso de manifiesto la existencia de una amplia variedad de especies oxidantes de compuestos intermedios del azufre que pudieran estar potencialmente implicados en la oxidación del residuo en la presa de estériles (bien por la oxidación de la pirita, bien por la oxidación del ion sulfito).

Este último aspecto se quiso comprobar especialmente puesto que, como se ha visto, el ion sulfito es uno de los elementos que desaparecen del sistema con el tiempo y pueden estar implicados en la generación de acidez en el mismo. Por ello, se prepararon cultivos de enriquecimiento en medio sulfito y 9K a pH 3, utilizando como inóculo la muestra P.E..

Se pudo comprobar el crecimiento de bacterias en cultivos en los que la única fuente de energía era el sulfito sódico (Figuras 33 a y b), sin embargo, resultó muy difícil seguir el crecimiento y mantener los cultivos en este medio, debido a que, como se verá en el apartado 2.4., la oxidación del ion sulfito por la acción del oxígeno atmosférico transcurrió con una cinética muy rápida, lo que supuso una desaparición casi instantánea de la fuente energética necesaria para el crecimiento de la bacteria. La manipulación de los cultivos, los cuales debían ser esterilizados previamente mediante filtro Millipore de 0,22 micras, hizo que el tiempo transcurrido en condiciones oxidantes fuera demasiado largo.

Por otro lado, al utilizar un medio de reacción muy ácido, parte del ion sulfito se transformaba en ácido sulfhídrico, con lo que la concentración de ion sulfito disponible disminuía considerablemente. Sin embargo, el medio donde tienen lugar las condiciones óptimas de crecimiento para las bacterias litoautótrofas, que fueron las bacterias ensayadas en estos experimentos, debe ser ácido.

También se inocularon en medio con ion sulfito diversos cultivos de células precrecidas en medio de hierro (Figuras 33c y d), ya que la bibliografía refiere que la bacteria *Thiobacillus ferrooxidans* es capaz de oxidar distintos compuestos intermedios del azufre, entre ellos el propio ion sulfito. Las bacterias crecieron en este medio, adaptándose bien a estas condiciones, como pudo observarse por el estado de división celular en el que se encontraban (Figura 33d).

Mediante estos ensayos se pudo demostrar la capacidad de ciertas bacterias (entre ellas las bacterias que oxidan ion ferroso) para crecer en presencia de ion sulfito como única fuente de energía, pero no se pudo establecer una relación directa con la oxidación de dicho ion y la consiguiente disminución del pH.

#### -Distribucion de microorganismos anaerobios -

##### • *Bacterias reductoras de sulfato*

Se comprobó la presencia de bacterias anaerobias reductoras de sulfato en las muestras procedentes de los lodos del fondo de la presa. La observación mediante microscopía electrónica de transmisión de los cultivos mixtos de estas bacterias mostró que, en su mayor parte, se trataba de bacilos (Figura 34). No se detectó la presencia de esporas, lo cual hizo descartar a la especie *Desulfatamaculum* (más propia de aguas dulces) y a la especie *Clostridium* (reductora de sulfitos), ambas esporuladas.

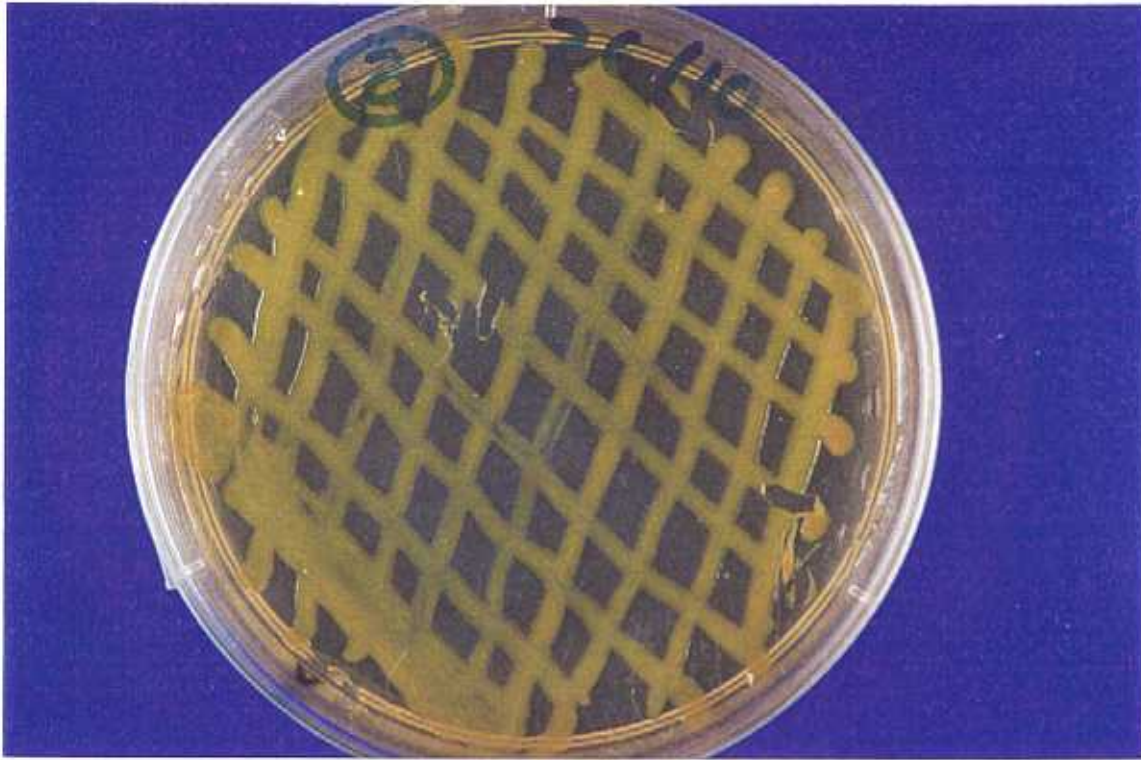


Figura 28: Crecimiento en medio sólido (I) de dos bacterias heterótrofas aisladas a partir de muestras de agua de mina: a) bacteria 2; b) bacteria 3



Figura 29: Crecimiento en medio solido (I) de la levadura *Rhodotorula sp.* aislada del agua de mina



Figura 30: Crecimiento en medio sólido (I): a) bacteria heterótrofa D.2.C  
b) bacteria oxidante de azufre y tetracionato

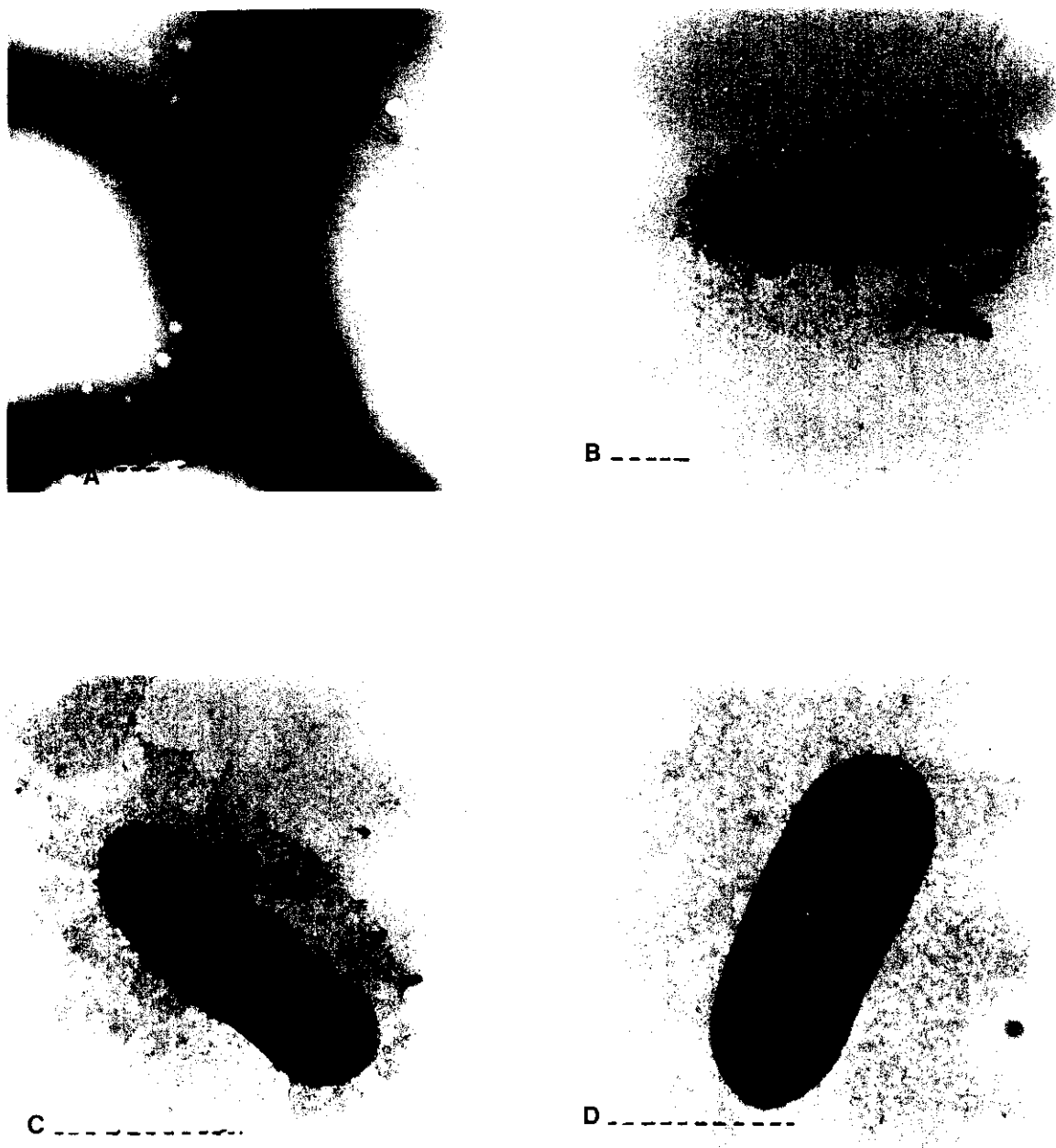


Figura 31: Micrografías (TEM) correspondientes a la bacteria D.2.C  
Barras, 1 μm



Figura 32: Crecimiento en medio sólido (Fe) de bacterias hierrooxidantes: a) Presencia de colonias de *Thiobacillus acidophilus* asociadas al crecimiento de bacterias hierrooxidantes;

b) *Thiobacillus ferrooxidans*

Barras, 1 $\mu$ m

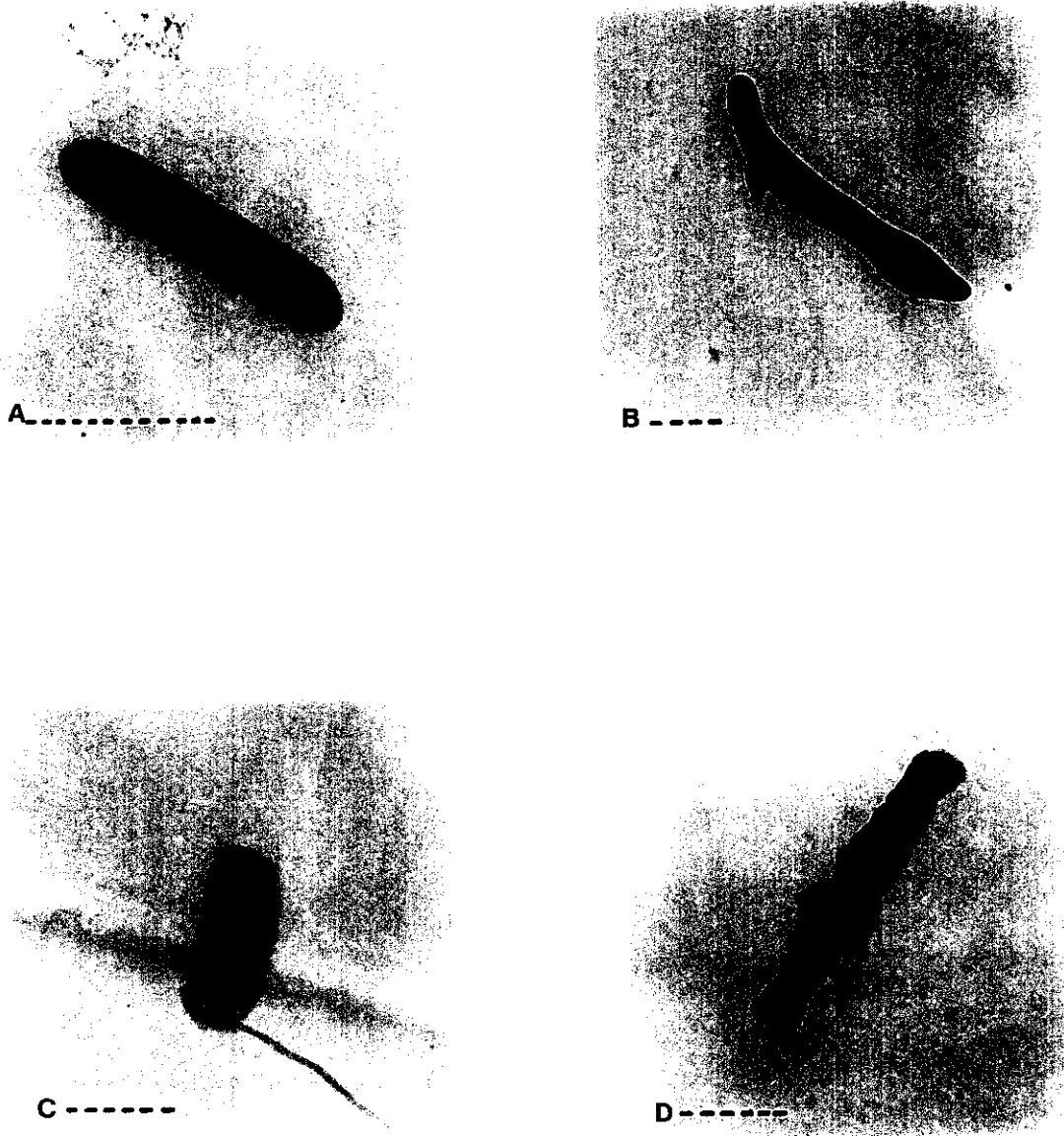


Figura 33: Micrografías (TEM) de cultivos de bacterias crecidas en presencia de sulfito sódico como única fuente de energía: a) P.E.; b) P.E.; c) S.2.(Fe); d) S.2.(Fe)

Barras, 1 $\mu$ m

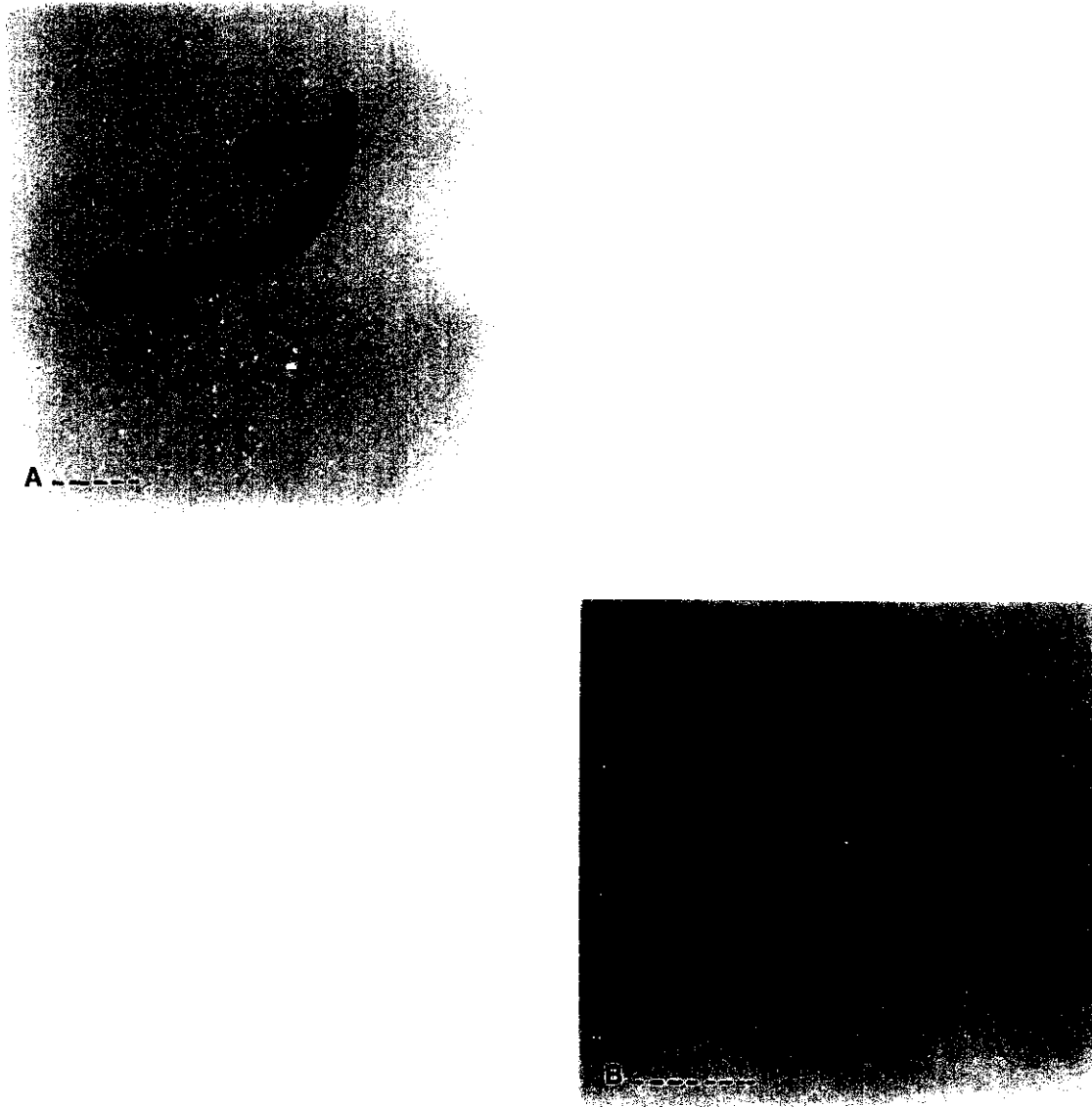


Figura 34: Micrografías (TEM) correspondientes a bacterias reductoras de sulfato aisladas a partir de los lodos del fondo de la presa

Barras, 1 $\mu$ m

### 3.1.4.b.- Aislamiento y caracterización

Siguiendo los criterios descritos en el apartado de Materiales y Métodos, se aislaron y caracterizaron algunos cultivos con el fin de identificar el tipo de microorganismos presentes en las muestras. En el caso de los heterótrofos estrictos (una levadura aislada y dos bacterias) no se realizaron pruebas de identificación, tan sólo alguna tinción general. La descripción de los microorganismos aislados se muestra en la Tabla XX.

Tabla XX: Descripción general de los microorganismos aislados

Microorganismo	Localización de la muestra de la que procede	pH muestra	Principal característica cultural
Litoautótrofos			
D.2	D.2. A 1 cm de la superficie de la presa	7,2	Oxidante de Fe
D.2.c	D.2. A 1 cm de la superficie de la presa	7,2	Iniciamente se aisló de una colonia crecida en placa A para heterótrofos, y tenía la peculiaridad de ser un heterótrofo hierro oxidante. Con el tiempo perdió la capacidad de crecer en heterotrofia
S.2. (TTT)	S.2. Muestra de superficie en la presa	4,6	Aislado en una placa en medio tetracionato, es una bacteria oxidante de S e intermedios del S
4o(Tio)	“cv-2”. Muestra de superficie en presa en condiciones de “presa abandono”	2,7	Aislado en placa de tiosulfato, es una bacteria oxidante de compuestos de azufre
8 <sub>2</sub> a	“cv-2”. Muestra de superficie en presa aislada en condiciones de “presa abandono”	2,7	Aislado en placa de hierro, es una bacteria oxidante de hierro
heterótrofos			
1	cv-2. Muestra de rebose de la presa	3,5	Levadura aislada en placa de medio A
2	P.E.	8	Bacteria aislada en placa de medio I
3	cv-2 Muestra de rebose	3,5	“
h	“cv-2”. Muestra de superficie en presa; aislada en condiciones de “presa abandono”	2,7	Levadura

(... continuación Tabla XX)

7b	"cv-2". Muestra de superficie en presa; aislada en condiciones de "presa abandono"	2,7	Bacteria
E	cv-2	3,5	Bacteria que forma grandes colonias de aspecto cremoso sobre placas en medio A/I
Anaerobios			
C	Lodo del fondo de la presa	7	Cultivo mixto que crece en anaerobiosis y desprende H <sub>2</sub> S
A'	Lodo del fondo de la presa	7	Cultivo mixto que crece en anaerobiosis y desprende H <sub>2</sub> S
A''	Lodo del fondo de la presa	7	Cultivo mixto que crece en anaerobiosis y desprende H <sub>2</sub> S

-Bacterias litoautótrofas\*

• *Morfología de colonia*

Las distintas cepas aisladas presentaron la morfología descrita en la Tabla XXI cuando crecieron sobre medio sólido.

Tabla XXI: Morfología de colonia de las cepas aisladas

Cultivo	Descripción de la colonia
D.2.	Sobre medio de Fe formó colonias rojizas con precipitados típicos de sales de Fe (Fig 32b ) < 1mm
D.2.c	Inicialmente aislada en placa sobre medio A en el que formó colonias cremosas y de tamaño > 1 mm, con una parte central más oscura (Fig 30a)
S.2.( TTT )	Formó colonias blanquecinas de tamaño < 1mm (Fig 30b)
4o(Tio)	Colonias esféricas, de borde liso, blanquecinas y tamaño < 1 mm
8 <sub>2</sub> a	Colonia típica rojiza de precipitado de sales de hierro
1	Colonia roja esférica, cremosa, >1mm (Fig 29)
2	Colonia amarilla, cremosa, > 1mm (Fig 28a)
3	Colonia blanca, cremosa, > 1mm (Fig 28b)

\*Se incluye en este apartado (aunque no corresponda) la morfología de colonia, celular y la tinción de Gram de las bacterias heterótrofas (D.2.C, 2 y 3) aisladas así como la morfología celular y de colonia de la levadura (1).

- *Morfología celular*

Todas las células anteriormente descritas eran **bacilos**, salvo en el caso de las bacterias 2 que se trataba de bacterias filamentosas y las correspondientes al cultivo 1 que, como se ha indicado anteriormente, correspondían a una levadura. Las bacterias D.2., D.2.c, y 8<sub>2</sub>a eran bacilos cortos que podían aparecer en parejas. Esto también se observó, y de un modo mucho más frecuente, en el caso de las bacterias S.2.(TTT) y 4o.(Tio). Las morfologías correspondientes se reflejan en la Figura 35 en la que además aparecen las cepas tal y como se observaron al microscopio electrónico de transmisión.

- *Tinciones*

Se realizaron las tinciones de Gram y esporas para todos los aislados. Dado que las bacterias litoautótrofas se tiñen con gran dificultad, se trató de mejorar la eficacia de la tinción exponiendo el segundo colorante a un tiempo mayor para lograr más nitidez (Coto, 1994). Asimismo se hicieron las pruebas de oxidasa y catalasa para algunos aislados. Los resultados se reflejan en la Tabla XXII.

Tabla XXII: Resultados de distintas pruebas de identificación de microorganismos

	Gram	Esporas	Catalasa	Oxidasa	Movilidad
D.2.	-	-	n.d.	n.d.	+
D.2. c	-	-	n.d.	n.d.	+
S.2. (TTT)	-	-	n.d.	n.d.	+
4.o.(Tio)	-	-	n.d.	n.d.	+
8 <sub>2</sub> a	-	-	n.d.	n.d.	+
2	-	-	-	-	+
3	-	-	-	-?	+

+: crecimiento positivo; -: crecimiento negativo; n.d.: no determinado; -?: crecimiento dudoso

- *Características culturales*

Como criterio de identificación de los cultivos, y siguiendo las pautas del Manual Bergey's (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1989), se hicieron varias pruebas y observaciones culturales.

a) *Crecimiento en distintos sustratos*

Uno de los criterios determinantes para asignar las distintas especies dentro del género *Thiobacillus* es la capacidad para oxidar distintas fuentes de energía. Por ello, las bacterias

litoautótrofas aisladas se crecieron en distintos sustratos. Los resultados aparecen en la Tabla XXIII.

Tabla XXIII: Crecimiento en distintos sustratos

	Fe	Fe+Ye	Tiosulfato	Tetratio- nato	Azufre	I
D.2.	+	+↓	+	+	+	-
D.2.c	+	+↓	+	-	+	-
S.2.(TTT)	-	-	+	+	+	-
8 <sub>2</sub> a	+	+↓↓	+	-	+	-
4o (tio)	-	-	+	+	+	-

+: crecimiento positivo; -: crecimiento negativo; +↓: crecimiento escaso; +↓↓: crecimiento muy escaso

### b) pH final de cultivo

La capacidad productora de ácido de las distintas cepas aisladas se determinó a través de la medida del pH de un cultivo crecido. Se comprobó que todos los cultivos disminuyeron el pH al crecer, algunos incluso hasta valores por debajo de 1.

En la Tabla Tabla XXIV se resumen estos resultados. Se muestran también los valores correspondientes a la generación de acidez por parte de una cepa de colección *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC crecida en las mismas condiciones que las anteriores.

Tabla XXIV: pH final de cultivo

	pH final en medio de S	pH final en medio de Fe
D.2	n.d.	1,6
D.2.c	1,09	1,61
S.2.(TTT)	0,63	n.d.
4o(Tio)	1,26	n.d.
8 <sub>2</sub> a	n.d.	1,60
<i>T. thiooxidans</i>	0,6	n.d.
<i>T.ferrooxidans</i> ATCC 23270	1,0	1,69

n.d.: no determinado

La bacteria *Thiobacillus ferrooxidans* es capaz de disminuir el pH hasta valores del orden de 1,0 cuando crece sobre medio de azufre. *Thiobacillus thiooxidans* puede hacer disminuir el pH del medio hasta 0,6 (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1989).

Los aislados D.2., D.2.c, S.2. (TTT), 4o(Tio) y 8<sub>2</sub>a fueron bacilos Gram negativos con capacidad para oxidar compuestos de azufre, lo que permitió incluirlos dentro del género *Thiobacillus* (Kelly D. y Harrison A., 1989). D.2., D.2.c y 8<sub>2</sub>a fueron acidófilos capaces además de oxidar hierro e incapaces de crecer en heterotrofia. Las características

morfológicas, tintoriales y fisiológicas que presentaron hicieron que podamos incluirlos dentro de la especie *Thiobacillus ferrooxidans*.

Morfológicamente son muy parecidas las especies *Thiobacillus ferrooxidans* y *Thiobacillus thiooxidans*. Ambos son bacilos cortos, Gram negativos y poseen flagelos. Se distinguen bien fisiológicamente por la incapacidad que presenta *Thiobacillus thiooxidans* para oxidar hierro ferroso. Las cepas S.2. (TTT) y 4o(Tio) además de ser bacilos Gram negativos no crecieron en medio de hierro, por lo que se las clasificó dentro de la especie *Thiobacillus thiooxidans*. Además, las colonias a partir de las cuales fueron aisladas presentaron la característica morfología descrita por Hutchinson (Hutchinson K. y col., 1969) en los inicios de su aislamiento, consistente en que la bacteria forma colonias con una zona central más intensa de color amarillento y una corona exterior blanca. Otra de las características comunes con el *Thiobacillus thiooxidans* fue que al crecer en medio azufre, el pH de los cultivos descendió hasta valores próximos a 0,5.

#### -Bacterias anaerobias reductoras de sulfato

El crecimiento de bacterias reductoras de sulfato (BRS) se detectó fácilmente por el fuerte olor a ácido sulfhídrico que desprendieron los cultivos, así como por la aparición de precipitados negros y brillantes procedentes de la reacción entre el H<sub>2</sub>S generado en la reducción del sulfato y los metales presentes en el medio. Sin embargo, puede ocurrir que se aprecien ambas características y, no obstante, sean consecuencia de alguna reacción de tipo químico que conduce al mismo efecto.

Para confirmar que la reducción de sulfatos que se observaba en los cultivos inoculados con las muestras tomadas en el fondo de la presa era consecuencia de la reducción inducida por las bacterias y no debida a mecanismos químicos, se realizó siempre una siembra por duplicado en medio C y en medio C con molibdato. El molibdato es un análogo del sulfato y se ha comprobado que interfiere en el primer paso enzimático de la activación de este ion y, en concreto, en la actividad de la enzima sulfurilasa (Postgate, 1993), por lo que en medio con molibdato no se produciría crecimiento de este tipo de bacterias y, por tanto, no aparecerían los precipitados negros característicos.

En todos los inóculos realizados con las muestras de **lodo** tomadas en diferentes puntos del fondo de la presa, se detectó la presencia de bacterias reductoras de sulfato, dado que sólo se apreció crecimiento en aquellos cultivos que no tenían molibdeno en el medio (Figura 36). En los cultivos que se realizaron inoculando muestras de agua del fondo de la presa

no se detectó crecimiento, ni tampoco transformación química en los cultivos con molibdeno (Figura 36). Por tanto, las bacterias sulfato-reductoras se encontraron en la presa asociadas al mineral de los lodos del fondo, donde se encontraron las condiciones anaerobias más estrictas, óptimas para su crecimiento (Kuyacak, 1991).

En aquellos casos en los que el crecimiento fue evidente y en los que se observó claramente la aparición de precipitados negros y brillantes, éstos se recogieron en medio nitrógeno para evitar su posible descomposición y fueron analizados mediante difracción de rayos-X. El correspondiente análisis indicó que los precipitados formados correspondían a un sulfuro de hierro identificado como  $\text{FeS}_2$  (Figura 37).

La naturaleza de las bacterias reductoras de sulfatos (BRS) se comprobó a través de dos pruebas: por su crecimiento en aerobiosis y por su crecimiento en medio sin sulfatos. Ambos ensayos deberían dar resultado negativo si efectivamente se trataba de BRS.

Todos los cultivos de BRS en los que el crecimiento había sido positivo, así como los pases sucesivos de estos cultivos, se inocularon en medio agar nutritivo. En el crecimiento en medio sólido de las muestras correspondientes a los primeros pases, se observó la aparición de colonias de bacterias heterótrofas, las cuales fueron desapareciendo cuando se inocularon cultivos de BRS más recientes. Las bacterias heterótrofas que aparecían estaban asociadas a las muestras de pulpa del fondo de la presa a partir de las cuales se realizaron los inoculos. En pases sucesivos, las BRS se fueron seleccionando y terminaron por dominar los cultivos.

El crecimiento en medio sin sulfatos siempre dió resultado negativo.

Las BRS encontradas fueron bacilos no formadores de esporas (Figura 34).

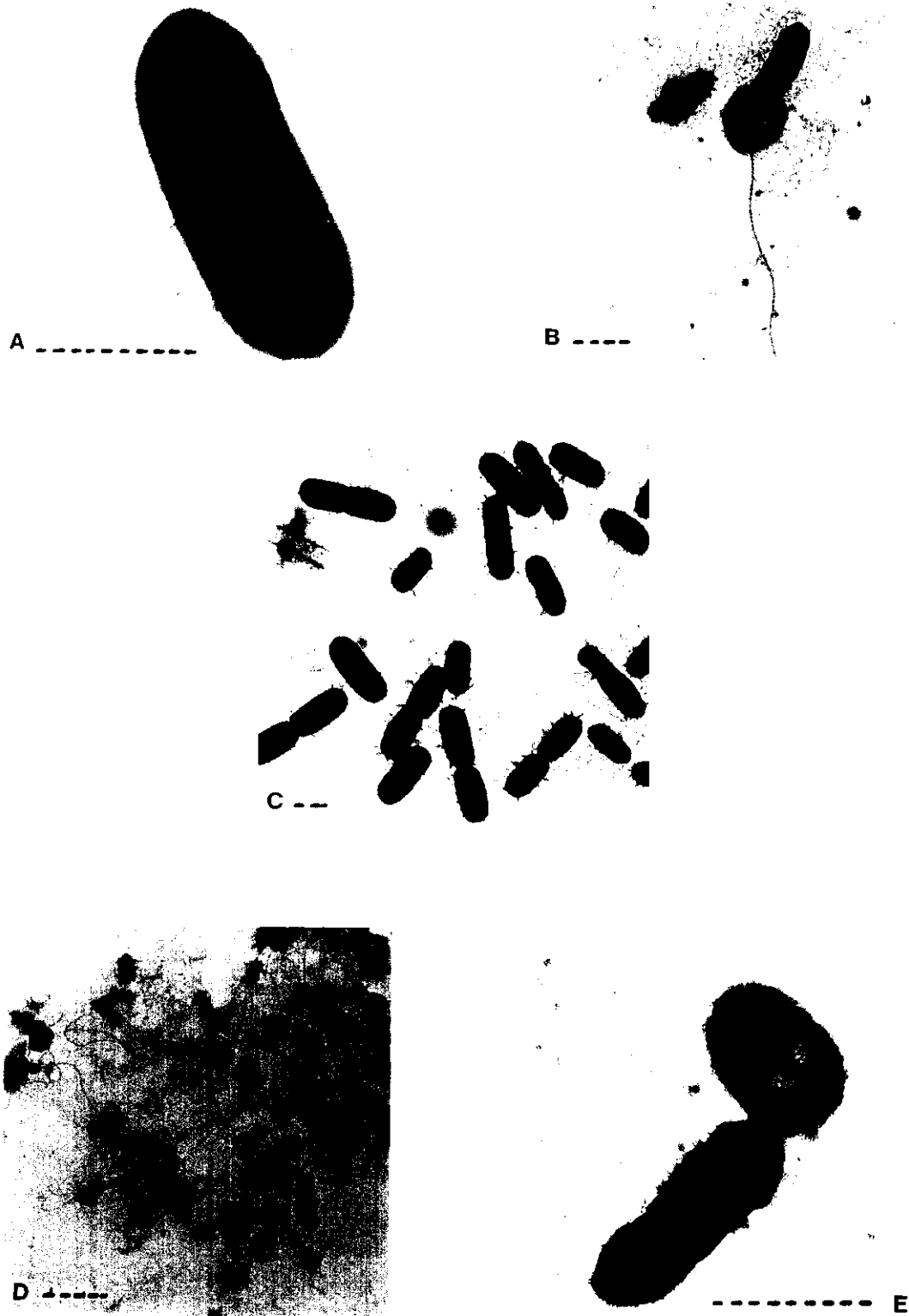


Figura 35: Micrografías (TEM) correspondientes a los distintos aislados: a) D.2. (Fe); b), c), d) y e) S.2. (TTT).

Barras, 1  $\mu\text{m}$

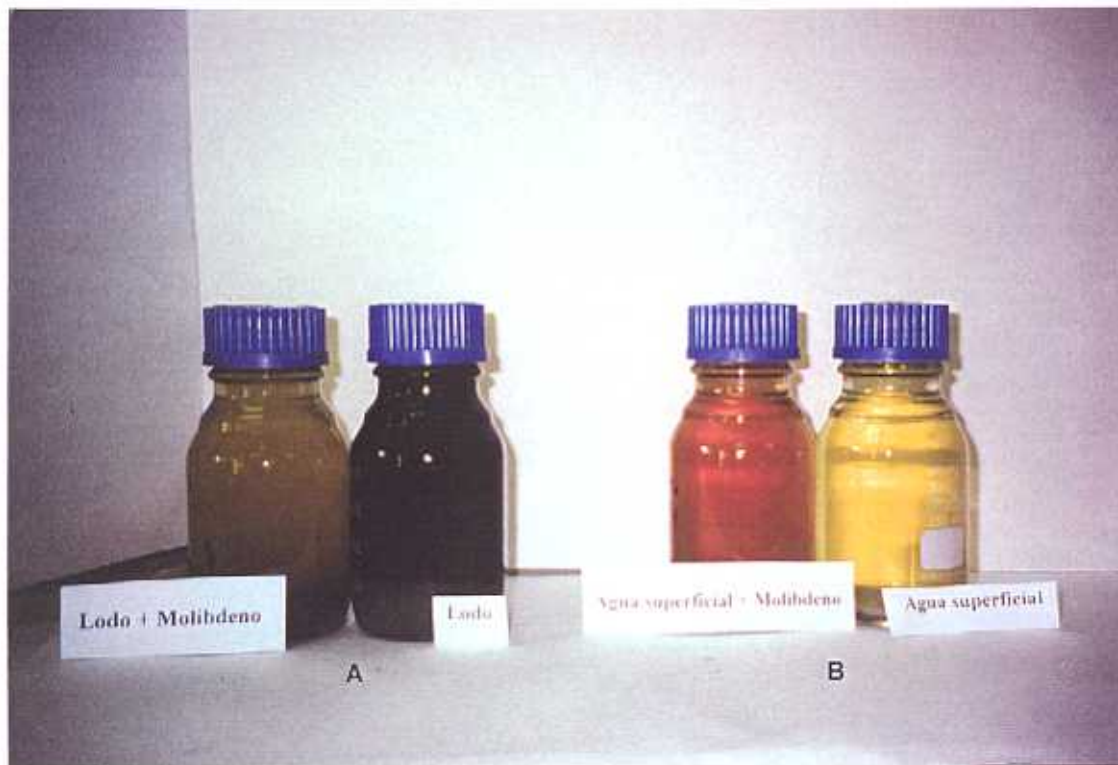


Figura 36: Crecimiento de bacterias anaerobias reductoras de sulfato: a) muestras de lodo del fondo de la presa; b) muestras de agua del fondo de la presa

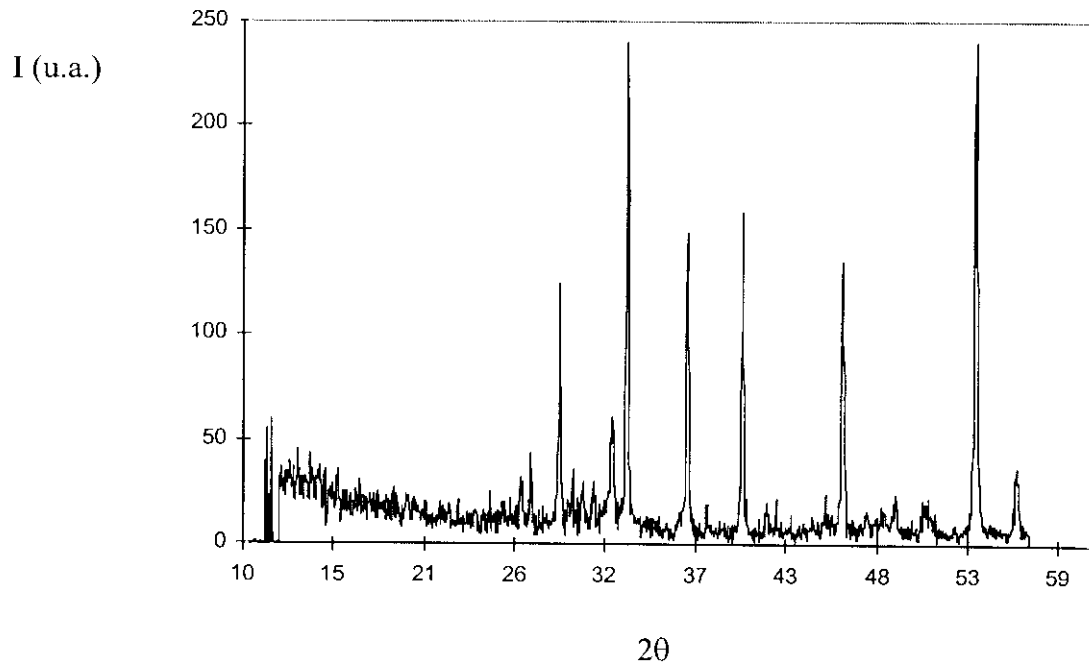


Figura 37: Diffractograma correspondiente al precipitado de las BRS

### 3.1.4.c.- Cuantificación de microorganismos

Los resultados del recuento de bacterias litoautótrofas y de bacterias anaerobias reductoras de sulfatos de acuerdo al criterio del NMP (Número Más Probable) y del recuento en placa para las bacterias heterótrofas fueron los indicados en la Tabla XXV.

Tabla XXV: Recuento de bacterias litoautótrofas, heterótrofas y BRS.

Muestra	Fe-oxidantes	S-oxidantes	Heterotrofos	Anaerobios
S.6.	$1,1 \times 10^7$	$0,2 \times 10$	$10^3$	n.d.
S.2.	$25 \times 10$	$0,2 \times 10$	n.d.	n.d.
R.EP-06	-	$2,0 \times 10$	n.d.	n.d.
D.2.	-	-	n.d.	n.d.
CV-2	$1,1 \times 10$	$0,8 \times 10$	23	n.d.
C	$2,5 \times 10$	-	60	$1,7 \times 10^2$
P.E.	-	-	$2 \times 10^4$	n.d.
P.E.*	$0,2 \times 10$	$1,7 \times 10$	$0,2 \times 10^5$	n.d.

Todos los datos están expresados en cél/ml salvo los correspondientes a D.2., C y P.E\* que vienen dados en cél/g; -: crecimiento negativo; n.d.: no determinado; P.E.\*: muestra de pulpa en la interfase sólido-líquido en la presa

Desde un punto de vista cuantitativo se confirmaron los resultados obtenidos en la caracterización cualitativa de la microbiología del sistema (apdo. 3.1.5.).

La presencia de microorganismos fue muy importante, así como la variedad de especies encontradas, las cuales se seleccionaron naturalmente en función de las condiciones químicas de cada zona (Figura 38 y Tabla XXVI). Hongos, levaduras y bacterias heterótrofas se encontraron asociadas al mineral desde la salida de planta (muestra P.E.). También aparecieron hongos y bacterias heterótrofas en las muestras de lodo del fondo de la presa, donde se detectó además la presencia de bacterias heterótrofas neutrófilas que crecieron en medio agar nutritivo. La presencia de bacterias litoautótrofas quedó reservada para la superficie de la presa, que fue el lugar en el que las condiciones químicas fueron más extremas y en el que la oxigenación fue más importante. Las especies identificadas (*Thiobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus thiooxidans*, *Leptospirillum*) son habituales en ambientes mineros y aparecen asociadas a estériles de mina, aguas de drenaje, etc. Incluso es frecuente que en ocasiones se utilice la bacteria *Thiobacillus ferrooxidans* como un indicador del estado de biodegradación en que se encuentra un determinado residuo minero (Babij, 1980) de tal manera que un número importante de bacterias de esta especie estaría indicando un estado de deterioro (oxidación, acidez, etc) importante.

La escasa población de bacterias litoautótrofas azufre y hierro-oxidantes encontrada en el fondo de la presa indicó que la oxidación microbiológica en este punto tuvo poca importancia. Este aspecto quedó reflejado en el estado de escasa biodegradabilidad observado en las muestras. Por el contrario, si se hubiera encontrado una presencia importante de estos microorganismos en la zona más profunda, estaría indicando, con gran probabilidad, la mayor aireación de estas capas, junto con la posibilidad de que estuvieran ejerciendo su propia acción sobre el mineral, bien mediante la oxidación directa, bien catalizando la oxidación del ión ferroso.

Todos estos datos microbiológicos confirmaron los resultados de los análisis químicos y mineralógicos. Así, los valores de pH neutro, el potencial reductor y la baja concentración de metales en solución medidos en el fondo de la presa, se correspondieron con la actividad desarrollada por las bacterias anaerobias reductoras de sulfato que se encontraron, y en concentración importante, asociadas a los lodos del fondo de la presa.

Los valores de pH ácido, potencial oxidante y la presencia de metales y sulfatos en solución, medidos en las aguas superficiales de la presa, estuvieron relacionados con la

oxidante de las bacterias litoautótrofas. Aunque esta actividad quedó encubierta, en buena medida, por la presencia del ion sulfito, como se detallará más adelante.

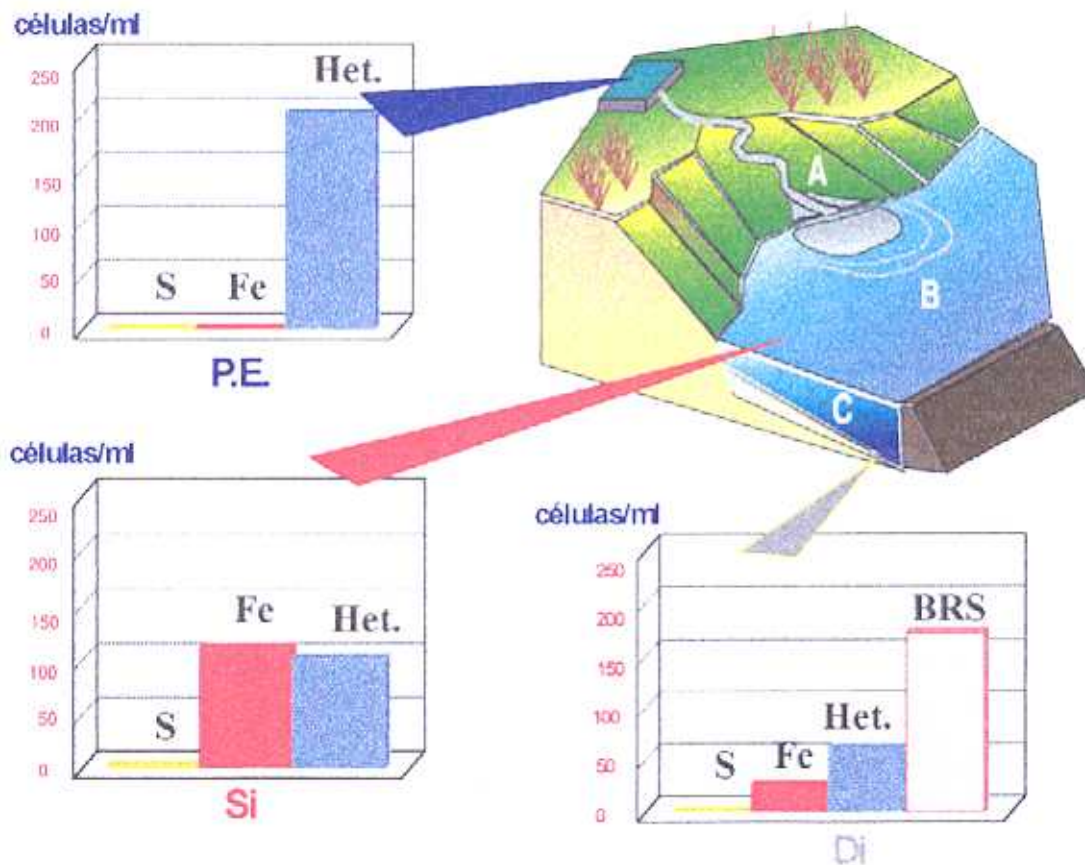


Figura 38: Distribución microbiana en el sistema objeto de estudio

P.E: muestra tomada a la salida de la planta de flotación;

Si: muestra tomada en el agua superficial de la presa,

Di: muestra tomada en los lodos del fondo de la presa

S: bacterias azufre-oxidantes; Fe: bacterias hierro-oxidantes

Het.: bacterias heterótrofas; BRS: bacterias reductoras de sulfato

Tabla XXVI: Presencia de microorganismos en los puntos más representativos

Muestra	Localización	Autótrofo		Heterótrofo		Anaerobio
		S-oxte	Fe-oxte	Levad. y hongos	Bacterias	
P.E.	Pulpa salida planta	-	-	+	+	n.d.
CV-2	Rebose de agua en presa	+	+	+	+	n.d.
R.EP-06	Rebose espesador en planta	+	-	+	+	n.d.
S.2.	Agua superficial en presa	+	+	+	+	n.d.
D.2.	Agua en presa a 1m de la superficie	+	+	+	+	n.d.
P.E.*	Canalillo de agua que circula sobre la lengua de pulpa sedimentada en la planta	+	+	+	+	n.d.
C	lodo en el fondo de la presa	+	+	+	+	+

+: crecimiento positivo; -: crecimiento negativo; n.d.: no determinado

### 3.2.- ESTUDIO DE LOS FACTORES IMPLICADOS EN LA TRANSFORMACIÓN DEL RESIDUO

En el apartado 3.1. se ha explorado el estado del sistema, se ha cuantificado la transformación y se han clarificado dos de los aspectos planteados en el esquema inicial del problema (Figura 18): que la transformación (D) del residuo (A) en (B) fue una acidificación que tuvo lugar fundamentalmente en la presa y que, como consecuencia de dicha transformación, se produjo una disminución importante en el valor del pH (desde 8 a 3,5) y un incremento considerable de la concentración de metales y sulfatos en disolución. Por su parte, el ion sulfito en solución prácticamente desapareció como consecuencia del proceso de meteorización.

Además de la cuantificación de la transformación, se ha estudiado el estado químico, mineralógico y microbiológico de cada uno de los "ambientes" que se establecieron en el

sistema (Figura 4), de tal modo que se ha detectado la presencia o no de determinados factores potenciales generadores de acidez.

Por ello, en el presente apartado, se estudiarán cada uno de estos factores y su contribución a la meteorización de residuo. Por ejemplo, en el estudio microbiológico, se ha detectado la presencia de bacterias litoautótrofas en las aguas de la presa. En este capítulo, se analizará la influencia de la oxidación microbiológica en la transformación del residuo.

Otro factor que se estudiará será la influencia de la oxidación del ion sulfito ya que se trata de un elemento que desapareció durante la transformación y que, por tanto, “se meteoriza”. Su cinética de oxidación, la incidencia de la misma en la generación de aguas ácidas y el papel regulador del Eh son aspectos que se tratarán en el apartado 3.2.1.. Además, se investigará la influencia bacteriana en dicha oxidación.

Las contribuciones microbiológica y química a la meteorización del residuo, teniendo en cuenta las características particulares de cada “ambiente” del sistema, se estudiarán a través de los ensayos de meteorización (apdo. 3.2.2.) que se diseñaron específicamente para evaluar estos factores.

Finalmente, el resultado conjunto de la transformación química y la sucesión microbiológica se simuló a través de un modelo en columna que se discutirá en el apartado 3.2.3..

### **3.2.1.- Cinética de oxidación del ion sulfito**

#### **3.2.1.a.- Ensayos de oxidación química**

Estos ensayos se realizaron empleando disoluciones patrón de sulfito sódico en agua destilada, de acuerdo a la metodología descrita en el apartado 2.4.. La concentración de ion sulfito en solución pudo ser determinada con precisión gracias a la valoración potenciométrica automática. El potencial correspondiente al punto de equivalencia en la valoración estuvo en torno a 250 mV. La curva potenciométrica correspondiente a la oxidación de una disolución de 5 g/l de sulfito sódico se refleja en la Figura 39.

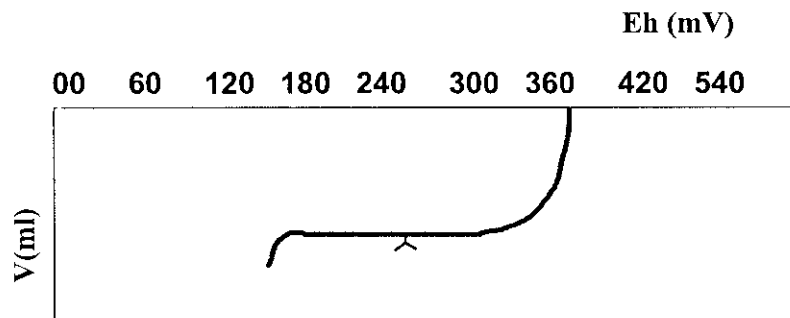


Figura 39: Determinación del punto final en la valoración de sulfitos

Se comprobó que las disoluciones de sulfito sódico eran claramente alcalinas, con valores de pH comprendidos entre 8 y 9. Esta observación experimental estuvo de acuerdo con la ecuación [8]. Para los ensayos cinéticos de oxidación química del ion sulfito se eligieron las concentraciones de 0,5, 5 y 10 g/l. Se prefirió usar concentraciones para las cuales el método analítico empleado tuviera la máxima sensibilidad, por ello, se probaron las de 5 y 10 g/l, respectivamente. El límite inferior estuvo en la concentración de 0,5 g/l que permitió aproximar los ensayos al rango de concentración en el que se encontraba el ion sulfito en la presa de estériles (0,1 g/l). La disminución de la concentración de ion sulfito en la oxidación de las disoluciones patrón con 0,5, 5 y 10 g/l de sulfito sódico en agua, a temperatura ambiente y expuestas a la atmósfera, se refleja en la Figura 40.

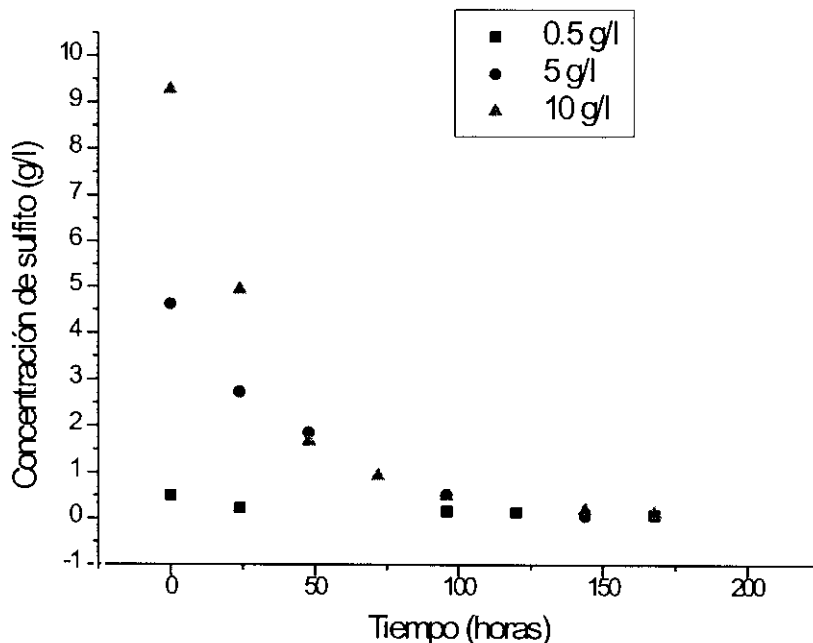


Figura 40: Cinética de oxidación de disoluciones patrón con 0,5, 5 y 10 g/l de sulfito sódico

La correspondiente variación de pH asociada a esta cinética de oxidación se refleja en la Fig. 41.

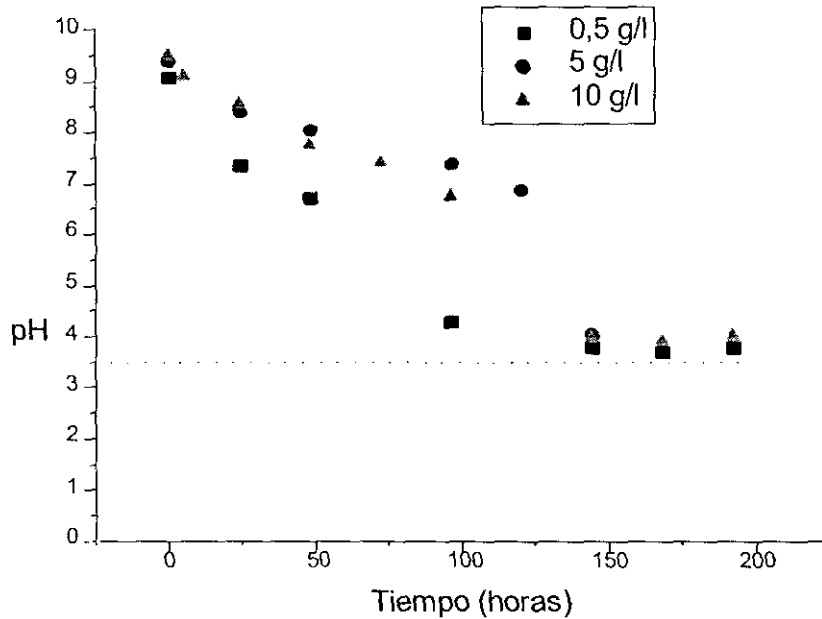


Figura 41: Variación del pH en la oxidación de disoluciones con 0,5, 5 y 10 g/l de sulfito

Como consecuencia del proceso de oxidación, el pH de las disoluciones de sulfito sódico disminuyó hasta valores comprendidos entre 3,5 y 4 debido al consumo de  $\text{OH}^-$  durante la reacción (ecuación [10]). Esta disminución de pH fue además independiente de la concentración inicial de ion sulfito (Figura 40), lo cual se puede explicar en base a que en la reacción global de oxidación el balance neto de protones es nulo. Este efecto se puede comprobar en el equilibrio, pero en las 200 horas que duró el experimento no hubo tiempo para que el oxígeno consumiera en su reducción los protones liberados en la oxidación del ión sulfito. Por otro lado, existen otros equilibrios, como por ejemplo el de protonación del ión sulfito, con su correspondiente cinética, que también alteran el balance protónico de la reacción global.

### -Orden de reacción

Como se indicó en la introducción, la cinética de oxidación del ion sulfito transcurre a través de un mecanismo a base de radicales en el que participan multitud de compuestos intermedios. Deducir la ecuación cinética y el orden de reacción a partir del mecanismo de

reacción es, por tanto, bastante complicado y da lugar a ecuaciones cinéticas de difícil interpretación. Muchos autores utilizan el orden empírico de reacción (Fuller y Crist, 1941; Schroeter, 1966; Hegg y Hobbs, 1978), el cual calculan deduciéndolo a partir de los resultados experimentales correspondientes a la oxidación.

Uno de los estudios más rigurosos acerca de la oxidación del ion sulfito fue el realizado por Fuller y Crist (Fuller y Crist, 1941). En él utilizaban disoluciones de sulfito sódico recristalizado y una doble metodología para seguir la oxidación: la medida del oxígeno consumido y la valoración del ion sulfito con yodo. A partir de los resultados obtenidos, concluyeron que la cinética de oxidación del ion sulfito es de **primer orden** respecto a la concentración de ion sulfito. Estudios posteriores de diversos autores han avalado esta misma conclusión (Hegg y Hobbs, 1978; Pasiuk, 1988; Wisniewski, 1990), confirmando que la desaparición del ion sulfito con el tiempo se ajusta a una cinética de primer orden, de acuerdo con las siguientes expresiones:

$$\frac{-d[SO_3^{2-}]}{dt} = K_1 \cdot [SO_3^{2-}] \quad [42]$$

$$\int \frac{-d[SO_3^{2-}]}{[SO_3^{2-}]} = \int K_1 \cdot dt \quad [43]$$

$$\text{Ln} \frac{[SO_3^{2-}]_0}{[SO_3^{2-}]_t} = K_1 \cdot t \quad [44]$$

$$\text{Ln}[SO_3^{2-}]_t = \text{Ln}[SO_3^{2-}]_0 - K_1 \cdot t \quad [45]$$

A partir de los datos experimentales obtenidos en el presente trabajo, se calculó el correspondiente orden de reacción y se comprobó el ajuste con la ecuación correspondiente a la cinética de primer orden. Concretamente, para una disolución de sulfito sódico de concentración 10 g/l, se obtuvo la recta que se representa en la Figura 42.

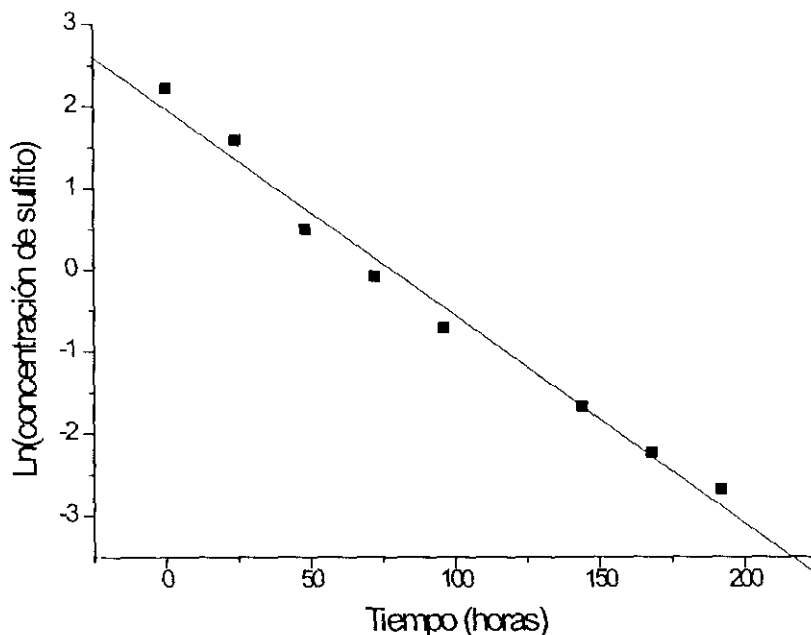


Figura 42: Orden de reacción en la cinética de oxidación del ion sulfito

Como queda reflejado en la Figura 42 el ajuste de los datos experimentales a una ecuación de primer grado fue excelente, obteniéndose un valor de 0,993 para el coeficiente de correlación (R). Por su parte, el valor que se obtuvo para la constante  $K_1$  fue de  $2,01 \text{ s}^{-1}$ .

### -Influencia del pH

Como se ha descrito anteriormente, la pulpa alcalina que salía de la planta de flotación acaba en la presa con valores de pH muy bajos. Se desconocía la influencia que pudiera tener la presencia del ion sulfito en esta disminución del pH. Por ello, se realizaron ensayos cinéticos de oxidación de éste a distintos valores iniciales de pH, con el fin de averiguar cómo transcurre dicha oxidación.

Se eligieron los siguientes valores de pH: el valor correspondiente a la disolución de sulfito en agua, que oscila entre 8,5 y 9,0; dos valores intermedios, 3 y 4; y un valor extremo de pH ácido (1,2). Las disoluciones se prepararon pesando el sulfito sódico y disolviéndolo en agua destilada. Finalmente, el pH se ajustaba con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 M.

Los experimentos se realizaron para las concentraciones de 5 y 10 g/l a cada valor de pH. Los resultados aparecen en las Figuras 46 y 47.

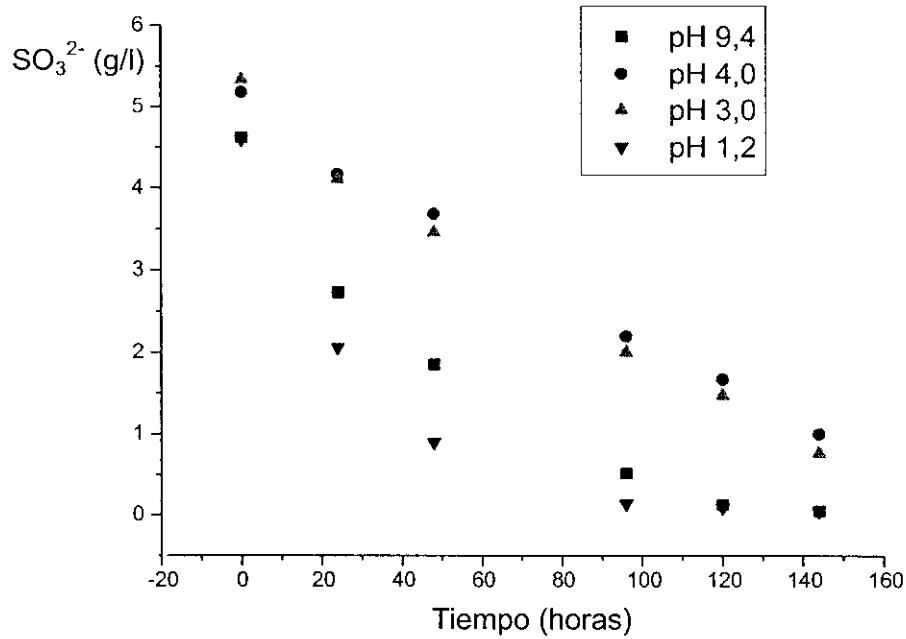


Figura 46: Influencia del pH inicial de la disolución sobre la oxidación del sulfito sódico (5 g/l)

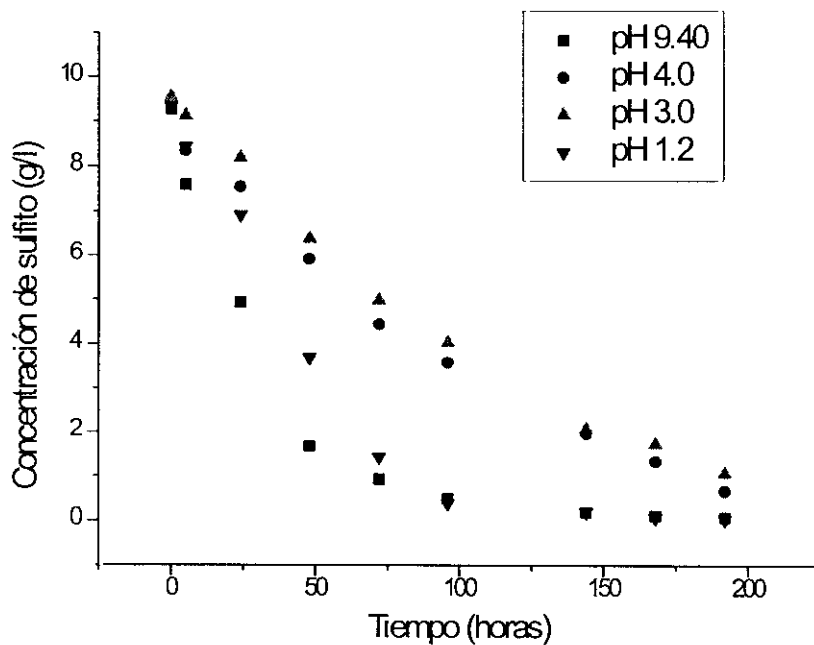
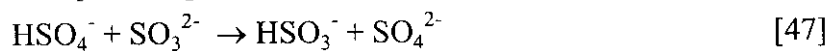


Figura 47: Influencia del pH inicial de la disolución sobre la oxidación del sulfito sódico (10 g/l)

La cinética de oxidación fue más rápida a valores de pH extremos, mientras que a valores de pH intermedios la oxidación transcurrió más lentamente. La oxidación química del ion sulfito vino determinada, por tanto, por la concentración inicial de protones, debido a que el pH determina la concentración de especies (sulfito/bisulfito, etc) en el equilibrio. Este mecanismo de influencia del pH se explica a continuación.

A través de las constantes de equilibrio y de las ecuaciones adecuadas, se puede construir un diagrama de distribución de especies para una concentración de S(IV) y una fuerza iónica determinadas (Figura 2). A valores de pH comprendidos en el intervalo de 3 a 6, predomina la especie  $\text{HSO}_3^-$ , que es la especie “menos reactiva” ya que la oxidación transcurre preferencialmente a expensas de la especie  $\text{SO}_3^{2-}$ . El mecanismo se puede describir del siguiente modo (Schroeter, 1966):



El  $\text{HSO}_4^-$  es una especie altamente ionizable e intercambia rápidamente su protón con el ion sulfito para formar la especie menos ionizable hidrogenosulfito y el sulfato. Schroeter propone la siguiente ecuación para la oxidación del sulfito y su dependencia con el pH:

$$\frac{-d[S_t]}{dt} = \frac{g \cdot [\text{HSO}_3^-]}{[H^+]^{1/2}} \quad [49]$$

$$[S_t] = C_{sulf.} + C_{bisulf.} \quad [50]$$

donde  $g$  es la constante catalítica referida a la cantidad de oxígeno disuelto. Su valor es  $2,0 \times 10^{-6} (\text{mol/l})^{1/2} / \text{s}$ .

El pH determina la especie que predomina sobre las demás, de tal modo que a pH 4 es el  $\text{HSO}_3^-$  la especie que predomina y, por tanto, a este pH, la disminución de especies con la oxidación es sensiblemente menor que a pH 8, donde predomina la especie  $\text{SO}_3^{2-}$  que es rápidamente oxidada.

La concentración de  $SO_3^{2-}$  para cada valor de pH puede calcularse a partir del valor de la constante de equilibrio :



$$K = \frac{[SO_3^{2-}][H^+]}{[HSO_4^-]} = 6,24 \times 10^{-8} \quad [52]$$

A pH 4:

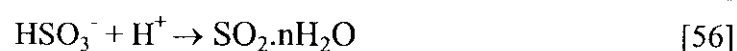
$$\frac{[SO_3^{2-}]}{[HSO_4^-]} = \frac{6,24 \times 10^{-8}}{10^{-4}} = 6,24 \times 10^{-4} \quad [53]$$

A pH 8:

$$\frac{[SO_3^{2-}]}{[HSO_4^-]} = \frac{6,24 \times 10^{-8}}{10^{-8}} = 6,24 \quad [54]$$

La reacción de oxidación de todas las especies en equilibrio con el ion sulfito (sulfitos, bisulfitos, etc) es dependiente, en último término, de la concentración de  $SO_3^{2-}$ , lo cual explica por qué la cinética fue más rápida en aquel intervalo de pH en el que predominaba esta especie.

A valores de pH muy bajos (inferiores a 2,5) la oxidación tuvo de nuevo una cinética muy rápida. La explicación a este resultado viene de nuevo de la mano de la concentración de las distintas especies en el equilibrio: a valores de pH bajos, el equilibrio se desplaza hacia la formación de  $SO_2$ . Es decir, en este caso, la desaparición de  $SO_3^{2-}$  no fue consecuencia de la aparición de especies más oxidadas (sulfatos o tiosulfatos) sino del desprendimiento de  $SO_2$ , lo cual se observó experimentalmente por el fuerte olor que despidieron las soluciones. Este resultado se explica a través de las siguientes reacciones:



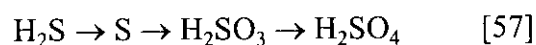
Los datos obtenidos a partir de los resultados de oxidación del ion sulfito vinieron a demostrar la importante influencia que tuvo la presencia de dicho ion en las condiciones químicas encontradas en la presa, comprobándose que la disminución del pH de la pulpa fue cuantitativamente similar al descenso de pH que acompañó a la oxidación química del ion sulfito en los experimentos realizados.

Por otro lado, también los datos cinéticos aportados acerca de la influencia del pH en la oxidación se vieron reflejados en el sistema objeto de nuestro estudio: a pH 8, que fue el valor de pH al que salía la pulpa de la planta de flotación, con una concentración de entre 88 y 100 ppm, la disminución en la concentración de ion sulfito fue rápida, detectándose en la presa entre 3 y 10 ppm. Pero en ésta, donde el agua se encontraba a pH 3, estas 3-10 ppm tardaron mucho en desaparecer y se necesitó un tratamiento químico adicional para poder oxidarlas.

### 3.2.1.b.-Ensayos de oxidación bacteriana

Una vez estudiada la cinética química de oxidación del ion sulfito, se planteó la posibilidad de comprobar si en su transformación pudiera existir participación microbiológica, protagonizada por las bacterias litoautótrofas que, como ha quedado demostrado en los apartados 2.3.2 y 2.3.3., estuvieron siempre presentes en el sistema.

El fundamento de esta hipótesis parte de los resultados aportados por recientes estudios relativos al metabolismo de bacterias litoautótrofas en los que, empleando modernas técnicas para el seguimiento de compuestos intermedios del azufre, se puso de manifiesto que especies como *Thiobacillus ferrooxidans* (Lorbach S. y col., 1993) y *Thiobacillus thiooxidans* (Suzuki I. y col., 1993) fueron capaces de utilizar sulfito como única fuente de energía para su metabolismo. El papel que juega el ión sulfito en el metabolismo de estos microorganismos parece estar relacionado con la participación, como intermedio en la oxidación a sulfatos, de especies reducidas del azufre (azufre elemental, sulfuros) (Kodama y col., 1968; Suzuki y col., 1993):



Se han purificado distintas enzimas relacionadas con este metabolismo y se ha comprobado que, a determinadas concentraciones, el ion sulfito puede ser incluso un inhibidor de la oxidación si se acumula en exceso (*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 1994).

En el apartado 3.2.1.a., se comprobó que la oxidación química del ion sulfito transcurrió a través de una cinética muy rápida, de modo que, de partida, parecía poco probable que las bacterias pudieran superar al oxígeno en su competencia por el ion sulfito. Aún así, se prepararon experimentos de oxidación de ion sulfito con agua de mina y con agua de mina estéril para evaluar la posible influencia bacteriana en su oxidación, ya que la presencia de bacterias en el agua de mina había quedado confirmada a partir de la caracterización microbiológica de las muestras tomadas.

Se trataron de reproducir lo más fielmente posible las condiciones del sistema real; por ello, la concentración de ion sulfito elegida en un principio fue de 0,1 g/l, al tratarse de la concentración que se encuentra a la salida de la planta. Debido a la inestabilidad de las disoluciones de sulfito sódico cuando se encuentra en condiciones oxidantes (disoluciones expuestas a la atmósfera, como es el caso del experimento), fue muy difícil seguir con exactitud la evolución de la concentración de disoluciones tan diluídas; por ello, los ensayos se realizaron finalmente a una concentración de 0,5 g/l.

Los resultados de los ensayos de oxidación del ion sulfito en agua de mina se reflejan en la Figura 48.

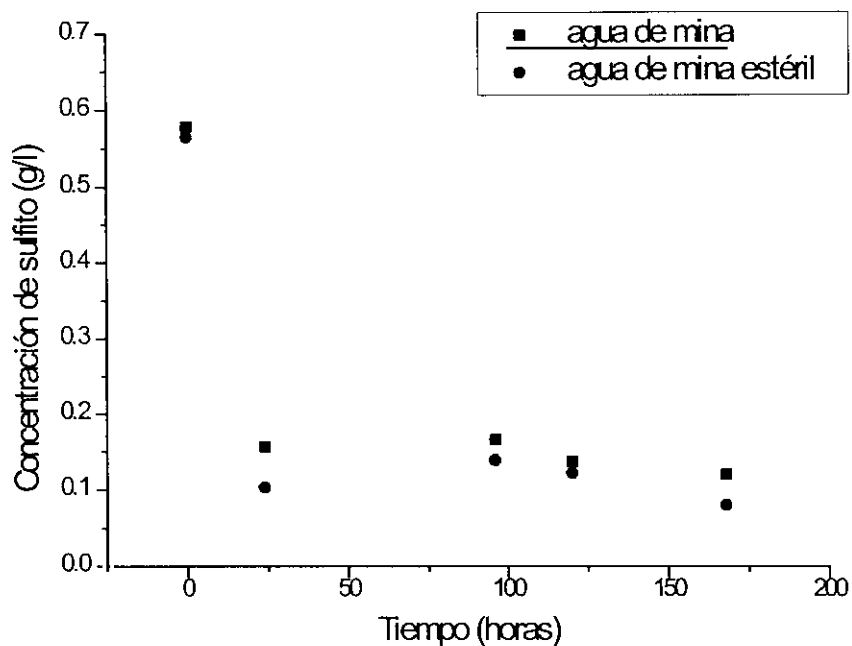


Figura 48: Oxidación del ion sulfito en agua de mina

Como refleja la Figura 48, no se observó ninguna diferencia entre los resultados de los experimentos realizados con agua de mina y con agua de mina estéril. Dado que la concentración de bacterias en las aguas naturales no es muy abundante, se decidió concentrar el número de células presentes en los cultivos para poder verificar con más eficacia la posible influencia bacteriana en la cinética de oxidación del ion sulfito. Por esto, los experimentos se repitieron utilizando cultivos en los que se inoculó con bacterias azufre y hierro-oxidantes aisladas del propio sistema. Los cultivos de bacterias utilizados fueron los siguientes:

D.2. (Fe): bacterias oxidantes de hierro

S.2. (Fe, S): bacterias oxidantes de Fe y S

H.M.: cultivo mixto

Los experimentos se realizaron en medio 9K. Se eligieron dos valores iniciales de pH: 3, porque es el valor óptimo para el crecimiento de las bacterias y además es el que presenta la presa; y 8 por ser el de la pulpa a la salida de la planta. La concentración de ion sulfito se fijó en 0,15-0,2 g/l. Los cultivos se mantuvieron a 35°C con agitación orbital con el fin de favorecer el crecimiento de las bacterias.

Las condiciones elegidas para estos experimentos plantearon problemas importantes. Por un lado, las condiciones óptimas para el crecimiento de las bacterias no fueron las más favorables para poder controlar la oxidación del  $\text{SO}_3^{2-}$ . Si las disoluciones se ajustan a pH 3, ha de tenerse en cuenta que parte del sulfito se transformará en bisulfito con lo que la concentración de sustrato disponible para las bacterias será mucho menor. Por otro lado, si el medio de reacción se ajusta a pH 8, para que el sulfito sea la especie predominante, muchas de las sales del medio de crecimiento de las bacterias precipitan a valores de pH tan elevados. Además, las bacterias litoautótrofas empleadas en estos ensayos, que fueron elegidas por ser las directamente implicadas en procesos de oxidación de compuestos inorgánicos, poseen un pH óptimo de crecimiento mucho mas bajo, en torno a 3.

Pero el problema más importante que se planteó durante el desarrollo de estos experimentos fue que la oxidación del ion sulfito tuvo una cinética muy rápida, con lo que no se pudo detectar proliferación celular que pudiera asociarse a dicha oxidación. No parece probable, por tanto, que las bacterias participen en la oxidación del ion sulfito en la presa. Su contribución a la disminución del pH estará más bien relacionada con la oxidación de la pirita y otros iones como el  $\text{Fe}^{2+}$  presentes en las aguas, como se discutirá más adelante.

### 3.2.1.c.- Ensayos de oxidación en agua de mina

Los ensayos de oxidación de ion sulfito en agua de mina se realizaron para aproximar los experimentos a condiciones más reales. Para realizar estos ensayos se utilizó agua de mina procedente de la superficie de la presa de estériles (cv-2). Se eligió este punto de muestreo por tratarse del lugar donde el ion sulfito tuvo un tiempo de residencia mayor, donde se aprecia la disminución de pH más acusada (ver apdo. 3.1.2.) y donde se encuentran metales en disolución cuya influencia en la oxidación del ion sulfito también interesaba evaluar. Para realizar estos ensayos, se prepararon tres disoluciones de sulfito sódico: una en agua destilada que serviría como blanco; otra en agua de mina que tenía un pH de 2,4 y otra en agua de mina estéril que tuvo el mismo pH. La justificación de los ensayos con agua de mina estéril estuvo, como se ha indicado en el apartado 3.2.1.b., en considerar la posible influencia que pudiera tener la acción bacteriana en la oxidación del ion sulfito.

Inicialmente, se eligió la concentración de 0,5 g/l de ión sulfito para la realización de los experimentos. Se observó que al añadir dicho ión al agua de mina, la disolución se coloreaba levemente y el pH subía instantáneamente. En el caso de la disolución en agua de mina, el pH subió desde 2,4 a 2,7, y en el caso de la disolución preparada con agua de mina estéril, el pH subió desde 2,4 a 2,9. Los valores de pH de 2,7 y de 2,9 fueron los valores de pH iniciales, respectivamente. Por su parte, la disolución de  $\text{SO}_3^{2-}$  en agua destilada dejó un pH de 9, que fué el valor de pH con el que se inició el experimento en este caso.

Los resultados de estos experimentos se reflejan en las Figuras 49 y 50.

Como puede apreciarse en dichas figuras, la cinética de oxidación fue muy rápida: en 48 horas prácticamente se había consumido todo el ion sulfito. Por otro lado, no se observó ninguna diferencia entre los ensayos realizados con agua de mina y los realizados con agua de mina estéril. La oxidación del ion sulfito fue tan rápida que no se pudo estudiar la posible influencia de la oxidación bacteriana.

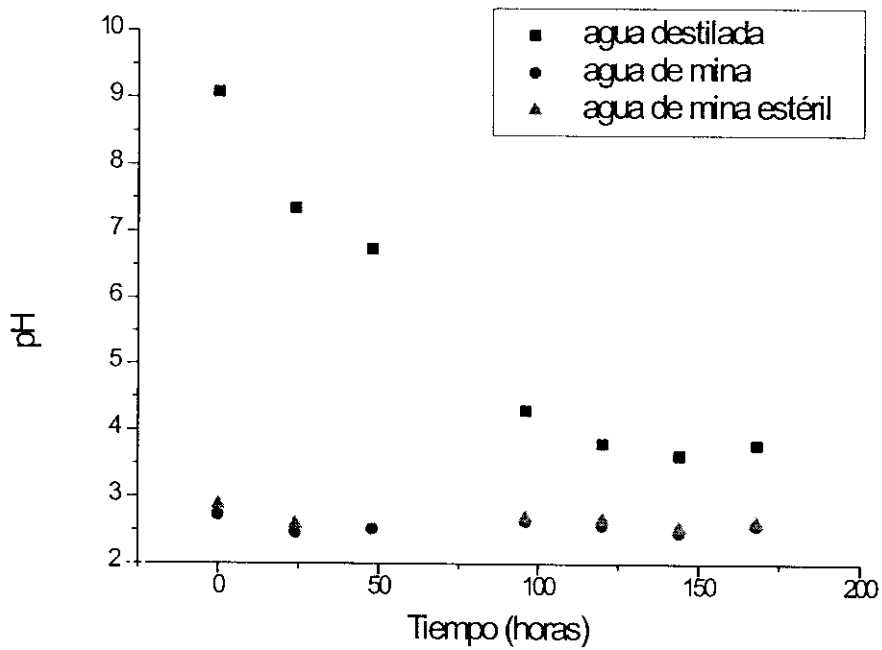


Figura 49: Evolución del pH en la oxidación de una disolución con 0,5 g/l de ión sulfito en agua de mina

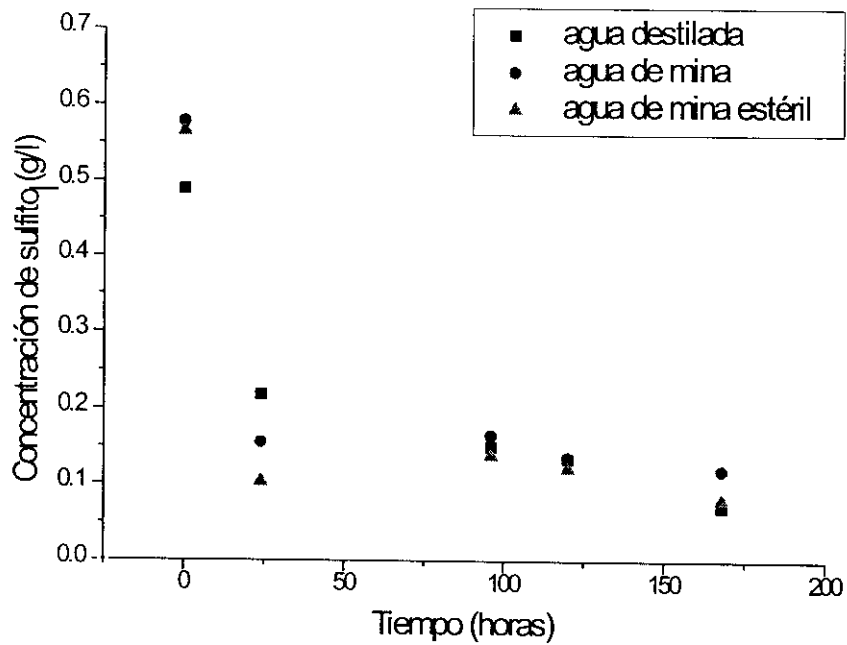


Figura 50: Cinética de oxidación química de una disolución con 0,5 g/l de ión sulfito en agua de mina

La cinética de oxidación para las disoluciones preparadas en agua de mina fue ligeramente más rápida que en el caso de la disolución en agua destilada, pese a que el pH de partida en este caso era superior, lo que hubiera significado una cinética más rápida de acuerdo con lo discutido en el apartado 3.2.1.a.. La justificación de este resultado estuvo en el hecho de que en el agua de mina existían metales en disolución (ver composición de la muestra de agua superficial CV-2 tomada en la presa de estériles y utilizada en este experimento, apdo. 2.2.2.b.) ejerciendo un efecto catalítico en dicha oxidación. Se ha comprobado experimentalmente que metales como el hierro, el cobre o el manganeso (Basset y col., 1951; Hegg y Hobbs, 1978; Clarke, 1981; Wisniewski, 1990), aceleran la oxidación del ion sulfito. La importancia de la presencia de los metales es tal que algunos autores incluso proponen que en la etapa inicial de la oxidación se necesita de la presencia de un metal que inicie la reacción en cadena (Schroeter L., 1966; Pasiuk-Bronikowska W., 1988).

Los mismos ensayos descritos anteriormente se repitieron para la concentración de 5 g/l de ion sulfito. Al añadir éste al agua de mina, se detectó un incremento de pH desde 2,2 a 7,2, lo que fue acompañado por la aparición de una intensa coloración amarillenta. Como se describió en el apartado 3.2.1.a., el ion sulfito se hidroliza en agua desprendiendo  $\text{OH}^-$ . Esta es la razón por la que el pH aumentó al preparar las disoluciones en agua de mina. La aparición de la intensa coloración amarillenta y de los precipitados pardo-rojizos que se observaron se debió a que, a valores de pH próximos a 7, precipitaron los metales disueltos en el agua de mina. Esto se comprobó mediante el análisis del agua, antes y después de la adición del ion sulfito: mientras que el agua de mina tenía una concentración de 81 ppm de Fe, 2,9 ppm de Cu y 24,3 ppm de Zn, al añadir el ion sulfito los valores respectivos fueron de 6,3 ppm de Fe, 0,2 ppm de Cu y 14,6 ppm de Zn.

Los resultados obtenidos para la oxidación de disoluciones de ion sulfito de concentración 5 g/l se reflejan en las Figuras 51 y 52. En dichas figuras se incluyen además los resultados de un experimento realizado también en agua de mina a la que se le añadieron 2 g de pirita, con el objeto de estudiar su posible influencia en la oxidación del mineral.

La validez de estos experimentos hay que valorarla con relativo cuidado. Las condiciones iniciales no fueron iguales en los ensayos que pretendían ser comparativos ya que la adición del ion sulfito modificó mucho las disoluciones. Los valores de pH inicial no fueron semejantes y éste fue un factor que, como quedó demostrado en el apartado 3.2.1.a., influyó decisivamente en la oxidación.

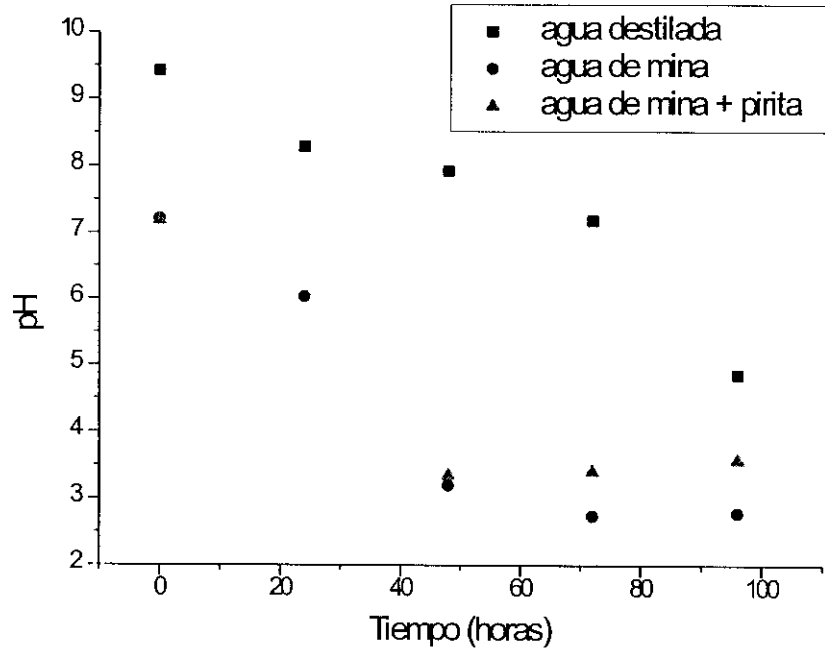


Figura 51: Evolución del pH en la oxidación de una disolución con 5 g/l de ion sulfito en agua de mina

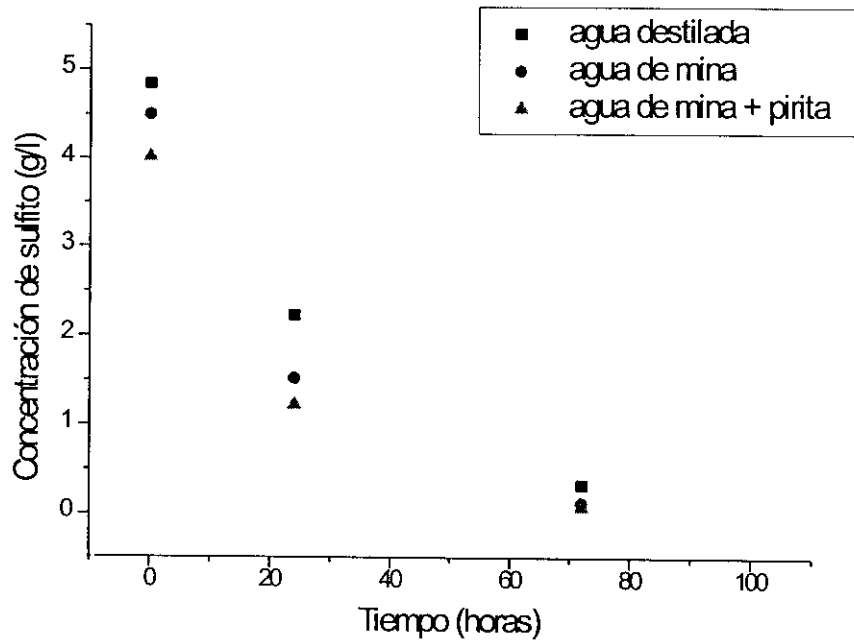


Figura 52: Cinética de oxidación química de una disolución con 5 g/l de ion sulfito en agua de mina

Sí se pueden extraer, no obstante, algunas conclusiones interesantes; por ejemplo, que pese a que el valor de pH para las disoluciones en agua de mina fue inferior, sin embargo, las reacciones transcurrieron con una cinética rápida, incluso superior a la de pH alcalino. Como se ha indicado anteriormante, este efecto cabe interpretarlo en base a que en el agua de mina además de los iones  $H^+$  existían otros catalizadores importantes de la reacción como fueron los iones  $Cu^{2+}$ . En presencia de iones cobre, la cinética de oxidación se incrementó notablemente. Este efecto fue creciente a medida que la reacción transcurrió ya que conforme el ion sulfito era oxidado a sulfato la solución se volvía menos básica, aumentando por tanto la solubilidad del cobre (Fuller y Crist, 1941) y aumentando por tanto su concentración en solución. En el caso de la disolución en presencia de piritita, el efecto fue aún más acusado debido a que a la presencia de los iones cobre se unió la de los iones hierro, que ejercieron un efecto similar, aunque menos intenso, al de los iones cobre.

### 3.2.1.d.- “Planta activa” y “presa abandono”

Durante el periodo de realización del presente estudio, la planta de flotación experimentó una parada técnica que duró unos seis meses. Este hecho supuso, por un lado, el cese del aporte de pulpa a la presa y, por tanto, la falta de aireación de la misma durante la caída desde la planta. Por otro lado, supuso el cese del aporte de ion sulfito a la pulpa, por lo que el residuo evolucionó durante este periodo en ausencia de uno de los factores que se habían considerado potencialmente implicados en la oxidación. Durante este tiempo, la presa experimentó transformaciones importantes que permitieron estudiar la evolución del residuo en lo que se han denominado condiciones de “abandono”, para compararlo con las condiciones en que la planta estuvo activa y que se han denominado “presa activa”.

Transcurridos los tres primeros meses en condiciones de “abandono”, comenzaron a observarse visualmente los primeros cambios en la presa (Figura 53): el agua, que en condiciones de “planta activa” era transparente, se volvió rojiza, y en las orillas podían apreciarse precipitados pardo amarillentos y blanquecinos. Los resultados correspondientes al análisis químico del agua de la presa se muestran en la Tabla XXVII.

Cuando la planta se encontraba en funcionamiento existía un aporte continuo de ión sulfito a la pulpa residual. Debido al carácter reductor del ion sulfito (ecuaciones [4] y [5]), la presa se mantuvo en condiciones no oxidativas, lo que hizo que la piritita no llegara a oxidarse. Esto quedó comprobado (ver apdos. 3.1.1. y 3.1.2.) mediante los análisis químicos de distintas muestras de pulpa (en los cuales el porcentaje de S no aparecía modificado), en los difractogramas correspondientes (en los que no aparecía ningún

compuesto procedente de la meteorización de sulfuros) y en los valores de concentración de metales y sulfatos presentes en el agua superficial, que si bien fueron más elevados que en el punto de vertido (P.E., ver Figura 3), no llegaron a ser tan altos como cabría esperarse para un agua de mina totalmente oxidada.

Tabla XXVII: Análisis del agua de la presa en condiciones de “planta activa” y de “presa abandono”

	Planta activa	Presa abandono
SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> (ppm)	3	No hay aporte
Fe (ppm)	50	305
Cu (ppm)	0,3	21,8
Zn (ppm)	30	105
pH	3,5	2,47
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (ppm)	1333	3123

El punto de muestreo que se tomó como referencia fue el correspondiente a CV-2 (ver Figura 3)

En base a este planteamiento cabría preguntarse:

*¿Que factor o elemento sufre alteración desde el vertido hasta el punto de rebose?*

Al discutir los datos correspondientes a los análisis de las muestras de la pulpa a la salida de la planta y del agua del rebose en la presa (Tabla XIX), uno de los aspectos que destacaron fue que el ion sulfito prácticamente desaparecía (en el caso de “presa abandono” no existió aporte del mismo). Como se ha visto en el apartado 2.4.1., el ion sulfito al oxidarse consume OH<sup>-</sup>. Si se comparan, aunque sea de un modo aproximado, la evolución del pH de una disolución de ion sulfito de concentración 5 g/l siguiendo los datos cinéticos obtenidos en el laboratorio, y la evolución del pH que existió a lo largo del recorrido de la pulpa desde la salida de la planta hasta el rebose, se encuentra que el pH que se alcanzó al final de la oxidación fue similar en ambos casos (Tabla XXVIII).

Tabla XXVIII: Comparación de la evolución del pH en el sistema y en la oxidación química de una disolución patrón de ion sulfito

pH de una solución de 5g/l de sulfito sódico	pH en el muestreo de la presa
9,49	11,1 (P.1)
9,08	10,6 (P.2.)
8,55	6,5 (P.4.)
7,74	4,6 (S.2.)
7,4	3,6 (S.2.)
6,75	3,4 (S.5.)
<b>3,96</b>	<b>3,5 (S.6.)</b>

Entre paréntesis figuran los puntos sucesivos de muestreo (ver Figura 3)



Figura 53: "Planta activa" y "presa abandono"

El grado de acidez alcanzado en la presa en condiciones de “planta activa” fue del orden de la acidez final de una disolución de ión sulfito a oxidación total. Cuando la presa se abandonó y cesó el aporte reductor, la pirita pudo oxidarse y se llegó entonces a valores de pH mucho más bajos que no se alcanzaron por la oxidación química del ion sulfito.

Efectivamente, la muestra F-1 que fue tomada en un lugar del recorrido de la pulpa en el que el agua se remansaba, presentó unas características visuales (agua roja y precipitados pardo-amarillentos) similares a las de la presa en condiciones de “presa abandono”. Estas condiciones de remansamiento supusieron que en estos lugares el agua no se renovó, no hubo aporte reductor, y existió además un tiempo de reacción suficiente para que pudieran darse la oxidación química y microbiológica de la pirita, situación similar a las condiciones de “presa abandono”. Los datos de pH que se obtuvieron en ambos casos fueron de 2,42 para el agua remansada y de 2,43 para la presa “abandono”.

Si se comparan los valores de pH obtenidos en la presa en ambas condiciones, con algunos valores característicos de drenajes ácidos (DAM) en distintas minas del mundo (Kuyarak,1990), se encuentra que los valores correspondientes a la situación de “presa abandono” son comparables con los de típicas aguas ácidas de drenaje de mina (Tabla XXIX).

Tabla XXIX: Análisis del agua en condiciones de “planta activa” y de “presa abandono”. Además, dos ejemplos típicos de aguas ácidas (DAM)

	Planta activa	Presa abandono	AMD	
pH	3,5	2,5	2,5	2,9
Fe (ppm)	50	305	204	431
Cu (ppm)	30	105	7,1	55,5
Zn (ppm)	0,3	3123	2035	3060
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (ppm)	1333	21,8	1,4	2

Se puede concluir, por tanto, que en condiciones de “planta activa” fue el ion sulfito el que condicionó el estado químico de la presa imponiendo unas condiciones reductoras que impidieron que la pirita llegara a oxidarse. Tanto el pH en la presa (3,5) como la concentración de metales y sulfatos, estuvieron determinados por la oxidación del ion sulfito. En condiciones de “abandono”, se desencadenaron los procesos microbiológicos que consiguieron disminuir el pH hasta valores en torno a 2,5, condiciones que sólo se alcanzaron cuando existió participación bacteriana en la oxidación de sulfuros.

### 3.2.2.- Ensayos de meteorización

#### 3.2.2.a.-Ensayo ABA

El ensayo ABA elegido es una modificación del ensayo ABA estandarizado (Sobek y col, 1978). La novedad que presenta se concreta en la fase de digestión de la muestra en la que se prefieren utilizar condiciones más suaves (agitación orbital a temperatura controlada en lugar de llevar la muestra a ebullición) con el fin de evitar sobreestimar el potencial neutralizante. Del mismo modo, los límites inferior y superior de pH exigidos (1,0-1,6) tras la digestión, aseguran que la muestra no ha “sobrerreaccionado” pero sí que se le ha dado el tiempo y las condiciones suficientes para que la reacción progrese adecuadamente.

El ensayo ABA se realizó sobre dos muestras similares aunque diferentes. Ambas correspondieron a la pulpa procedente del punto de muestreo P.E. (ver Figura 3), pero fueron tomadas en distintos momentos del proceso, por lo que sus características no pudieron considerarse idénticas y fue necesario caracterizarlas separadamente. Se utilizará la terminología “pulpa P1” para designar al mineral que se empleó en las columnas M, H-S/S, L/Li y h33/h66. Se llamará “pulpa P2” al mineral empleado en las columnas M2 y H-S/R. Los resultados correspondientes se discutirán en párrafos posteriores.

Previamente a la realización del ensayo, la pulpa se secó al aire y se trituró hasta un tamaño homogéneo, tal y como recomienda la norma.

El volumen de NaOH consumido por cada una de las muestras, en ensayos que se realizaron por duplicado, así como los valores inicial y final de pH medidos durante la valoración, se muestran en la Tabla XXX.

Tabla XXX: Volumen (ml) de NaOH consumido durante la realización del test ABA

Muestra	pH inicial	pH final	V <sub>NaOH, 2N</sub> (ml)
P1 <sub>1</sub>	0,59	8,32	20,7
P1 <sub>2</sub>	0,59	8,37	20,6
			V <sub>medio</sub> = 20,65
P2 <sub>1</sub>	0,65	8,56	19,7
P2 <sub>2</sub>	0,60	8,33	20
			V <sub>medio</sub> = 19,85

A partir de estos valores y mediante cálculos sencillos, se pudo conocer el volumen de HCl 0,5 N que reaccionó con la base contenida en los 2 g de cada muestra:

$$V_{HCl} = 80ml - \frac{V_{NaOH} \cdot N_{NaOH}}{N_{HCl}} = 80ml - \frac{V_{NaOH} \cdot 1,98}{0,5172} \quad [58]$$

Para el caso de la muestra de pulpa **P1** este valor dió un resultado de **0,94 ml**, mientras que para la muestra de pulpa **P2** resultó ser de **4,00 ml**. La cantidad de base que acompañó a la muestra P2 fue superior, o lo que es lo mismo su capacidad neutralizante fue superior a la de P1.

El potencial neutralizante de las muestras (NP) calculado de acuerdo con la fórmula [41] (apartado 2.3.5.) resultó ser:

$$NP (P1) = 12,22$$

$$NP (P2) = 51,8$$

El potencial ácido (AP) de las muestras calculado a partir del valor del contenido en S total fue similar para ambas pulpas:

$$AP (P1) = \% S \times 31,25 = 37,6 \times 31,25 = 1175$$

$$AP (P2) = \% S \times 31,25 = 38,15 \times 31,25 = 1192$$

El potencial neto neutralizante de las muestras (NNP) fue por tanto:

$$NNP (P1) = 12,22 - 1175 = -1163 \text{ Kg CaCO}_3/\text{tm material}$$

$$NNP (P2) = 51,8 - 1192 = -1140 \text{ Kg CaCO}_3/\text{tm material}$$

El NNP resultó ser inferior a 0 en ambos casos, luego la conclusión de este primer ensayo estático de meteorización fue que las muestras P1 y P2 eran generadoras potenciales de acidez. Este primer resultado de aproximación se confirmó posteriormente mediante otros ensayos estáticos y dinámicos que permitieron dilucidar bajo qué condiciones concretas estas muestras, que en principio eran generadoras de acidez, exhibían esta propiedad y con qué cinética.

La interpretación de los resultados de un ensayo de este tipo exige, no obstante, cierta experiencia y ser meticuloso en los juicios ya que, en ocasiones, muestras que dieron un

resultado positivo de NNP, no exhibieron este comportamiento en los ensayos cinéticos o en los ensayos de campo, lo que no quiere decir que bajo determinadas circunstancias pudieran manifestarse como generadoras de acidez. Del mismo modo, muestras que no exhibieron una tendencia a la generación de acidez, sin embargo, sí resultaron fuertemente contaminantes en condiciones de campo.

Desde este punto de vista, nunca debe interpretarse un ensayo ABA como una diferencia aritmética de dos números sino que debe hacerse una interpretación racional y cautelosa de los resultados. Se han utilizado varios criterios para interpretar los resultados de un ensayo estático. Algunos autores consideran muestras generadoras potenciales de acidez a aquellas con valores de NNP en torno a  $-5 \text{ Kg CaCO}_3/\text{t}$  de material (criterio aplicado a muestras procedentes de minas de carbón). En la región de *British Columbia*, en Canadá, se aplicaba el criterio de  $\text{NNP} = 0$  para la minería metálica. Posteriormente, se consideró que valores comprendidos entre  $-20$  y  $+20$  eran inciertos y no concluyentes (Ferguson, 1991). En 1991, Smith y Bridges (Smith y col., 1991) hicieron una propuesta más definitiva: las muestras debían tener una relación 3:1 (NP/AP), de modo que muestras con valores inferiores a esta relación deberían someterse a ensayos cinéticos.

### **3.2.2.b.- Ensayo en matraz agitado**

Como se indicó en el apartado 3.5.2., mediante este tipo de experimentación se pueden realizar ensayos cinéticos en los que además de conocer el potencial neutralizante de la muestra, se puede observar la influencia de un factor en particular. Éste es un método rápido y económico para predecir el potencial contaminante, aunque sus resultados deben ser interpretados igualmente de modo cuidadoso, especialmente si tratan de compararse con medidas de campo (Silver, 1985).

Previamente a los ensayos de meteorización en matraz agitado, se realizó un ensayo rápido a la muestra P1 de lo que se conoce como “determinación de la máxima capacidad lixiviante de una muestra- *maximum leachability assay, M.L.A.*- de acuerdo con el método de Kuryk (Doepker, 1991). Dado que las muestras de pulpa eran semejantes en su composición, se consideró suficientemente representativo realizar este ensayo rápido sólo a una de ellas y se eligió para ello la muestra P1. El procedimiento consistió en pesar 1 gramo de muestra que se mezcló con 2 ml de ácido nítrico concentrado y 2 ml de ácido clorhídrico en 25 ml de agua destilada. La mezcla se mantuvo en matraz agitado, a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante 4 y 12 horas (el ensayo se hizo por duplicado), transcurridos los cuales, las respectivas muestras se filtraron y se enrasaron en un matraz de 100 ml. Posteriormente, se

procedió al análisis de Fe y Cu mediante absorción atómica y al análisis turbidimétrico de los sulfatos. En la Tabla XXXI se muestran los resultados obtenidos, los cuales dan una idea de los niveles de concentración obtenidos tras la lixiviación química de la muestra.

Tabla XXXI: Ensayo rápido para la determinación de la máxima capacidad liviviente de una muestra

Muestra	Fe <sub>t</sub> (ppm)	Cu <sub>t</sub> (ppm)	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (ppm)
M.L.A. 4 horas	5.300	18,6	1978,6
M.L.A. 12 horas	5.700	19,5	1978,6

Confirmando los resultados obtenidos en el ensayo ABA, la muestra presentó un elevado contenido en metales que se disolvieron en condiciones químicas agresivas. Ahora bien, estas cifras hay que interpretarlas, como en otras ocasiones, con cuidado pues sólo dan idea del potencial contaminante de la muestra. La evolución real que haya de tener un residuo habrá que estudiarla bajo la acción de determinados condicionantes específicos, y precisamente con esta filosofía se diseñaron los ensayos en matraz agitado que a continuación se describen.

#### ~~-Influencia de las bacterias y del ion sulfito en la generación de acidez.- Ensayos preliminares~~

Mediante este experimento se pretendía estudiar la influencia que la presencia del ion sulfito y las bacterias pudieran tener en la acidificación del residuo en la presa. Para ello, se comparó el pH final de tres ensayos preparados a partir de muestras de pulpa residual (P.E., ver Figura 3) en los que ésta se dejó evolucionar en “condiciones naturales” (M), bajo la presencia de 1 g/l de ion sulfito (MS) y bajo la acción de las bacterias (20 ml de inóculo de un cultivo de *Thiobacillus ferrooxidans* (MB) aislado a partir de muestras tomadas en la presa (apdo. 3.1.4.b.)).

La adición de ion sulfito (sulfito sódico) a la pulpa supuso que el pH inicial se incrementara (desde 8 a 9) debido a que, como quedó expuesto en el apartado 3.2.1., las disoluciones acuosas de sulfito sódico son básicas. Por otra parte, la adición de 20 ml de inóculo de *Thiobacillus ferrooxidans* hizo descender el valor de pH inicial hasta 2. Ambas situaciones supusieron que las condiciones iniciales de este experimento no fueran las más favorables debido a que los tres ensayos no se iniciaron a idénticos valores de pH. Estas deficiencias se corrigieron en experiencias posteriores pero, aún así, se pudo obtener alguna conclusión interesante de estos primeros resultados. Si se observa la variación del pH en los tres casos (Figura 54), se aprecia que la evolución del experimento con y sin ion sulfito

fue similar, alcanzándose un valor en torno a 3, consistente con el valor de pH encontrado en la presa en condiciones de “presa activa” discutido en el apartado 3.2.1.d.. Este resultado se justifica considerando que en la muestra de mineral de partida (M) existía un contenido de ion sulfito residual (recuérdese que la pulpa P.E. salía de la planta de flotación con una concentración de ion sulfito del orden de las 80-100 ppm) que se oxidó del mismo modo que el ion sulfito incorporado en la muestra MS.

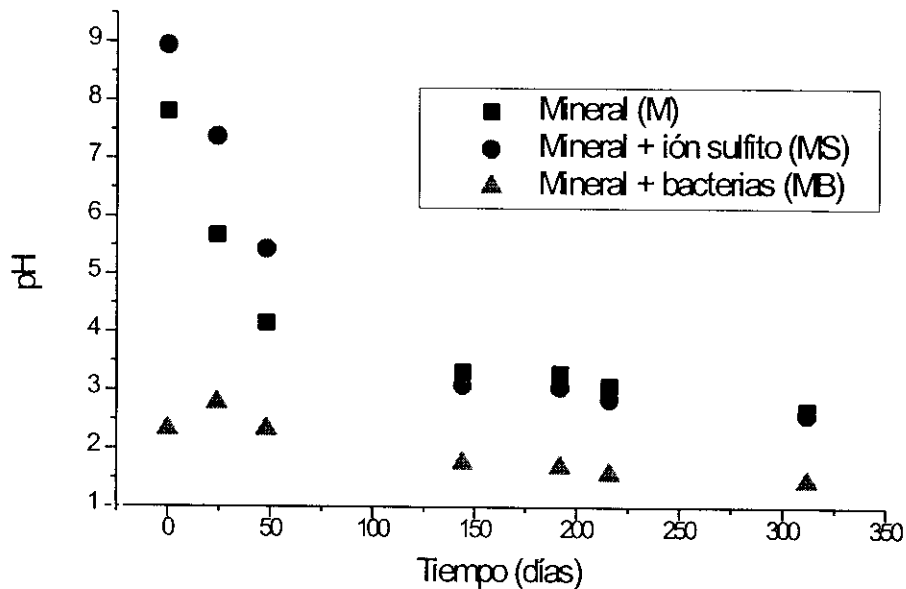


Figura 54: Evolución del pH en la pulpa

Los datos correspondientes a la evolución de la concentración de hierro para estos tres casos se reflejan en la Figura 55.

La concentración inicial de hierro en MB fue superior a la de las muestras M y MS debido a que éste se incorporó al ensayo con el inóculo. Durante el tiempo que duró el experimento no hubo lixiviación importante en las muestras M y MS, a diferencia de lo que sucedió con la muestra inoculada en la que la concentración de hierro total en solución se incrementó notablemente, lo que vino a indicar la importancia que tuvo la presencia de bacterias litoautótrofas en la meteorización del residuo.

Los resultados obtenidos en estos ensayos preliminares se matizaron y completaron con los ensayos siguientes.

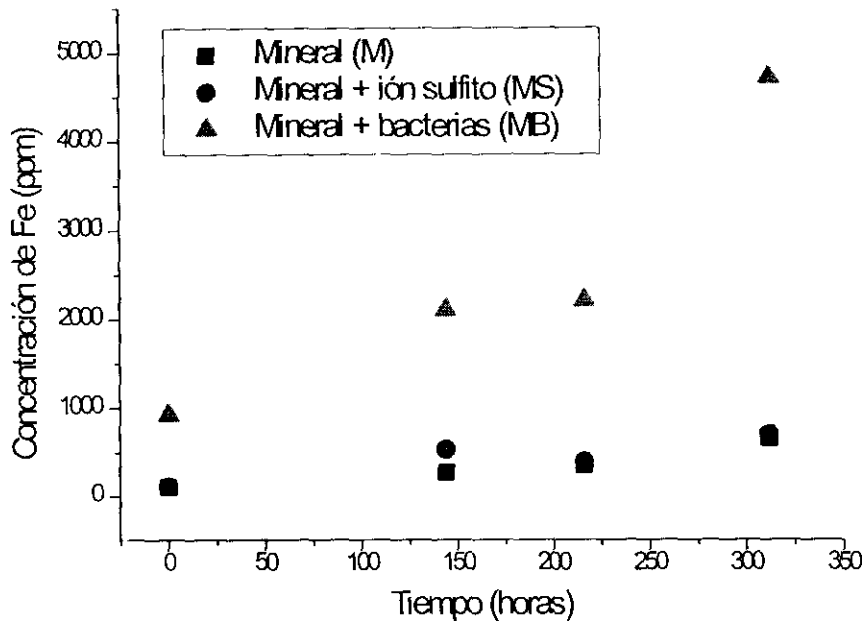


Figura 55: Evolución de la concentración de hierro en la pulpa

*-Influencia de la catálisis bacteriana en la meteorización de la pulpa residual*

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos preliminares, se diseñaron nuevos experimentos para estudiar la incidencia concreta de cada factor. Para estudiar la influencia de la catálisis bacteriana, se prepararon tres ensayos en los que se utilizó pulpa como mineral de partida. En uno de ellos, se utilizó la pulpa (o lodo) exclusivamente (L); en otro ensayo se adicionaron 10 ml de un inóculo de bacterias hierro-oxidantes aisladas en la presa (LB); y en un tercer ensayo se utilizó lodo con 20 ml de timol, con el fin de estudiar la evolución química de la pulpa (LT) -el timol inhibe el crecimiento bacteriano-. Periódicamente, se tomaban muestras y se reponía la evaporación (mediante pesada) con agua destilada. La adición del inóculo al cultivo LB se realizó transcurrido el periodo inicial en que la muestra consume ácido (neutralización de componentes básicos) y en el que, por tanto, el pH sube bastante. Se prefirió retrasar el momento del inóculo porque las bacterias utilizadas en este experimento (cultivo de *Thiobacillus ferrooxidans*) crecen a valores de pH ácidos con lo que probablemente no llegarían a acomodarse a las condiciones básicas iniciales del experimento y, por tanto, la actividad mostrada no sería representativa en estas condiciones. El inóculo, en este caso, se adicionó a partir de 10 ml de un cultivo de *Thiobacillus ferrooxidans* que se centrifugó con el fin de evitar la incorporación de hierro procedente del cultivo al experimento.

La evolución del pH en los tres ensayos realizados (Figura 56) mostró claramente cómo la presencia de bacterias influye en la catálisis del proceso de generación de acidez. Mediante mecanismos químicos, el pH pudo disminuir hasta valores en torno a 4 pero fue necesaria la actividad microbiológica para disminuir el pH a valores por debajo de 2 (Ritcey y col., 1982; Silver, 1985). El comportamiento de la pulpa sola (L) y de la pulpa con bacterias, aún así, fue bastante parecido. Esto se debió a que cuando la pulpa se dejó evolucionar libremente, de un modo espontáneo empezaron a desarrollarse las bacterias que acompañaban al mineral de partida (lo que no sucedió en el cultivo LT al que se le adicionó un bactericida). Este resultado confirmó ciertas observaciones realizadas por Silver (Silver, 1985) en relación a la evolución de residuos mineros abandonados. La hipótesis de Silver consistía en que los residuos eran capaces de crear su propio microambiente lixivante, esto es, generar un microentorno de condiciones óptimas para la oxidación del mineral.

Las diferencias encontradas en la evolución de la pulpa en los tres ensayos se hicieron mucho más patentes cuando se analizó el comportamiento del hierro total en solución (Figura 57). Mientras que en presencia del bactericida (timol) prácticamente no se disolvió nada, en presencia de bacterias la concentración se incrementó notablemente, tanto cuando se trató de poblaciones naturales que comenzaron a desarrollarse (L), como cuando se comprobó la actividad con bacterias ya adaptadas (LB). El tiempo transcurrido hasta el comienzo de la disolución biológica del metal (biolixiviación) fue de aproximadamente diez días, tiempo necesario para que se neutralizaran los componentes básicos de la muestra de partida (incremento de pH inicial) y para que el pH comenzara a descender.

La presencia de bacterias asociadas al mineral de partida quedó patente en la caracterización del sistema y en la descripción del aislamiento de microorganismos. Se quiso comprobar tanto si estas bacterias se encontraban adheridas al mineral o se encontraban en el agua de la pulpa, como la actividad que mostraban en ambos casos. Por eso, estos mismos experimentos se repitieron utilizando mineral seco procedente de la pulpa. El mineral, una vez seco, se pulverizó finamente antes del comienzo de la experiencia. Se utilizaron 25 g en 250 ml de agua destilada. Se prepararon cinco ensayos distintos: uno exclusivamente con el mineral (M); otro con el mineral y timol (MT); otro en medio 9K (ver apdo. 3.3.1.) a pH 2, con 33,3 g/l de sulfato ferroso y un inóculo del 10% de un cultivo de *Thiobacillus ferrooxidans* (MB); otro en medio 9K a pH 2 con hierro y timol (MBT); y finalmente, un ensayo en medio 9K a pH 2, sulfato ferroso y un inóculo del 10% de un cultivo mixto de bacterias crecidas en pulpa de este mismo mineral (MCM). Como en el caso anterior, los inóculos se centrifugaron antes de añadirlos a los cultivos para evitar incorporar hierro (férrico) a la disolución.

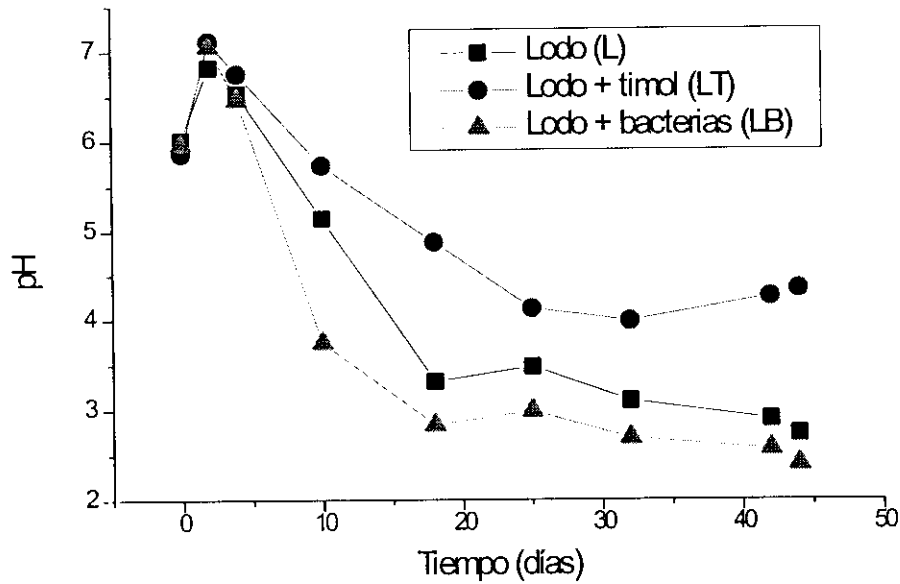


Figura 56: Influencia de la oxidación microbiológica en la generación de aguas ácidas.- Evolución del pH

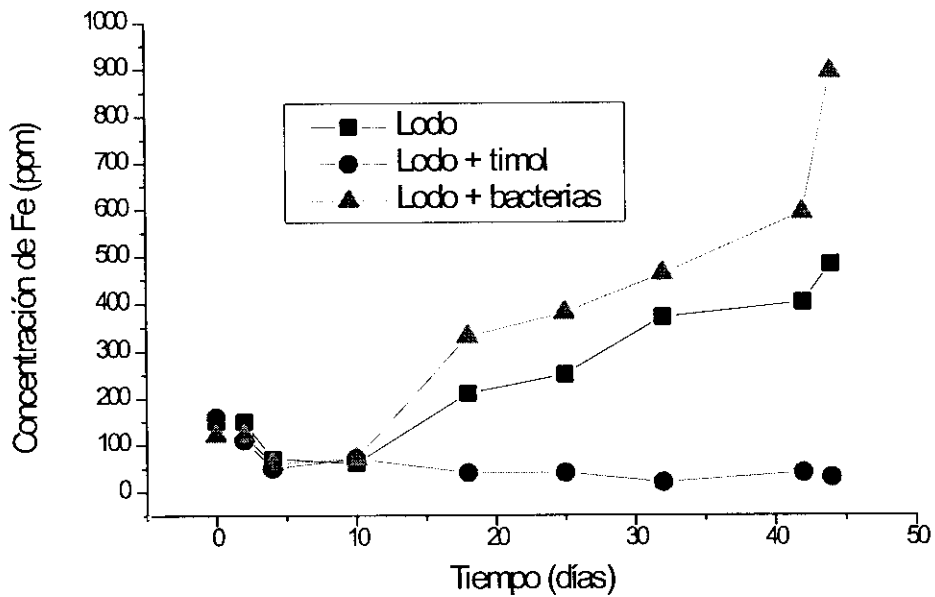


Figura 57: Influencia de la oxidación microbiológica en la generación de aguas ácidas.- Evolución de la concentración de Fe

La evolución del pH del mineral condujo a una acidificación importante que llegó a valores difícilmente explicables desde un punto de vista exclusivamente químico (Figuras 58 y 59). Esta evolución de pH fue paralela a la proliferación celular que se siguió a través del recuento de bacterias en cada ensayo. El número de células presentes se incrementó notablemente a medida que las condiciones químicas se fueron haciendo más ácidas y por tanto más favorables para el crecimiento bacteriano, efecto que ya había sido observado también por otros autores en semejantes experimentos de meteorización (Ritcey y col, 1982; Silver, 1985).

El descenso tan acusado de pH no se observó cuando existió un bactericida en el medio (MT), aunque a medida que el timol se fue evaporando (no se repuso a lo largo del experimento), se comenzó a observar la acidificación (Figura 58). El control de bacterias a través del microscopio óptico también se realizó en el ensayo con timol, advirtiéndose que mientras en el cultivo M se pudieron contar del orden de  $10^6$  cél/ml, cifra que se fue incrementando a medida que transcurrió el experimento, no se observó crecimiento celular apreciable en medio con timol.

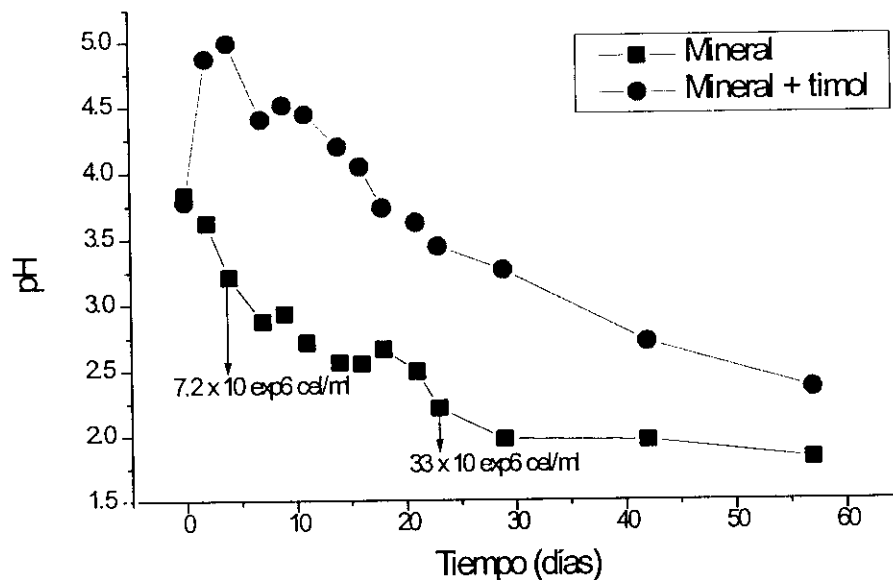


Figura 58: Variación de pH en los ensayos en matraz agitado

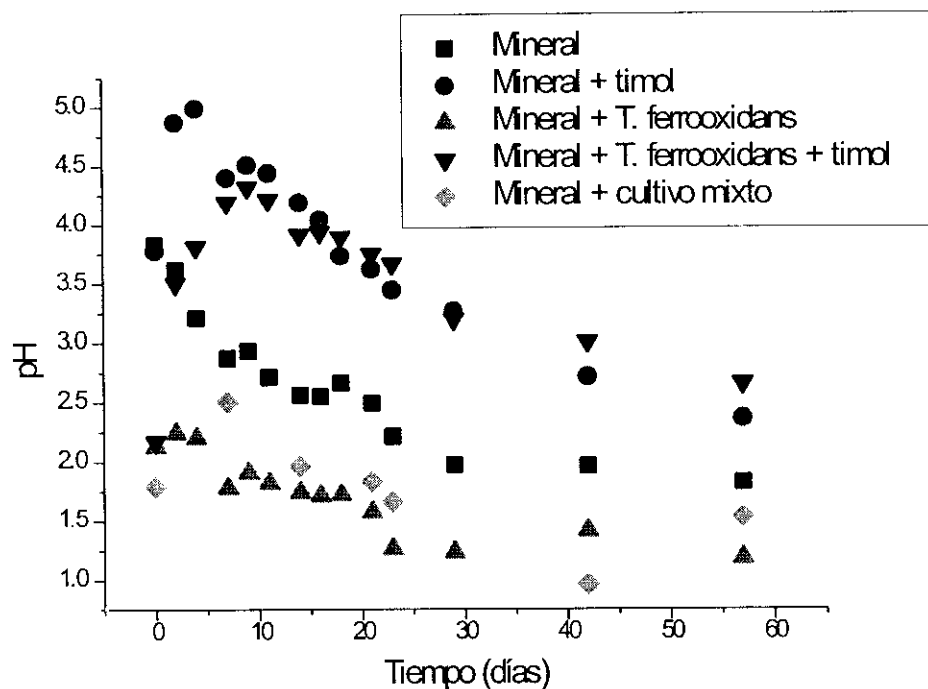


Figura 59: Variación del pH en ensayos en matraz agitado

El efecto catalítico de las bacterias en la oxidación del mineral se pudo observar también, y de un modo más patente, en los experimentos realizados con inóculo, bien de un cultivo mixto, bien de un cultivo de bacterias hierro-oxidantes. La disminución del pH fue mucho más acusada en los experimentos realizados con bacterias (Figura 60) que en el “estéril”. La diferencia fundamental entre la actividad observada para el cultivo mixto (MCM) y para el cultivo de *Thiobacillus ferrooxidans* fue que los valores de pH que se alcanzaron en el caso de utilizar el primer cultivo fueron bastante inferiores a los que se midieron cuando el *Thiobacillus ferrooxidans* fue la única especie presente. En un cultivo mixto se desarrollan especies capaces de oxidar hierro y especies con capacidad para oxidar azufre, entre las que probablemente se encuentre el *Thiobacillus thiooxidans*. Como quedó indicado en el apartado 3.1.4.b, esta especie es capaz de hacer disminuir el pH del medio hasta valores del orden de 0,6 (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1989). En el cultivo MCM se llegaron a medir valores de pH de 0,96.

La variación de la concentración de hierro total observada en estos experimentos reflejó la actividad bacteriana tan importante que se desencadenó en los experimentos inoculados (MB y MCM, Figura 61) y en aquellos en los que ésta sucedió de un modo espontáneo (M, Figura 61). La variación de la concentración de Fe total en el ensayo con mineral (M) reflejó la tendencia de la curva del crecimiento bacteriano. Esta tendencia se hizo todavía

mucho más patente para el caso del ensayo inoculado con *Thiobacillus ferrooxidans* (MB, Figura 61). En los ensayos realizados en presencia de timol (MT y MBT) no se observó disolución del mineral.

La variación en la concentración de ion sulfato mostró la misma tendencia que la del hierro (Figuras 62 y 63), si bien fue en el cultivo inoculado con *T. ferrooxidans* en el que se observó mayor concentración de ión sulfato en solución. En los ensayos a los que se les adicionó timol (MT y MBT) se comprobó de nuevo la ausencia de disolución de mineral, y en el ensayo en el que exclusivamente se dejó evolucionar al mineral (M) la concentración de sulfatos en solución también aumentó comparativamente bastante con el ensayo en el que no existió oxidación biológica (Figura 62), pero siempre en niveles muy inferiores a los medidos en el experimento inoculado con *T. ferrooxidans*.

La evolución de la concentración de sulfatos también reflejó la cinética de crecimiento bacteriano: la tendencia de la curva en el experimento realizado a partir de pulpa (M en la Figura 63) mostró con claridad las tres fases características del modelo de Monod de crecimiento bacteriano: fase de latencia, crecimiento exponencial y reposo.

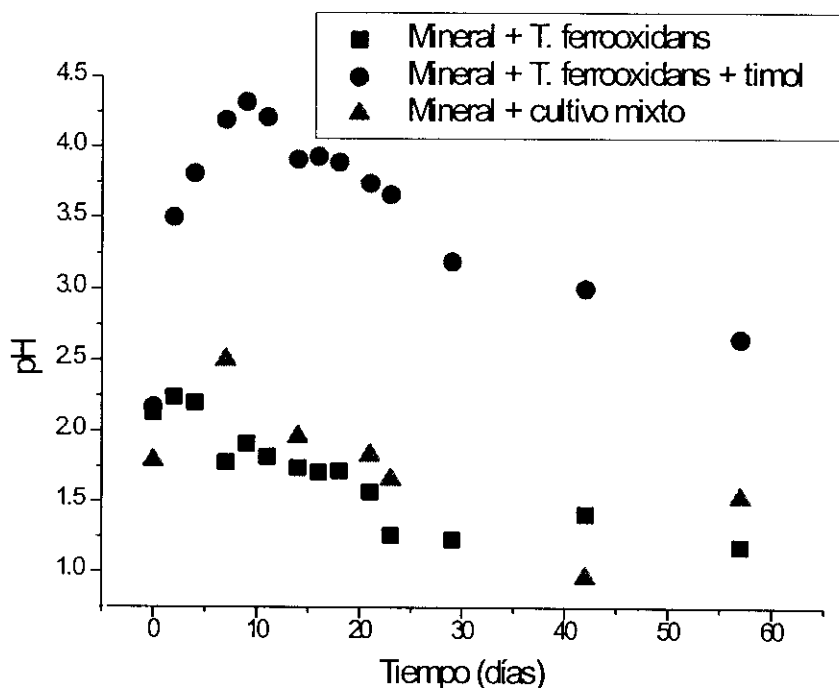


Figura 60: Evolución del pH en ensayos inoculados

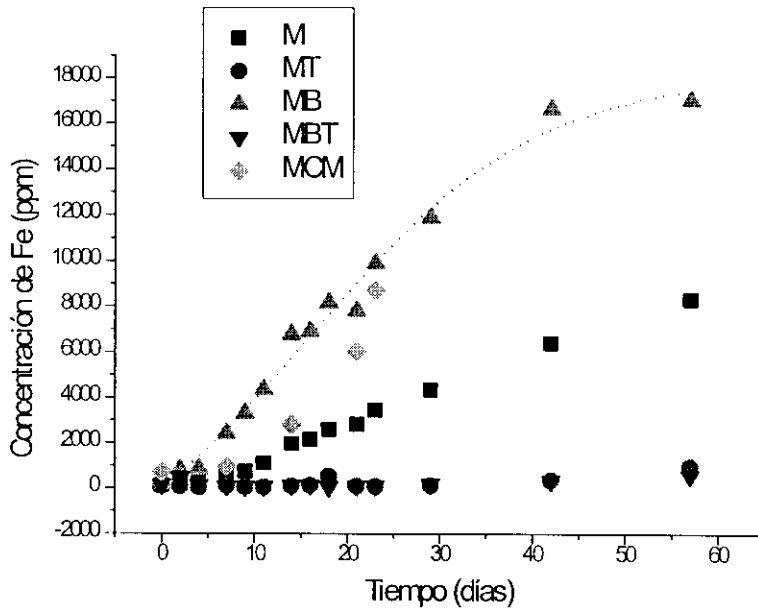


Figura 61: Evolución de la concentración de hierro en ensayos en matraz agitado. Leyenda: mineral (M); mineral + timol (MT); mineral + T. ferrooxidans (MB); mineral + T. ferrooxidans + timol (MBT); mineral + cultivo mixto (MCM)

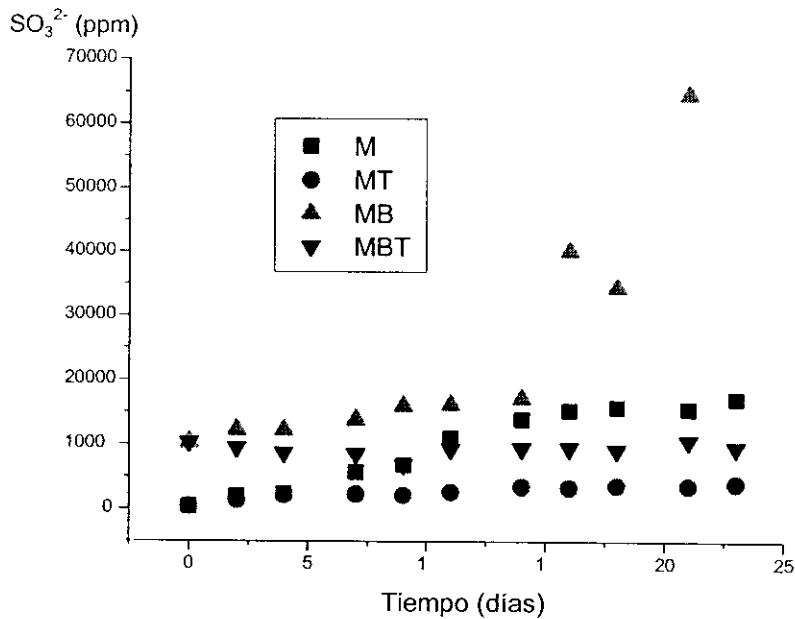


Figura 62: Evolución de la concentración de ion sulfato en ensayos en matraz agitado. Leyenda: mineral (M); mineral + timol (MT); mineral + T. ferrooxidans (MB); mineral + T. ferrooxidans + timol (MBT)

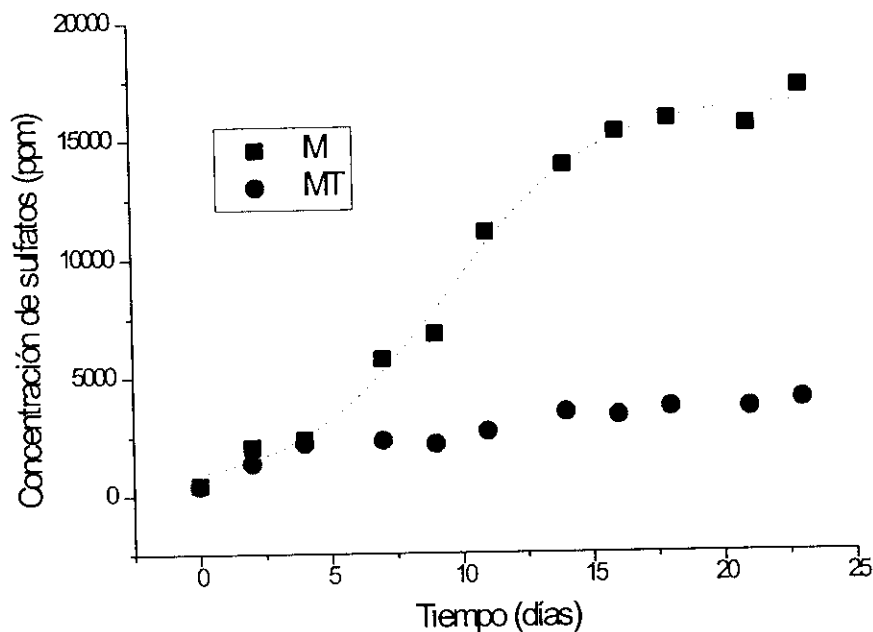


Figura 63: Evolución de la concentración de ion sulfato en ensayos en matraz agitado. Leyenda: mineral (M); mineral + timol (MT)

Los resultados aportados por los ensayos de meteorización realizados con mineral, bien en forma de pulpa, bien a partir de residuo seco, vinieron a confirmar que la evolución “natural” del residuo A (Figura 18) condujo a una acidificación del mismo, y que en dicho proceso de acidificación las bacterias litoautótrofas presentes en las aguas de drenaje jugaron un papel muy importante ya que fueron efectivamente uno de los factores transformadores de la pulpa. Estas bacterias se encuentran asociadas al mineral y también en la pulpa, pues se ha visto en los experimentos descritos que tanto cuando se utilizaron muestras de lodo, como cuando se partió de mineral seco, la actividad biológica desencadenada fue siempre muy importante y comparable. Ahora bien, la cinética con la que estas bacterias sean capaces de atacar el mineral en el ambiente natural de la presa dependerá de factores como la población de bacterias presentes y de otros aún más importantes como el estado de actividad de estas bacterias que a su vez dependerá de que existan las condiciones óptimas para su crecimiento (pH, nutrientes, temperatura, etc).

Otra de las conclusiones que puede extraerse de estos experimentos es que las bacterias fueron capaces de generar su propio microambiente (pH) óptimo de crecimiento. Así, se ha visto cómo en los ensayos realizados a partir de pulpa exclusivamente (L), en los que se dejó que ésta siguiera su evolución natural, la cinética de transformación fue más lenta que

en aquellos en los que se inocularon bacterias ya adaptadas al mineral y en condiciones óptimas de crecimiento, pero en último término llegaron a acomodarse y a crecer con una velocidad comparable. Las bacterias tuvieron que sucederse unas a otras, competir y adaptarse hasta conseguir desarrollarse adecuadamente, pero una vez alcanzadas las condiciones óptimas de crecimiento su desarrollo fue semejante.

Aunque, como ha quedado demostrado en estos experimentos, la influencia de la oxidación microbiológica del residuo en la presa es un factor muy importante, sin embargo, el estado final del sistema dependerá de la resultante de todos los demás factores, físicos, químicos y microbiológicos, actuando en su conjunto. Así pues, los valores de pH, Eh, concentración de metales y sulfatos en solución medidos en la presa de estériles vendrán condicionados por la interacción de todos estos factores. De hecho, se ha visto que, en condiciones de laboratorio, las bacterias oxidaron el mineral hasta generar aguas que alcanzaron valores de pH inferiores a 2 y, sin embargo, los valores de pH medidos en la presa de estériles (en torno a 3,5, ver apdo. 3.1.1.) no se correspondieron con esta circunstancia. Lo que realmente sucede en la presa es que además de la actividad microbiológica que se desencadena, existen factores de tipo químico, como es la presencia del ion sulfito que, como enseguida veremos, condicionan (todos en su conjunto) las características del sistema.

#### *-Influencia del ion sulfito en la meteorización del residuo en la presa*

La influencia de la presencia del ion sulfito en la presa se trató de reproducir también a través de ensayos en matraz agitado. Para ello, se preparó un nuevo experimento en el que se intentaba comparar la evolución de la pulpa bajo la influencia del ion sulfito con la evolución de la pulpa bajo la influencia bacteriana. Se dispusieron dos matraces con 150 g de pulpa lixiviada. Es decir, se partió de una pulpa “parcialmente meteorizada”, durante un periodo de 18 días, con un valor de pH de 3. El motivo de utilizar este tipo de mineral era evitar la fase previa de adaptación de los microorganismos a las condiciones extremadamente básicas que tiene la pulpa de partida (en el momento de su vertido desde la planta de flotación).

A uno de los matraces se le añadieron 10 ml de inóculo del cultivo 8<sub>2a</sub> (ver apdo. 3.1.4.b.) de *Thiobacillus ferrooxidans* y al otro 0,1 g/l de SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (en forma de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>). Mediante el ensayo inoculado con bacterias se trataba de reproducir las condiciones de “presa abandono”, y mediante el ensayo en presencia de ion sulfito, se trataba de reproducir las condiciones de “planta activa” (apdo. 3.2.1.d.). La evolución del pH y de la concentración

del hierro liberado a la solución como consecuencia del proceso de meteorización, se ilustran en las Figuras 65 y 66.

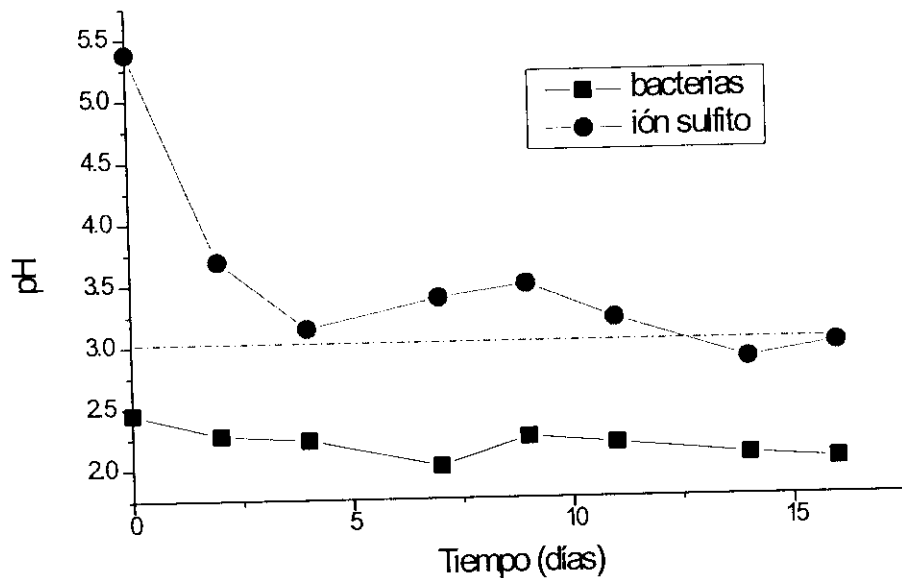


Figura 65: Influencia de las bacterias y del ion sulfito en la meteorización del residuo.- Evolución del pH

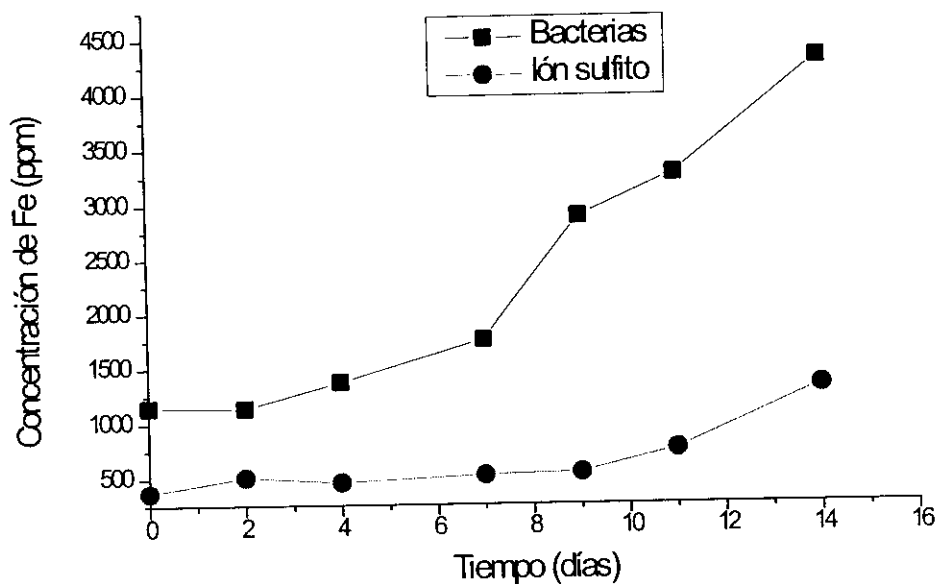


Figura 66: Influencia de las bacterias y del ion sulfito en la meteorización del residuo.- Evolución de la concentración de Fe

Los resultados aportados por estos ensayos mostraron que el ion sulfito condicionó el grado de meteorización del residuo de tal manera que, en su presencia, el pH descendió menos (Figura 65) y la oxidación del mineral (con la consiguiente disolución metálica) fue también inferior (Figura 66). Estos resultados confirmaron las conclusiones apuntadas en el apartado 3.2., donde ya se indicaba que la presencia del ion sulfito condicionaba el estado químico del sistema de tal manera que el valor de pH final que se alcanzó en la presa se correspondió con el de la oxidación final del ion sulfito (en torno a 3; Figura 65), y no con el correspondiente a la oxidación bacteriana que desciende hasta 2. Por otro lado, debido al carácter moderadamente reductor del ion sulfito, también se impidió la oxidación del mineral y, por tanto, la disolución de los metales (hierro) (Figura 66).

Lo que sucede en la presa, por tanto, es una solución de compromiso entre las condiciones reductoras impuestas por la presencia del ion sulfito (que predominarán sobre el poder microbiológico mientras éste esté presente -“planta activa”-) y la actividad microbiológica. En condiciones de “presa abandono”, se desencadenará la acción microbiológica que, como se acaba de demostrar, es la responsable de los bajos niveles de pH y del enorme incremento en la concentración de metales y sulfatos en solución.

En el apartado 3.2.1. se estudió la influencia del factor “sulfito” en la transformación del residuo A en B (Figura 18). En este apartado se acaba de confirmar la capacidad de las bacterias aisladas en la presa para transformar el residuo. Luego queda, por tanto, demostrado que las bacterias son capaces de oxidar el mineral, y que son las responsables en último término de las condiciones químicas de la presa en situación de “presa abandono”.

### **3.2.2.c.- Ensayos de meteorización en columna**

La evolución de la pulpa también se siguió a través de ensayos cinéticos de meteorización en columna. La justificación de estos ensayos reside en estudiar la contribución de la oxidación de la pirita a la generación de acidez del agua en la presa, ya que mediante este tipo de experimentación se consigue acelerar la meteorización de la muestra respecto de las condiciones ambientales. Como ha quedado descrito en el apartado 3.3.5., se realizaron distintos experimentos en los que se emplearon columnas específicas para el estudio de variables concretas. En este capítulo, se discutirán los resultados aportados por cada uno de estos ensayos.

### -Evolución del drenaje

Para el estudio de la evolución del drenaje se utilizaron columnas pequeñas de acuerdo al diseño descrito en el apartado 3.3.5. De forma general, se diseñaron distintas columnas para el estudio de variables concretas, pero siempre con la misma filosofía: estudiar la evolución del drenaje de un residuo bajo la acción de distintos factores.

- *Columnas de humedad-sequedad (H-S) y mineral sumergido (S): estudio del comportamiento del residuo sumergido bajo agua*

En el sistema objeto de estudio existe una zona (ver Figura 4, C) en la que el residuo de flotación se encuentra sumergido bajo agua. El comportamiento del mineral en estas condiciones se estudió a través de una columna (S). El nivel de agua en la columna se repuso con agua destilada durante el tiempo que duró el experimento. Como comparación con este modelo, de modo paralelo, se siguió el comportamiento del residuo en una columna de iguales dimensiones (30 cm de altura y 6 cm de diámetro) en la que el mineral estuvo sometido a ciclos de humedad y sequedad (H-S) (ver apdo. 3.3.5.). El mineral que se dispuso en las columnas fue la pulpa P1 pero en esta ocasión se secó al aire previamente, por lo que fue necesario desmenuzarlo y homogeneizarlo antes de situarlo en la columna. Una vez en ésta, se humedeció con 250 ml de agua destilada que se mantuvieron en contacto 24 horas y que se drenaron posteriormente (Hood y col., 1984). Estas columnas se mantuvieron termostalizadas a 30 °C para conseguir acelerar el proceso de meteorización. Los resultados de la evolución del pH en las columnas S y H-S se muestra en la Figura 67.

La meteorización del residuo de pirita mantenido bajo agua no generó drenaje ácido. El agua sirvió como barrera al oxígeno porque, tanto la difusión como la solubilidad del oxígeno fueron más bajas. De hecho, la disposición de residuos bajo agua es un método que se propone para la prevención de la contaminación de los residuos mineros (Doepker y Drake, 1991; Ritcey, 1991; East y col., 1994 y Lapakko, 1994). Como contraste, el residuo sometido a ciclos de humedad-sequedad (H-S) generó aguas ácidas, alcanzándose valores comparables a los obtenidos en los experimentos en matraz agitado (ver apdo. 3.2.2.b.). Teniendo esto en cuenta, y a la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que ~~la fracción de pirita sumergida no es un factor que contribuya a la generación de aguas ácidas en el sistema.~~ La concentración de metales y sulfatos medidos en los drenajes sucesivos de ambas columnas se muestra en las Figuras 68 a 71.

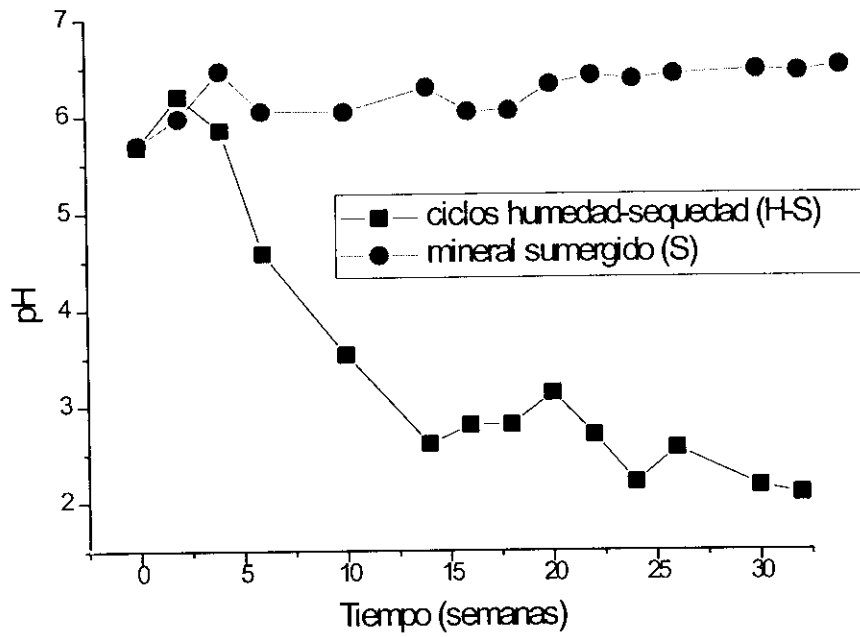


Figura 67: Evolución del pH en los drenajes de H-S y S

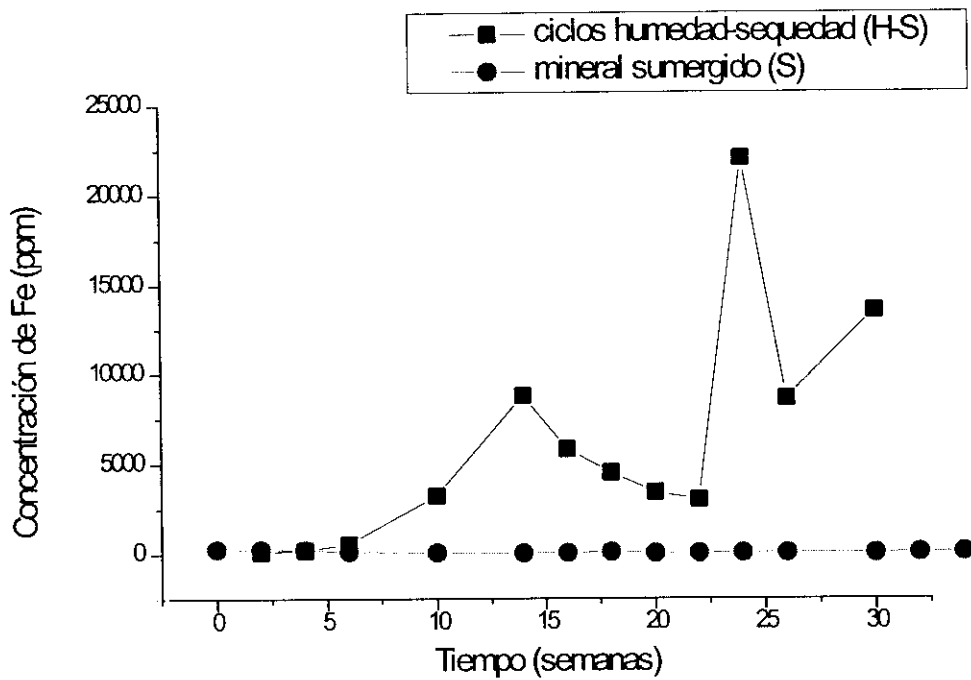


Figura 68: Evolución de la concentración de Fe en los drenajes de H-S y S

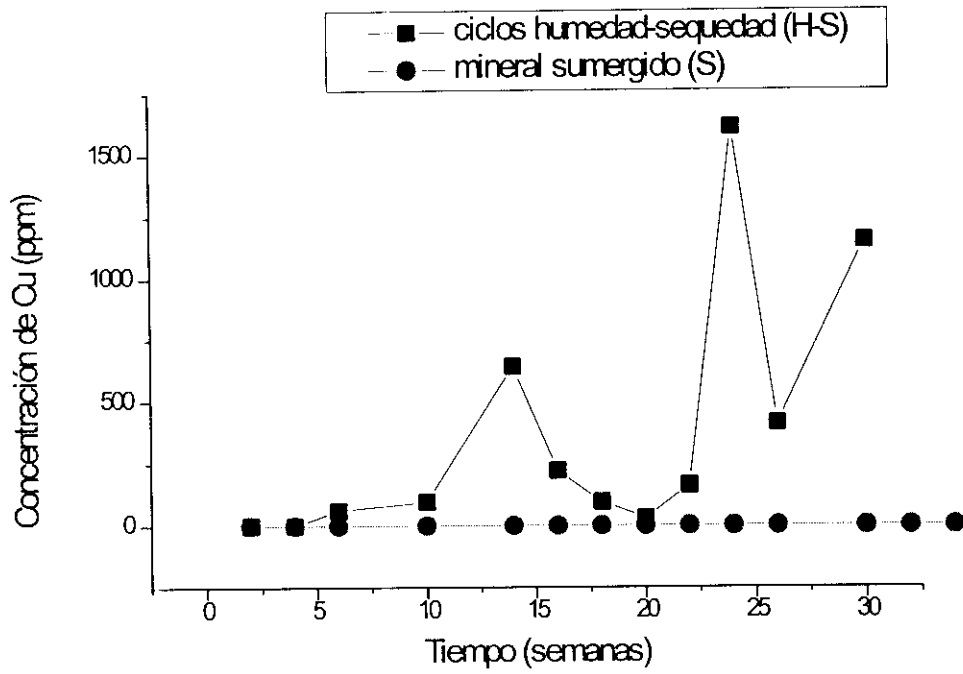


Figura 69: Evolución de la concentración de Cu en los drenajes de H-S y S

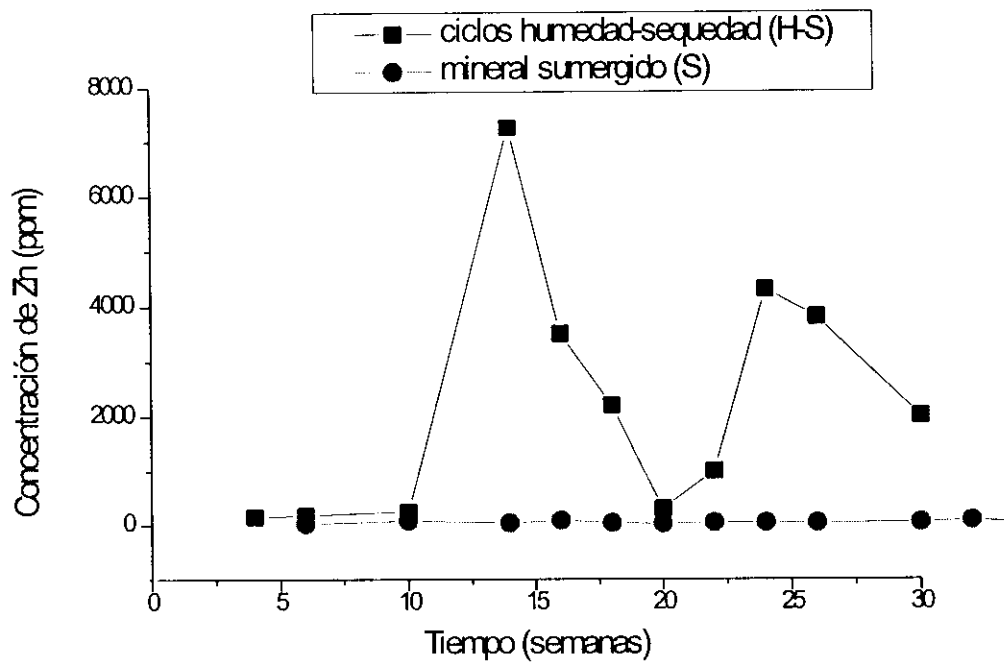


Figura 70: Evolución de la concentración de Zn en los drenajes de H-S y S

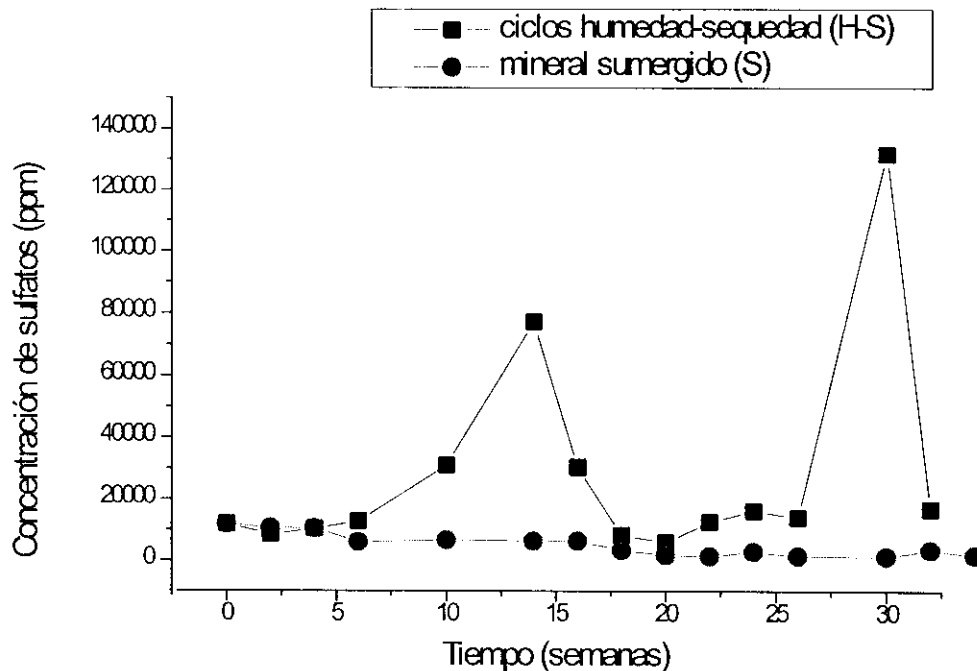


Figura 71: Evolución de la concentración de sulfatos en los drenajes de H-S y S

La concentración de metales y sulfatos medidos en los efluentes de S estuvieron siempre en cotas muy inferiores a los obtenidos en H-S. En éstos, además, se observaron dos picos importantes que supusieron un incremento en la concentración de metales y sulfatos en solución y que coincidieron con descensos en los valores de pH. Estos picos se midieron en periodos prolongados de sequedad (dos semanas sin riego), comprobándose que, como ya habían observado otros autores (Doepker, 1991), tras un periodo largo de sequedad se incrementa notablemente la meteorización del residuo, lo que se traduce en un descenso del pH y en un aumento correlativo de la concentración de sulfatos y metales en las aguas de drenaje.

Los niveles de hierro y cinc en solución se mantuvieron en S en un intervalo comprendido entre las 20-80 y 25-80 ppm, respectivamente (Figuras 68 y 70). La concentración de hierro medida inicialmente en S fue algo superior a la que se observó en los drenajes posteriores (Figura 72). Esto pudo deberse a la disolución y al arrastre de hierro que acompañaba al mineral (formando algún óxido o hidróxido precipitados), ya que, como se ha dicho anteriormente, el mineral que se utilizó en estas columnas fue pulpa seca y, aunque se hizo un lavado previo con 250 ml para humedecerlo, puede ser que este lavado no fuera suficiente para arrastrar totalmente los productos de oxidación.

No se llegó a disolver Cu en el caso de la columna S. Por su parte, los sulfatos, igual que en el caso del hierro, mostraron inicialmente una concentración superior (6.000 ppm) a la alcanzada en los posteriores drenajes, lo que cabe explicarse también mediante el efecto de arrastre. Los valores de concentración de sulfatos se estabilizaron dando un flujo continuo del orden de las 1.400 ppm.

Los niveles de sulfatos y metales medidos en los drenajes de la columna S fueron siempre inferiores a los detectados en la presa de estériles, con lo que, de nuevo, viene a demostrarse que en ésta existe algún factor adicional que hace aumentar la meteorización del residuo, y que este factor adicional procede de la transformación del mineral expuesto, puesto que la contribución de la pirita sumergida es muy pequeña, a pesar de que la proporción de mineral en estas condiciones es muy superior a la de mineral expuesto.

Por su parte, los niveles de hierro, cobre y cinc medidos en el caso de la columna H-S estuvieron comprendidos entre las 3.000 y 5.000 ppm para el caso del Fe, las 200 y 400 ppm para el Cu, y entre 1.000 y 7.000 ppm para el caso del Zn. Los niveles de sulfatos oscilaron entre las 10.000 y las 16.000 ppm, todos ellos muy por encima de los medidos en la columna S.

La concentración de metales y sulfatos en la presa de estériles tuvo siempre valores inferiores a los de la columna H-S. Este resultado es consistente con los obtenidos anteriormente (ver apdos. 3.2.1.d. y 3.2.2.b.) pues indica que en la presa debe existir algún otro factor que “encubre” de alguna manera la oxidación química y microbiológica del residuo. Este factor es, como se ha visto anteriormente, la presencia del ion sulfito.

Los valores de Eh medidos en los drenajes de S se mantuvieron siempre por debajo de cero, en torno a - 15 mV; los valores de Eh medidos en los drenajes de H-S siempre estuvieron cercanos a 300 mV. El porcentaje de  $Fe^{2+}$  frente a  $Fe^{3+}$  fue para el caso de S de más o menos el 60 % y en la columna H-S en torno al 0,5 %. Este resultado confirma que cuando el mineral se encuentra sumergido, se mantiene en condiciones reductoras, mientras que un mineral “expuesto” está sometido a condiciones oxidantes.

Como se ha dicho anteriormente, mediante la columna S se trató de reproducir la parte del sistema correspondiente al mineral sumergido, mientras que la columna H-S representaría las “lenguas” superficiales de pirita sometidas a periodos secos y húmedos (Figura 4). Pues bien, en relación con esto cabe señalar que los valores de Eh medidos en el fondo de la presa fueron siempre negativos, y los valores de pH estuvieron en torno a 7; por su parte, el

potencial medido en el agua superficial fue siempre positivo y el valor de pH en torno a 3. Es decir, que mediante este modelo se ha conseguido representar también el gradiente químico (Figura 24) que se encuentra en el sistema, correspondiéndose los valores de Eh y pH obtenidos.

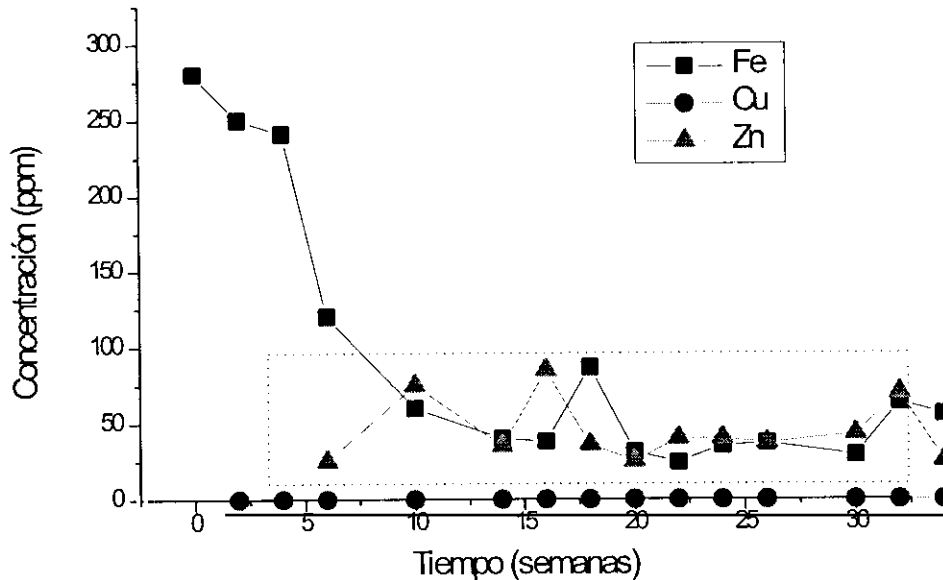


Figura 72: Concentración de metales medida durante la meteorización de la columna S. Se destaca el orden de concentración medido para los tres elementos: Fe, Cu y Zn

- *Columnas L y Li: influencia de la oxidación bacteriana*

Como se ha visto en capítulos anteriores, las bacterias del género *Thiobacillus* son capaces de oxidar el mineral provocando con ello un emperoramiento considerable en la calidad del agua que fluye de estos residuos, sobre los que ha existido por tanto una clara acción microbiológica. La presencia de estas bacterias en nuestro sistema ha sido demostrada anteriormente (apdo. 3.1.4.) e incluso se comprobó su capacidad para acelerar la oxidación del residuo de pirita (apdo. 3.2.2.b.).

Aún así, se quiso modelizar el comportamiento del residuo en aquellas zonas del sistema sometidas a riegos eventuales (ver Figura 4) y estudiar la influencia de la catálisis bacteriana.

Tomando 300 g de mineral secado al aire y finamente desmenuzado, se montaron dos columnas de cristal de 30 cm de altura y 6 cm de diámetro para estudiar el efecto de la influencia de la catálisis bacteriana en la oxidación del residuo. En una de ellas, se estudiaron los fenómenos de lixiviación (L) y en la otra la participación bacteriana en la meteorización (biolixiviación), para lo que se inoculó con un cultivo mixto crecido a partir del mismo mineral. A esta segunda columna se le denominó Li (ver apdo. 2.3.5.). Después de lavar el mineral seco con 250 ml de agua destilada y de mantenerlo en estufa a 30°C, durante 24 horas, se utilizaron 20 ml del cultivo mixto para inocular la columna Li. Transcurridas unas horas, para permitir que este riego penetrara toda la columna, se comenzaron a establecer los habituales ciclos de humedad-sequedad.

La evolución del valor de pH en los drenajes de ambas columnas se muestra en la Figura 73. En ella queda reflejado cómo el valor de pH medido en ambas columnas comenzó siendo inicialmente algo inferior en Li, pero la tendencia a la generación de acidez terminó por igualarse en ambos casos. Este efecto, que ya fue observado en los experimentos en matraz agitado (ver apdo. 3.2.2.b.), se explica teniendo en cuenta que en L existe una microflora asociada al mineral que se desarrolla cuando las condiciones son favorables y que cataliza la reacción de oxidación de la pirita del mismo modo que el cultivo inoculado en Li.

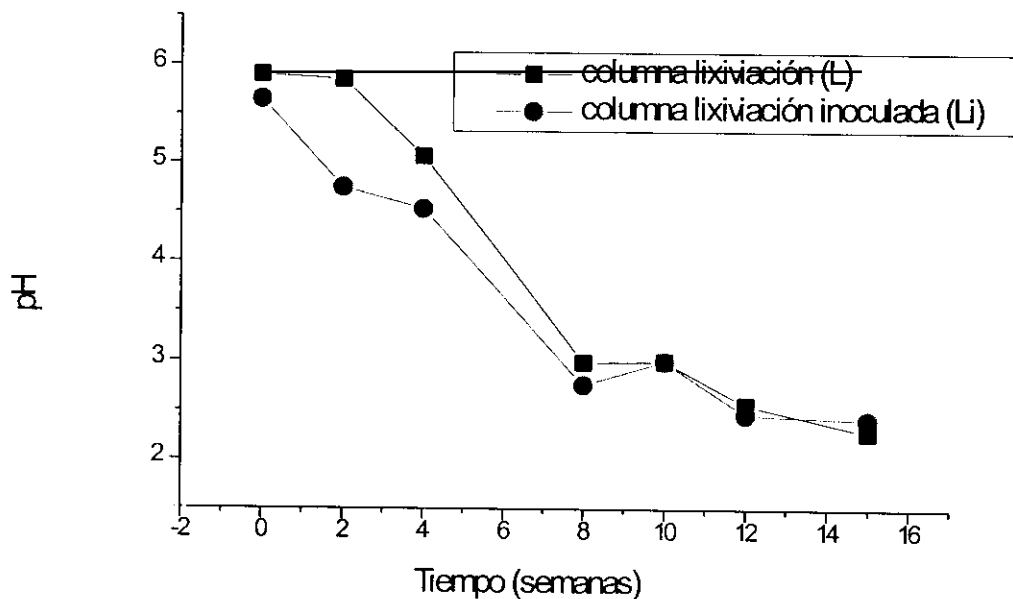


Figura 73: Evolución del pH en los drenajes de las columnas L y Li

La concentración de sulfatos que se midió en los drenados de ambas columnas fue ligeramente superior en Li, observándose en ambas una tendencia creciente hasta concentraciones del orden de 14.000 mg/l. En la Figura 74 se puede observar también un aumento considerable en la concentración de ión sulfato que se correspondió temporalmente con el descenso brusco en el valor del pH. Ambos hechos reflejaron, como ya se había observado en el caso de las columnas H-S y S, la respuesta del sistema a ciclos prolongados de sequedad: tras un periodo de dos semanas sin riego, la meteorización del residuo se incrementó notablemente.

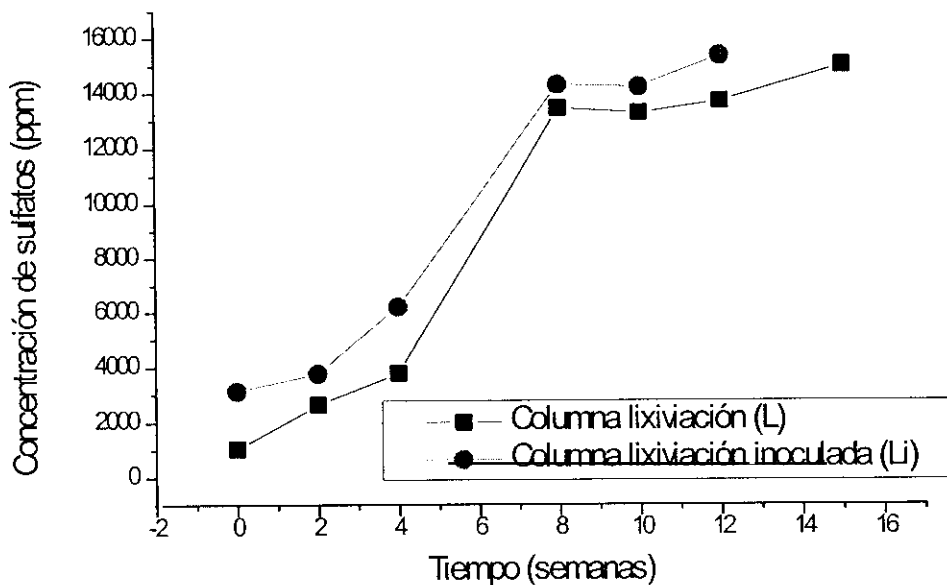


Figura 74: Evolución de la concentración de sulfatos en los drenajes de L y Li

Por su parte, los niveles de hierro, cobre y cinc medidos en los drenajes de ambas columnas reflejaron una meteorización considerable y fueron, igual que la concentración de sulfatos, ligeramente superiores en la columna inoculada Li (Figura 75).

Si se comparan estos valores con los obtenidos en los ensayos en matraz agitado (apdo. 3.2.2.b.) y con los anteriores resultados de la columna de meteorización H-S, se comprueba que las concentraciones de metales estuvieron en el mismo rango. Es decir, niveles de hierro entre las 16.000 y 22.000 ppm, de cobre nunca por encima de las 1.600 ppm, y de Zn entre las 4.000 y 7.000. Los distintos ensayos de meteorización aportan, por tanto,

tanto, resultados coherentes, comparables y reproducibles, puesto que los resultados se repitieron en ambas columnas de meteorización.

No se observaron diferencias importantes entre las columnas L y Li debido a que, como se ha apuntado anteriormente, las bacterias asociadas al mineral en L estuvieron catalizando la oxidación de la piritita, de lo contrario, no se habrían obtenido niveles de concentración de metales tan elevados en los drenajes (como sucedía en los experimentos en matraz agitado realizados en presencia de timol, ver apdo. 3.2.2.b.). De modo que, aunque la disolución comenzó un poco más tarde en L, con el tiempo, ambas columnas tuvieron comportamientos similares. La presencia de bacterias en los drenajes de L se verificó por la observación al microscopio de éstos, si bien no se realizó un seguimiento cuantitativo de las mismas.

En torno a la cuarta semana, y al igual que sucedió con los valores de pH y sulfatos, se observó un incremento importante en la concentración de metales en solución, tanto para el caso de la columna L como de la Li. Este incremento coincidió con un riego tras un periodo largo de sequedad, y la explicación es la misma que la apuntada anteriormente.

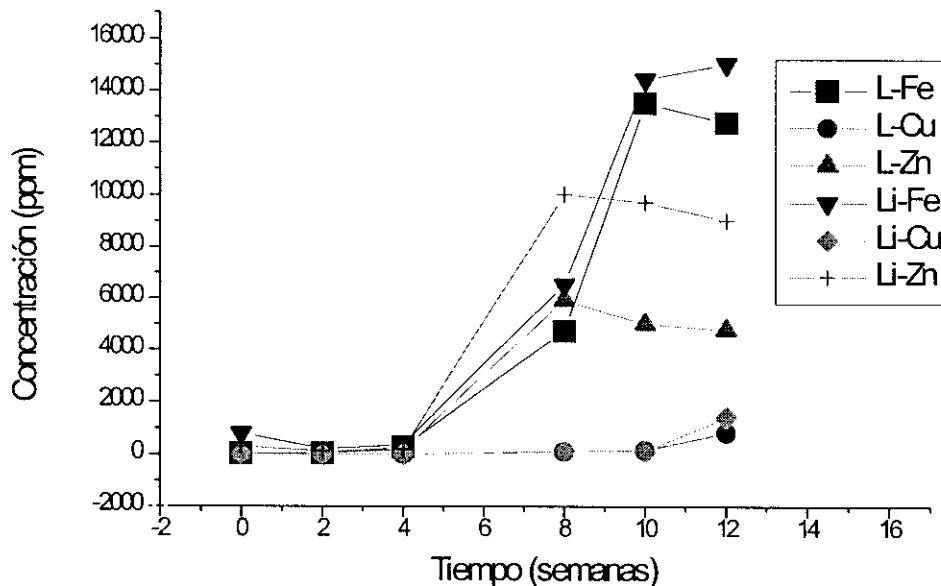


Figura 75: Niveles de Fe, Cu y Zn medidos en los drenajes de L y Li

La conclusión a obtener de estos experimentos es que el propio residuo posee una microflora asociada que es capaz de desencadenar el proceso catalítico de oxidación de la pirita. Cuando las bacterias se encontraron activas, los niveles de pH, metales y sulfatos medidos en los drenajes estuvieron muy por encima de los encontrados en la presa en condiciones de “planta activa”. Si en el sistema no existiera ningún otro factor que inhibiera o encubriera esta actividad (por ejemplo, la presencia del ion sulfito), las bacterias serían capaces de generar un drenaje con las clásicas características de drenaje ácido. Esta fue la situación que se desencadenó en las condiciones de “presa abandono” (ver apdo. 3.2.1.d.).

- *Columnas h-s y R*

En la presa de estériles existían zonas (lenguas superficiales de pirita expuestas a la acción del agua de la presa, figura 4) que tenían, como hemos visto, un pH ácido (3-3,5) y especies oxidadas de metales en disolución.

Con el fin de reproducir las condiciones de meteorización del residuo cuando el agua que eventualmente lo riega es el agua de la presa, se diseñó otro ensayo en columna en régimen de recirculación con el propio agua de la presa (R). Como siempre, los resultados obtenidos se compararon con los de otra columna en régimen de ciclos de humedad-sequedad (h-s) que se montó paralelamente.

La meteorización de ambas columnas dió lugar a un resultado inesperado: por un lado, la columna R no llegó a generar acidez (Figura 76), al menos durante el tiempo que duró el experimento. Durante 15 semanas, el valor de pH nunca fue inferior a 6,5. En principio, cabría esperarse que la recirculación con agua de lixiviación hubiera potenciado la meteorización del residuo por la acción oxidante de especies metálicas que sucesivamente irían apareciendo en disolución. Sin embargo, la tendencia a la oxidación observada en la columna R fue muy débil.

Este aspecto quedó reflejado también en los niveles de metales que se detectaron en los sucesivos drenajes: en las diferentes muestras tomadas no se midieron concentraciones apreciables de metales en solución y sólo los iones sulfato estuvieron presentes. Estos sulfatos, cuya concentración fue comparativamente más elevada que la medida en h-s (pese a que aquí sí se observó meteorización), procedían del agua de riego de la columna. Como se indicó en el apartado 2.3.5.a., para el diseño de este experimento se decidió regar la columna con agua de pulpa (muestra P.E., ver Figura 3), donde la concentración de sulfatos

fue del orden de las 2.600 ppm. En la columna R, los valores medidos para la concentración de sulfatos estuvieron comprendidos en el margen entre las 3.000 y 3.500 ppm (Figura 77). La explicación al hecho de que la columna R no sufriera meteorización puede deberse a que la recirculación de 40 ml diarios hicieron que la columna se saturara en agua, disminuyendo por tanto la “accesibilidad” del oxígeno al mineral. El oxígeno, como se ha indicado anteriormente, es un factor esencial para que se dé la oxidación del residuo. Por otro lado, la meteorización de la columna h-s tuvo una cinética más lenta que la observada en columnas similares en las que se utilizó el mismo régimen de ciclos de humedad-sequedad (H-S/S; L/Li). El mineral de partida que se utilizó en este caso fue la pulpa P2. Como quedó descrito en el apartado 3.2.2.a., y de acuerdo con los resultados obtenidos en el ensayo ABA, esta pulpa presentó una mayor capacidad neutralizante y, por tanto, una ligera mayor inercia a la oxidación. Este aspecto se reflejó claramente en los niveles de hierro medidos en los distintos drenajes de la columna h-s (Figura 78), que siempre fueron inferiores a los obtenidos en columnas similares. Por tanto, este resultado fue consistente con los datos aportados por los ensayos estáticos descritos anteriormente. Tan solo se midieron concentraciones del orden de 50 ppm de hierro y 35 de Zn en los drenajes de h-s. Por su parte, el cobre no llegó a disolverse en esta columna. No obstante, los valores crecientes de hierro y sulfatos revelaron que sí se estaba produciendo cierta meteorización (Figuras 78 y 79).

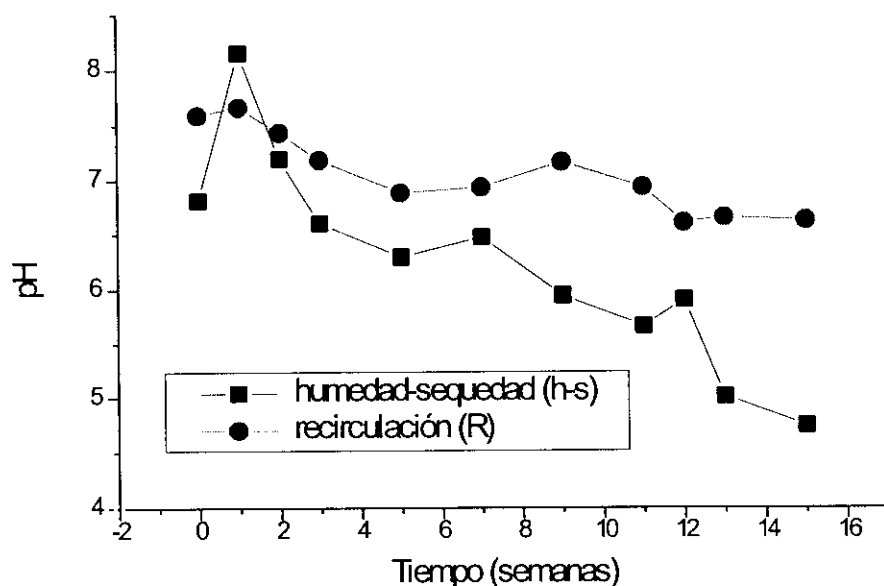


Figura 76: Evolución del pH en los drenajes de las columnas R y h-s

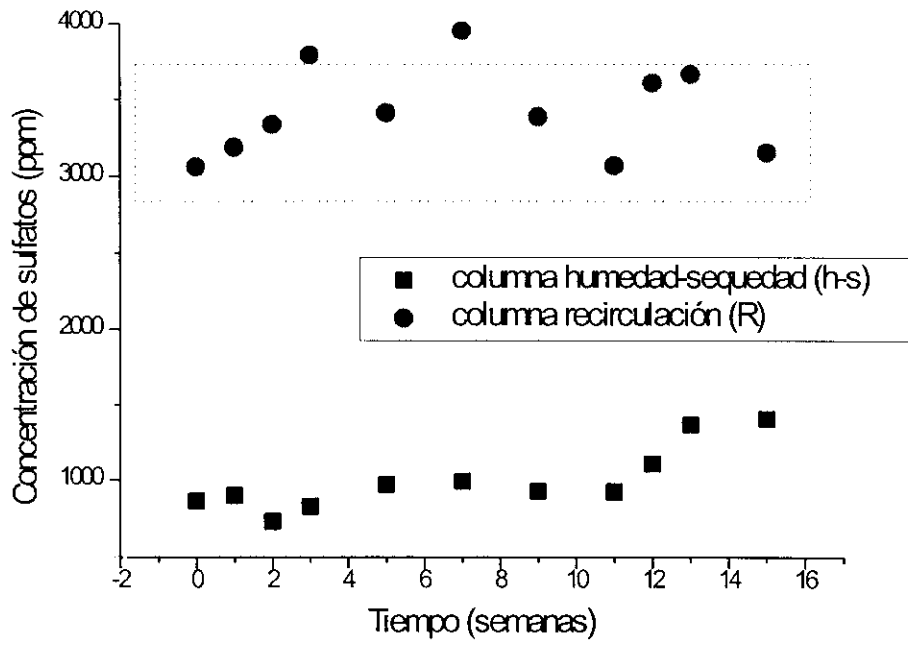


Figura 77: Evolución de la concentración de sulfatos en los drenajes de las columnas h-s y R. Se destaca el valor medio obtenido para la columna R

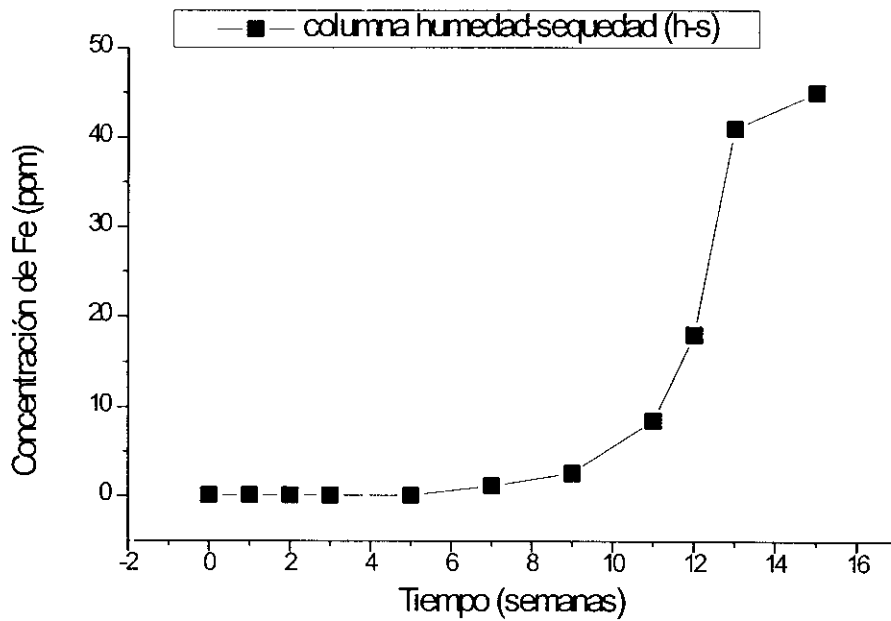


Figura 78: Evolución de la concentración de Fe en los drenajes de la columna h-s

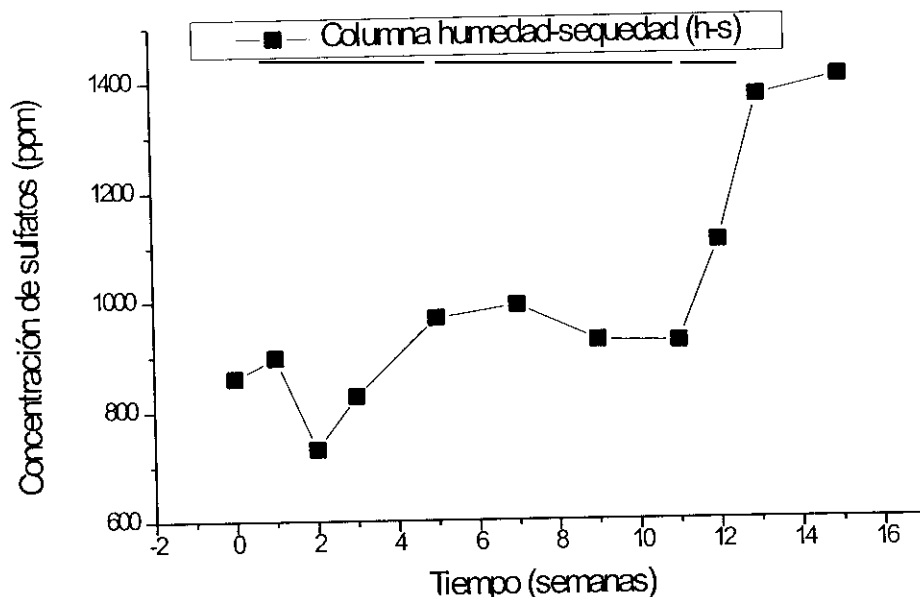


Figura 79: Evolución de la concentración de sulfatos en los drenajes de la columna h-s

- *Influencia de la altura de lecho en la meteorización del residuo: columnas h33 y h66*

Otro de los factores que interesó estudiar fue la influencia de la altura de lecho en la meteorización y para ello se diseñaron dos columnas, h33 y h66, de igual diámetro (6 cm), cuyas alturas de lecho fueron, respectivamente, 33 y 66 cm. La relación 1:2 en volumen de lecho, se mantuvo también en el riego, que siguió siempre esta proporción (ver diseño de columna en apdo. 2.3.5.a.). El régimen elegido fue el de ciclos de humedad-sequedad.

La evolución en el valor de pH en los drenajes de ambas columnas se muestra en la Figura 80.

La conclusión más inmediata que se pudo extraer al estudiar los valores de pH fue que a menor altura de lecho, mayor meteorización del residuo se producía. De modo que, por ejemplo, en el ciclo 8 (correspondiente a 17 semanas de meteorización), cuando en h33 ya se había alcanzado en los líquidos el valor de pH de 2.0, en h66 este valor se encontraba todavía en 4,9.

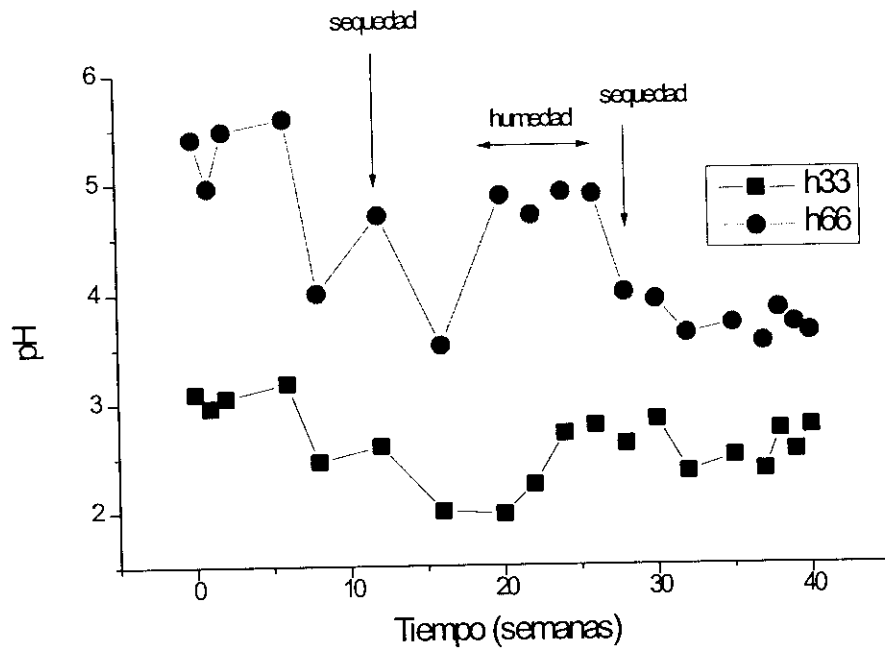


Figura 80: Evolución del pH en los drenajes de las columnas h33 y h66.  
Influencia de ciclos prolongados de humedad y sequedad

El factor diferenciador fundamental que se dió entre las dos columnas fue la facilidad de penetración del oxígeno y el tiempo que el mineral permaneció embebido en agua. Dos factores son necesarios para que los residuos de sulfuros liberen metales en condiciones de meteorización: que haya oxígeno disponible y que el agua que “moja” el mineral se pueda evaporar (Doepker, 1991). Cuanto mayor sea la altura de la columna, mayor será el tiempo en que el mineral permanece húmedo (porque, en principio, mayor es el tiempo que tarda en drenar y por tanto en secarse durante los ciclos de sequedad) y, consecuentemente, la facilidad de penetración del oxígeno será menor. En una columna en condiciones de “saturación” (de agua), la velocidad de oxidación es mucho menor y, en estas condiciones, la oxidación de los residuos se producirá exclusivamente en aquellas zonas de no-saturación, donde exista siempre presencia de agua y oxígeno. El diferente grado de meteorización que tiene lugar en columnas de tamaños distintos ha sido aprovechado por varios autores para estudiar los mecanismos de generación de aguas ácidas. Si se somete un residuo a meteorización en columnas de diferentes tamaños, la evolución que éste tuviera en las menores podría servir como “sensor” para mostrar su evolución en las condiciones más desfavorables; por su parte, las columnas más grandes servirían para explicar procesos de estabilización interna que pudieran hacer disminuir la disolución. La evolución de la concentración de metales y sulfatos en los drenajes sucesivos de las columnas h33 y h66,

así como la influencia de los periodos largos de sequedad se muestra en las Figuras 81 y 82.

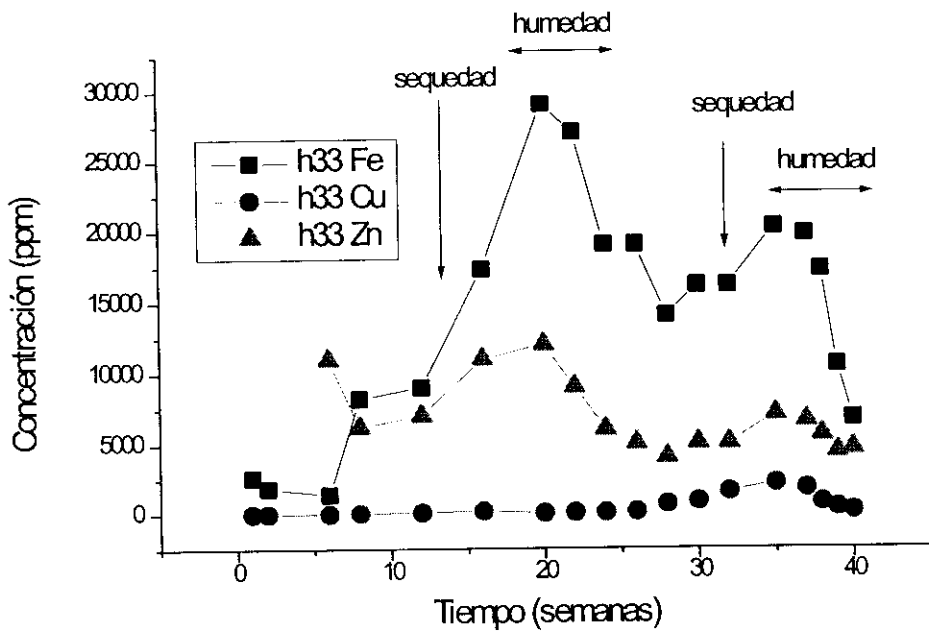


Figura 81: Evolución de la concentración de metales en los drenajes de la columna h33

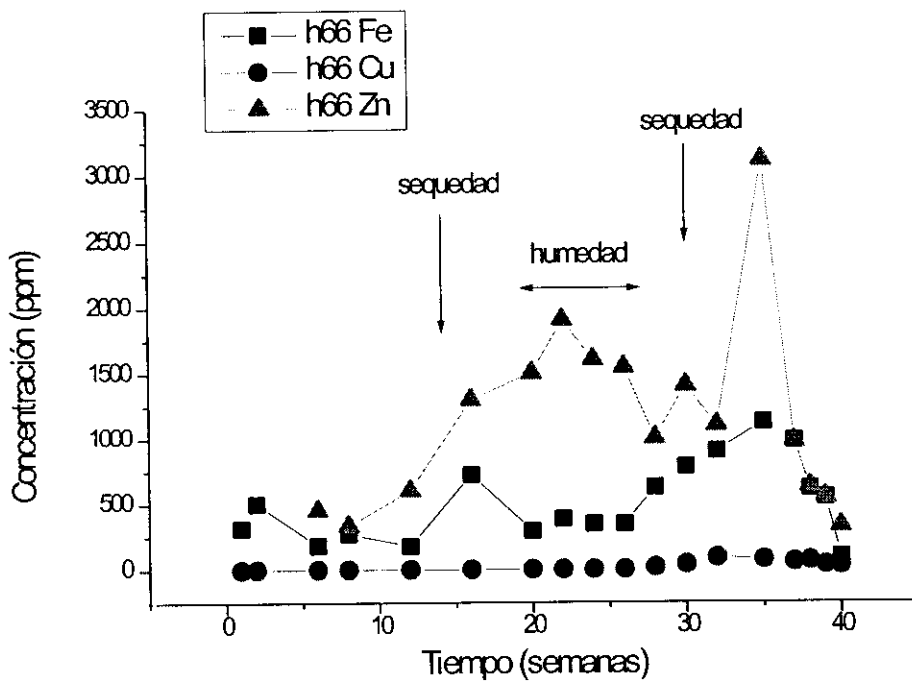


Figura 82: Evolución de la concentración de metales en los drenajes de la columna h66

En dichas figuras puede apreciarse cómo la meteorización del residuo fue muy superior en la columna h33, donde se alcanzaron niveles en la concentración de metales muy por encima de los que se midieron en h66. Mientras que en h33 se detectaron concentraciones de hierro del orden de  $30 \times 10^3$  mg/l, que estuvieron por encima de la concentración de cinc en solución ( $5-10 \times 10^3$ ), en h66 se disolvió fundamentalmente el Zn, y el hierro sólo alcanzó valores de  $1-10 \times 10^2$  mg/l, es decir, siempre por debajo de h33. Tanto en h33 como en h66 prácticamente no llegó a disolverse nada de cobre. Los niveles de metales medidos en los drenajes de ambas columnas se comparan en las Figuras 83 a 85. La disolución de hierro en la columna h66 es insignificante si se compara con la obtenida en la columna h33 (Figura 83) y lo mismo sucede para las concentraciones de Zn y Cu (Figuras 84 y 85).

Igual que en experimentos anteriores (columnas H-S/S y L/Li), también se quiso comprobar la influencia de los ciclos largos de sequedad en las columnas h33 y h66, y se ensayó además otro factor como los periodos largos de humedad, en los que el tiempo de contacto agua/mineral fue mucho más elevado (una semana, frente a 48 horas). Los periodos de humedad se provocaron manteniendo riegos frecuentes, y los periodos de sequedad se consiguieron espaciando los riegos.

La influencia de los ciclos de sequedad y de humedad se observó en ambas columnas, aunque los dos efectos se detectaron más claramente en h33, donde la meteorización del residuo fue mayor. Los ciclos secos provocaron en ambos casos un incremento de la meteorización de la pirita, lo que se reflejó en el aumento de las concentraciones medidas en los efluentes, así como en el descenso brusco de los valores de pH; un periodo de humedad prolongada supuso una ralentización en la oxidación (Figuras 80 a 85). En la Figura 80 se puede apreciar claramente la repercusión en los valores de pH de ambos procesos: un periodo de sequedad largo provocó un descenso de pH, mientras que un periodo húmedo supuso una “meseta” en la que la oxidación del mineral fue más lenta. Por su parte, la concentración de metales en los efluentes se incrementó en los ciclos largos de sequedad, y se mantuvo con pocas variaciones en los ciclos de humedad (Figuras 81 y 82). Ambos efectos revirtieron cuando se volvió al régimen habitual de riegos. En las Figuras 83 a 85 se muestran comparativamente los valores de concentración de metales obtenidos en ambas columnas. En algunos casos (Figura 83), la disolución metálica fue tan superior en h33 que llegó a enmascarar el efecto en h66. En la Figura 85 se aprecia el efecto de un ciclo largo de sequedad en los niveles de cobre medidos en h33. Pese a que la disolución de cobre fue muy pequeña en ambas columnas, un ciclo largo de sequedad promovió un incremento apreciable de la concentración de este metal en los efluentes de h33.

La concentración de sulfatos en los efluentes (Figura 86) fue siempre superior en la columna h33, si bien el nivel se mantuvo bastante uniforme en cada columna y con una concentración elevada desde los primeros drenajes. Este efecto es debido a que la oxidación de la pirita origina un flujo uniforme de sulfatos cuya velocidad está controlada por la disponibilidad de oxígeno, el área de contacto y el tamaño del mineral (Donovan, 1994).

La diferencia entre h33 y h66 estuvo básicamente en la disponibilidad de oxígeno, que fue superior en h33 por ser la columna de menor tamaño; pero para una misma columna, los tres factores anteriores se mantuvieron constantes durante el periodo que duró la meteorización, de ahí que la concentración de sulfatos se mantuviera también aproximadamente constante.

En general, todos los resultados obtenidos fueron consistentes con ensayos de otros autores. Un periodo de sequedad supone que el mineral se agriete, por lo que cuando se riega después de un periodo de este tipo, el agua disuelve los productos de oxidación formados durante el periodo previo, generándose más acidez (Doepker, 1991; Fdez-Rubio, 1986).

Por su parte, los periodos húmedos provocan una “ralentización” en la oxidación, debido, como ya se ha explicado anteriormente, a que una columna mantenida en régimen de riegos frecuentes termina por saturarse de agua, con lo cual el oxígeno no consigue acceder al mineral.

El efecto de los ciclos largos de sequedad sirvió para reproducir las condiciones ambientales que se presentan en épocas de verano, cuando eventualmente pueden producirse tormentas tras un periodo largo de sequedad. En condiciones naturales, este efecto causa tremendos daños en aquellas zonas en las que los residuos abandonados han quedado expuestos a la acción atmosférica.

El fenómeno podría darse en nuestro sistema, en aquellas zonas donde la pirita aflora a la superficie (ver Figura 4), y dado que la época de estío es tremendamente calurosa y seca en la zona, el efecto de un ciclo prolongado de sequedad será intenso y muy perjudicial desde el punto de vista de la generación de drenaje ácido.

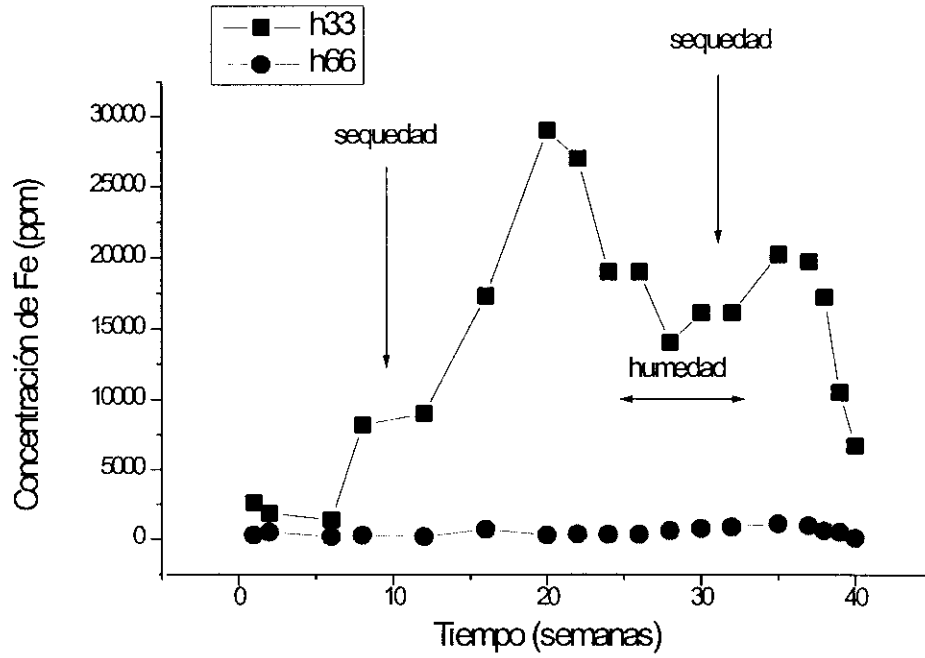


Figura 83: Evolución de la concentración de Fe en los drenajes de las columnas h33y h66

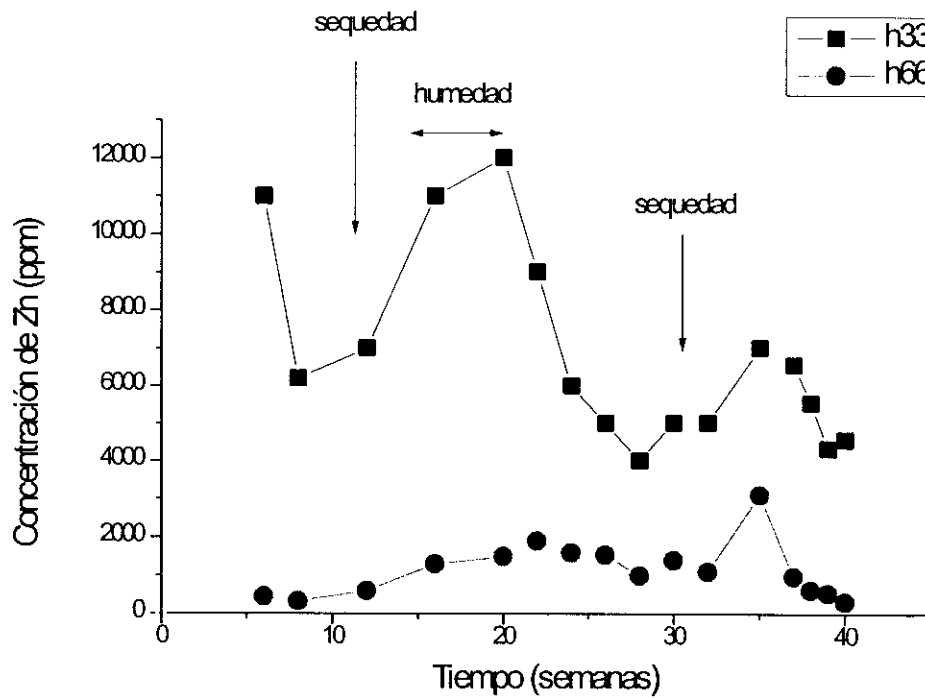


Figura 84: Evolución de la concentración de Zn en los drenajes de las columnas h33 y h66

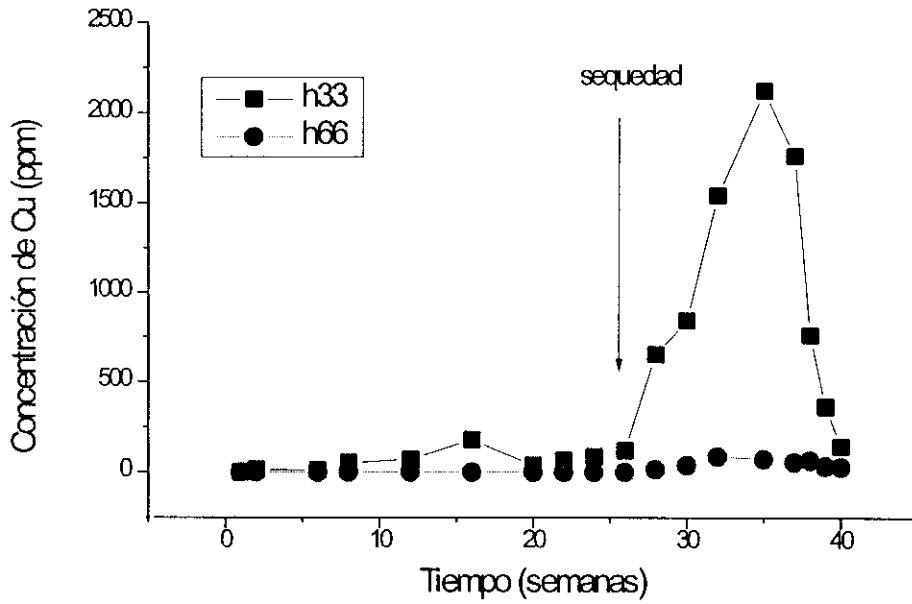


Figura 85: Evolución de la concentración de Cu en los drenajes de las columnas h33 y h66

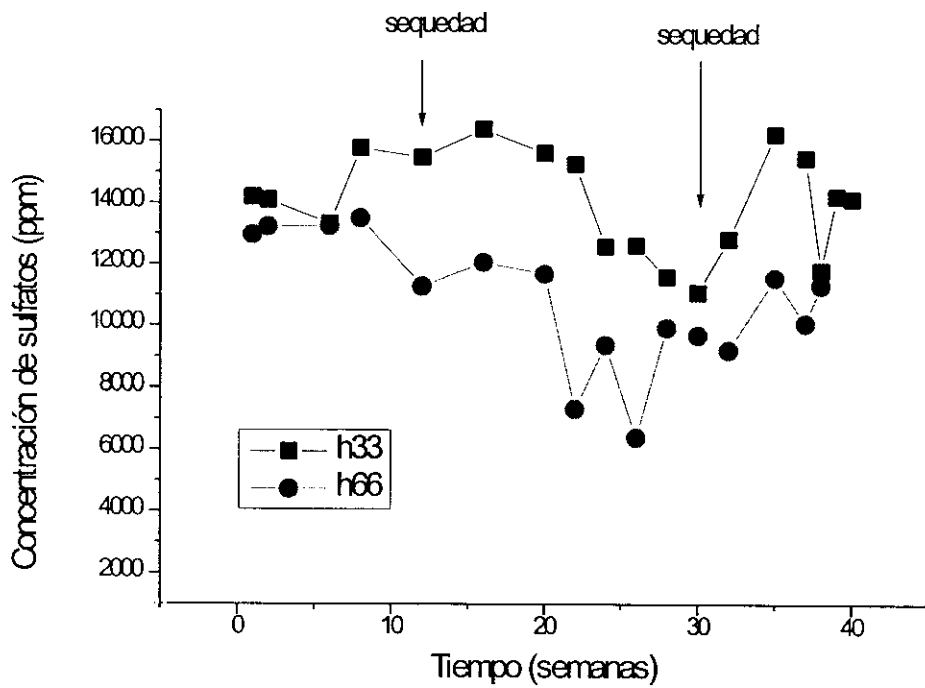


Figura 86: Evolución de la concentración de sulfatos en los drenajes de h33 y h66

- *Columnas grandes de meteorización (M y M2)*

En los puntos 1 a 4 anteriores, se ha discutido la influencia de distintos factores en la meteorización del residuo utilizando siempre modelos en columna de pequeño tamaño. Con el fin de comprobar estos resultados en un modelo a mayor escala, que se aproximara más a las condiciones reales que se dieron en la presa, se montó una columna grande (ver en Materiales y Métodos, diseño de columnas, apdo. 2.3.5.) para estudiar la meteorización de la pirita en estas nuevas condiciones. Se utilizó la pulpa P1 como residuo de partida.

La meteorización tuvo lugar en dos fases. En una fase preliminar se concedió tiempo suficiente para que el mineral se acomodara y para que se estableciera la adecuada distribución de fases sólido-líquido. En esta primera fase, la columna se regó continuamente mediante una bomba peristáltica cuyo caudal se fue modificando de acuerdo con la percolación del líquido. Cuando la columna llegó a estabilizarse, se comprobó que el flujo óptimo de percolación era de 2 ml/h (48 ml/día) para un riego de 45 ml/día repartido en adiciones de 15 ml cada ocho horas. En estas condiciones, el mineral se mantenía húmedo pero no existía capa de agua sobre la superficie de la pulpa. La evolución del pH y la concentración de sulfatos en los distintos drenajes obtenidos durante esta primera fase, con una duración de 16 semanas, se ilustra en las Figuras 87 y 88.

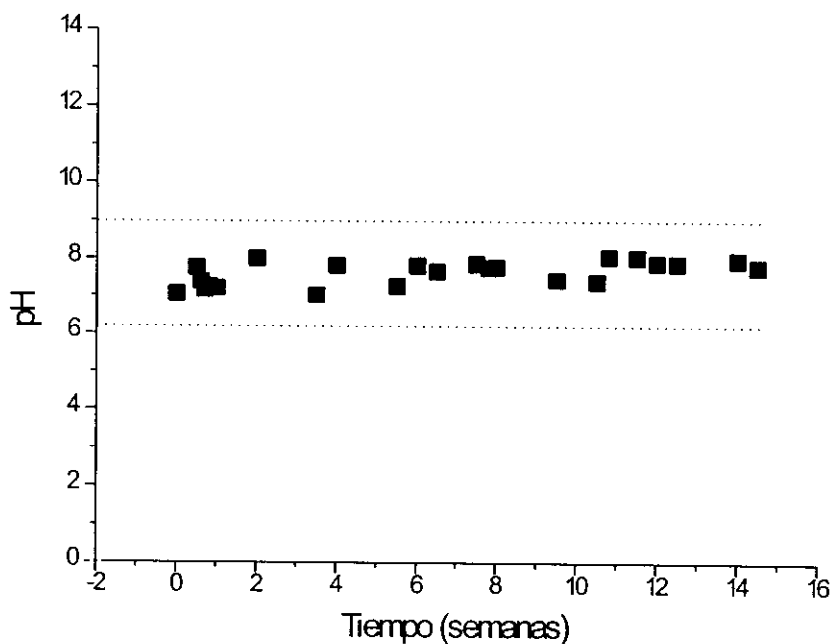


Figura 87: Evolución del pH de la pulpa en la fase preliminar de la columna M

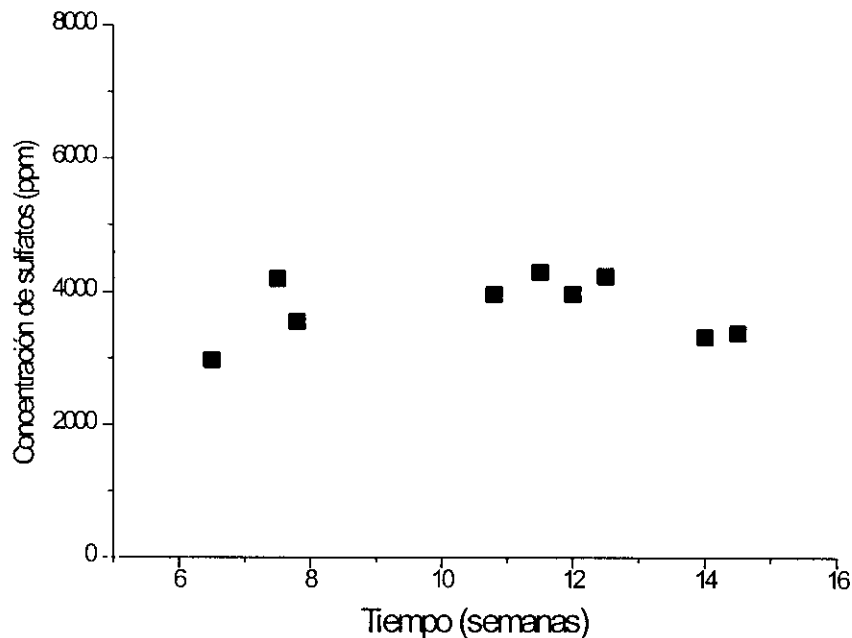


Figura 88: Evolución de la concentración de sulfatos en la fase preliminar de la columna M

Durante esta fase preliminar no se observó ninguna tendencia a la generación de acidez. Los valores de pH en los distintos drenajes se mantuvieron en la franja comprendida entre 7 y 8 (Figura 87) y los valores de concentración de sulfatos tampoco sufrieron importantes variaciones (Figura 88). La concentración de hierro, cobre y cinc medida en los efluentes correspondientes estuvo siempre en el intervalo entre 0,1 y 0,3 ppm.

Este resultado, inesperado y aparentemente en desacuerdo con los datos obtenidos en los ensayos realizados a menor escala, llevó a la decisión de cambiar el régimen de riegos y a estudiar la meteorización de la columna con un régimen de ciclos de humedad/sequedad similar al utilizado en las columnas de los experimentos anteriores. La metodología de los ciclos de humedad/sequedad es un aspecto muy resaltado en la bibliografía (Hood y col., 1984; Lapakko, 1990) porque, en opinión de los investigadores, reproduce con mayor realismo las condiciones ambientales cambiantes a las que puede estar sometido un residuo cuando se abandona. Por tanto, la decisión de cambiar el régimen de riegos era muy aconsejable de acuerdo con el estudio que se pretendía hacer del sistema. Se establecieron riegos con 2.000 ml de agua destilada que se pusieron en contacto con el mineral 48 horas y se dejaron drenar periódicamente (apdo. 2.3.5.). La evolución del pH en los distintos efluentes obtenidos en estas nuevas condiciones se ilustra en la Figura 89.

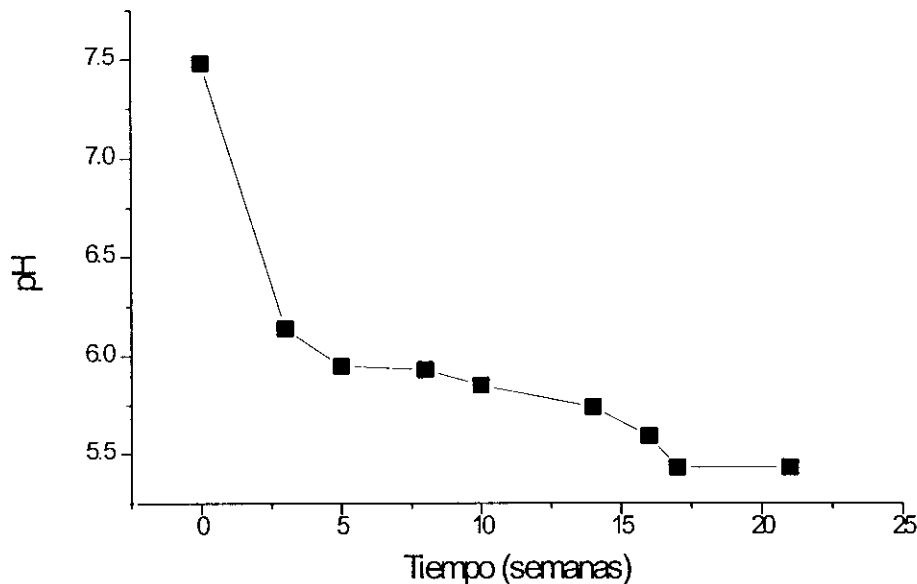


Figura 89: Evolución del pH en los drenajes de la columna M

La evolución del pH en estas nuevas condiciones fue, en una primera aproximación, pequeña y comparable a la situación anterior al establecimiento de los ciclos: en cinco meses no se generó acidez apreciable. Pero si se analizan detenidamente los valores y se acota el intervalo de pH, se pueden establecer algunos matices importantes. Por un lado, sí existe disminución significativa en el valor del pH; y por otro, la evolución en la meteorización del residuo condujo también a un incremento en la concentración de metales y sulfatos en los drenajes (Figuras 90 a 92). Como puede observarse, la concentración de cinc, hierro y sulfatos se elevó progresivamente a medida que transcurrió el proceso de meteorización, alcanzándose niveles de 640 ppm para el hierro, 1.300 ppm de cinc y 15.505 ppm de sulfatos en solución. No sucedió lo mismo para la concentración de cobre que se mantuvo siempre en valores de concentración inferiores a 0,5 ppm (el contenido en cobre del residuo de partida fue considerablemente inferior a su contenido en Zn y especialmente en Fe, por tratarse de un residuo de pirita; ver composición de la pulpa en Materiales y Métodos, apdo. 2.3.5.a.). Este mismo efecto ya se había observado en la meteorización en columnas de menor tamaño.

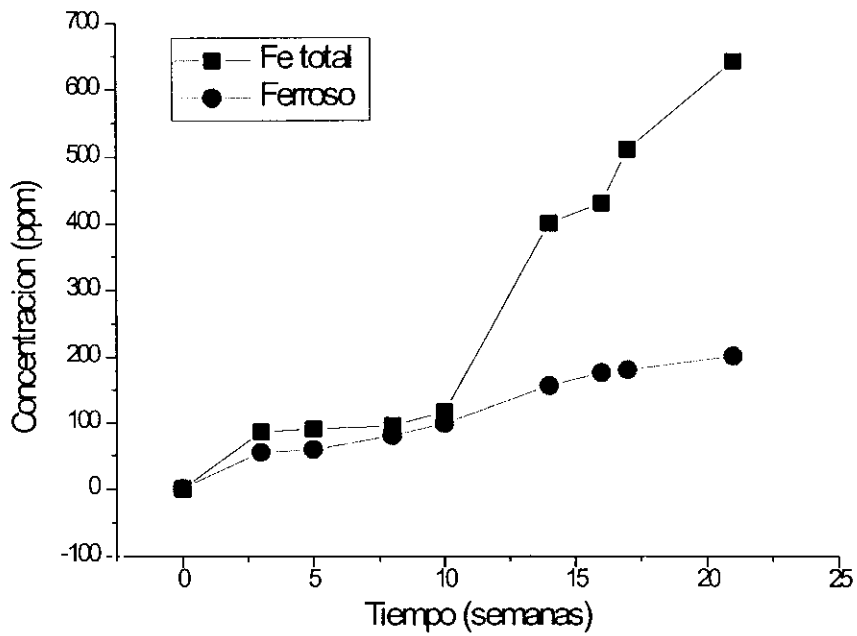


Figura 90: Evolución de la concentración de  $Fe_t$  y  $Fe^{2+}$  en los drenajes de la columna M

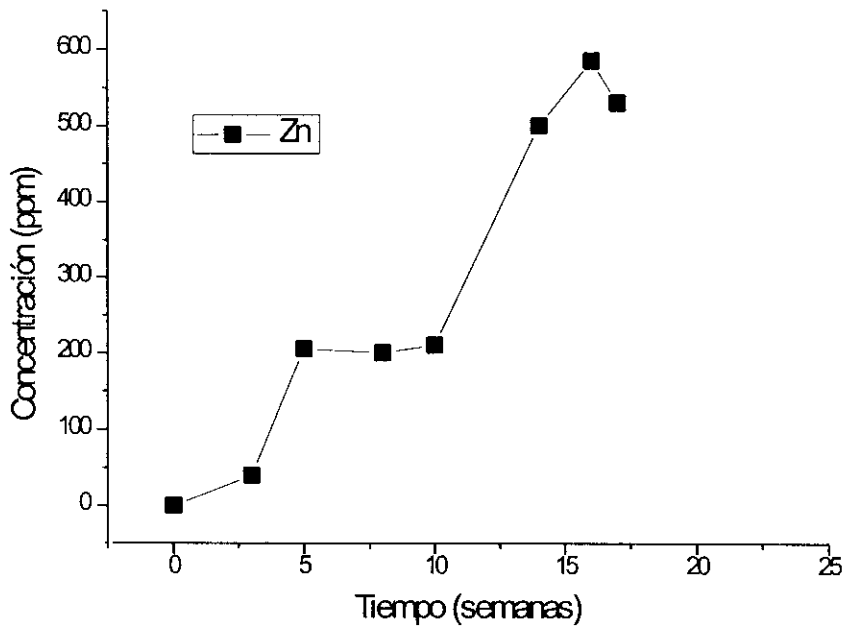


Figura 91: Evolución de la concentración de Zn en los drenajes de la columna M

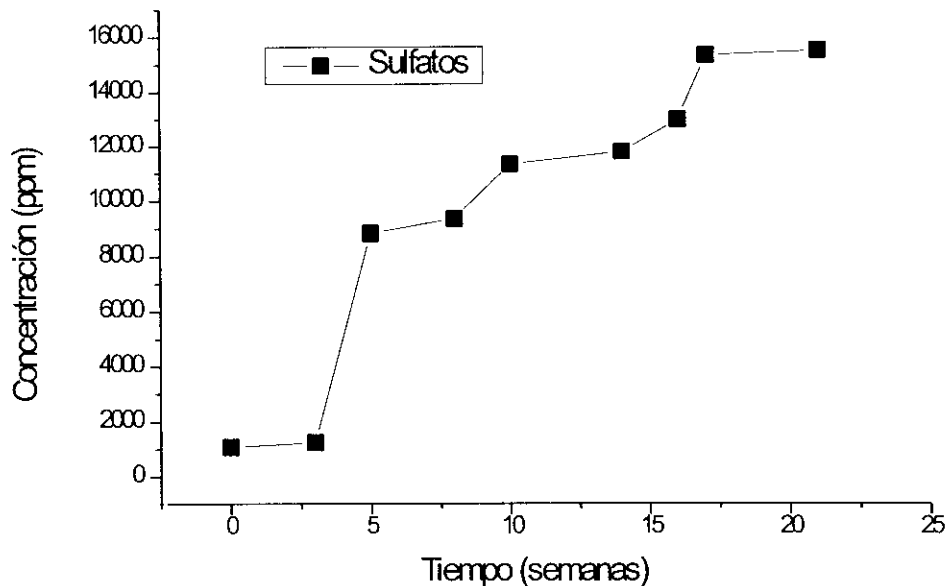


Figura 92: Evolución en la concentración de  $\text{SO}_4^{2-}$  en los drenajes de la columna M

Los valores obtenidos en la meteorización de la columna M correspondieron a una cinética de oxidación mucho más lenta que la observada en los experimentos anteriores. De hecho, los niveles de concentración de metales y sulfatos y el valor de pH alcanzado estuvieron muy por debajo de los obtenidos para las columnas pequeñas, todo ello después de un periodo de meteorización muy prolongado.

En cualquier caso, con el fin de confirmar estos resultados, se dispuso una nueva columna de meteorización, M2 (ver características en apdo. 2.5.5.), en idénticas condiciones. La pulpa de partida que se utilizó en este caso fue la P2 (ver composición en apartado 2.5.3.a.).

Los resultados de la evolución del drenaje para esta nueva columna se ilustran en las Figuras 93 a 96, en las que además se comparan los valores obtenidos con los correspondientes a la columna M, para un mismo volumen de agua añadido.

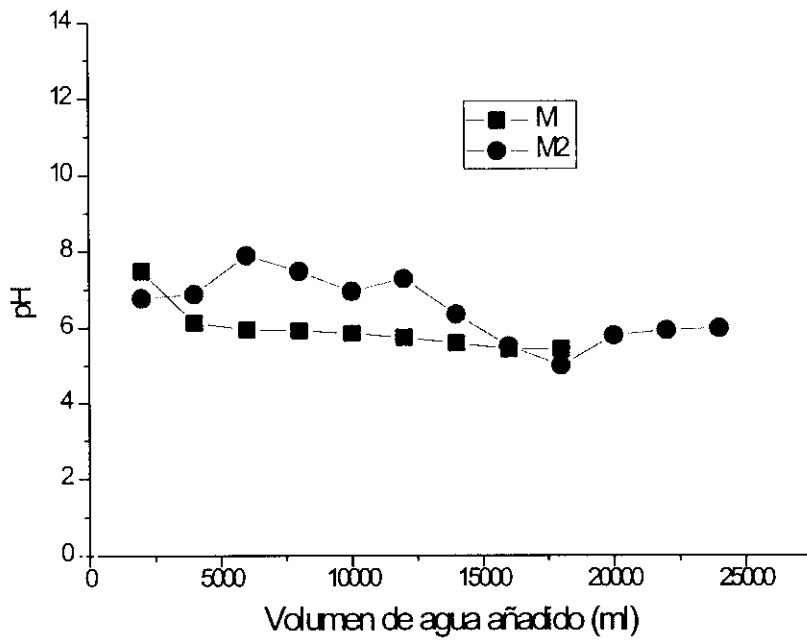


Figura 93: Evolución del pH en los drenajes de las columnas M y M2

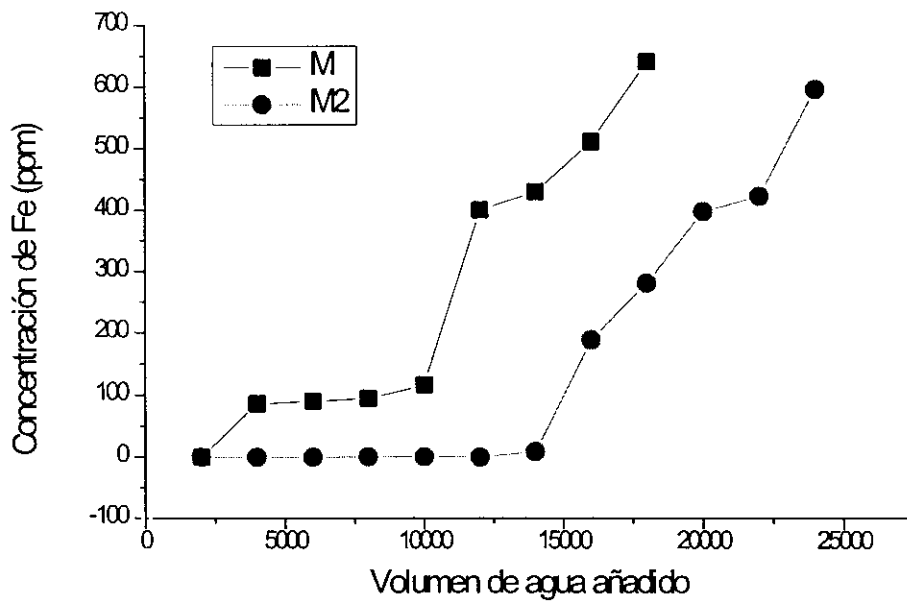


Figura 94: Evolución de la concentración de  $Fe_t$  en los drenajes de las columnas M y M2

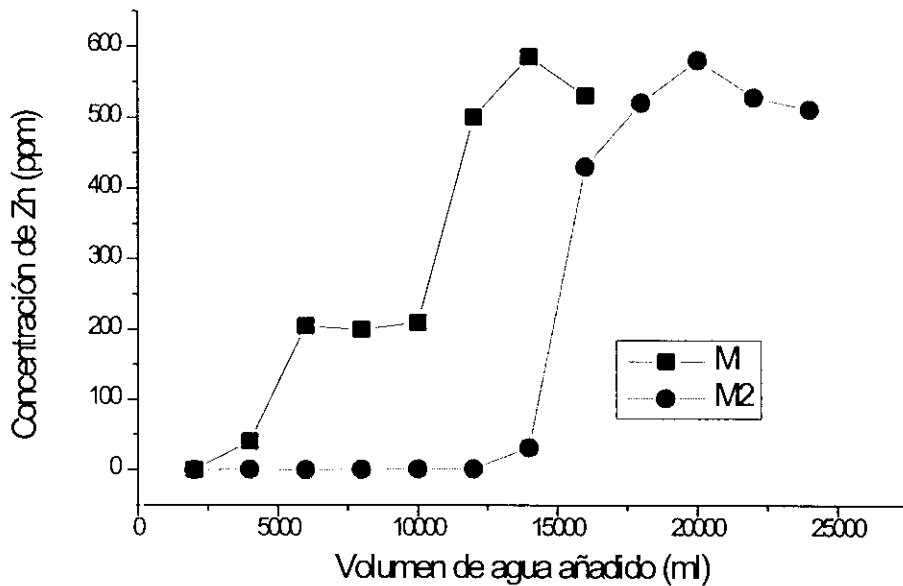


Figura 95: Evolución de la concentración de Zn en los drenajes de las columnas M y M2

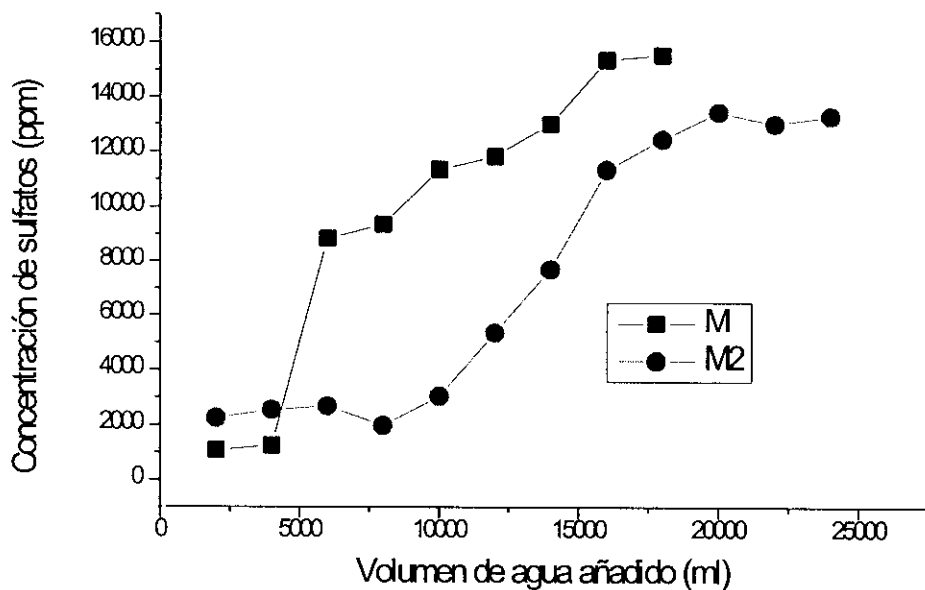
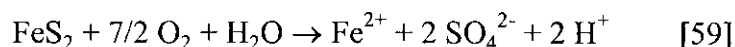


Figura 96: Evolución de la concentración de  $SO_4^{2-}$  en los drenajes de las columnas M y M2

De forma general, la columna M2 tuvo una evolución similar a la M, lo que sirvió para confirmar los resultados obtenidos. Los valores de pH que se midieron en ambos drenajes (Figura 93) fueron comparables, observándose una tendencia lenta y similar en ambos casos a la generación de acidez.

Es decir, aparentemente y limitándose exclusivamente a los valores de pH, parecería que este residuo, en estas condiciones de meteorización concretas, tanto de tiempo como de diseño experimental, no generó acidez, puesto que el mínimo valor de pH que se midió en ambas columnas, estuvo en torno a 5.

Sin embargo, la generación de drenajes ácidos no se centra exclusivamente en el pH. La oxidación de un residuo se manifiesta también por la evolución de otros parámetros durante la meteorización, así los metales que se disuelven (hierro y otros metales que puedan acompañarle en la piritita) y los sulfatos que aparecen fruto de la oxidación de los grupos  $S^{2-}$  a través de la reacción:



Así, si se observa la evolución de la concentración de los diferentes iones en los correspondientes drenajes, se comprueba que la oxidación de la piritita generó un incremento creciente en la concentración de hierro y sulfato. La presencia de en torno a 15.000 mg/l de  $SO_4^{2-}$  indicó que algo de acidez se estuvo generando en estas columnas -la ausencia de  $SO_4^{2-}$  en los efluentes indicaría que la piritita no se habría oxidado (Silver, 1985; Donovan, 1994; Rose y col., 1994)-. Luego, de la observación de los datos obtenidos (Figuras 94 a 96), se pudo inferir que la piritita se estuvo oxidando tanto en la columna M como en M2, si bien con una cinética muy lenta, de tal manera que el pH no había disminuido y las concentraciones de metales y sulfatos en solución estuvieron muy por debajo de los valores previstos de acuerdo con los experimentos anteriores (ensayo ABA, ensayos en matraz agitado y pequeñas columnas de meteorización).

Los valores de concentración de metales que se alcanzaron en M y M2 estuvieron en similar rango de concentración (en torno a las 500 ppm de Zn, 600 ppm de Fe y 0,5 ppm de Cu), aunque la columna M2 tuvo una cinética más lenta de oxidación o, lo que es lo mismo, se necesitaron más ciclos (añadir mayor volumen de agua) para alcanzar las mismas concentraciones que en M. Este resultado es consistente con el obtenido en el ensayo ABA (apdo. 3.2.2.a.), en el que se vió que la cantidad de piritita que era necesario oxidar para neutralizar la base de la muestra era inferior para el caso de la columna M. La

diferencia entre ambas columnas estuvo en la pulpa utilizada: en la columna M se utilizó la pulpa P1 y en la columna M2 se utilizó la pulpa P2. Como se vió en el apartado 3.2.2.a., la capacidad neutralizante de la muestra P2 fue superior a la de P1 y, por lo tanto, la cinética de oxidación de P2 debía ser menor que la observada para P1.

• *Influencia de los ciclos largos de sequedad*

Se estudió también la influencia de los ciclos largos de sequedad en las características del agua efluente de las columnas de meteorización M y M2. Este aspecto, como ya se ha indicado, trata de reproducir el efecto de los periodos secos a los que está sometida la pulpa residual de la presa en aquellas zonas en las que, por la propia sedimentación de la pulpa, parte del mineral queda expuesto superficialmente a los agentes de meteorización. Dadas las condiciones climatológicas de la zona, el residuo de pirita pudo permanecer periodos largos en condiciones de sequedad y sometido a elevadas temperaturas, aunque eventualmente pudieron caer lluvias que facilitarían la meteorización del residuo seco.

Para reproducir este fenómeno, se prolongaron los ciclos de sequedad y el riego posterior se efectuó con el mismo volumen de agua. Se pudo comprobar que tras un periodo largo de sequedad, se incrementó considerablemente la concentración de metales y sulfatos en los sucesivos drenajes, lo que ya había sido apuntado por otros autores y comprobado repetidamente en la presente experimentación.

El efecto pudo observarse con claridad especialmente en la columna M. En M2 quedó más enmascarado puesto que la meteorización también fue más lenta (Figuras 97 a 99) debido a que, como se ha explicado anteriormente, esta columna presentó más inercia a la oxidación. El efecto de los periodos secos se justifica en base a que durante la meteorización de las columnas M y M2 se formaron depresiones, huecos y canales por los que el agua terminó circulando preferencialmente (Silver, Ritcey y Cauley, 1985). Estos canales y grietas se formaron durante los periodos secos y en ellos tuvo lugar una oxidación superficial que pudo comprobarse visualmente por la formación de precipitados rojizos sobre los surcos. El riego posterior a un periodo prolongado de sequedad ocasionó la disolución de estos precipitados con la consiguiente generación de acidez (Fdez-Rubio, 1986). La formación de estos canales también provocó que no toda el agua que se adicionaba en cada ciclo penetrara y empapara el residuo. Parte de ella circulaba a través de los canales y drenaba directamente. Este factor explica también los bajos niveles de concentración de metales y sulfatos encontrados en las columnas M y M2, ya que la

formación de canales se da con mayor facilidad en columnas de mayor volumen de lecho e impide que la meteorización afecte a la totalidad del residuo.

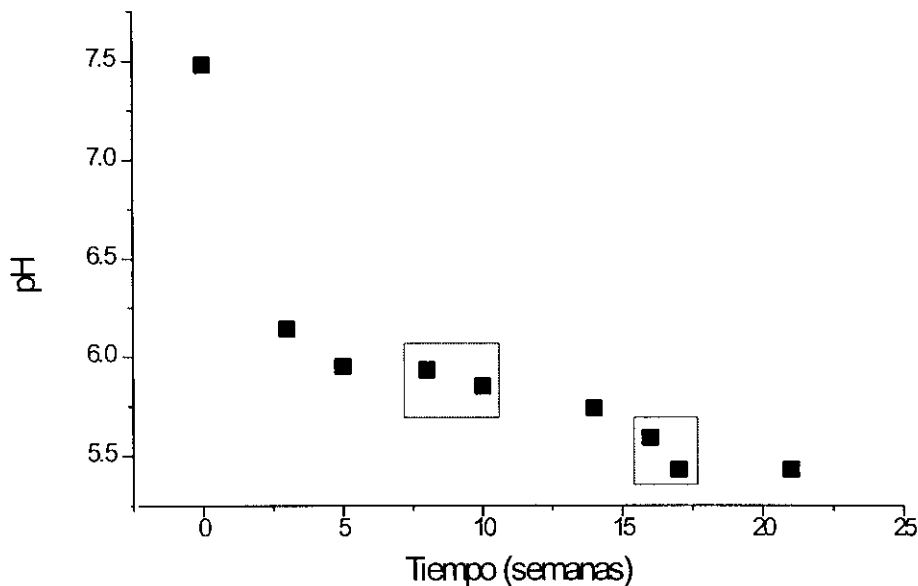


Figura 97: Evolución del pH en los drenajes de la columna M. Se destaca la variación de pH bajo la influencia de prolongados periodos de sequedad

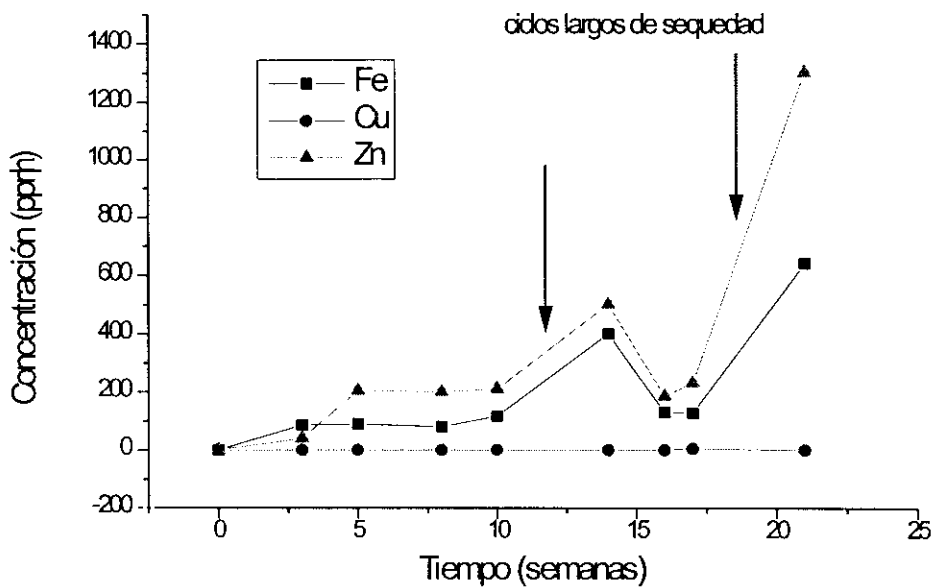


Figura 98: Evolución de la concentración de Fe, Cu y Zn en los drenajes de la columna M. Influencia de ciclos largos de sequedad

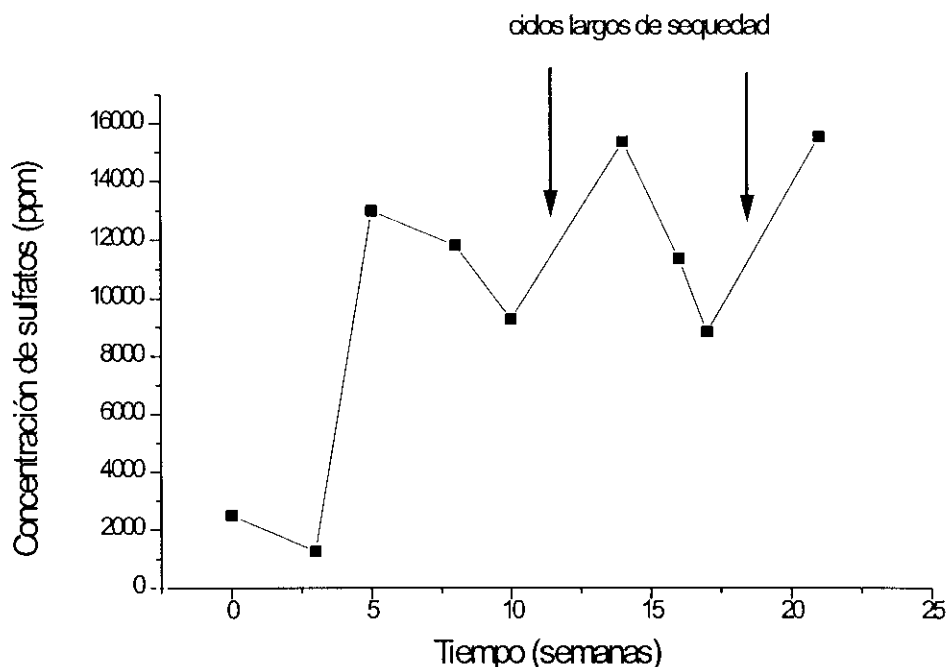


Figura 99: Evolución de la concentración de sulfatos en los drenajes de la columna M. Influencia de ciclos largos de sequedad

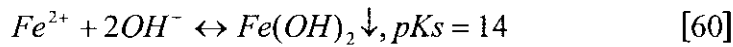
- *Cinética de oxidación del ion ferroso en las muestras drenadas*

El drenaje de las columnas se efectuó de acuerdo con las condiciones descritas en el apartado de Materiales y Métodos (ver 2.3.5.). En los volúmenes recién drenados se efectuaba una lectura directa de pH y Eh (éste siempre presentó valores que oscilaron entre -29 y 20 mV en lecturas realizadas de forma inmediata). Se observó que si bien las muestras eran transparentes en el momento de ser recogidas, transcurridas unas horas, se volvían amarillas e incluso aparecían precipitados pardo-rojizos si el líquido se dejaba evolucionar con el tiempo. Esta transformación sucedía en unas horas (2-3 horas), se intensificaba en las siguientes y a las 24 horas siempre era evidente. Aunque este fenómeno ya había sido observado y descrito por otros autores (Wang y col., 1992), atribuyéndolo a la oxidación del hierro contenido en las disoluciones, sin embargo, se quiso comprobar este aspecto y verificar si la aparición del color se debía a la precipitación del ion ferroso o bien a la oxidación de éste a férrico y la consiguiente precipitación de hidróxidos u otros compuestos de hierro (III). Este último aspecto parecía bastante discutible, por la aparentemente lenta cinética de oxidación del  $\text{Fe}^{2+}$ .

Se estudió, por un lado, la estabilidad de ambas especies en el rango de pH de los drenajes y, por otro, la cinética de oxidación del ion  $Fe^{2+}$ .

a) Estabilidad química teórica de las especies  $Fe^{2+}$  y  $Fe^{3+}$  en solución acuosa.

Considerando el valor de pH 5,5 como representativo de los drenajes de la columna M, la estabilidad de los iones ferroso y férrico sería la siguiente (Burriel y col., 1985):

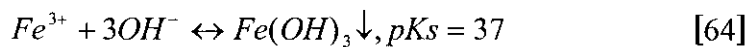


$$[Fe^{2+}][OH^{-}]^2 = 10^{-14.7} \quad [61]$$

$$[H^{+}][OH^{-}] = 10^{-14}, [OH^{-}] = 10^{-8.5} \quad [62]$$

$$[Fe^{2+}] = \frac{10^{-14.7}}{10^{-17}} = 10^{2.3} \quad [63]$$

Luego a pH 5,5, la especie  $Fe^{2+}$  puede existir en solución en concentraciones apreciables y sin precipitar. Con respecto a la especie  $Fe^{3+}$ :



$$[Fe^{3+}][OH^{-}]^3 = 10^{-37} \quad [65]$$

$$[Fe^{3+}] = \frac{10^{-37}}{10^{-25.5}} = 10^{-11.5} \quad [66]$$

A pH 5,5 la especie  $Fe^{3+}$  no existe en solución.

b) Cinética de oxidación del ion ferroso

La velocidad de oxidación del ion ferroso es muy dependiente del pH (Stumm y col., 1961; Singer, 1970; Walsh y Mitchell, 1972; Gazea y col., 1996). Dicha dependencia puede describirse de acuerdo a la siguiente relación:

$$-\frac{d[Fe^{2+}]}{dt} = K \cdot [Fe^{2+}][OH^{-}]^2 \cdot pO_2 \quad [67]$$

$$K = 8,0 \times 10^{13} \text{ l.mol}^{-2} \cdot \text{atm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}, \text{ a } 25^{\circ} \text{ C}$$

Si consideramos constante la  $pO_2$  y un valor de  $pH = 5,5$ :

$$-\frac{d[Fe^{2+}]}{dt} = 8,10^{13} \cdot 10^{-17} \cdot [Fe^{2+}] \quad [68]$$

$$-\ln[Fe^{2+}]_0^f = 8,10^{-4} [t]_0^f \quad [69]$$

El tiempo necesario para reducir a la milésima parte la concentración inicial,  $C_i$ , de ion ferroso, (t), sería:

$$t = \frac{1}{8,10^{-4}} \left( \ln \frac{C_i \cdot 10^{-3}}{C_f} \right) \quad [70]$$

$$t = 6 \text{ días}$$

Con estos datos, se midieron las concentraciones de  $Fe^{2+}$  antes y después de la aparición de coloración en los efluentes, así como los respectivos valores de pH en varias muestras procedentes del drenaje de distintas columnas en las que se observaba este efecto.

Así, para una muestra que tuvo un valor de pH inicial de 6,4 y una concentración inicial de ion ferroso de 20,5 ppm, el valor de la concentración de ion ferroso en la solución coloreada fue de 1,1 ppm. Según las expresiones anteriores, el tiempo necesario para realizar esta oxidación sería:

$$-\frac{d[Fe^{2+}]}{dt} = 8,10^{13} \cdot [10^{-7,64}]^2 \cdot [Fe]^{2+} \quad [71]$$

$$t = \frac{1}{8,10^{-2,28}} \cdot \left( \ln \frac{1,1}{20,5} \right) \approx 68 \text{ minutos} \quad [72]$$

Es decir, que en tan sólo una hora, o un poco más, es posible la oxidación de ion ferroso para este valor de pH. Este tiempo coincide con el que se observaba en la aparición de la coloración en las muestras obtenidas durante los ensayos de laboratorio.

Luego, la aparición de la coloración y la precipitación subsiguiente se debieron a la oxidación de ion ferroso a férrico, que para estos valores de pH tuvo una cinética bastante más rápida de lo que en principio se podría suponer.

Como comprobación, se realizó un análisis por difracción de rayos-X del precipitado obtenido, demostrándose que se trataba de óxidos e hidróxidos de hierro (III):  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  y  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (Figura 100). En el difractograma aparece además algo de pirita arrastrado al tomar la muestra.

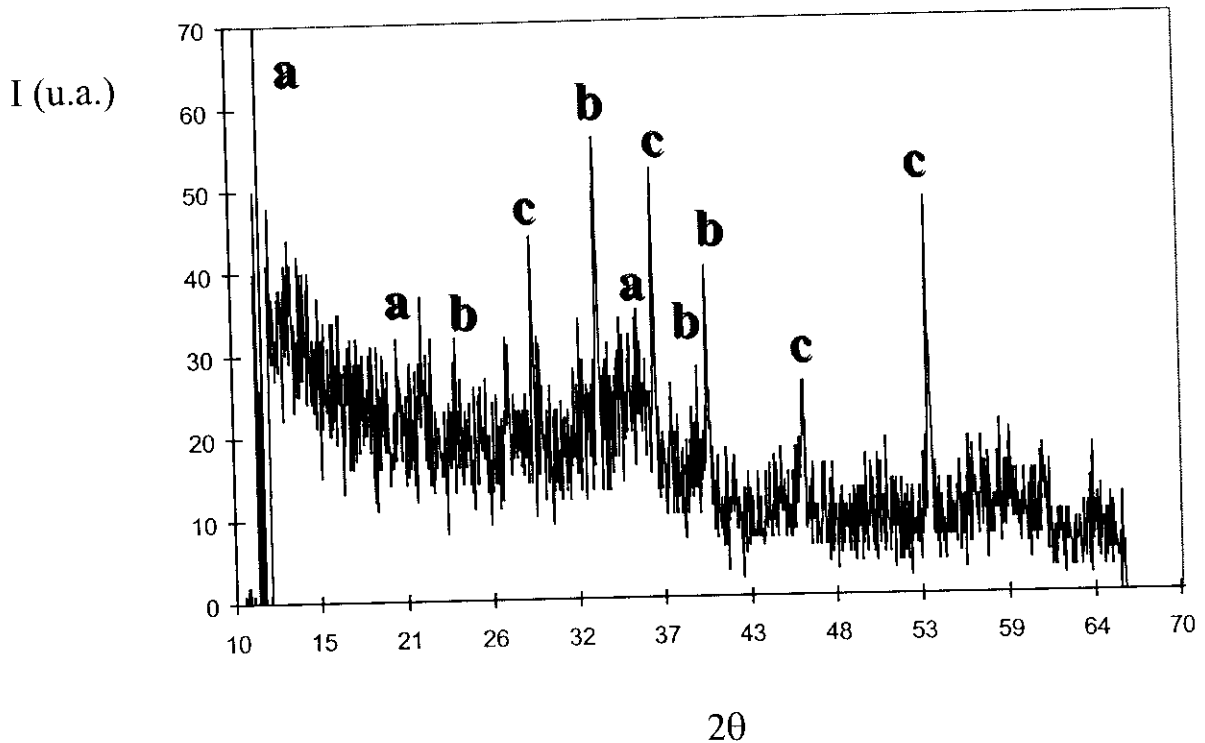


Figura 100: Difractograma correspondiente al precipitado producido durante la oxidación de las disoluciones drenadas de las columnas: a,  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ; b,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ; c, pirita

A la vista de estos resultados, la metodología que se debe adoptar para prevenir la oxidación de las muestras recién drenadas consiste en una acidulación con ácido sulfúrico previa a la correspondiente determinación analítica. Inmediatamente después del drenado de las columnas, se debe hacer la determinación del pH y Eh y tomar 1 ml para el correspondiente análisis de sulfatos.

• *Conclusiones generales relativas a los ensayos de meteorización en columna*

Los resultados de los ensayos en columna permitieron corroborar ciertos planteamientos y conclusiones que se venían discutiendo en apartados anteriores.

En primer lugar, y como se ha descrito en los apartados 2.5.1. y 3.2.2.a., los resultados aportados por el ensayo ABA hay que tomarlos como medida orientativa pero nunca como parámetros definitivos a la hora de valorar el comportamiento de un determinado residuo. En nuestro caso, el ensayo ABA aseguraba que tanto la muestra de pulpa P1 como la P2 poseían una fuerte tendencia a la generación de acidez. Como acaba de demostrarse, este potencial ácido sólo se puso de manifiesto bajo determinadas condiciones experimentales.

En segundo lugar, los resultados confirmaron también las conclusiones de los primeros experimentos de meteorización en columna. En los ensayos anteriormente descritos, se había visto cómo la altura de columna influye en la meteorización del residuo, de tal manera que cuanto mayor es dicha altura, más saturada en agua permanece y, por tanto, más se dificulta la oxidación. Si se comparan los drenajes obtenidos en columnas con alturas crecientes (Figura 101), se comprueba que a medida que la meteorización progresa se va estableciendo un mayor distanciamiento entre los resultados de cada columna, esto es, en los primeros ciclos, las diferencias en los valores de pH de los drenajes de las columnas son pequeñas (ciclo 2). Cuanto más se avanza en la meteorización, o lo que es lo mismo, cuanto mayor es el número de ciclos de meteorización al que se ha sometido a una columna, mayores diferencias existen entre los valores de pH medidos considerando tendencias generales.

Si se compara el grado de meteorización alcanzado en columnas de tamaños distintos para un mismo ciclo (Figura 102), esto es, cuando se han añadido volúmenes de agua equivalentes, se aprecian claramente también estas diferencias.

Las columnas h33 y h66 se diseñaron de modo que los volúmenes de lecho respectivos fueran uno doble del otro (ver apdo. 2.3.5). El riego también fue proporcional y los resultados de meteorización fueron consistentes con el argumento propuesto acerca de cómo influye la altura de una columna en el grado de “inercia” a la meteorización.

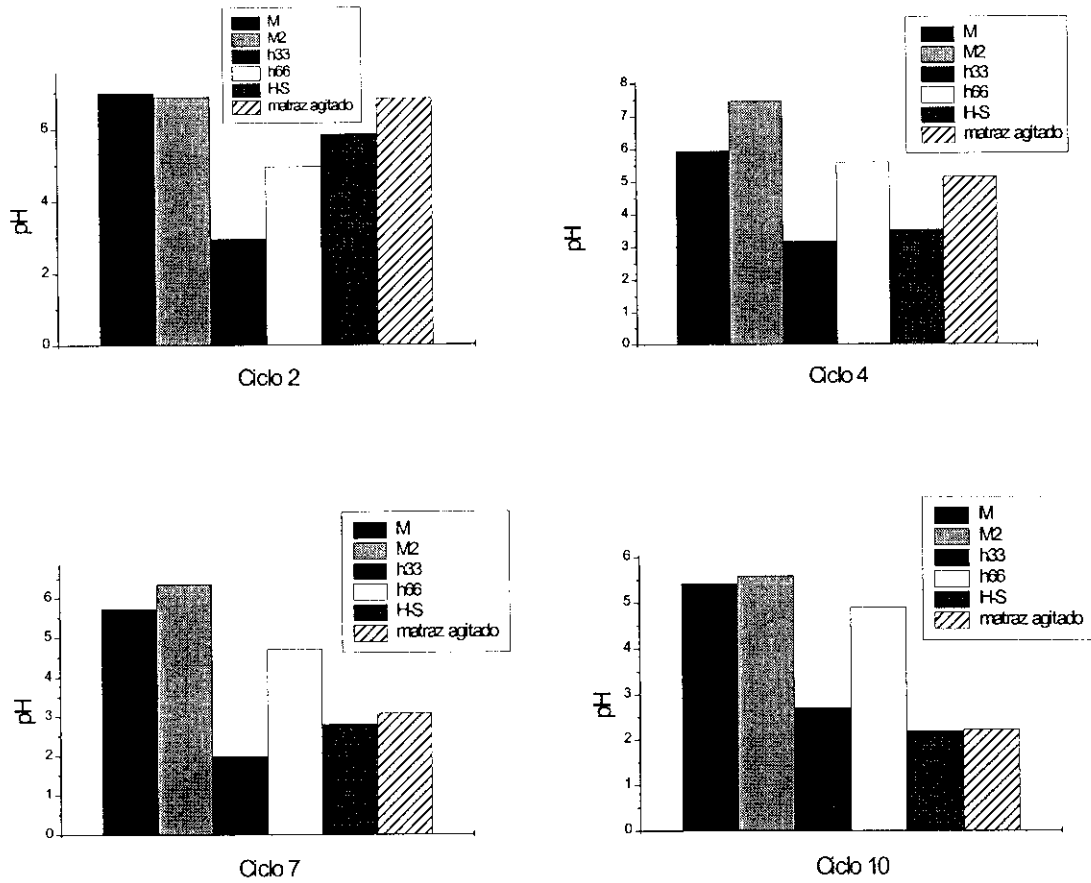


Figura 101: Influencia de la altura de columna en la cinética de meteorización. Las alturas de lecho respectivas fueron: M, 65 cm; M2, 50 cm; h33, 33 cm; h66, 66 cm; H-S, 13,5 cm

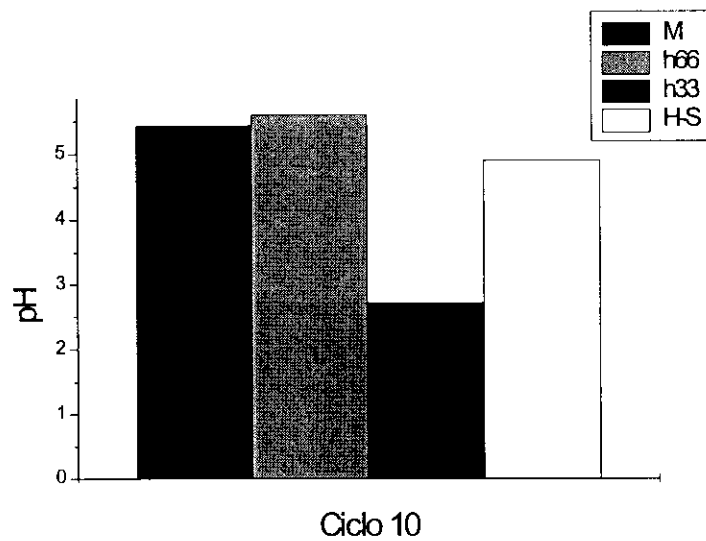


Figura 102: Influencia de la altura de columna en la meteorización del residuo

En la Tabla XXXII se reflejan de modo cuantitativo los valores de pH, concentración de metales y sulfatos medidos en los drenajes de las columnas h33 y h66 en el ciclo 11. Como se aprecia, la inercia de una columna a la meteorización fue mayor cuanto mayor fue la altura del lecho.

Tabla XXXII: Grado de meteorización en h33 y h66 alcanzado en el ciclo 11

Columna	Fe (ppm)	Cu (ppm)	Zn (ppm)	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (ppm)	pH
h33	19.000	118	5.000	12.600	2,8
h66	340	0,1	1.540	6.386	4,9

La lenta cinética de oxidación observada en M y M2 se explica en base a este mismo planteamiento: la oxidación es mucho más lenta en columnas con mayor volumen de lecho debido a que, como se ha explicado anteriormente, las columnas altas se saturan, esto es, retienen agua durante y entre los ciclos, con lo que la penetración del oxígeno necesario para la oxidación es mucho peor que en el caso de las columnas pequeñas. Así, por ejemplo, en el ciclo 8 (correspondiente a 17 semanas de meteorización), cuando en h33 ya se había alcanzado el valor de pH de 2,0, en h66 el valor de pH estaba en 4,9 y el valor de pH medido para un tiempo equivalente en la columna M fue de 5,4. Luego, efectivamente, las columnas M y M2 tuvieron mayor inercia a la meteorización, existiendo, sin embargo, incipiente generación de acidez, como ha quedado demostrado por los valores crecientes en la concentración de metales y sulfatos que se midieron en los sucesivos drenajes. El tiempo que han permanecido M y M2 en condiciones de meteorización ha sido insuficiente para alcanzar los valores de acidez que se obtuvieron en columnas de menor volumen de lecho en condiciones similares. Para alcanzar el mismo grado de meteorización hubiera sido necesario un considerable mayor número de ciclos.

Otra conclusión interesante que se puede extraer de los experimentos de meteorización proviene de la comparación de los ensayos en matraz agitado y de meteorización en columna. Si se compara la evolución de los valores de pH a partir de un lodo sin inocular y en los distintos drenajes de la columna H-S (Figura 103), se observa que en ambos casos la generación de acidez tuvo una tendencia semejante. Considerando pues la validez de ambas experiencias, y dado que la concentración de hierro que se midió en los efluentes de la columna H-S (13.500 ppm) fue cercana a la que se midió en los experimentos en matraz agitado, en los que se había realizado un inóculo, se puede concluir que en la meteorización del residuo en la columna H-S existió necesariamente participación microbiológica. Luego, por tanto, el comportamiento de columnas sometidas a ciclos de humedad-sequedad debe estar sometido a la influencia de la oxidación microbiológica.

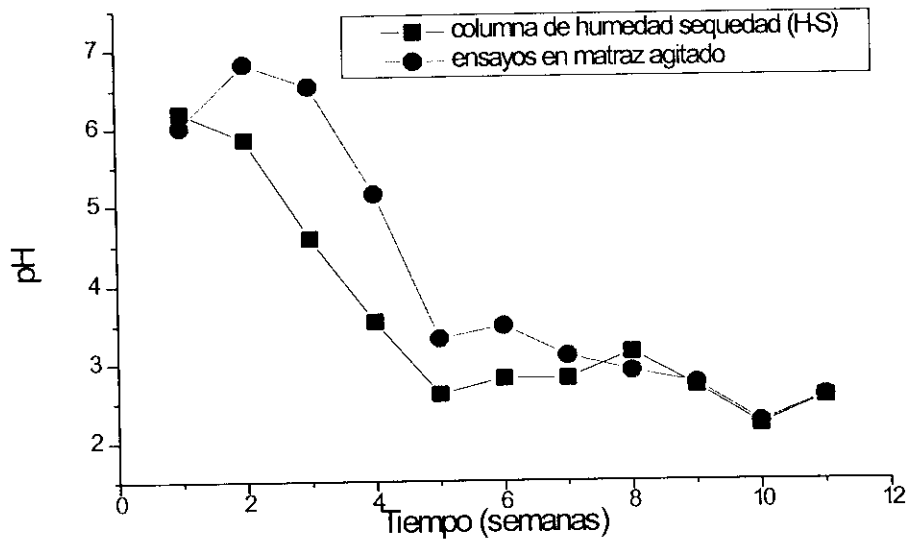
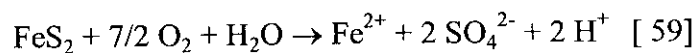


Figura 103: Evolución del pH en los experimentos de meteorización en columna (H-S) y en matraz agitado

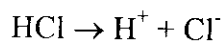
Finalmente, la conclusión fundamental que se debe sacar de todas estas experiencias es la consistencia entre el modelo ensayado y los resultados reales medidos en el sistema.

En este sentido, se pueden utilizar los resultados obtenidos en el ensayo ABA (apdo. 3.2.2.a.) para calcular la cantidad de mineral que debía ser oxidada en cada columna para neutralizar la base que la acompaña y se puede, asimismo, contrastar este resultado con los obtenidos a partir del modelo en columna.

Tomando como base la reacción [59] de oxidación de la pirita (*Draft acid rock drainage technical guide*, 1989; Donovan, 1994; Rose y col., 1994):



por cada mol de sulfuro se producen dos protones. Por otro lado, con el ensayo ABA se había calculado la cantidad de HCl 0,5N que era necesario añadir para neutralizar los 2 gramos de muestra empleados en cada ensayo. Considerando la disociación total del HCl:



[73]

se obtiene fácilmente la cantidad de pirita que hubiera sido necesario oxidar en cada columna para generar los  $\text{H}^+$  necesarios que neutralizarán el contenido en base de la muestra.

Así, por ejemplo, para neutralizar la muestra de mineral utilizado en la columna M, se necesitarían 4,23 l de HCl 0,5 M, es decir, se necesitarían 2,115 M de  $\text{H}^+$  generados por 1,075 moles de pirita o, lo que es lo mismo, por 126,6 g de pirita. Un cálculo semejante realizado para el resto de las columnas se muestra en la Tabla XXXIII.

Tabla XXXIII: Gramos de pirita que es necesario oxidar para neutralizar el contenido básico en el mineral de cada columna.

Columna	pirita (g)
M	126,60
H-S, S, Li, L	4,21
h33	10,26
h66	19,61

Estos resultados son consistentes sólo con las condiciones impuestas en algunas columnas. A la vista de estos datos también se deduce que sería necesario oxidar muy poca cantidad de pirita para neutralizar la base contenida en el mineral de las distintas columnas. Este resultado estaría en desacuerdo con el comportamiento de las columnas S, M y M2 y sólo para el caso de las columnas L, Li y H-S, efectivamente, hicieron falta pocos ciclos para que comenzara a generarse acidez. Es necesario insistir de nuevo en la necesidad de interpretar debidamente los resultados del ensayo ABA y de analizarlos con precaución, pues da información acerca del comportamiento de un residuo bajo la peor de las situaciones, pero no tiene en cuenta variables que pueden aparecer en condiciones ambientales reales y que pueden alterar los resultados previstos. En este sentido, el tamaño de partícula del sólido y la altura del lecho son parámetros fundamentales a considerar.

-Desmonte: distribución microbiológica y mineralógica

Una vez finalizados los ensayos de meteorización en columna, se procedió al desmonte de las mismas. Se seleccionaron distintas muestras en cada caso, cuyo número y distribución fueron función del tamaño de la columna. Se procedió entonces a la caracterización mineralógica y microbiológica de las mismas (apartado 2.3.5.).

• *Columna M*

En el desmonte de la columna de meteorización M se seleccionaron las muestras que se indican en la Figura 104. Se tomaron muestras longitudinalmente, cada 20 cm aproximadamente y, en el sentido radial, muestras interiores y exteriores.

La meteorización de esta columna había supuesto la formación de canales a través de los cuales discurrió el agua preferencialmente durante los riegos. Sobre la superficie de estos canales, se formó una fina capa de precipitados pardo-rojizos que se apreció claramente en el desmonte de la columna. Por este motivo, se seleccionaron las muestras que se han denominado “exteriores”, para indicar estas zonas perimetrales más expuestas; y las zonas denominadas “interiores”, correspondientes a las zonas centrales de la columna.

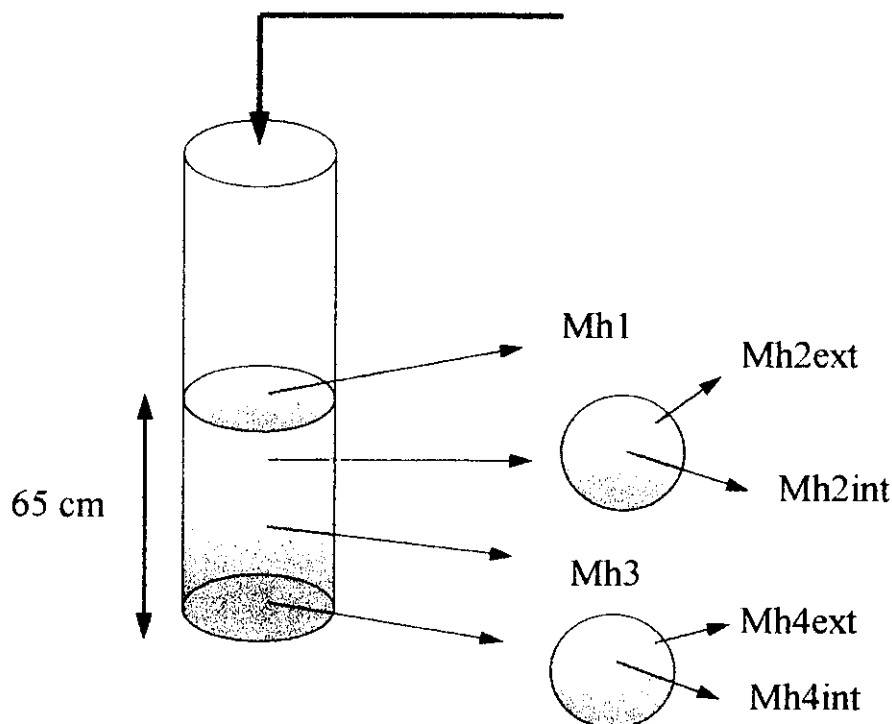


Figura 104: Muestras seleccionadas en el desmonte de la columna de meteorización M

*a) Distribucion microbiológica*

Los resultados correspondientes al recuento de microorganismos se muestran en la Tabla XXXIV. Como puede apreciarse, existió una presencia importante de microorganismos asociados al mineral: unos, que ya aparecían en la caracterización de la pulpa inicial, incrementaron su número; y otros, aparecieron o se seleccionaron en ciertas localizaciones de la columna donde se establecieron microambientes específicos.

Si se comparan estos valores con los obtenidos en la caracterización microbiológica de la pulpa inicial (Tabla XI), se puede observar cómo la meteorización del mineral ha potenciado, en general, el crecimiento microbiológico. Se han desarrollado especies hierro-oxidantes y bacterias anaerobias que no aparecían en la caracterización de la pulpa inicial. Por su parte, el número de bacterias azufre-oxidantes, así como el número de heterótrofos se ha visto incrementado.

En cuanto a la distribución microbiológica a lo largo de la columna, la aparición de bacterias azufre-oxidantes fue homogénea desde un punto de vista cuantitativo, con la excepción de la muestra h1, correspondiente al mineral superficial, donde se detectó un incremento notable. Como se ha descrito anteriormente, las bacterias litoautótrofas (entre las que se encuentran las azufre-oxidantes) son muy dependientes del oxígeno, lo que explica por qué es precisamente en la muestra h1, la más oxigenada de la columna, donde se desarrollaron preferencialmente. Tanto la presencia de bacterias litoautótrofas azufre-oxidantes como la de hierro-oxidantes fue importante a lo largo de toda la columna, debido a que el régimen de ciclos de humedad y sequedad elegido condujo a la oxigenación completa de la misma y a que no se establecieran estrictas condiciones anaerobias.

Las bacterias litoautótrofas hierro-oxidantes también crecieron fundamentalmente en aquellas zonas de la columna en las que existió mayor aireación (muestra h1 superficial y muestras exteriores). La columna M tuvo dos puntos fundamentales de oxigenación: el correspondiente a la muestra h1 superficial, con una superficie libre expuesta importante, y la zona cercana correspondiente al punto de muestreo h4, próxima al punto de drenaje de la columna. Precisamente, asociada a estos dos puntos fue donde se encontró una distribución más importante de bacterias hierro- y azufre-oxidantes y además fue en estos puntos donde no se encontraron bacterias anaerobias reductoras de sulfatos.

Las bacterias reductoras de sulfatos (BRS), que necesitan condiciones anaerobias para crecer, sólo se detectaron en muestras interiores y profundas coincidiendo precisamente con las zonas en las que peor se desarrollaron las bacterias litoautótrofas.

Existió también una presencia importante y homogénea de heterótrofos, entre los que se cuantificaron bacterias, levaduras y hongos, que se desarrollaron bien a lo largo de toda la columna.

Se puede decir que en la columna M se estableció una selección microbiológica en función del aporte de oxígeno (Figura 105), de tal modo que existieron dos zonas (la zona superficial y la correspondiente al punto de drenaje) en las que la difusión del oxígeno fue superior y, por ello, en las que se desarrollaron preferencialmente aquellos microorganismos con necesidad de este gas (bacterias litoautótrofas). Aún así, y debido a los ciclos de humedad-sequedad, en esta columna nunca se llegó a establecer una zona en condiciones exclusivamente anóxicas, lo que se demuestra por la presencia de bacterias litoautótrofas en toda columna.

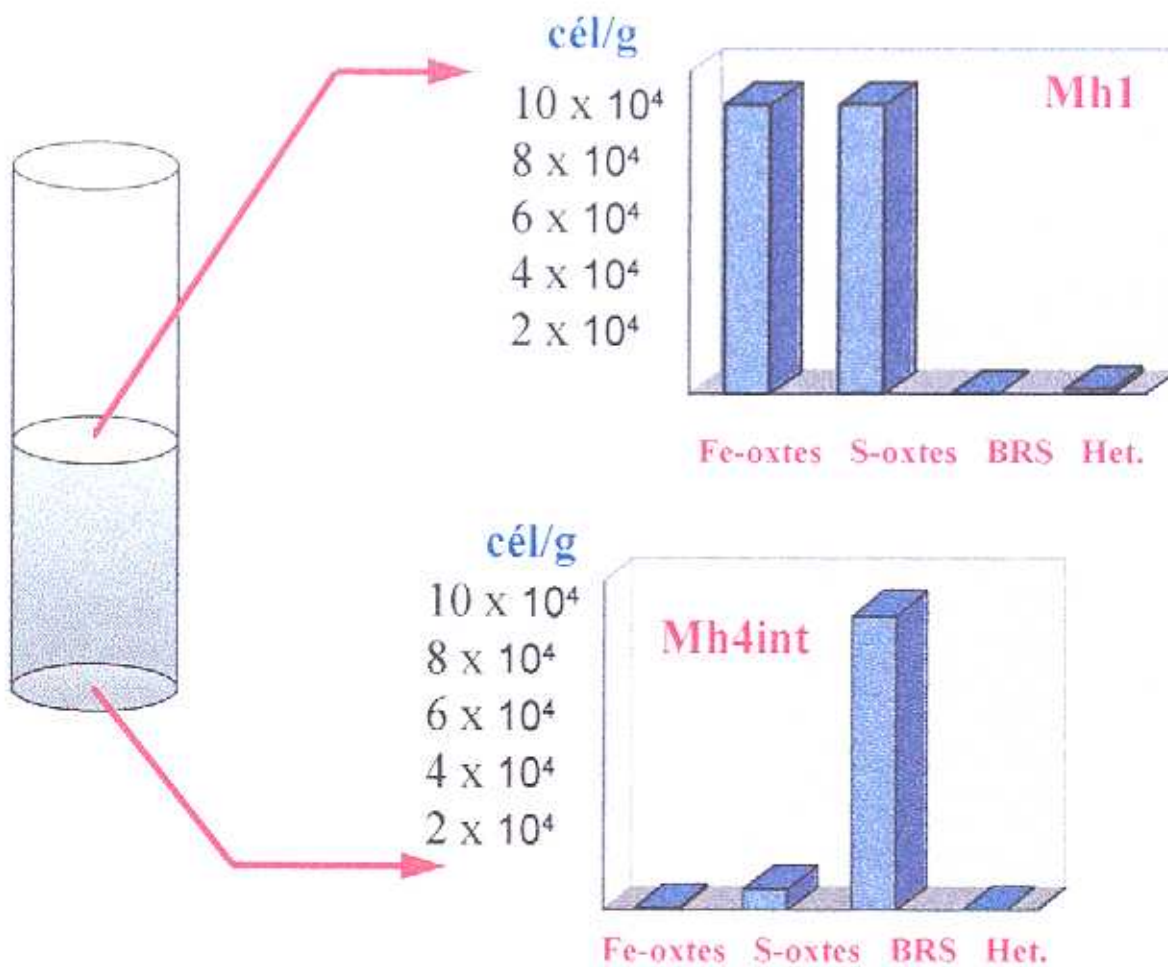


Figura 105: Distribución microbiológica en la columna M

Tabla XXXIV: Distribución microbiológica en la columna M

Muestra	Bacterias Fe-oxidantes (células/g)	Bacterias S-oxidantes (células/g)	BRS (células/g)	Heterótrofos totales (cél/g)
h1	$9,0 \times 10^4$	$9 \times 10^4$	-	$16 \times 10^2$
h2 exterior	$27 \times 10^3$	$12 \times 10^3$	-	$4 \times 10^3$
h2 interior	$12 \times 10^3$	$12 \times 10^3$	+	$8 \times 10^2$
h3	$15 \times 10$	$57 \times 10^2$	+	$3,12 \times 10^4$
h4 exterior	$9,0 \times 10^3$	$18 \times 10^3$	-	$4,0 \times 10^4$
h4 interior	$57 \times 10$	$6,6 \times 10^3$	+++	-

+: crecimiento positivo; -: crecimiento negativo

### b) Análisis mineralógico de las muestras

El análisis mineralógico de las muestras también aportó datos interesantes acerca del “estado de meteorización” en que se encontró el mineral. Confirmando los datos químicos de los drenajes, se comprobó que efectivamente la pirita apenas había sufrido transformación, aunque analizando más detalladamente los correspondientes espectros se obtuvieron algunas otras conclusiones interesantes.

En la Figura 106 aparecen reflejados los difractogramas correspondientes a tres muestras diferentes. Tanto en la muestra más superficial (Mh1), como en la muestra intermedia (Mh2ext) y en la más profunda (Mh4), la pirita fue el componente principal del que se identificaron claramente todos sus picos característicos, indicando que el mineral, en su mayoría, permanecía todavía sin transformar.

Aún así, la evolución del residuo no fue homogénea a lo largo de toda la columna de tal manera que en la parte superficial y más expuesta, el mineral sufrió cierta oxidación que condujo a la formación de sulfatos. En concreto, se identificó el sulfato de plomo, producto de oxidación del sulfuro de plomo que aparecía en la muestra inicial como componente minoritario acompañando a la pirita. Este comportamiento es el que cabe esperar para un sulfuro expuesto a la acción del oxígeno y del agua, como era el caso de la muestra superficial Mh1. El sulfuro de plomo presente en pequeña proporción en la muestra (ver difractograma de la muestra Mh4), se oxidó preferencialmente respecto de la pirita en base a que su potencial de reposo es menor. Como es sabido (Ballester y col., 1991), cada sulfuro en contacto con un determinado medio acuoso tiene un potencial de reposo específico. Cuando dos o más sulfuros minerales se encuentran en contacto, el que tiene un potencial de reposo más alto puede actuar catódicamente, mientras que el que tiene un

potencial de reposo más bajo puede hacerlo anódicamente. Se ha demostrado (Ballester y col., 1991) que la pirita facilita la oxidación de los sulfuros minerales  $PbS$ ,  $ZnS$  y  $CuFeS_2$ , mientras que los mismos minerales retardan la disolución de aquella. Los potenciales de reposo de la pirita, galena, esfalerita y calcopirita son, respectivamente, 0,66, 0,40, 0,46 y 0,56 voltios para un medio a pH 4.

Este sulfato de plomo aparece menos definido en la muestra intermedia (Mh2ext) y no aparece en la muestra más profunda (Mh4).

El comportamiento del mineral superficial difirió respecto del observado para la muestra más profunda, de tal manera que asociados a la muestra Mh4 no se encontraron sulfatos de plomo y sí aparecieron, sin embargo, sulfuros de plomo que no lo hacían en la muestra Mh1. La explicación a este resultado experimental está en el hecho de que ciertos sulfuros de plomo que podían estar acompañando al mineral de partida, junto con una fracción muy pequeña de calcopirita, se atacaron durante el proceso de meteorización (riegos) en la parte superior de la columna. En la parte inferior no se dieron las condiciones necesarias para ello.

La disolución de los sulfuros condujo además a la aparición de plomo y cobre en solución que debieron emigrar a la parte inferior de la columna durante los sucesivos riegos. Estos metales debieron encontrar en la parte inferior con un medio reductor promovido por la actividad biológica de las BRS y el cobre volvió a precipitar como sulfuro, de ahí que en el difractograma correspondiente a la muestra más profunda, Mh4, aparezcan los picos característicos del  $CuS_2$ .

Los datos mineralógicos corroboraron, por tanto, los resultados aportados por el estudio microbiológico: asociadas a la muestra superficial existía una mayor proporción de bacterias aerobias capaces de oxidar el mineral, cuya actividad metabólica quedó reflejada en la aparición de productos de oxidación de los sulfuros. En la parte más profunda de la columna, el ambiente reductor, la ausencia de oxígeno y la actividad metabólica de las BRS predominaron, de tal modo que no se detectaron productos de oxidación del mineral, sino productos de precipitación debido a la presencia de un ambiente reductor con  $H_2S$ .

El comportamiento de la muestra Mh2ext fue intermedio: por un lado, aún aparecen asociados a esta muestra los productos de oxidación de la pirita; y por otro, se detectó el efecto de la disolución del  $PbS$  y del  $CuFeS_2$  porque los picos tuvieron pequeña intensidad.

Acompañan al mineral, además, restos de los silicatos  $\text{Ca}_5\text{Si}_3\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{K}_2\text{Mg}_5\text{Si}_{12}\text{O}_{30}$ .

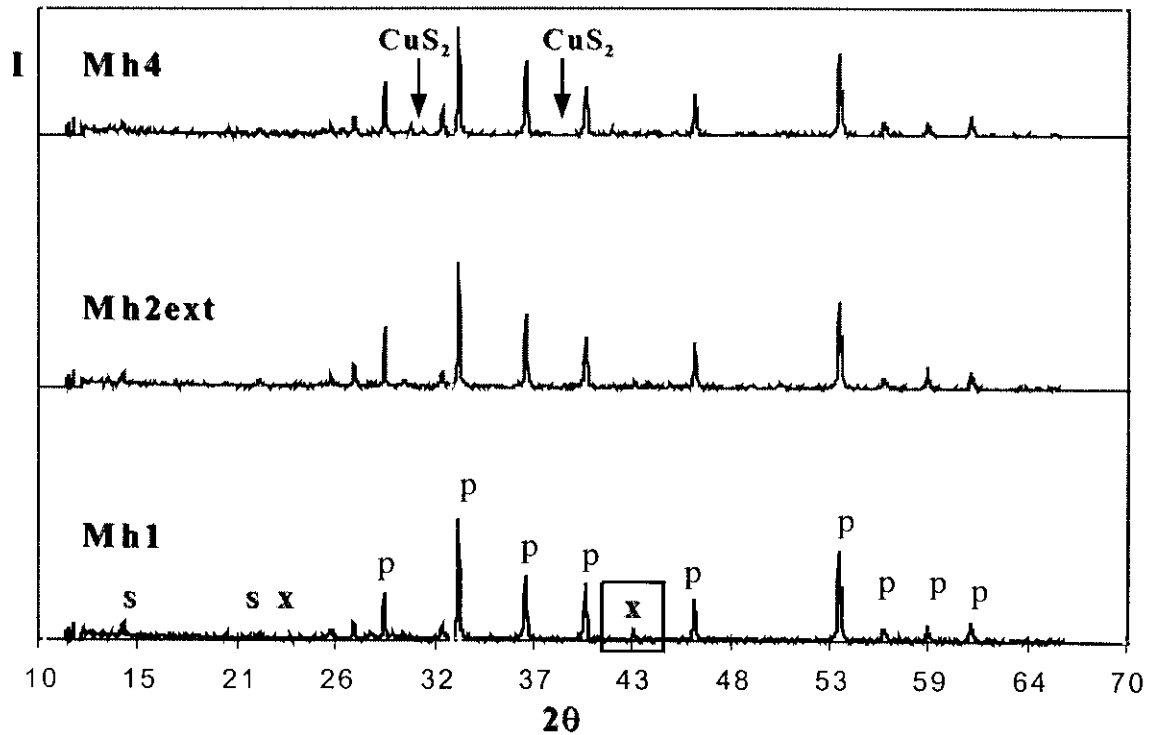


Figura 106: Difractogramas correspondientes a muestras del desmonte de la columna M (p, pirita; x, sulfato de plomo; s, silicato)

• *Columnas H-S, S, L y Li*

En el desmonte de las columnas pequeñas se tomaron tan sólo dos muestras de cada una, correspondientes al mineral superficial ( $X_s$ ) y al mineral profundo ( $X_p$ ). A estas muestras se les realizó una determinación microbiológica, así como al último drenaje de cada una de ellas. La distribución microbiológica en las columnas se detalla en la Tabla XXXV. La presencia de microorganismos en el último drenaje de cada columna se muestra en la Tabla XXXVI.

Se detectó una presencia importante de bacterias (azufre y hierro-oxidantes) en todas las columnas salvo en la columna S, lo que estuvo de acuerdo con el grado de meteorización alcanzado en cada una de ellas (ver análisis químicos de los drenajes correspondientes).

Estas bacterias estuvieron asociadas tanto a las muestras superficiales como profundas, no existiendo diferencias apreciables entre el número de bacterias contabilizadas en las muestras procedentes de ambos puntos. Las columnas tuvieron una altura de lecho pequeña (de tan solo 30 cm) y presentaron oxigenación tanto superficial como a través del tubo de drenaje, por tanto, no existieron condicionantes de tipo ambiental que pudieran inducir a la selección de especies.

Tabla XXXV: Distribución microbiológica en las columnas pequeñas de meteorización

Columna/ Especie	H-S <sub>s</sub>	H-S <sub>p</sub>	S <sub>s</sub>	S <sub>p</sub>	L <sub>s</sub>	L <sub>p</sub>	Li <sub>s</sub>	Li <sub>p</sub>
Fe-oxte (cél/g mineral)	$4,5 \times 10^4$	$5 \times 10^4$	$4,5 \times 10$	-	$15 \times 10^2$	$9,5 \times 10^2$	$5 \times 10^4$	$5 \times 10^4$
S-oxte (cél/g mineral)	-	-	-	-	0,08	0,08	0,18	0,18

-: crecimiento negativo

Tabla XXXVI: Microorganismos asociados al efluente de las columnas pequeñas de meteorización

Especie/columna	H-S	S	L	Li
Fe-oxidante (cél/ml)	$1,8 \times 10^3$	-	$2,9 \times 10^2$	$2,1 \times 10^3$
S-oxidante (cél/ml)	$1,8 \times 10^5$	-	$6,5 \times 10^2$	$1,8 \times 10^4$

La presencia de bacterias en los respectivos drenajes se debió al arrastre de las mismas durante los riegos. Los resultados del recuento de bacterias en los drenajes de las columnas fueron coherentes con el recuento de bacterias asociadas al mineral en cada columna: aparecieron bacterias en todos los efluentes salvo en los correspondientes a la columna S.

Existió una proporción importante de bacterias hierro-oxidantes asociadas al mineral, lo que no sucedió en el caso de las bacterias azufre-oxidantes, probablemente porque a lo largo de los lavados sucesivos éstas pudieron desprenderse del mineral con más facilidad, lo que se confirmó con el hecho de que en los drenajes sí se contabilizaron ambas especies.

Todos los resultados fueron consistentes con los obtenidos en los ensayos de meteorización. Así, la presencia de bacterias asociadas al mineral confirmó que en la meteorización de un residuo hubo participación bacteriana, fruto de la cual se generó una acidez más importante que cuando se inhibió dicha actividad. Esta población “natural” que apareció asociada al mineral terminó creando su propio microambiente que le permitió vivir en condiciones óptimas de crecimiento. En este sentido, en los ensayos en matraz agitado ya se había comprobado cómo el grado de disolución que se alcanzó en experimentos inoculados, en condiciones óptimas, fue similar al de aquellos otros en los que la pulpa se dejó evolucionar libremente y en los que terminaron desarrollándose las bacterias. Así, el número de células que se encontró en la columna H-S fue similar al que apareció en la columna inoculada (Li) al final de los experimentos. Y aunque en L aparecieron valores inferiores, esto se debió a que la duración del experimento L/Li fue inferior al de H-S/S.

Relacionando datos del mismo experimento (es decir, para igual número de ciclos, L frente a Li), el número de bacterias fue siempre superior en el caso de la columna inoculada Li, tanto cuando estuvieron asociadas al mineral como cuando se contabilizaron en los efluentes. Aunque, como se acaba de indicar, si el experimento se hubiera dejado evolucionar un tiempo suficiente, las poblaciones bacterianas en ambas columnas se hubieran igualado.

El recuento de BRS dió en todos los casos resultado negativo. El pequeño tamaño de las columnas ocasionó que no llegaran a establecerse condiciones anóxicas, debido a que existió un intercambio de oxígeno tanto a nivel superficial como a través del tubo de drenaje. Este mismo efecto quedó reflejado en el hecho de que tampoco se establecieron diferencias entre el número de microorganismos aerobios asociados a muestras superficiales y profundas para una misma columna.

#### -Ensayos de actividad

---

En la caracterización microbiológica de las muestras obtenidas en el desmonte no sólo fue importante considerar el número de bacterias presentes sino también el estado de actividad en el que éstas se encontraban. Dado que fue en la columna M donde se encontró una mayor variabilidad y selección microbiológica (ver Tabla XXXIV) se decidió evaluar la “actividad oxidante y reductora” en las distintas capas de la columna M, para lo cual se preparon dos ensayos (descritos en el apartado 2.4.3.c.): uno para el seguimiento de la

oxidación bacteriana del ion ferroso y otro para evaluar la reducción biológica de los aniones sulfato.

- *Actividad oxidante: oxidación bacteriana del ion ferroso*

El parámetro elegido para el seguimiento de la actividad oxidante fue la concentración de ion ferroso, y como indicativo indirecto se midió también la evolución del pH durante los experimentos. Se seleccionaron cuatro muestras representativas de los distintos puntos de la columna: Mh1, Mh<sub>2</sub>int, Mh<sub>2</sub>ext y Mh<sub>4</sub>int.

Los ensayos de actividad hierro-oxidante mostraron que las bacterias asociadas al mineral en la columna M estuvieron activas (la disminución de la concentración de hierro fue claramente más rápida que en el ensayo en blanco, Figura 107), pero, sin embargo, no se observaron diferencias importantes entre los distintos puntos de muestreo considerados. La actividad que presentaron las bacterias fue similar en todos los casos, lo que se puso de manifiesto no sólo en la evolución de la concentración de ion ferroso sino también en la evolución del pH (Figuras 107 y 108). Tampoco se observaron diferencias de actividad entre las muestras interiores y exteriores, pese a que sí se había observado la aparición de precipitados rojizos (indicativo de oxidación) en las superficies externas del mineral.

Estos resultados pueden explicarse en base al modelo elegido, y ya han sido comentados anteriormente: las características de la columna (altura de lecho, régimen de riego, etc) provocaron que las condiciones químicas a lo largo de ella no fueran especialmente diferentes. Si bien existieron zonas (las correspondientes a la zona superficial, punto de drenaje y capa más externa del mineral) en las que se detectó una mayor presencia de bacterias (ver Tabla XXXIV) y una mayor transformación del residuo de pirita (ver Figuras 107 y 108); sin embargo, la actividad de las bacterias hierro-oxidantes en toda la columna fue semejante porque en ningún punto existieron condiciones químicas que inhibieran su actividad. Ahora bien, desde un punto de vista cuantitativo hubo zonas en las que estuvieron presentes en mayor proporción porque la oxidación fue mayor. Pero se puede decir que las que estuvieron, siempre estuvieron activas.

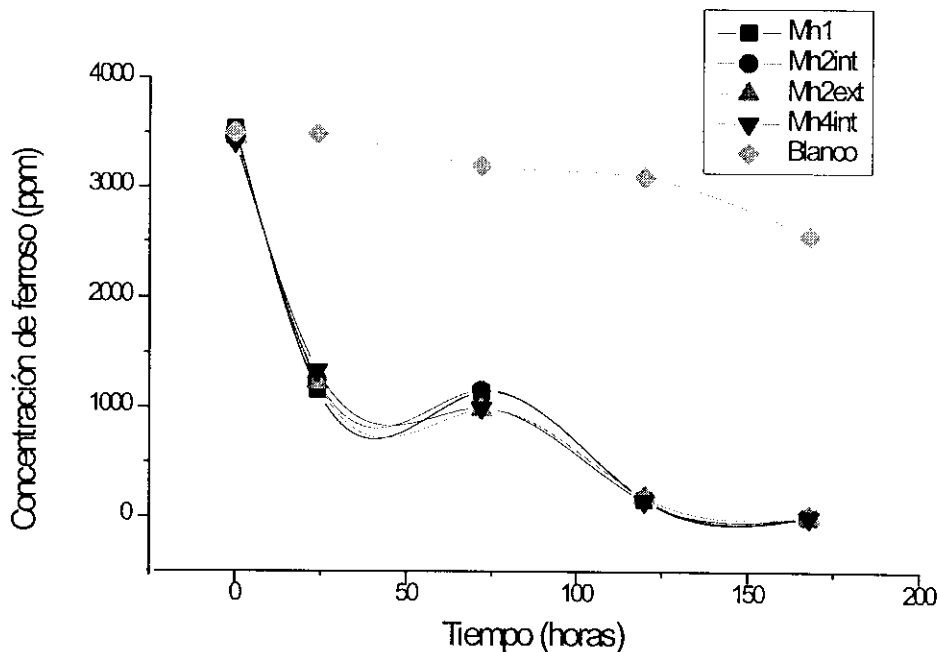


Figura 107: Evolución de la concentración de Fe<sup>2+</sup> en los ensayos de actividad oxidante de hierro

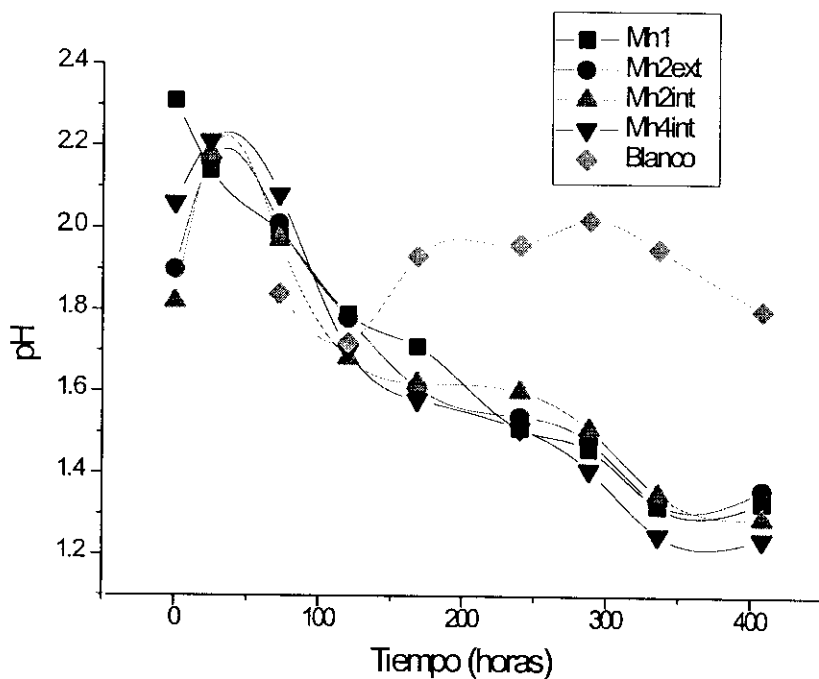


Figura 108: Evolución del pH en los ensayos de actividad oxidante de hierro

• *Actividad reductora: reducción biológica de sulfatos*

La actividad reductora se evaluó en la columna a través del seguimiento de la concentración de sulfatos y, de un modo indirecto, a través de la evolución del pH en muestras seleccionadas a distintos niveles.

A diferencia de lo que sucedió en el caso de las bacterias oxidantes de hierro, en el que no se observaron diferencias de actividad a lo largo de la columna, las bacterias reductoras de sulfatos sí fueron sensibles a las condiciones químicas que se establecieron en los distintos puntos, especialmente a la presencia de oxígeno, de modo que estas bacterias sólo crecieron a partir de las muestras más profundas de la columna (Mh3 y Mh4int). En las figuras 109 y 110 se muestran los resultados de los ensayos de actividad. Éstos revelan que la actividad reductora estuvo presente exclusivamente en los puntos más profundos e interiores de la columna. La disminución de la concentración de sulfatos y el incremento en el pH pusieron de manifiesto que las BRS presentes en Mh3 y en Mh4int se encontraban activas, lo que no sucedió en el caso de la muestra Mh1. Este resultado fue consistente con el obtenido en el recuento de bacterias, en el que tampoco se había detectado crecimiento asociado a la muestra Mh1. Como se detallará ampliamente en el apartado 3.3., ambos factores fueron indicativos de actividad reductora.

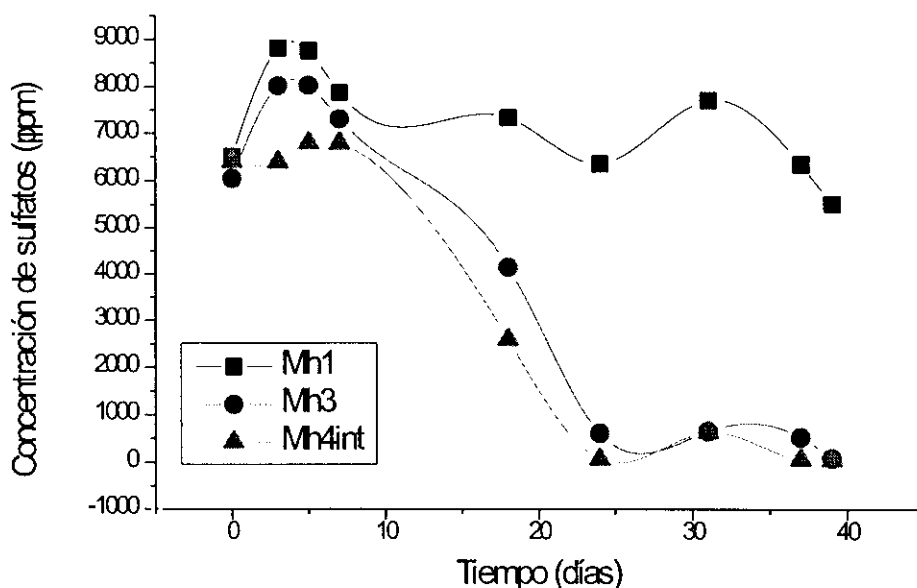


Figura 109: Evolución de la concentración de  $\text{SO}_4^{2-}$  en los ensayos de actividad reductora

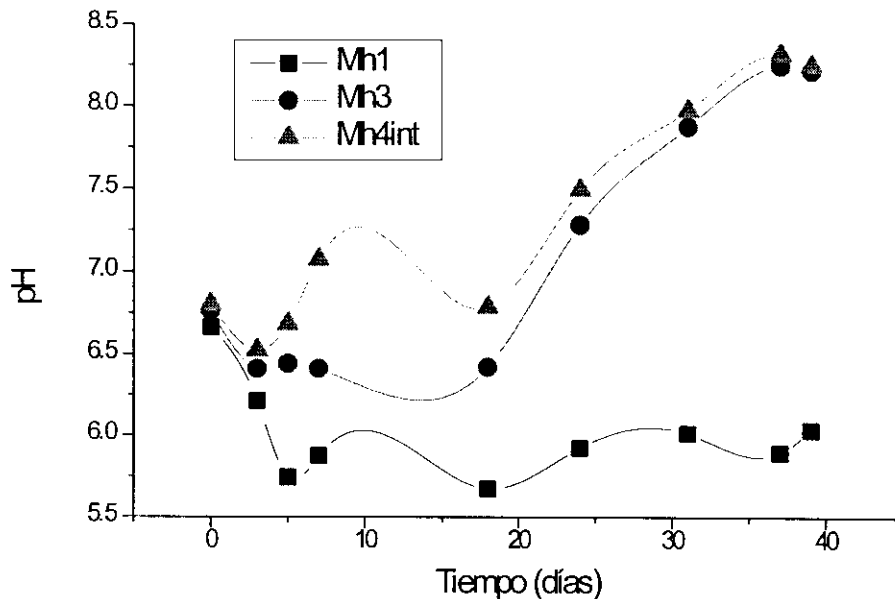


Figura 110: Evolución del pH en los ensayos de actividad reductora

El desmonte de la columna M aportó también datos acerca del “estado de meteorización” en que se encontró el mineral. Confirmando los datos químicos asociados a los drenajes de meteorización y los resultados del estudio mineralógico de las muestras, se comprobó que efectivamente la pirita de la columna M no se encontraba apenas oxidada.

El desmonte de la columna M confirmó los datos obtenidos durante la meteorización, así como la distribución microbiológica establecida a partir de los recuentos. Existió presencia importante de microorganismos que se seleccionaron según las condiciones establecidas en la columna. Aunque, desde un punto de vista cuantitativo, existió mayor presencia de bacterias litoautótrofas asociadas a las muestras más exteriores, sin embargo, la actividad evaluada en cada una de las zonas de la columna no mostró diferencias importantes porque el riego (y por tanto la oxigenación) de las columnas contribuyó a la homogenización.

Las BRS, sin embargo, sí fueron sensibles a las condiciones físico-químicas establecidas y no llegaron a crecer en ciertos puntos de la columna (h1, h2ext, h4ext) en los que la presencia de oxígeno fue más importante.

### 3.2.3.- Transformación química y sucesión microbológica: modelo en columna

En el apartado 2.3.5. ha quedado descrito el modelo en columna elegido para el estudio de las transformaciones químicas y microbológicas que acompañaron a la meteorización del residuo. Mediante este modelo, se trataron de reproducir las condiciones del sistema en el “ambiente A” (Figura 4), es decir, cuando la pirita estuvo sumergida bajo agua. Otras situaciones más específicas, de ambientes particulares del sistema, han sido reproducidas a través de los experimentos de “meteorización forzada” descritos en apartados anteriores.

El modelo para el estudio de la sucesión microbológica (SM) es un modelo en columna mediante el cual se evalúan los cambios microbológicos que acompañan a las transformaciones químicas del mineral. En nuestro caso, no se introdujo ningún factor (riegos, ciclos de sequedad) que pudiera alterar la propia evolución del residuo, salvo la temperatura, que se mantuvo a 30°C mediante una caja termostatzada, y la aireación forzada, que se provocó con una bomba peristáltica con el fin de simular el efecto del aire y el movimiento del agua. Los puntos de muestreo se describieron en su momento y se encuentran reflejados en la Figura 11.

#### 3.2.3.a.-Transformación química

La evolución química de las muestras tomadas en los diferentes puntos se ilustra en las Figuras 111 a 115. La primera observación importante que cabe resaltar es que en la columna no llegó a establecerse un gradiente químico en la capa de agua sobre el mineral (algo que sí sucedía en la presa de estériles). Esta podría considerarse como una objeción al modelo propuesto debido a que no se consiguió reproducir las condiciones en la presa. Dos factores han podido contribuir a este efecto: por un lado, una altura de columna insuficiente; y por otro, la aireación y el movimiento provocados en el agua, que pudo conducir probablemente a la mezcla de las distintas capas que se hubieran podido ir formando. Aún así, el modelo reprodujo bastante bien las condiciones del sistema encontradas en la presa, como enseguida se verá.

De acuerdo con esta primera observación, la evolución del pH en cada uno de los puntos de muestreo disminuyó de un modo semejante hasta alcanzar valores equivalentes a los que se encontraron en la superficie de la presa (ver Figura 3), no existiendo diferencias entre dichos cuatro puntos de muestreo (Figura 111).

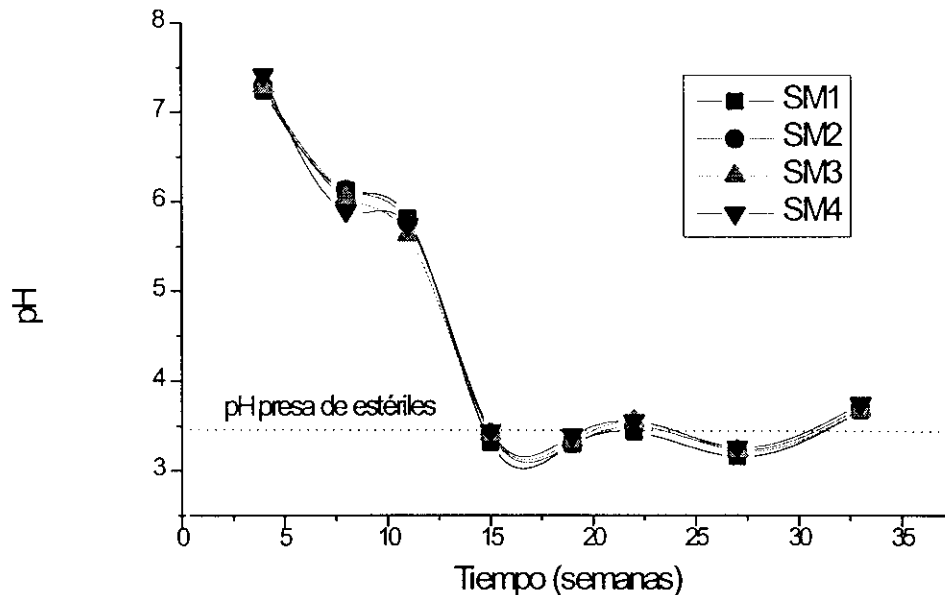


Figura 111: Evolución del pH en la columna SM

La concentración de metales en solución en cada uno de los puntos de muestreo estuvo siempre por debajo de los 80 mg/l, salvo en el caso del cobre, el cual no llegó a disolverse y se mantuvo siempre en valores comprendidos entre las 0,1 y 0,3 ppm. Estas concentraciones fueron del orden de las que se midieron en la presa en el punto CV-2 (ver Figura 3), o lo que es lo mismo, en el punto correspondiente al agua superficial. En la Figura 112 se representan los niveles máximos de concentración metálica medidos en los cuatro puntos de la columna en comparación con los valores de la presa.

Todas las muestras presentaron niveles similares de concentración metálica, con un pequeño incremento para las concentraciones medidas en la muestra más superficial (SM1) y para la muestra más próxima a la superficie del mineral (SM4). Pero básicamente, al igual que se observaba para el caso del pH, el grado de disolución metálica medida en los cuatro puntos, así como su evolución a lo largo del tiempo (Figuras 113a y 113b), fueron similares en todos los casos. La evolución de la concentración de metales en los puntos de muestreo presentó un pico ascendente que coincidió con un descenso brusco de pH.

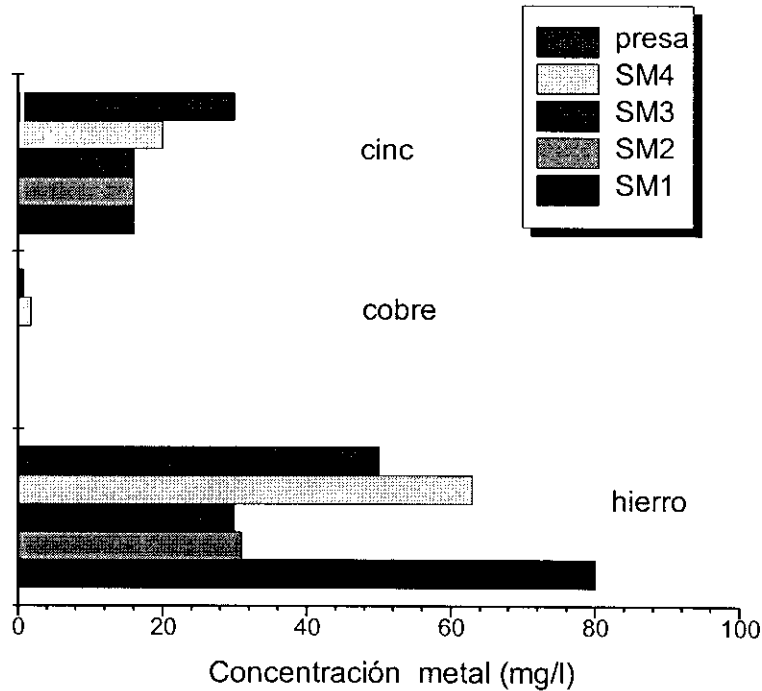
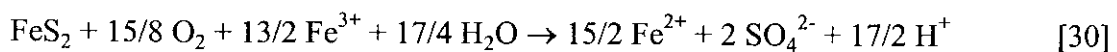


Figura 112: Comparación de los valores de concentración de metales medidos en la presa de estériles y en la columna SM

Este comportamiento puede explicarse teniendo en cuenta que el oxígeno pudo acceder a la interfase sólido-líquido por la aireación forzada a la que se sometió a la columna. Como consecuencia, parte de la piritita superficial se oxidó (ecuación [30]) ocasionando un descenso de pH y un incremento en la concentración de metales en solución:



Esta oxidación no progresó debido a la formación de un precipitado pardo-rojizo que se depositó sobre la interfase sólido-líquido, aislando el mineral e impidiendo el progreso de la oxidación. De hecho, este precipitado se identificó mediante análisis por difracción de rayos-X resultando ser un producto de oxidación de la piritita, en concreto, una mezcla de óxido férrico ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) y de sulfato de hierro y amonio  $(\text{NH}_4)_3\text{Fe}(\text{SO}_4)_3$  (Figura 114).

La posterior precipitación de los metales disueltos en forma de óxidos y sulfatos hizo disminuir su concentración en solución.

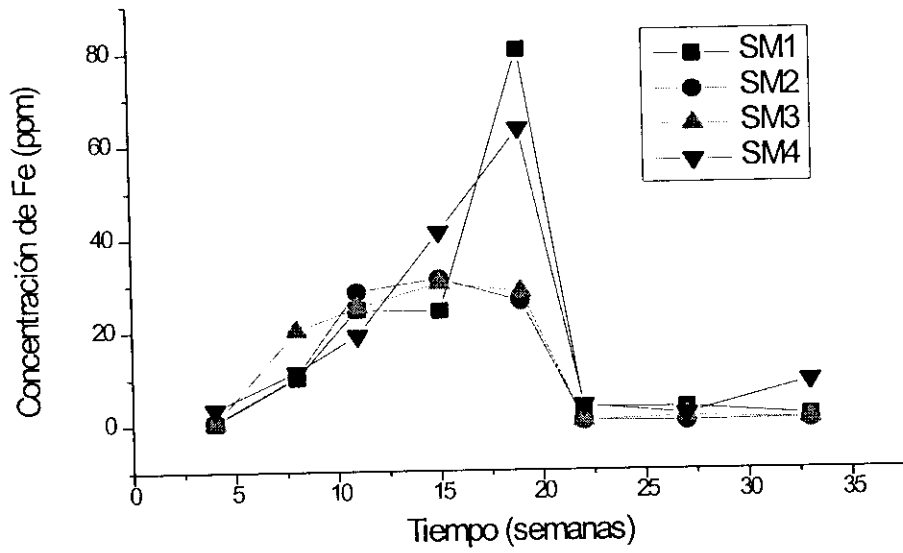


Figura 113a: Evolución de la concentración de Fe<sub>t</sub> en los cuatro puntos de la columna de SM

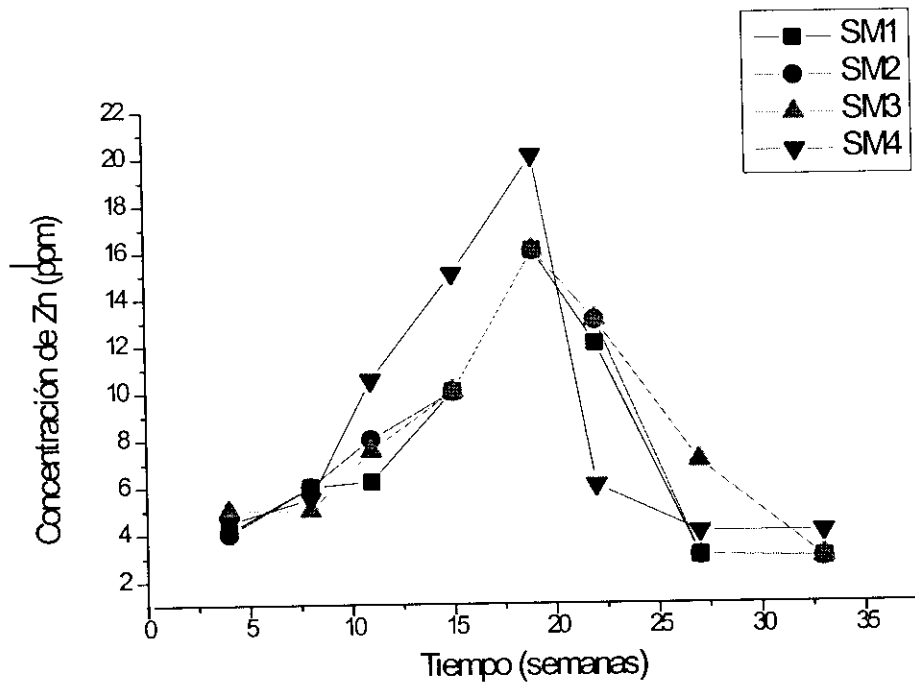


Figura 113b: Evolución de la concentración de Zn en los cuatro puntos de la columna de SM

La columna se estabilizó, finalmente, en una situación comparable a la que se ha reproducido mediante la columna (S) (ver apdo. 3.2.2.c.) y que corresponde a la zona de mineral sumergido en la presa de estériles (ambiente C, Figura 4).

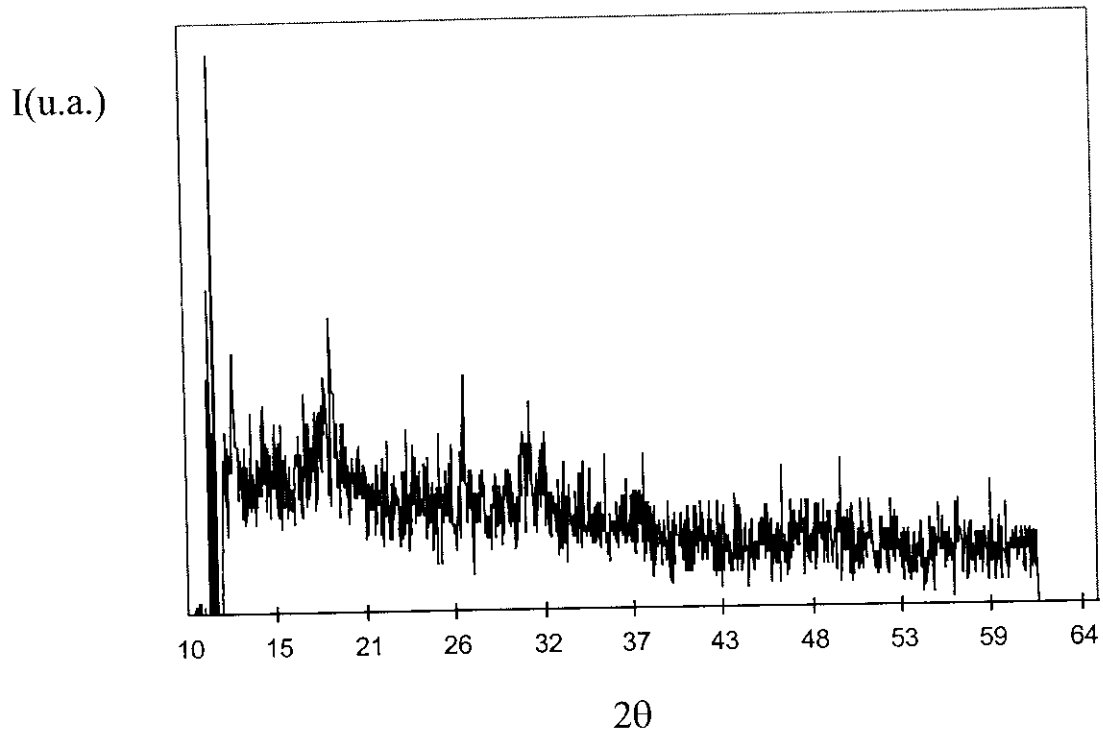


Figura 114: Diffractograma correspondiente al precipitado generado en la columna SM

La evolución de la concentración de sulfatos (Figura 115) también fue semejante en los cuatro puntos de muestreo, con valores iniciales bastante elevados (en torno a las 1.500-1.800 ppm) lo que no sucedía con la concentración inicial de metales. La capa de agua que quedó sobre el mineral, una vez que la pulpa sedimentó en la columna, correspondió al agua que acompañaba al residuo sólido a la salida de planta. En este agua estuvieron presentes los iones sulfito que acompañaban a la pulpa en una concentración en torno a las 250 ppm (ver análisis químico correspondiente a la muestra P.E., Tabla X). Los datos del primer muestreo fueron tomados a las cuatro semanas de haber montado la columna. Este tiempo fue suficiente para que se oxidaran los sulfitos presentes en el agua. Por eso el valor de la concentración de sulfatos en el primer muestreo ya estuvo en torno a las 1.500 ppm.

Los máximos niveles de concentración de sulfatos (en torno a la semana 20) correspondieron, por un lado, a la ligera oxidación de la pirita comentada anteriormente y, en mayor medida, a la oxidación del ion sulfito presente en el agua que acompañaba a la

pulpa. De hecho, estos valores máximos se correspondieron con el valor mínimo de pH, del orden de 3,5, precisamente el valor de pH final de oxidación del ion sulfito.

La concentración de sulfatos disminuyó a partir de la semana 20 debido a su precipitación formando una capa sobre la interfase sólido/líquido, cuya composición se ha descrito anteriormente.

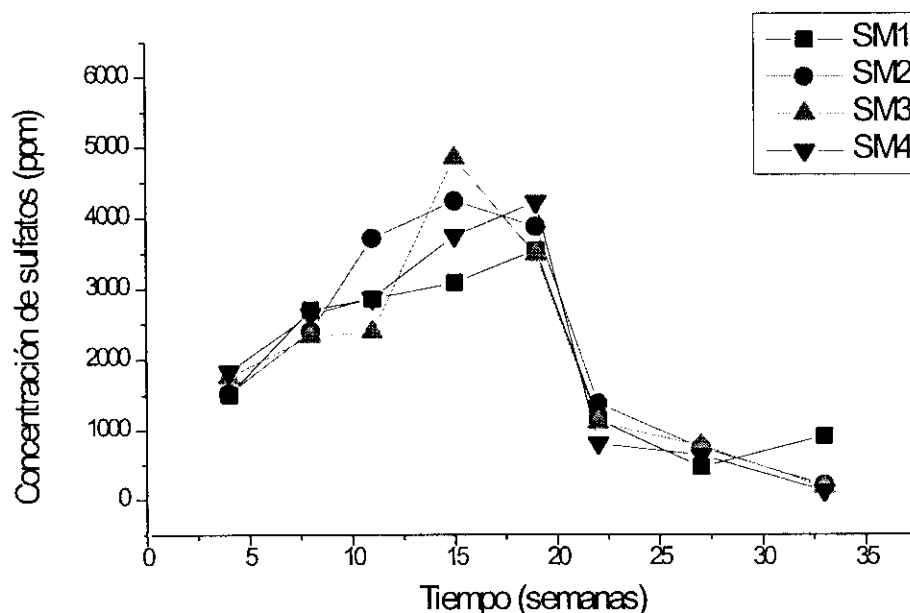


Figura 115: Evolución de la concentración de sulfatos en los cuatro puntos de la columna de SM

### 3.2.3.b.-Sucesión microbiológica

El seguimiento microbiológico de la columna tuvo un doble objetivo: por un lado, determinar la posible variabilidad de especies asociadas al mineral, para así contrastar con los resultados obtenidos en el muestreo de la presa de estériles; y por otro lado, estudiar la posible sucesión microbiológica que podría acompañar a la evolución química en cada uno de los puntos del sistema.

Para realizar este seguimiento, se incorporó un nuevo punto de toma de muestras, SM5 (Figura 11), correspondiente al mineral del fondo de la columna el cual se muestreó a través de un “cajetín” diseñado a tal efecto. Hay que destacar que esta columna, a diferencia de las otras columnas grandes de meteorización, M y M2, nunca se drenó, lo

cual permitió que, como enseguida se verá, en el fondo se establecieran estrictas condiciones anaeróbicas.

El análisis microbiológico de las muestras sucesivas mostró, en primer lugar, que hubo presencia de microorganismos asociados a la pulpa desde el principio, predominando, en un primer momento, cuando las condiciones químicas fueron básicas, los heterótrofos. Este aspecto corrobora los datos reales obtenidos al muestrear el sistema, pues, como se discutió en el apartado 3.1.4., se comprobó la presencia de microorganismos asociados al mineral desde las primeras muestras tomadas en la planta de flotación.

El segundo aspecto que cabe señalar es que la presencia de microorganismos fue bastante homogénea en los cuatro puntos de muestro correspondientes a la capa de agua sobre el mineral, aunque se observó un incremento tanto de heterótrofos como de bacterias azufre-oxidantes en los puntos SM1 y SM4, donde se había observado un incremento en la concentración de metales. Tanto los heterótrofos cuantificados como los litoautótrofos son microorganismos aerobios y, como ya se indicó anteriormente, los puntos SM1 y SM4 fueron los de mayor concentración de oxígeno: SM1, por estar en contacto con la superficie, y SM4 porque fue aquí donde se producía el burbujeo de aire forzado, a la altura de la interfase sólido-líquido.

Los microorganismos heterótrofos (cuantificados como la suma de bacterias, levaduras y hongos) fueron detectados durante todo el periodo que duró la observación de la columna, aunque su presencia fue menos importante cuando al ambiente se volvió más ácido. En estas condiciones, a valores de pH por debajo de 3, predominaron las bacterias litoautótrofas de las que se cuantificaron exclusivamente las azufre-oxidantes (en el recuento mediante NMP no crecieron bacterias hierro-oxidantes) (Figuras 116 y 117).

El crecimiento de bacterias reductoras de sulfato (BRS) sólo se detectó en la muestra SM5. Éstas empezaron a aparecer a partir de la semana 15, probablemente porque hasta entonces no llegaron a establecerse condiciones anaerobias en el fondo de la columna (Figura 118).

A partir de la muestra SM5 se realizaron algunos ensayos de crecimiento de BRS, comprobándose que este cultivo mixto creció muy bien a valores de pH comprendidos entre 5 y 7, estando sin embargo inhibido a pH 4. También crecieron bien en presencia de cobre, en concreto, a la concentración de 25 ppm.

Además, se investigó la presencia de otro tipo de microorganismos que pudieran estar asociados al mineral en este punto (SM5). Por ello, se realizaron ensayos de presencia de bacterias litoautótrofas azufre-oxidantes y hierro-oxidantes, y se evaluó la presencia de heterótrofos. El resultado fue un crecimiento muy débil de microorganismos litoautótrofos y una presencia importante de heterótrofos. Las condiciones químicas del fondo de la columna (pH, Eh, metales, sulfatos, etc) seleccionaron las especies microbiológicas de modo que las bacterias litoautótrofas, que necesitan básicamente oxígeno y ambientes ácidos para desarrollarse, no pudieron crecer en estas condiciones. No sucedió lo mismo con el amplio grupo de heterótrofos del que pudieron desarrollarse algunas especies neutrófilas.

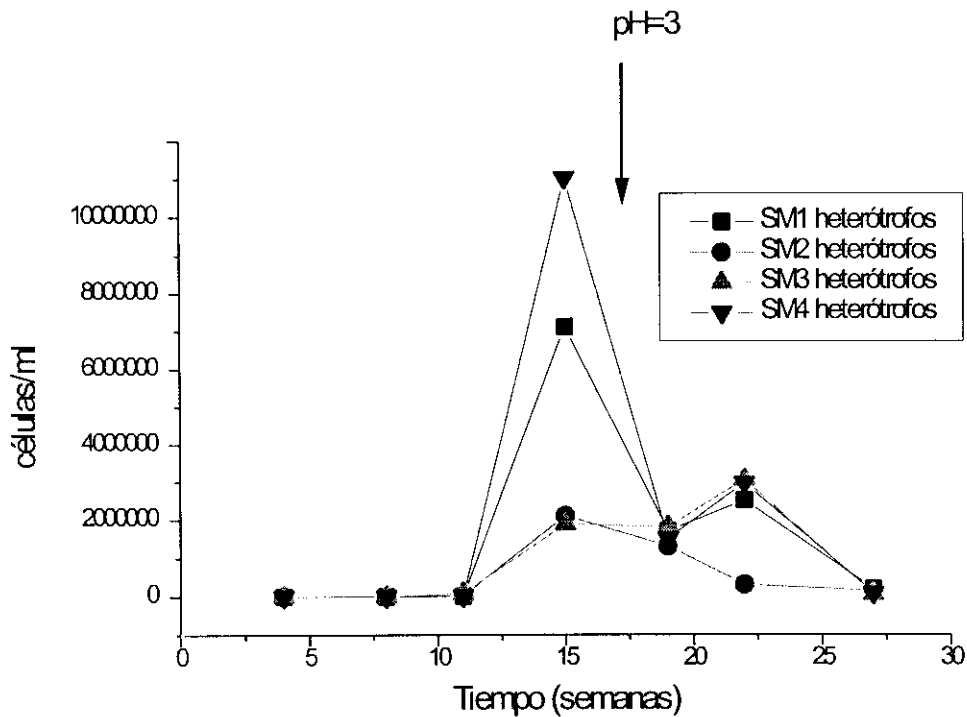


Figura 116: Evolución de la población de heterótrofos en la columna de SM

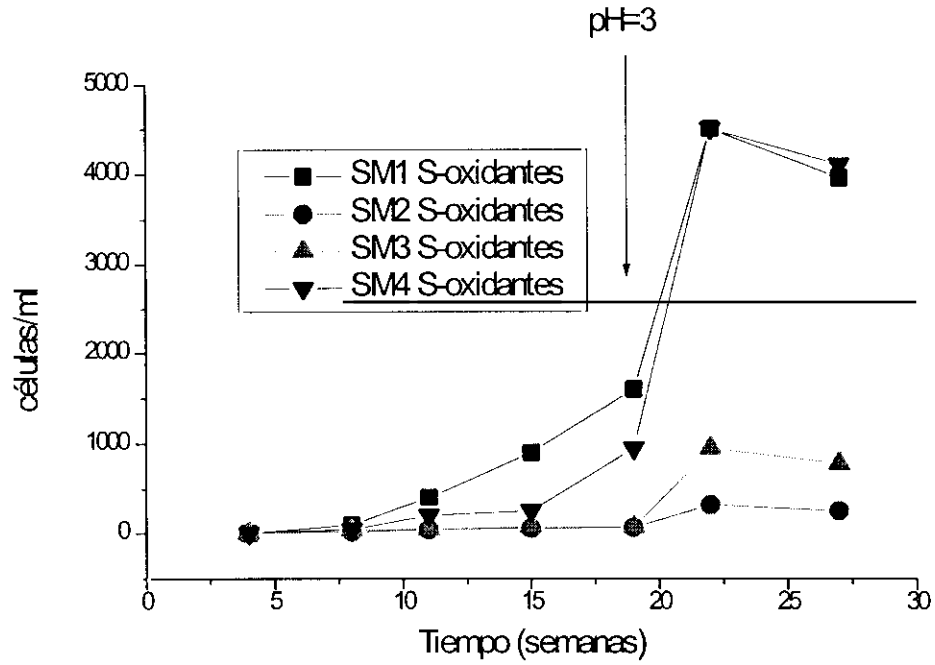


Figura 117: Evolución de la población de bacterias litoautótrofas azufre-oxidantes en la columna de SM

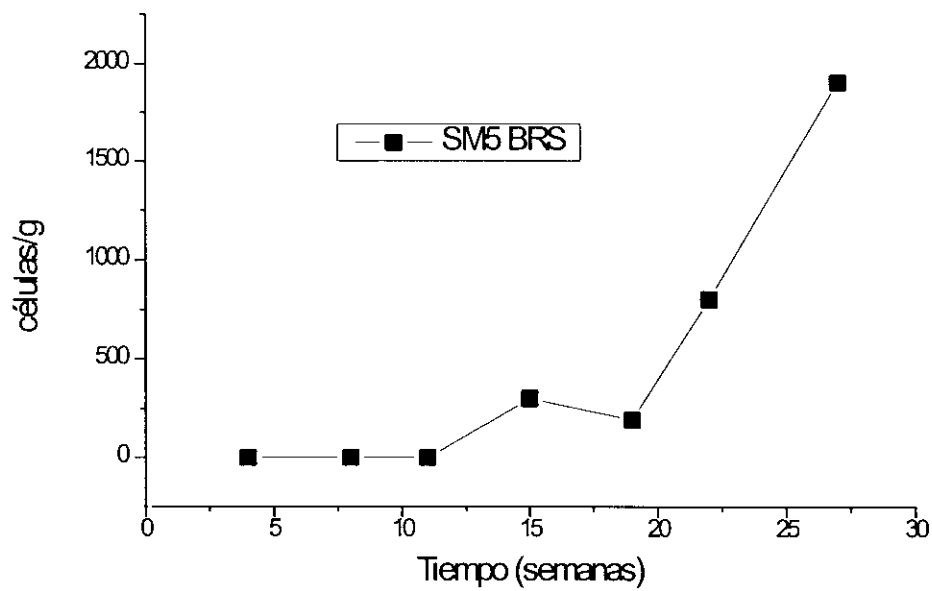


Figura 118: Crecimiento de BRS en la columna de SM

### **3.2.3.c.-Algunas consideraciones sobre los resultados de la columna de sucesión microbiológica**

Esta columna vino a representar las condiciones de “mineral sumergido” que se encontraron en la presa en situación de “presa activa”. La situación que se estableció en la columna de SM fue intermedia a la de las columnas L y S.

Por un lado, si las condiciones hubieran sido como en la columna S, puesto que también se trata de una columna con mineral sumergido, sin drenaje ni ciclos, el pH no habría descendido y tampoco se habría observado disolución metálica.

Por otro lado, si las condiciones hubieran sido como en las columnas L ó H-S, el pH habría bajado por debajo de 3,5 y la concentración de metales en solución habría sido mucho mayor. Lo que se observó fue que el valor de pH estuvo en el orden del pH final de la oxidación del ion sulfito, y que prácticamente no existió nada de disolución metálica.

Aunque la columna de SM sirvió para reproducir las condiciones de la presa en la zona correspondiente al mineral sumergido (ver Figura 4, “ambiente C”), el modelo presentó una limitación significativa puesto que la altura de la columna de agua sobre el mineral fue insuficiente, de tal manera que no se pudo establecer un gradiente químico, como se había observado en la presa.

No obstante, el modelo describió bien las dos zonas extremas (Figura 119): la zona superficial de la presa, con valores de pH del orden de 3 y concentración de metales en torno a las 50 ppm de Fe, 0,5 ppm de Cu, 40 ppm de Zn y concentración de sulfatos del orden de las 1.800 ppm.

En esta zona también se comprobó que predominaron los microorganismos aerobios, entre los que cabe destacar especialmente a las bacterias litoautótrofas. La columna reprodujo también la zona anaerobia, en la que se encontraron presentes las bacterias reductoras de sulfatos, además de las bacterias heterótrofas neutrófilas que se acomodaron a las condiciones más básicas del fondo de la columna.

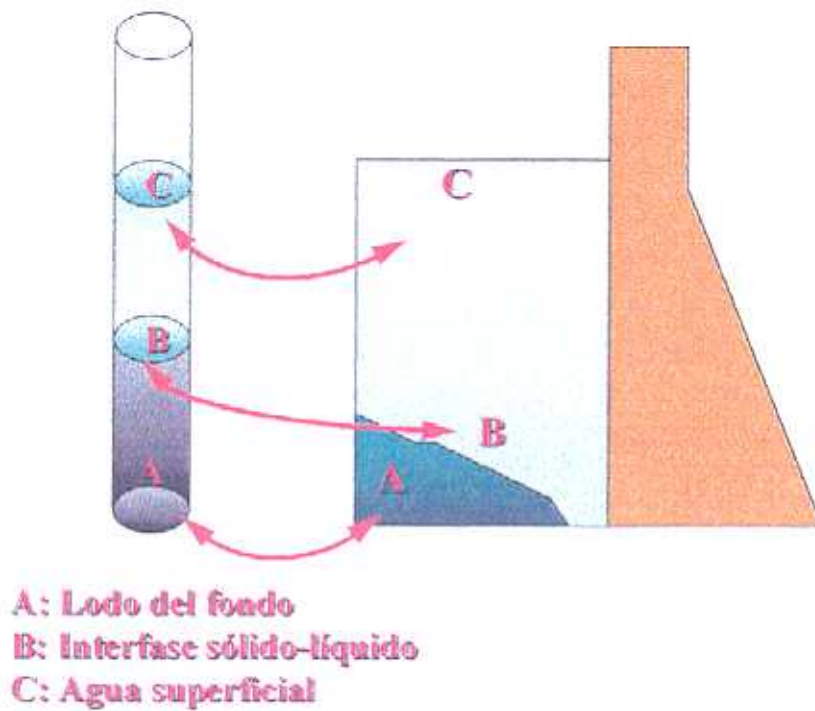


Figura 119: Diseño en columna empleado para la modelización del sistema

Se comprobó además que pese a que existió una presencia importante de bacterias asociadas al mineral, su actividad quedó enmascarada por la presencia del ion sulfito. Como ya se había descrito para el caso de la presa, también en la columna la presencia de dicho ion condicionó el estado físico-químico del sistema.

Finalmente, se verificó la sucesión de microorganismos que ocurrió de un modo paralelo a las condiciones químicas. Se comprobó cómo las distintas especies microbiológicas se acomodaron a las condiciones químicas más favorables para su crecimiento. Por ejemplo, las bacterias litoautótrofas azufre-oxidantes tuvieron un incremento importante de crecimiento cuando el pH descendió. Por su parte, las bacterias anaerobias reductoras de sulfatos estuvieron presentes de un modo más importante cuando se estableció la anaerobiosis en las capas inferiores de la columna.

#### 3.2.3.d.-Desmorte de la columna SM: caracterización micro y mineralógica de las muestra

Transcurridos los nueve meses que duró la experimentación en la columna SM, se procedió a su desmorte, para lo cual se seleccionaron una serie de muestras de las que se estudió su microbiología y su composición mineralógica.

En el desmonte de la columna SM, y teniendo en cuenta la altura del lecho del mineral, se eligieron las muestras que figuran marcadas en la figura 120.

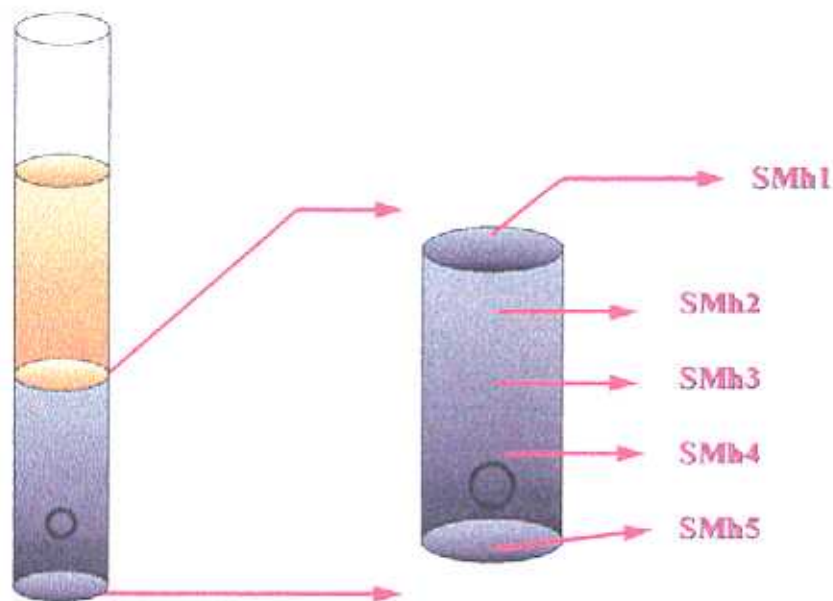


Figura 120. Muestras seleccionadas en el desmonte de la columna SM

#### -Distribución microbiológica

Se realizó un control de microorganismos en las distintas muestras seleccionadas que consistió en un recuento de bacterias azufre-oxidantes, bacterias hierro-oxidantes, heterótrofos totales (bacterias, levaduras y hongos) y bacterias anaerobias reductoras de sulfato. La distribución de microorganismos asociados a cada uno de los puntos seleccionados se detalla en la Tabla XXXVII.

Tabla XXXVII: Distribución de microorganismos asociados al mineral en la columna SM

Muestra	S-oxidantes (células/g)	Fe-oxidantes (células/g)	Heterótrofos (células/g)	BRS (células/g)
SMh1	$6 \times 10^4$	270	$23 \times 10^4$	-
SMh2	$24 \times 10^2$	150	$13 \times 10^3$	-
SMh3	$7 \times 10^2$	170	$10^2$	+
SMh4	$16 \times 10$	170	104	+
SMh5	$12 \times 10$	120	$27 \times 10$	$2 \times 10^2$

-: crecimiento negativo; +: crecimiento positivo

A diferencia de lo que sucedió en la capa de agua sobre el mineral, en la que no se detectó presencia de bacterias oxidantes de hierro, sin embargo, sí se encontró una presencia importante de bacterias hierro-oxidantes asociadas a la pirita, que estuvieron homogéneamente distribuidas en todo el volumen de lecho de la columna. Más adelante, se evaluará la actividad oxidante que éstas presentaron.

Desde un punto de vista cuantitativo, el número de bacterias azufre-oxidantes asociadas al mineral fue superior al de bacterias hierro-oxidantes y también al número de bacterias que se encontraron en la capa de agua sobre el mineral (ver Figura 117). La mayor proporción de bacterias azufre-oxidantes se encontró en la muestra SMh1 correspondiente a la interfase sólido-líquido, muestra en la que existió mayor presencia de oxígeno debido a la aireación. Fue también en esta muestra donde se registró la mayor proporción de heterótrofos.

En general, la proporción de bacterias litoautótrofas (azufre y hierro-oxidantes) fue menor cuanto más profunda se encontraba la muestra en la columna debido al gradiente de oxígeno que se estableció con la profundidad, de tal manera que en la parte inferior se crearon condiciones absolutamente anaerobias. Esto no sucedió exactamente igual en la columna de meteorización (M). Como ya se había indicado, en esta columna el riego y el drenaje homogeneizaron las condiciones químicas. Por esto, en la columna M la presencia de bacterias litoautótrofas se detectó a lo largo de toda la altura de lecho en proporción bastante homogénea, algo que no sucedió en la columna SM.

Como cabía esperarse, las bacterias anaerobias reductoras de sulfatos estuvieron presentes fundamentalmente en la muestra más profunda de la columna (SMh5), aunque también se detectaron asociadas a las muestras SMh3 y SMh4. Más adelante, e igual que para el caso de las bacterias hierro-oxidantes, se evaluará su actividad.

### -Caracterización mineralógica -

Los resultados del análisis por difracción de rayos-X de las muestras mostraron que, en general, la transformación del mineral, que se recordará se encontraba bajo agua durante el experimento, fue bastante pequeña, aunque se detectaron ciertos cambios a lo largo de la columna.

Así, la interfase sólido-líquido se cubrió de un fina capa de un precipitado rojizo, muy fino, cuyo análisis reveló que se trataba de un precipitado de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_3$  (Figura

121). Como ya se comentó anteriormente, la superficie del mineral estuvo sometida al oxígeno que se burbujeó en la columna, lo que permitió que se desencadenara la actividad de las bacterias litoautótrofas oxidantes del mineral, cuya proporción fue máxima en este punto de la columna, según se acaba de reflejar (Tabla XXXVII).

Del mismo modo, el análisis mineralógico de la muestra más profunda reveló que, si bien la pirita menos alterada se encontraba en este punto (igual que sucedía en la muestra MH4, ver resultados del desmonte de la columna M), la presencia de sulfuros como PbS y CuS<sub>2</sub> (que no aparecían en la muestra de pulpa inicial, ver Figura 23) ponía de manifiesto la existencia de actividad microbiológica reductora de sulfatos, que promovió la reprecipitación de estos sulfuros (Figura 121). Precisamente, asociada al punto Smh5 fue donde se encontró la mayor presencia de BRS

Frente al porcentaje importante de meteorización que apareció en la muestra más superficial, la muestra más profunda reveló que la pirita se encontraba muy poco alterada. En este punto (igual que sucedía en la muestra Mh4, ver desmonte columna M), se detectó la presencia de sulfuros como PbS y CuS<sub>2</sub> que pusieron de manifiesto la existencia de actividad microbiológica reductora de sulfatos. Precisamente, asociada al punto SMh5 fue donde se encontró la mayor presencia de BRS.

En la columna SM, a diferencia de lo que sucedió en la columna de meteorización (M), los productos de la oxidación superficial de la pirita se acumularon sobre la interfase sólido-líquido. El régimen de riegos en la columna M provocó que estos productos se arrastraran con el agua y, de hecho, en el desmonte de la columna M, se encontraron restos de ellos entre las grietas del mineral. La columna SM fue una columna mucho más estática y por eso se formó una capa considerable de mineral meteorizado en la interfase sólido-líquido.

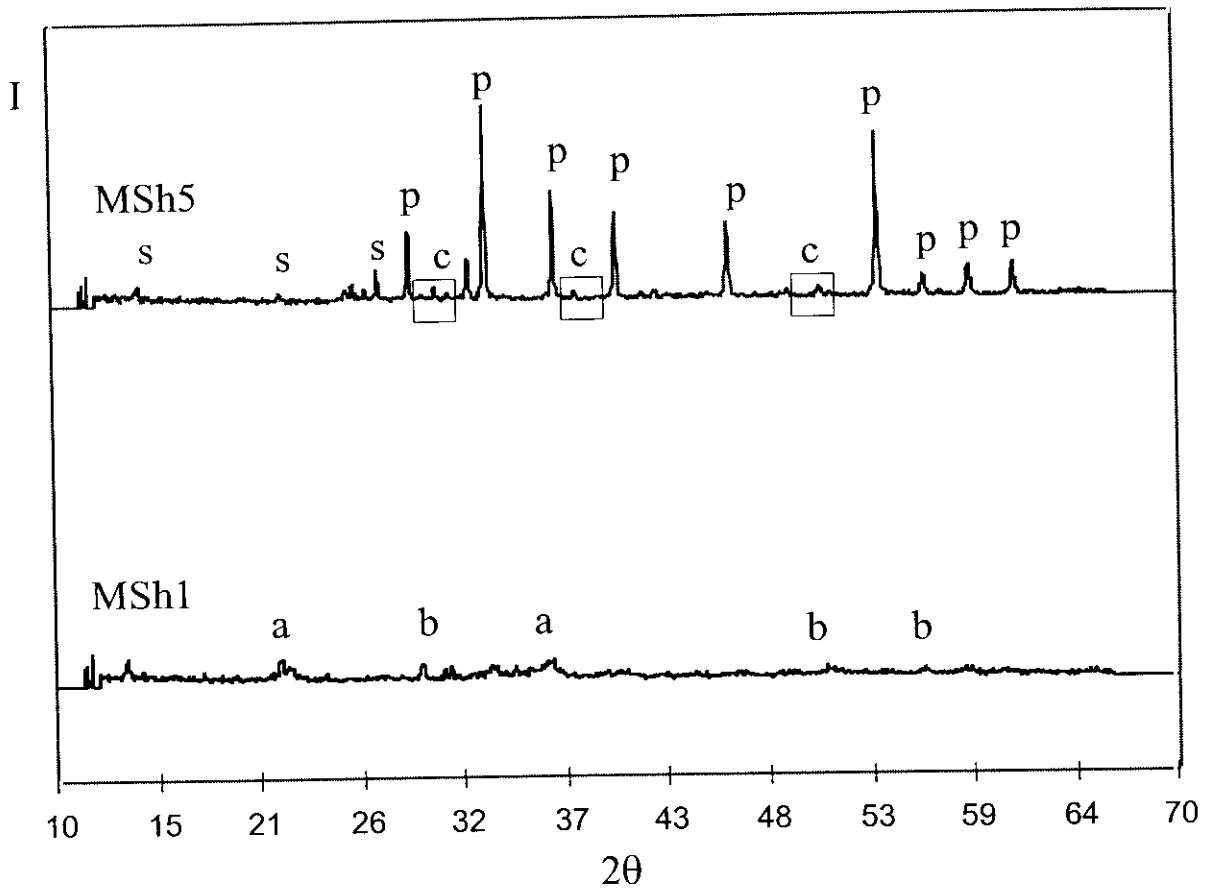


Figura 121: Difractogramas correspondientes a muestras seleccionadas en el desmonte de la columna SM.

a,  $(\text{NH}_4)_3\text{Fe}(\text{SO}_4)_3$ ; b,  $\text{FeO}(\text{OH})$ ; c,  $\text{CuS}_2$ ;

s,  $\text{K}_2\text{Mg}_5\text{Si}_{12}\text{O}_{30}$ ; p, pirita

Con el desmonte de la columna SM se acumularon nuevas evidencias y se confirmaron los resultados obtenidos durante los muestreos sucesivos en el sistema real de la presa de estériles: se confirmó que asociada al mineral existía una población importante de bacterias que se fueron desarrollando selectivamente a lo largo de la columna en función de las condiciones químicas que se iban generando. Es decir, mediante la columna SM se consiguió reproducir la estratificación microbiológica que se estableció en la presa: en las muestras más superficiales predominaron las bacterias litoautótrofas, aerobias y con capacidad para oxidar el mineral, mientras que en el fondo se desarrollaron las bacterias anaerobias reductoras de sulfatos cuya actividad promovió la precipitación de metales en forma de sulfuros.

Esta distribución microbiológica se estableció progresivamente, de tal manera que las bacterias se fueron sucediendo cuando las condiciones químicas se fueron haciendo adecuadas.

Los datos mineralógicos permitieron identificar todos los productos de la actividad microbiológica: óxidos y sulfatos procedentes de la actividad oxidante; sulfuros procedentes de la actividad reductora.

### **-Ensayos de actividad**

Al igual que para el caso de la columna de meteorización M (apdo. 3.2.2.c.), se seleccionaron distintas muestras representativas procedentes del desmonte de la columna SM para realizar los ensayos de actividad oxidante y reductora. La descripción de las condiciones de experimentación se detalló en el apartado 2.3.5.b..

#### **• *Actividad oxidante***

El recuento de microorganismos asociados a las distintas muestras del desmonte de SM puso de manifiesto que existía poca diferencia, desde un punto de vista cuantitativo, en cuanto a la presencia de bacterias oxidantes de hierro a lo largo de la columna, salvo para la muestra superficial SMh1. Estas bacterias se mostraron activas en las condiciones de crecimiento (medio, temperatura y agitación) en que se mantuvieron los cultivos, como puede apreciarse por el descenso en el valor de pH y en la concentración de ion ferroso en contraste con el ensayo en blanco. No se detectaron diferencias importantes en relación con la procedencia de la muestra a partir de los distintos niveles de la columna (Figuras 122 y 123). Sólomente la muestra SMh1 presentó una cinética de oxidación ligeramente superior a la del resto. Aunque esta débil tendencia es inapreciable en las gráficas, pudo constatarse a través del seguimiento de los cultivos (evolución del color, número de células, etc). Esta muestra fue tomada precisamente de la interfase sólido-líquido, lugar en el que existió una mayor actividad microbiológica gracias a la presencia de oxígeno.

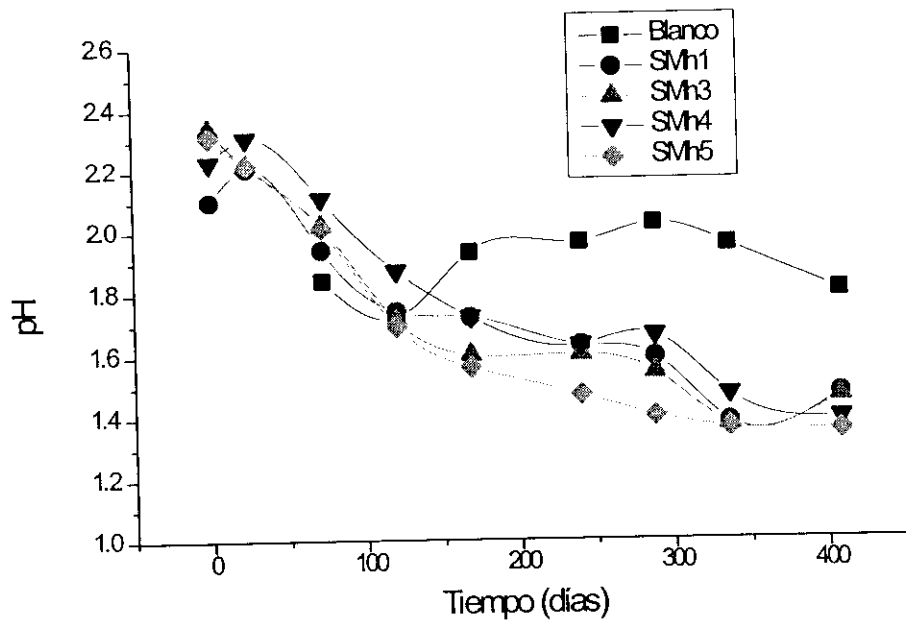


Figura 122: Evolución de la concentración de ion ferroso en los ensayos de actividad de la columna SM

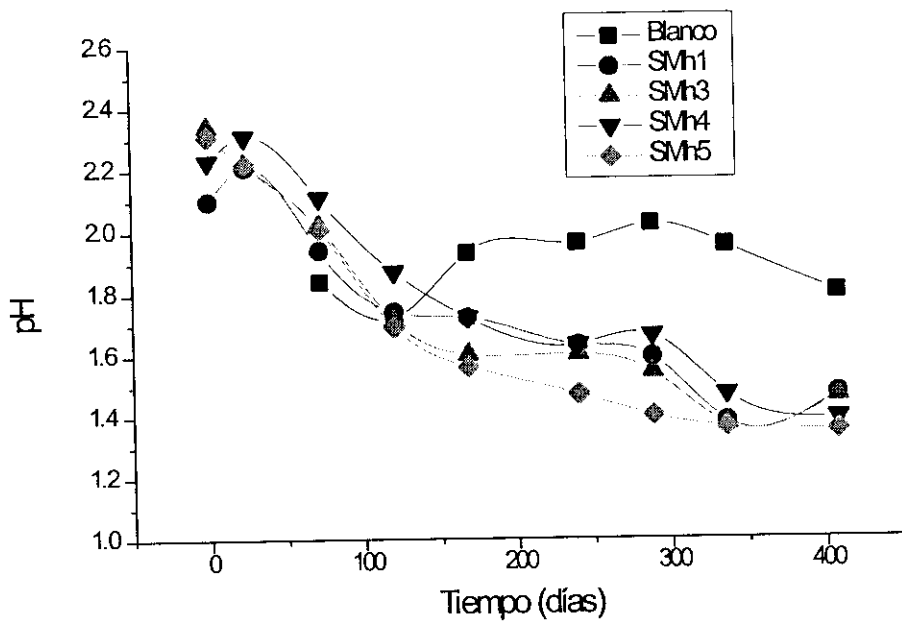


Figura 123: Evolución del pH en los ensayos de actividad oxidante de la columna SM

• *Actividad reductora*

Los ensayos pusieron de manifiesto que hubo un gradiente de actividad biológica reductora de sulfatos en la columna, de tal manera que fue en las muestras más profundas donde se encontró una mayor actividad. Esto pudo comprobarse a través del pH de los cultivos, que alcanzaron cifras próximas a 9 en las muestras más interiores, y por la práctica eliminación de los sulfatos presentes en el medio de cultivo (Figuras 124 y 125). Como ya se había comprobado en los recuentos microbiológicos, estas bacterias no aparecieron asociadas a las muestras más superficiales de la columna, y de hecho la actividad estuvo algo más ralentizada en aquellas muestras (SMh3) menos profundas, pues las bacterias tardaron más en crecer. No hubo crecimiento en la muestra más superficial SMh1. La razón obviamente fue que en la columna SM hubo un gradiente de oxígeno que provocó que las bacterias reductoras de sulfatos, anaerobios estrictos, sólo crecieran en las muestras interiores, donde no existió presencia de oxígeno (la misma razón por la que, como se acaba de ver, no crecieron las bacterias litoautótrofas).

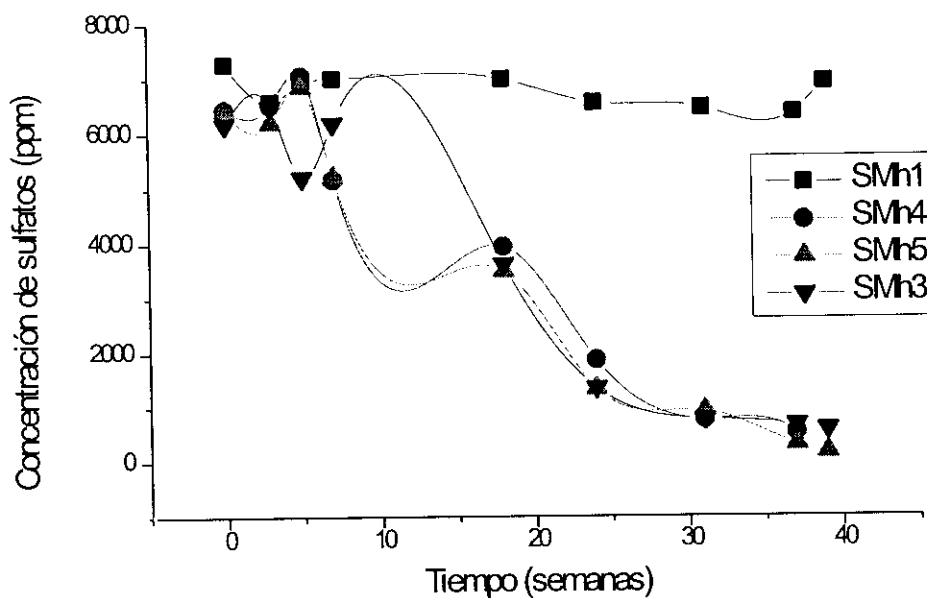


Figura 124: Evolución de la concentración de sulfatos en los ensayos de actividad de la columna SM

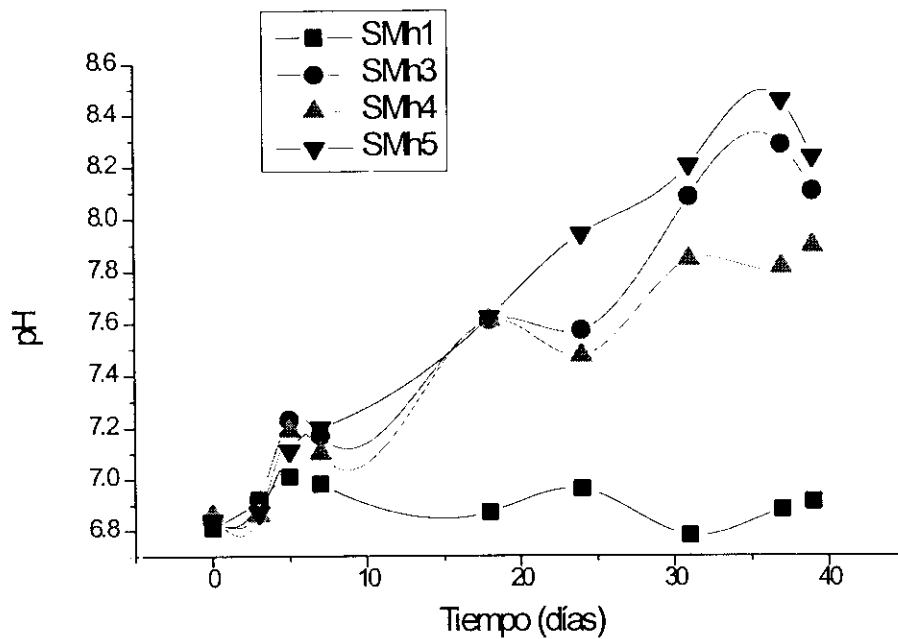


Figura 125: Evolución del pH en los ensayos de actividad reductora de la columna SM

La columna SM sirvió para simular satisfactoriamente el sistema “presa de estériles” en el “ambiente C” (Figura 4) correspondiente a la zona de pirita sumergida. Además de reproducirse las condiciones químicas encontradas en la presa, se estableció también la distribución microbiológica encontrada en la presa. El reparto de actividad microbiológica y de condicionantes químicos quedó establecido del modo que se ilustra en la Figura 126.

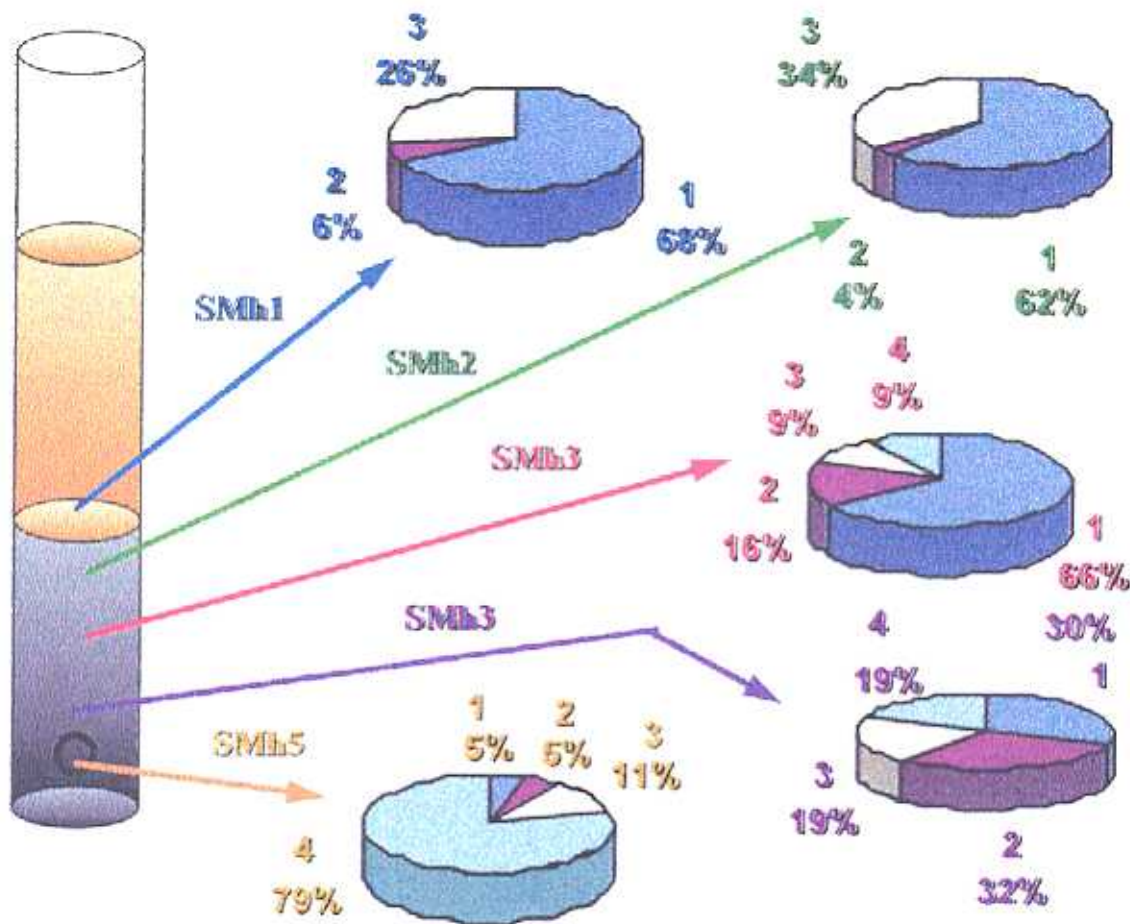


Figura 126: Distribución microbiológica en la columna SM.-  
 1: bacterias S-oxidantes; 2: bacterias Fe-oxidantes;  
 3: heterótrofos totales; 4: bacterias anaerobias reductoras de sulfatos (BRS)

### 3.3.- TRATAMIENTO DE DAM MEDIANTE BRS

El último objetivo por desarrollar fue, una vez conocidos los factores implicados en la transformación del residuo, presentar y plantear algún método para el tratamiento del drenaje generado en la meteorización del residuo piritico.

Como método de *prevención*, y dadas las características del sistema, se considera que el más eficaz sería la disposición de toda la piritita bajo agua. Sin embargo, esta solución no es suficiente para paliar totalmente el problema por dos motivos fundamentales: por un lado, porque inevitablemente existe en el sistema una proporción importante de mineral expuesto al aire que sigue su propia "cinética de degradación"; por otro lado, porque como se ha insistido en todos los capítulos precedentes, la presencia del ion sulfito condiciona

decisivamente el estado del sistema. Esta oxidación no se evita con la disposición del residuo bajo agua.

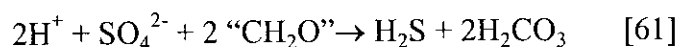
La solución al problema que supone la presencia del ion sulfito en las aguas residuales puede enfocarse desde varios puntos de vista. Por un lado, se podría tratar de inhibir la oxidación, algo muy difícil de conseguir en un sistema abierto y teniendo en cuenta además la particular facilidad con que se oxida este ion. También podría adicionarse algún inhibidor, de los cuales están descritos varios en la bibliografía como el manitol (Fuller y col., 1941) y compuestos complejos de naturaleza orgánica como la N,N-dimetilformamida y la N,N-dimetilacetamida (Schroeter (I), 1963) cuya utilización supondría un coste adicional importante.

Otra solución al problema podría estar en “la oxidación controlada”. Es decir, mediante la adición de un reactivo, se trataría de acelerar la oxidación del ion sulfito previamente a su vertido, con lo que no aparecería constantemente este ion en las aguas de la presa. Existen compuestos que son catalizadores positivos de esta oxidación, como, por ejemplo los iones cúpricos (Fuller y col., 1941; Higginson y col., 1957) y, en general, los metales pesados (Hegg y col., 1978; Pasiuk-Bronikowska, 1988; Schoroeter(II), 1963). También se ha demostrado la capacidad catalítica de compuestos como el cloruro férrico (Wisniewski, 1990). Sin embargo, la adición de cualquier compuesto supondría, igual que en el caso de la inhibición, un coste adicional importante. La oxidación también podría considerarse a través de un tratamiento biológico. Sin embargo, aunque se ha comprobado la capacidad de ciertas bacterias litoautótrofas de las especies *Thiobacillus thiooxidans* y *Thiobacillus ferrooxidans* para la oxidación del ion sulfito (Kodama y col., 1968; Lorbach y col., 1993; Suzuki y col., 1993), como quedó demostrado mediante los experimentos descritos en el apartado 3.2.1.b., la cinética de oxidación bacteriana es significativamente más lenta que la química.

La disposición de residuos bajo agua parece ser, pese a todo, el método más conveniente para el almacenamiento de la pirita. Pero, para que este método resulte definitivamente eficaz es necesario potenciar los procesos que conducen a la reducción en lugar de a la oxidación de intermedios.

Como se ha puesto repetidamente de manifiesto, la caracterización del sistema permitió conocer que en el fondo de la presa existían condiciones reductoras y unas poblaciones importantes de bacterias reductoras de sulfatos.

La viabilidad de los procesos de “resulfuración” está condicionada por la presencia de microorganismos que, por un lado, cooperen al mantenimiento de las condiciones anaeróbicas y, por otro, favorezcan la precipitación de sulfuros termodinámicamente estables (East y col., 1994). Dentro de este grupo de microorganismos se encuentran las bacterias reductoras de sulfatos, cuyo metabolismo proporciona dos compuestos básicos para la precipitación y estabilización de metales en un ambiente anaerobio como el H<sub>2</sub>S y el H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, además de alcalinizar el medio de acuerdo con la reacción:



Uno de los aspectos más importantes de cualquier método de almacenamiento de residuos es que éstos se estabilicen de la mejor manera posible de modo que se asegure su inmovilización. Si el residuo que se almacena es un mineral, y más en concreto un sulfuro, el ambiente en que éste ha de encontrarse para evitar su degradación deberá ser anaerobio. La manera de que los sulfuros depositados en los sedimentos no oxidantes se mantengan en condiciones estables es que las formas de precipitación sean lo más favorables posible. Es decir, por ejemplo, para el caso de efluentes con hierro, que se formen pirita o siderita; que en el caso de efluentes con manganeso, se forme la rhodochrosita, que es la forma más estable para este metal, etc. En general, casi todos los metales como, el Co, Ni, Cu, Zn, As, Cd, Ag, Se, Hg y Pb, pueden formar sulfuros estables.

Las aguas de mina son un ambiente idóneo para promover la reducción porque en ellas se encuentran normalmente disueltos una cantidad importante de sulfatos, con lo que aparentemente el único factor limitante sería el aporte de una fuente orgánica que favoreciese el crecimiento de las bacterias.

La presencia de BRS metabólicamente activas se puso de manifiesto en la presa de estériles por las condiciones de alcalinidad, así como por las concentraciones de sulfatos y metales medidas en el fondo. La eliminación conjunta de sulfatos y sulfitos en aguas contaminadas mediante reducción biológica se ha ensayado experimentalmente como método de tratamiento, obteniéndose buenos resultados (Särner, 1990). Este proceso ha tenido tanta aceptación que no sólo se propone como método de tratamiento de aguas contaminadas sino también como método de recuperación de metales, con cierto valor añadido, a partir de aguas residuales industriales (Hammack y col., 1994).

Por todas estas circunstancias, se ensayó este método para promover el tratamiento de las aguas de la presa. Inicialmente, se estudió la actividad de las bacterias aisladas en el propio

sistema para conocer los límites máximos y mínimos bajo los cuales se pueden encontrar metabólicamente activas.

Básicamente, el estudio se centró en tres aspectos: en conocer el intervalo de pH en el que se podían encontrar activas estas BRS; en investigar su tolerancia a metales; y finalmente en realizar ensayos de reducción biológica de sulfatos.

### 3.3.1.- Alcalinización del drenaje ácido

La posibilidad de tratar el agua ácida de la presa aprovechando la actividad metabólica de las BRS aisladas del propio sistema fue evaluada a través de los experimentos de crecimiento de cultivos mixtos a distintos pH. Se ensayaron los valores 4, 5 y 7. Los resultados que se muestran en las Figuras 127 a 130 correspondieron a ensayos distintos en las mismas condiciones iniciales. La diferencia entre ellos estuvo en el tipo de inóculo utilizado. En los ensayos denominados E se utilizó como inóculo un cultivo envejecido crecido en medio C a pH 7. En los ensayos F se utilizó un cultivo joven crecido en un medio con Cu a pH 5.

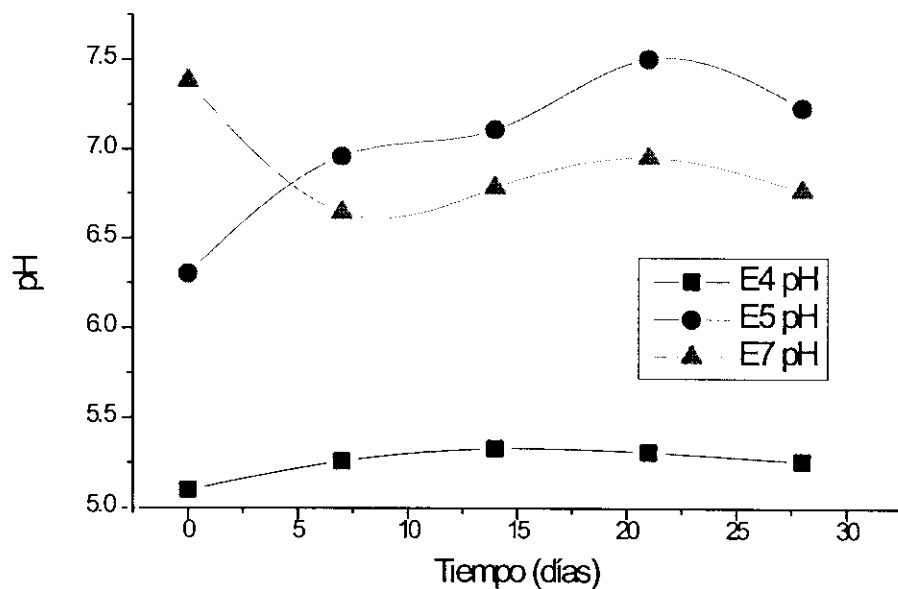


Figura 127: Crecimiento de BRS a distintos valores de pH

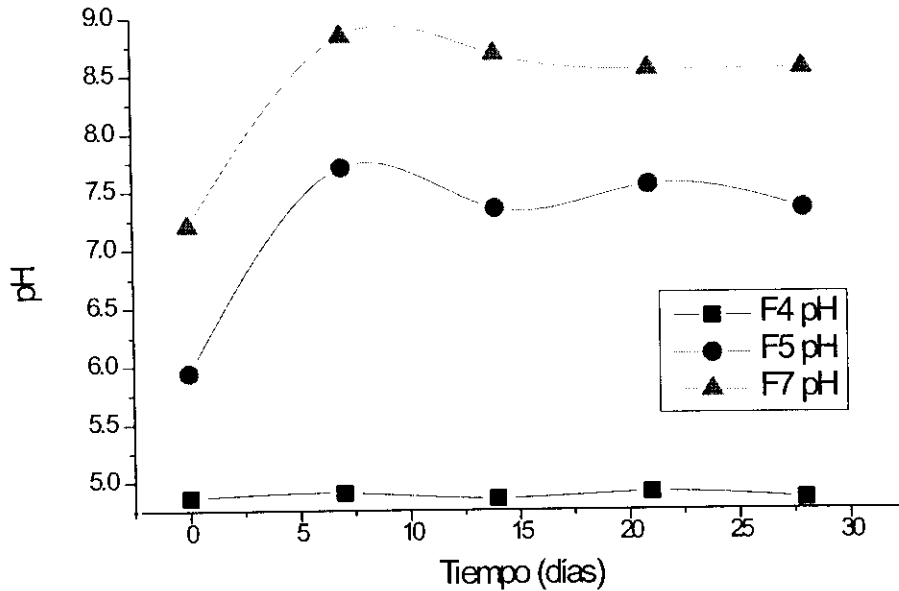


Figura 128: Crecimiento de BRS a distintos valores de pH

Las bacterias crecieron a pH 5 y 7. A pH 4 fueron, en general, difíciles de adaptar aunque en algunos casos, y con una cinética más lenta, los cultivos comenzaron a crecer (pudo observarse una disminución del Eh y un ligero aumento de pH; ver Figuras 127 a 130). De todos modos, el pH 4 pareció un límite inferior demasiado extremo que no se pudo utilizar como pH aceptable de crecimiento.

Pese a que el pH óptimo de crecimiento para este tipo de bacterias se encuentra entre 7 y 7,5, los cultivos mixtos ensayados se adaptaron muy bien a pH 5, obteniéndose mejores resultados cuando se utilizó un cultivo joven crecido a pH 5 que cuando se utilizó un envejecido y crecido a pH 7. La razón se encuentra en que las bacterias pueden verse afectadas por el propio  $H_2S$  desprendido como consecuencia de su propia actividad metabólica.

El metabolismo de las BRS provocó un incremento en el valor del pH en los cultivos, alcanzándose valores de hasta 8,5. El potencial redox se mantuvo por debajo de cero siempre que las bacterias crecieron adecuadamente (Figuras 129 y 130). Estas bacterias son capaces de generar potenciales muy negativos, aún partiendo de un medio oxidante.

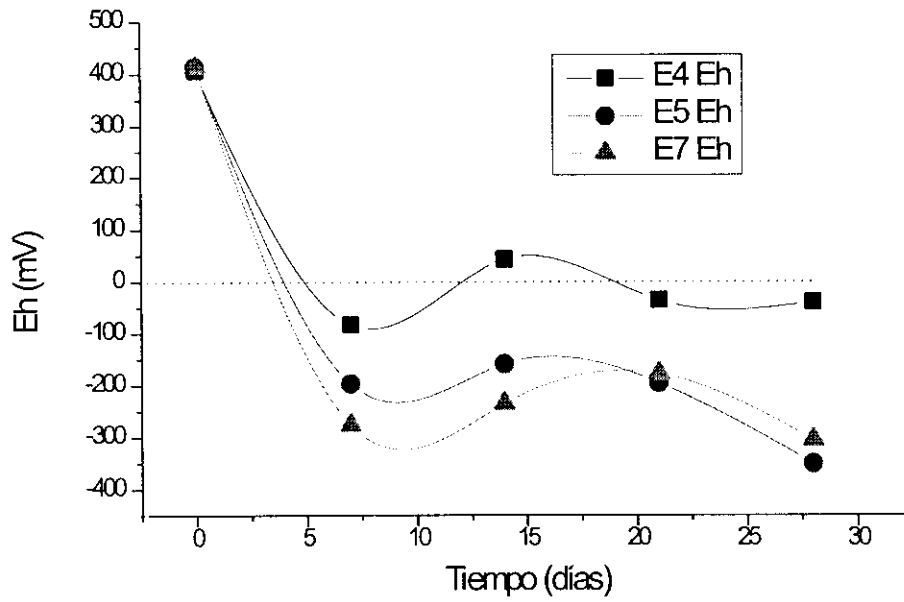


Figura 129: Variación de Eh durante el crecimiento de BRS a distintos valores de pH

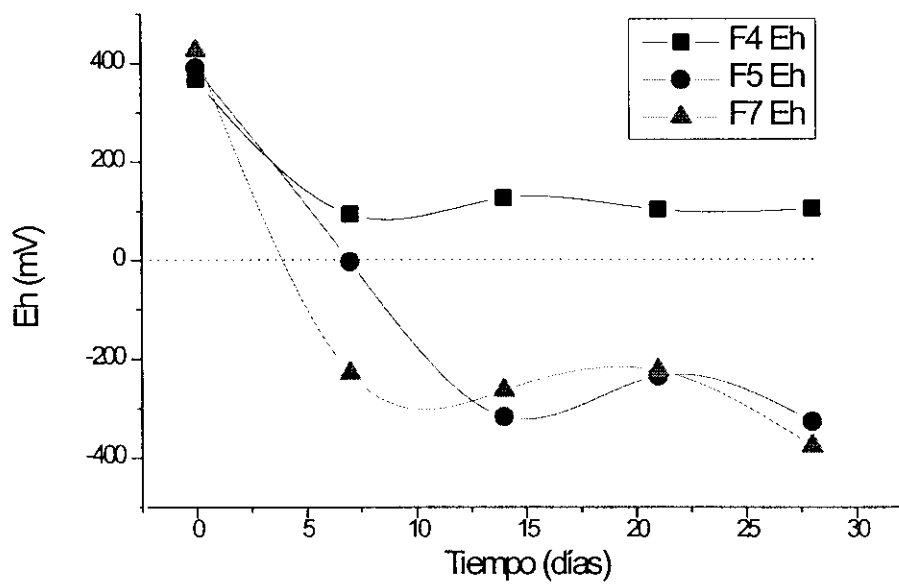


Figura 130: Variación de Eh durante el crecimiento de BRS a distintos valores de pH

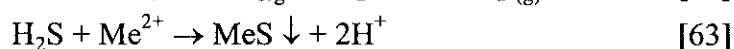
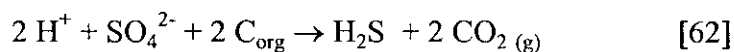
Adicionalmente, se ensayó el crecimiento de BRS en agua de mina utilizando el drenado de la columna h66 como medio de cultivo, que contenía una concentración importante de sulfatos y un valor de pH (en torno a 5) dentro del intervalo de actividad de las bacterias ensayadas. Este medio se enriqueció con lactato, extracto de levadura y citrato, para aportar la fuente de carbono y un medio reductor. Las concentraciones utilizadas fueron las habitualmente empleadas en el medio C (ver apdo. 2.3.1.).

Las BRS crecieron en estas condiciones, como se puso de manifiesto por el clásico olor a ácido sulfhídrico de los cultivos y porque sobre la superficie de la pulpa utilizada como inóculo se depositó una capa de sólidos negros correspondientes a la precipitación biológica de sulfuros. Pero el crecimiento fue mucho más lento y el pH en los cultivos sólo subió hasta valores en torno a 7.

Las BRS fueron capaces, en algunos casos, de subir el pH hasta tres unidades por encima del valor inicial. Ahora bien, su posible aplicación al tratamiento de aguas **ácidas** de mina ha de pasar necesariamente por un tratamiento químico previo de neutralización o por la adaptación prolongada de los cultivos, pues el crecimiento de estas bacterias en medio ácido aparece como un factor limitante importante. Aunque algunos autores han aportado resultados acerca del crecimiento en medio ácido (Béchar, Rajan y McCready, 1990; Cairns y col. 1991), también están documentadas y demostradas las dificultades que supone el crecimiento a valores de pH por debajo 5 (Tuttle y col., 1969; Arnesen y col., 1991).

### 3.3.2.- Precipitación biológica de metales

Una de las consecuencias indirectas de la actividad de las BRS es la precipitación de los metales disueltos en las aguas de mina, al reaccionar éstos con el H<sub>2</sub>S producido en la reducción del SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, de acuerdo con las reacciones (Kuyacak y col., 1991; Kuyacak y col., 1994; Rowley y col., 1994):



Dentro de los metales (Me) se pueden incluir al Fe, Zn, Ni, Cd, Cu, Pb, etc, todos ellos presentes habitualmente en las aguas residuales de mina.

Existen muchos trabajos sobre la precipitación de metales mediante procesos de reducción biológica, que incluyen todos estos metales e incluso otros de particular interés como el arsénico (Belin y col., 1993). Mediante este método se han conseguido eliminar concentraciones del orden de las 100 ppm de hierro, 300 ppm de cinc (Dvorak, 1991) y hasta 75 ppm de níquel (Hammack y col., 1992). El cobre es un metal conflictivo ya que puede llegar a ser tóxico para las bacterias. Sólo se ha conseguido buena eficacia de eliminación de cobre para concentraciones del orden de las 25 ppm y, por esta baja concentración, se eligió este metal tratando de mejorar su precipitación.

#### *-Eliminación biológica del cobre.- Ensayos preliminares*

Para los ensayos de eliminación de cobre se prepararon unos experimentos previos en los que se estudió la tolerancia al cobre del cultivo mixto de BRS aislado a partir de los lodos del fondo de la presa. Se probaron las concentraciones de 25 y 50 ppm y se ensayaron dos tipos de cultivos: uno adaptado previamente a cobre en medio C a pH 5 (Di) procedente del lodo del fondo de la presa y otro crecido a pH 7 (SMh5) aislado de una muestra profunda de la columna de sucesión microbiológica (SM). Finalmente, se probó la influencia del tamaño de inóculo utilizando cultivos con un 10 y un 20 %, respectivamente.

Los resultados de estos primeros experimentos pusieron de manifiesto que ambos cultivos mixtos de BRS toleraban concentraciones de hasta 50 ppm de cobre, mostrándose las bacterias igualmente activas en presencia de 25 y de 50 ppm de cobre. Este efecto pudo comprobarse por el aumento del pH (desde 5 hasta 8, aproximadamente; Figuras 131 y 134), por la disminución del Eh (siempre hacia valores negativos; Figuras 132 y 135) y, en definitiva, por la desaparición del cobre en solución (Figuras 133 y 136). Por otro lado se comprobó que fueron suficientes los inóculos del 10% para el buen desarrollo de los experimentos.

Se comprobó que el crecimiento de las BRS fue mejor en el caso de utilizar cultivos adaptados a cobre (Di), de tal manera que cuando se utilizó un cultivo de este tipo, a los cinco días (ver Figura 133), ya se había conseguido un 80% de precipitación del metal en solución. Cuando se utilizaron cultivos crecidos a pH 7 (SMh5), aunque también se produjo la eliminación del cobre, el crecimiento fue más lento, necesitándose al menos quince días para alcanzar el mismo grado de eliminación (Figuras 136).

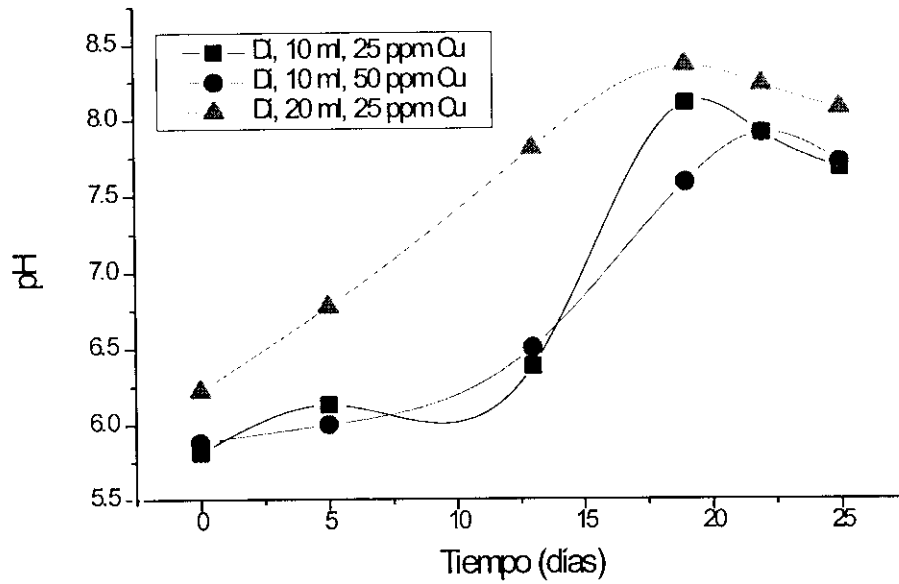


Figura 131: Evolución del pH durante el crecimiento de un cultivo adaptado de BRS en presencia de Cu

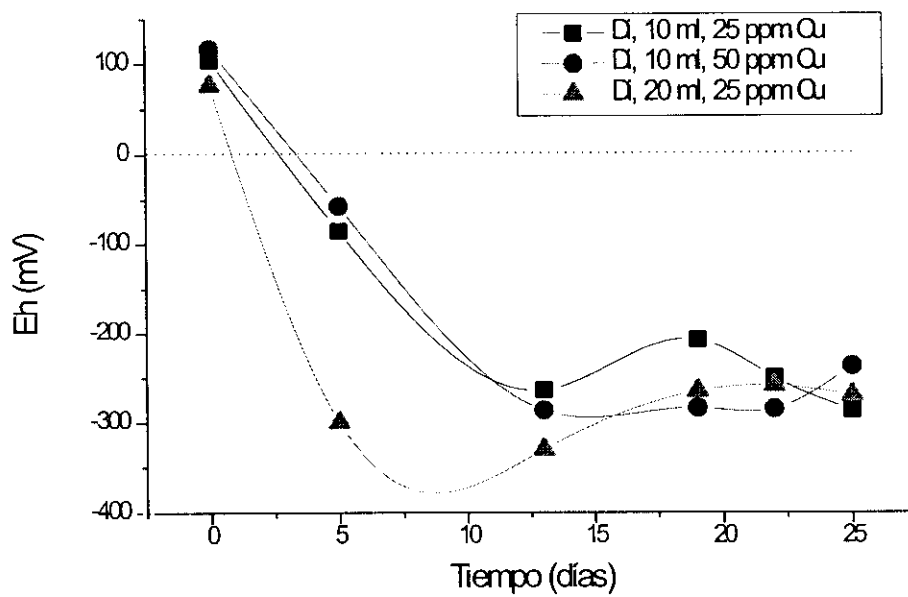


Figura 132: Evolución del Eh durante el crecimiento de un cultivo adaptado de BRS en presencia de Cu

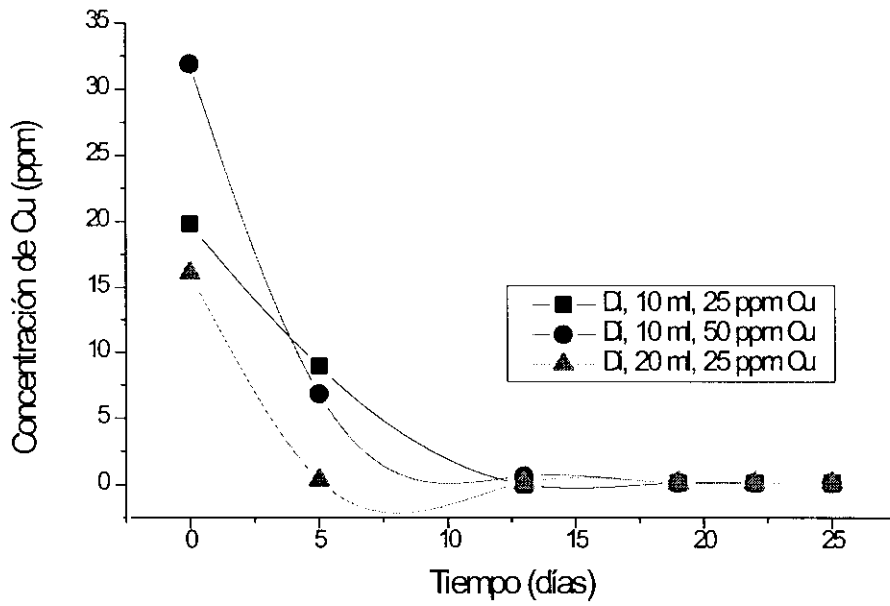


Figura 133: Crecimiento de un cultivo adaptado de BRS en presencia de Cu

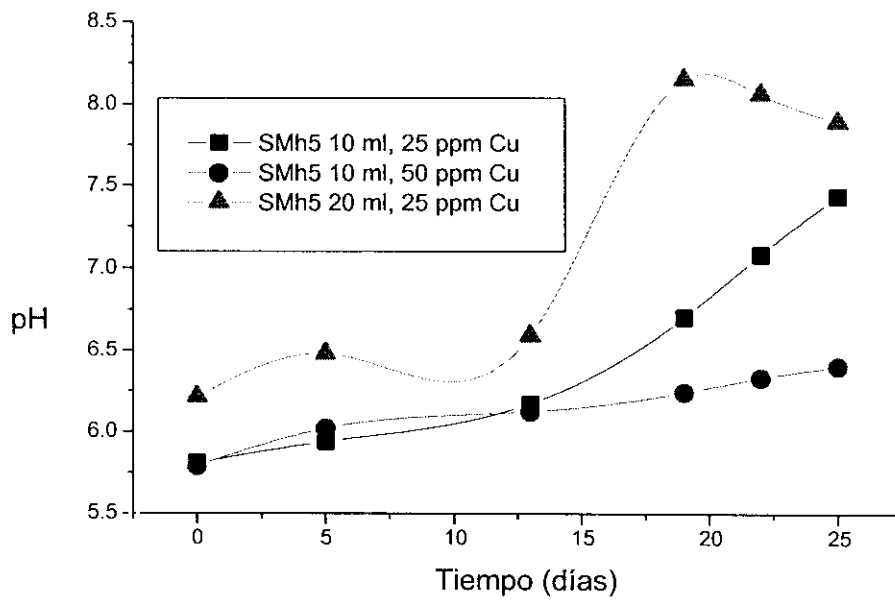


Figura 134: Evolución del pH durante el crecimiento de un cultivo no adaptado de BRS en presencia de Cu

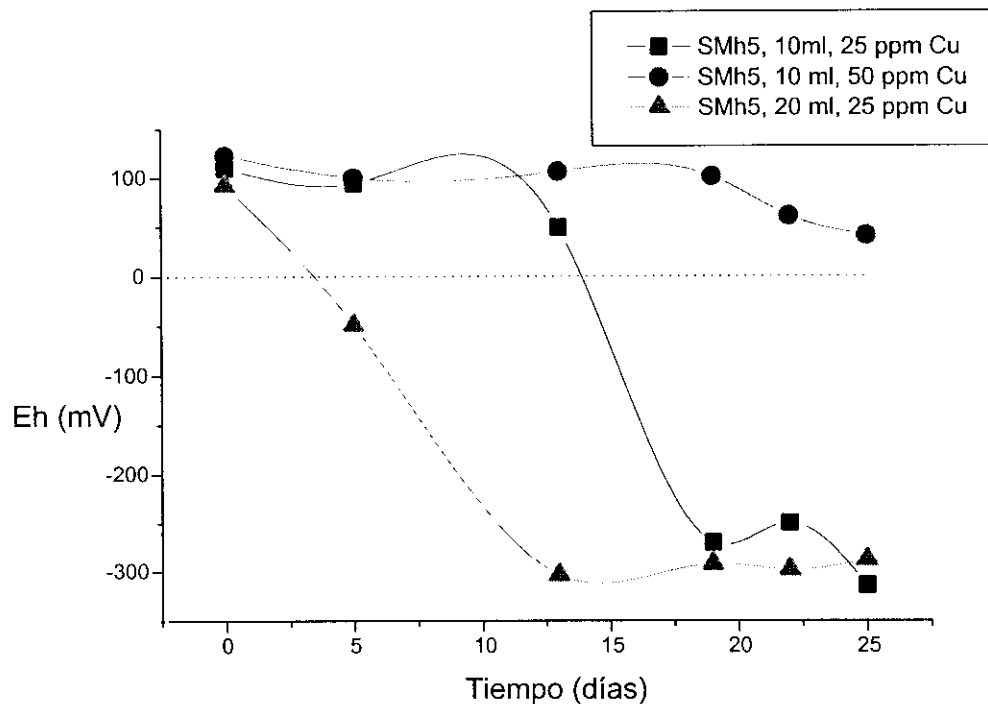


Figura 135: Evolución del Eh durante el crecimiento de un cultivo no adaptado de BRS en presencia de Cu

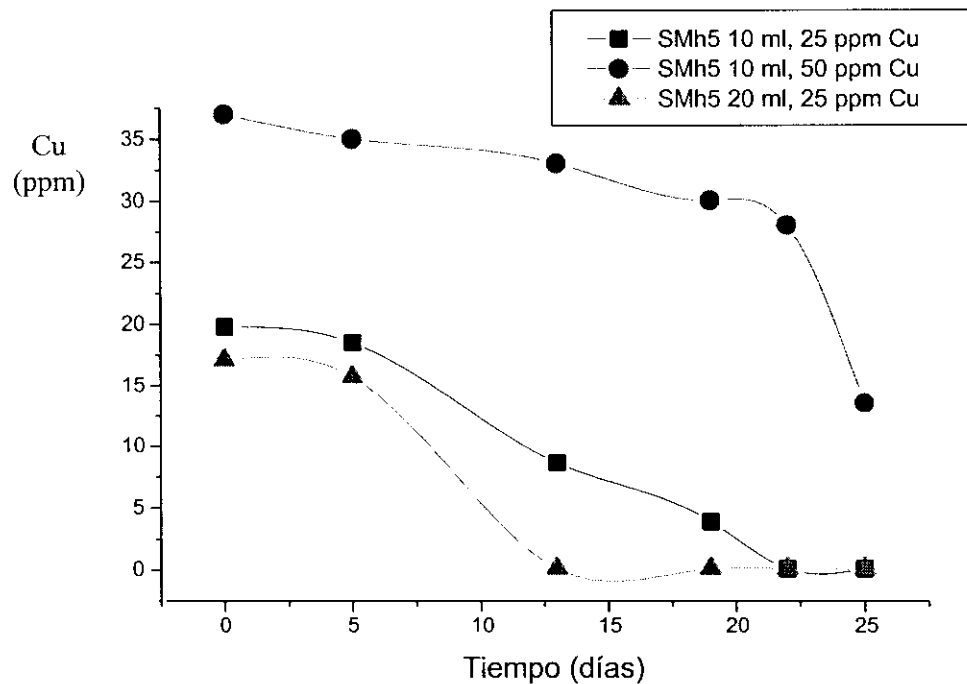


Figura 136: Crecimiento de un cultivo no adaptado de BRS en presencia de Cu

Según los resultados anteriores, se puede avanzar lo siguiente:

- El inóculo hizo, en general, aumentar el pH y disminuir el Eh, por lo que inicialmente se produjo una precipitación de cobre
- Los ensayos evolucionaron bien con inóculos del 10 %
- Los cultivos se adaptaron bien a la presencia de cobre y a crecer a un pH inicial de 5

*-Eliminación biológica del cobre.- Ensayos definitivos*

Tomando como base las condiciones iniciales fijadas en los ensayos preliminares, se realizaron otros experimentos de precipitación de metales en los que se probaron las concentraciones de 25, 50 y 100 ppm de cobre. Se siguió también la evolución del hierro, que estuvo presente en el medio de cultivo en una concentración inicial aproximada de 30 mg/l. Los experimentos se realizaron probando dos cultivos diferentes: un cultivo (Di) adaptado previamente a pH 5 y a un medio con cobre (crecido en presencia de 25 ppm de cobre); y un cultivo (Ei) crecido a pH 7 sin cobre.

Ambos cultivos de bacterias crecieron bien en todo el rango de concentraciones elegido, de modo que en aproximadamente quince días se consiguió una eliminación total del cobre cuando se partió de concentraciones del orden de 25 ppm, y de al menos el 50 % cuando se partió de concentraciones del orden de las 100 ppm (Figuras 137 a 139). Por su parte, el hierro también se precipitó eficazmente aunque se necesitaron tiempos más largos para alcanzar el mismo grado de eliminación (ver Figura 140). El hecho de utilizar un cultivo adaptado a un determinado metal mejora su eliminación. Di, el cultivo ensayado para la eliminación del cobre y del hierro, era un cultivo adaptado exclusivamente a cobre.

Los datos correspondientes a la eliminación del cobre y del hierro, en términos de rendimiento, se muestran en la Tabla XXXVIII.

Tabla XXXVIII: Eficacia en la eliminación biológica del cobre y del hierro

<b>Cultivo</b>	<b>25 ppm Cu</b>	<b>50 ppm Cu</b>	<b>100 ppm Cu</b>
% eliminación Cu	99,5	70 ,0	99,8
% eliminación Fe	93,2	90,8	97,1

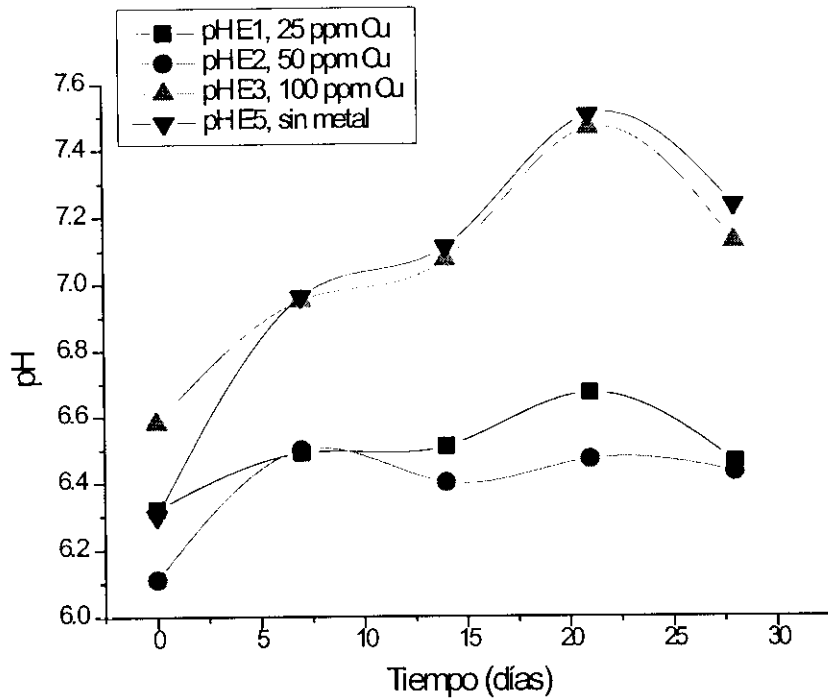


Figura 137: Crecimiento de BRS en presencia de Cu y 30 ppm de Fe.-  
Evolución del pH

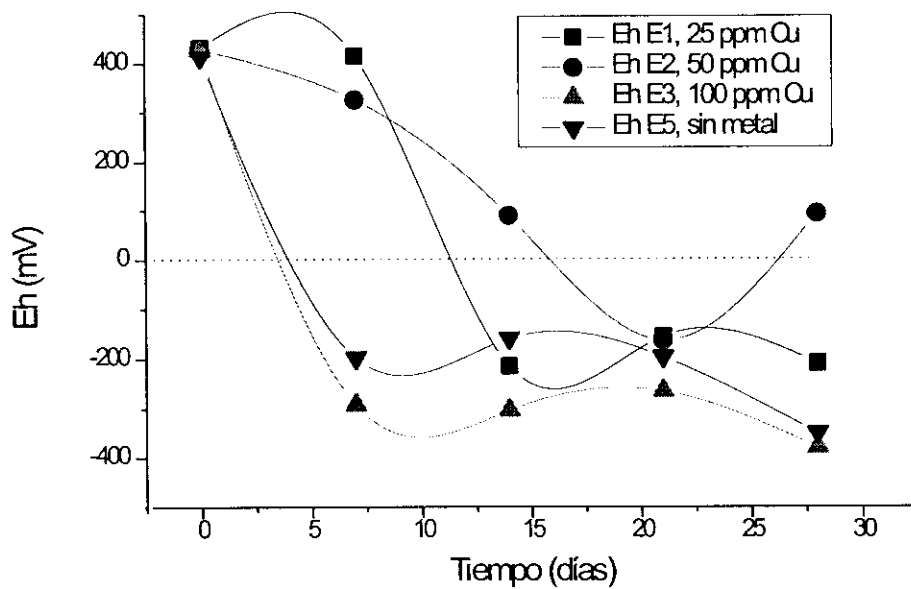


Figura 138: Crecimiento de BRS en presencia de Cu y 30 ppm de Fe.-  
Evolución del Eh

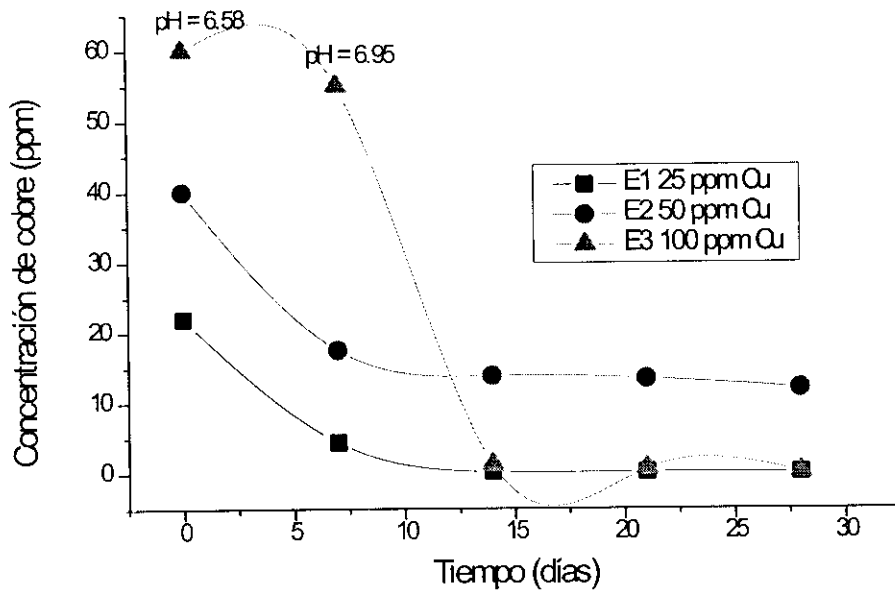


Figura 139: Eliminación biológica del cobre

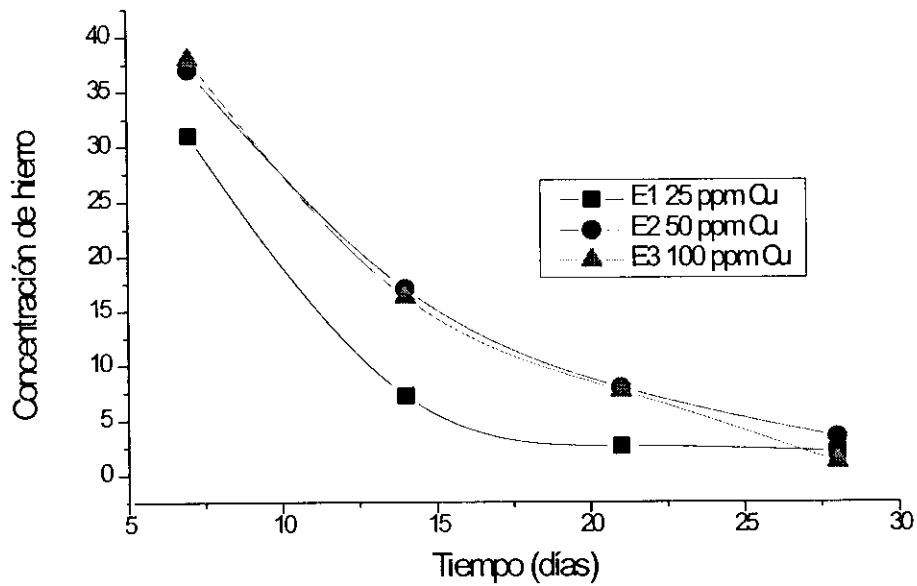


Figura 140: Eliminación biológica del hierro

La presencia de cobre y hierro en el medio de cultivo no inhibió el crecimiento de las BRS, que se adaptaron bien hasta concentraciones del orden de las 100 ppm de cobre y hasta 30 ppm de hierro.

Aunque se trató de adaptar cultivos a concentraciones crecientes de cobre, 200 ppm resultó ser una concentración límite en la que no se observó crecimiento. La concentración de 150 ppm no impidió el desarrollo de las bacterias (se formó un precipitado negro y los cultivos mostraron olor a ácido sulfhídrico), sin embargo, se tuvo una cinética de crecimiento extremadamente lenta.

Cuando se utilizó el inóculo Di, también se consiguieron buenos resultados con concentraciones de hasta 100 ppm de cobre, encontrándose que en tan sólo 5 días, las BRS fueron capaces de disminuir en un 50 % la concentración del cobre en solución (Figuras 141 a 143). Aunque concentraciones de cobre crecientes supongan un factor de desaceleración en el crecimiento (como se refleja en el tiempo que tardan los cultivos en alcanzar potenciales negativos y en la concentración de cobre residual para un mismo periodo de tiempo), en todos los casos (25, 50 y 100 ppm) las bacterias se mostraron activas, lo que no sucedió en el caso de los cultivos preparados con 200 ppm.

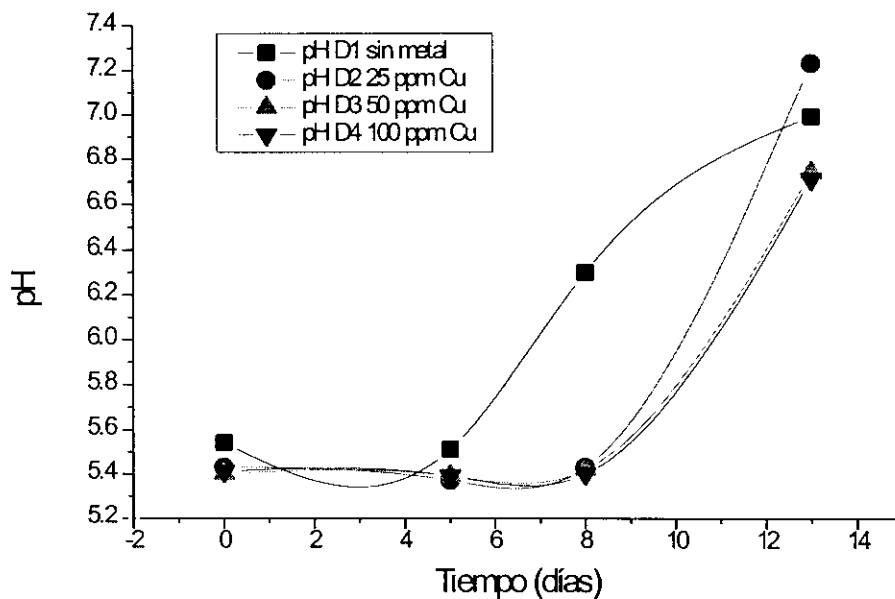


Figura 141: Crecimiento de BRS en presencia de Cu.-  
Evolución del pH

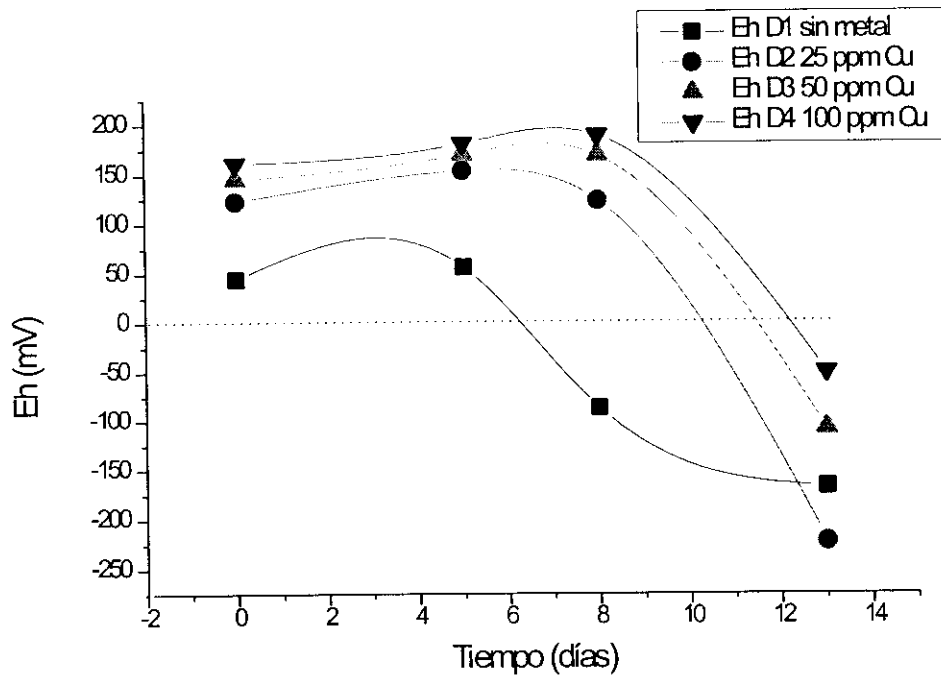


Figura 142: Crecimiento de BRS en presencia de Cu.-  
Evolución del Eh

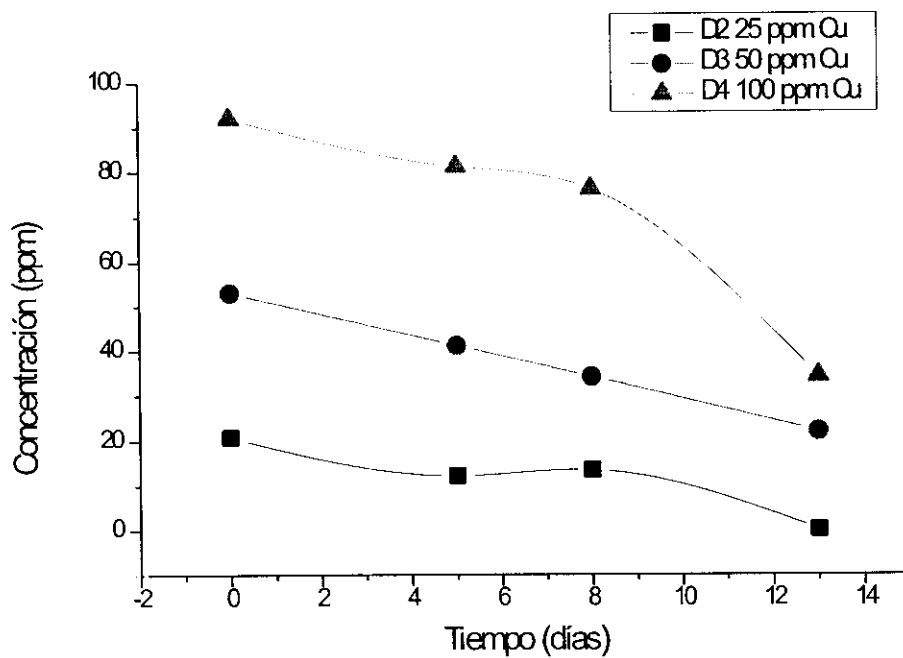


Figura 143: Crecimiento de BRS en presencia de Cu

La eliminación biológica de metales también se comprobó mediante el análisis por difracción de rayos-X de los distintos precipitados obtenidos. La forma más estable de

precipitación para el hierro resultó ser la pirita, mientras que el cobre lo hizo bajo la forma de  $\text{Cu}_7\text{S}_4$  (Figura 144).

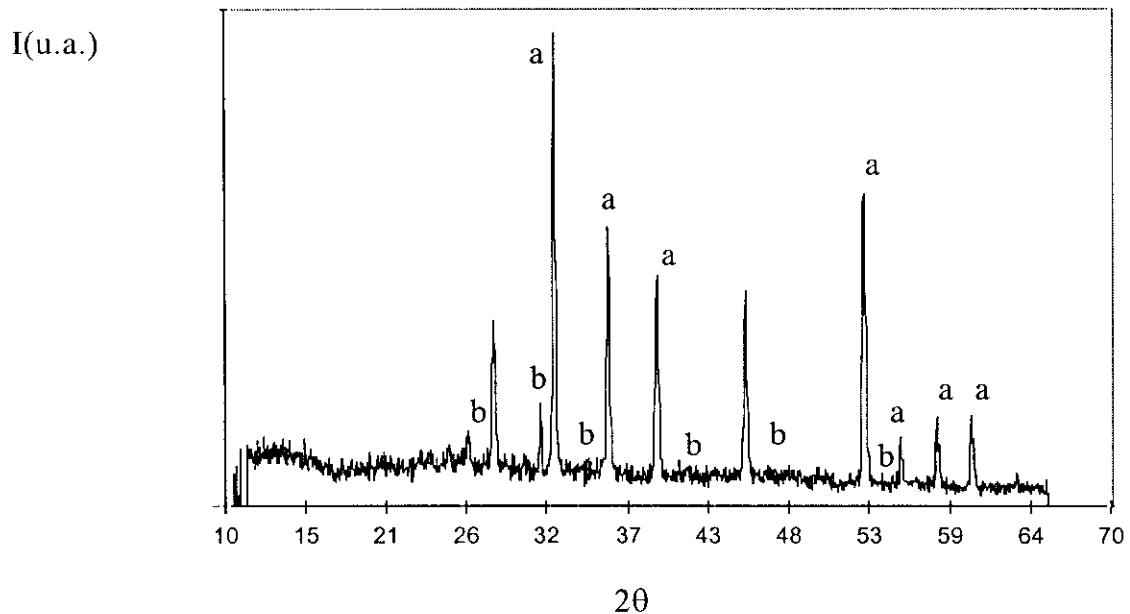


Figura 144: Difractograma correspondiente a un precipitado procedente de un cultivo de BRS crecido en un medio con Cu (a,  $\text{FeS}_2$ ; b,  $\text{Cu}_7\text{S}_4$ )

### 3.3.3.- Reducción biológica de sulfatos

Aunque en este capítulo se hace referencia esencialmente a la reducción biológica de sulfatos (han sido éstos el parámetro elegido para el seguimiento de los experimentos), sin embargo, de un modo implícito existe también la posibilidad de que los iones sulfito sean los sustratos metabólicamente aprovechables por las BRS y que puedan ser de este modo conjuntamente eliminados con los sulfatos (Särner, 1990). Este aspecto sería de notable interés en nuestro caso puesto que en la presa de estériles existen no sólo sulfatos sino también sulfitos y otras especies intermedias del azufre cuya oxidación genera acidez.

Para el control de los ensayos de reducción biológica de sulfatos, se puso a punto el método turbidimétrico. Así, y de acuerdo con lo expuesto en el apdo. 2.2.2.c., las muestras a analizar eran acidificadas previamente a la adición del reactivo para la generación del precipitado, con el fin de que éste se formara en las mejores condiciones.

La reducción biológica de sulfatos se ensayó utilizando una concentración inicial del orden de las 10.000 ppm. Se realizaron ensayos con inóculos de distinta procedencia: uno a pH 7 utilizando muestras interiores de las columnas de meteorización (M) y de sucesión microbiológica (SM); y otro a pH 5 con muestras naturales procedentes de los lodos del

fondo de la presa (A, B y C), manteniendo así las condiciones en las que habían sido crecidos. La reducción biológica de sulfatos fue efectiva y se consiguieron muy buenos resultados en ambos casos, incluso partiendo de concentraciones muy superiores al rango que se midió en la presa (10.000 ppm), donde oscilaron en el entorno las 1.800-2.000 ppm. Coincidiendo con los resultados obtenidos anteriormente, las bacterias se mostraron metabólicamente activas tanto a pH 7 como a pH 5 (Figuras 145 a 150). Tanto las bacterias procedentes de los lodos del fondo de la presa, crecidas inicialmente a pH 5, como las bacterias aisladas a partir de las muestras interiores de las columnas de meteorización, cuya actividad ya había sido comprobada en los ensayos posteriores al desmante, crecieron muy bien. Estas bacterias, crecidas a pH 7, fueron capaces de disminuir la concentración de sulfatos tan bien como los cultivos naturales, aunque con cinéticas un poco más lentas debido probablemente al envejecimiento de los cultivos procedentes de las columna de meteorización en el momento en que se realizaron los ensayos. En los experimentos con cultivos naturales, realizados por triplicado en idénticas condiciones (A, B y C), se consiguió la práctica eliminación de los sulfatos en aproximadamente nueve días (Figura 148). Como cabía esperarse, el valor del pH se incrementó y el Eh disminuyó hasta hacerse negativo durante el transcurso de los ensayos (Figuras 149 y 150). En todos los ensayos las bacterias fueron capaces de inducir sus propias condiciones ambientales óptimas de crecimiento (potencial redox, pH, etc).

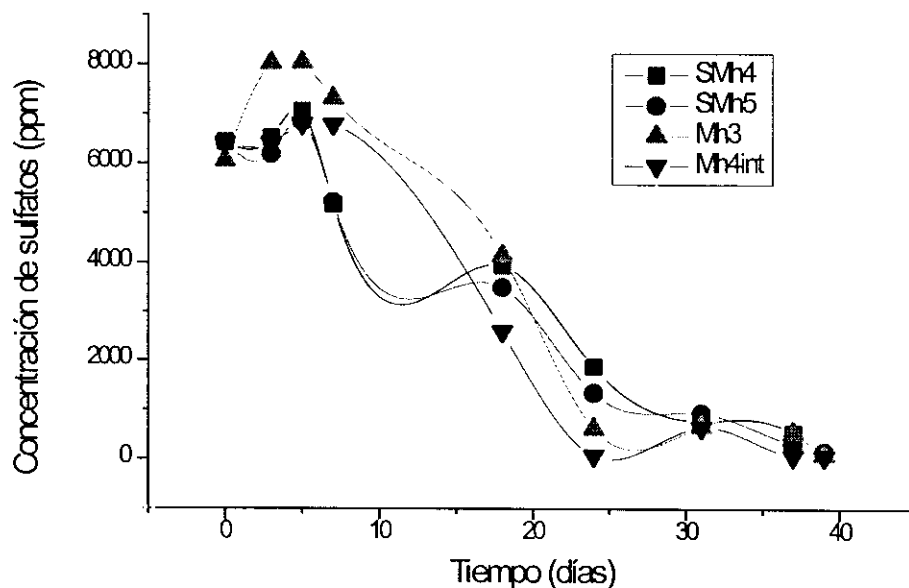


Figura 145: Reducción biológica de sulfatos a partir de cultivos procedentes de las columnas de meteorización.

Experimentos realizados a un pH inicial de 7

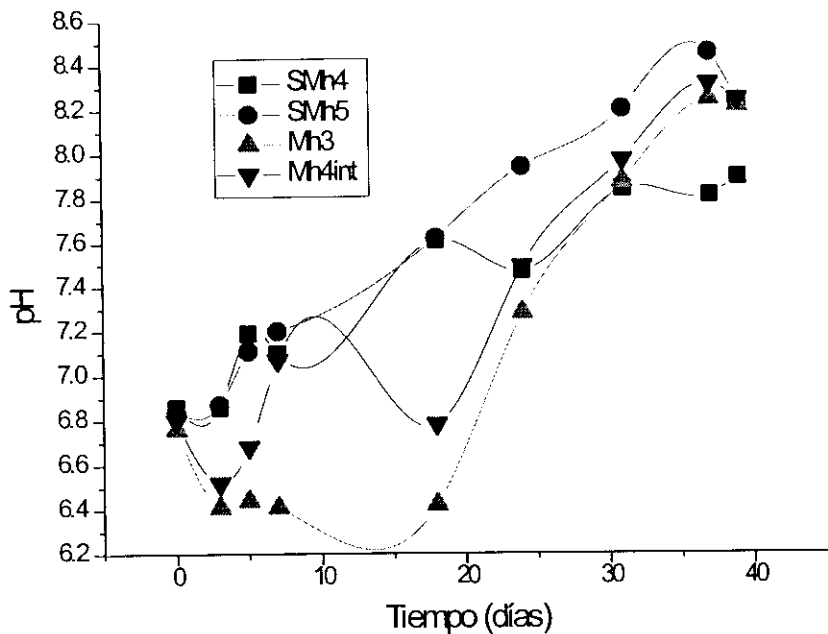


Figura 146: Evolución del pH en la reducción biológica de sulfatos a partir de cultivos procedentes de las columnas de meteorización. Experimentos realizados a un pH inicial de 7

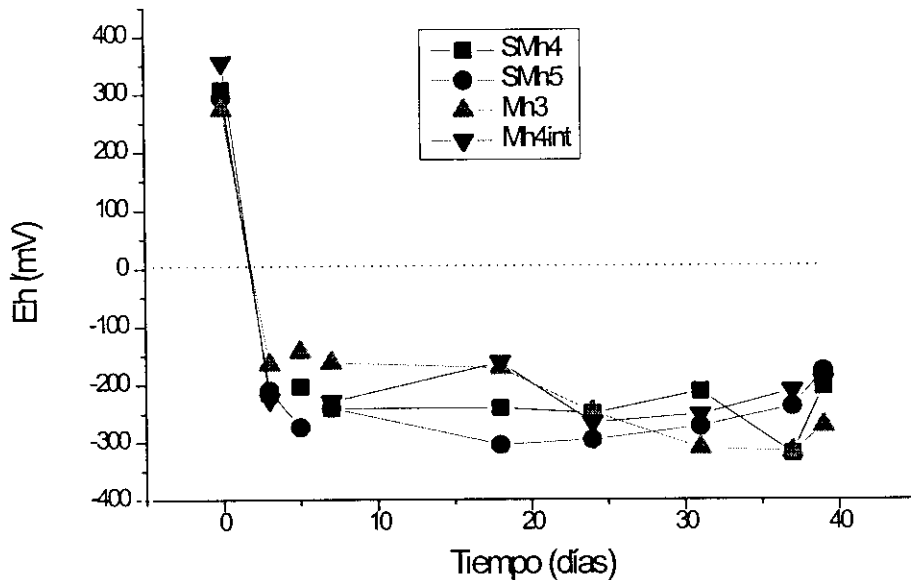


Figura 147: Evolución del Eh en la reducción biológica de sulfatos a partir de cultivos procedentes de las columnas de meteorización. Experimentos realizados a un pH inicial de 7

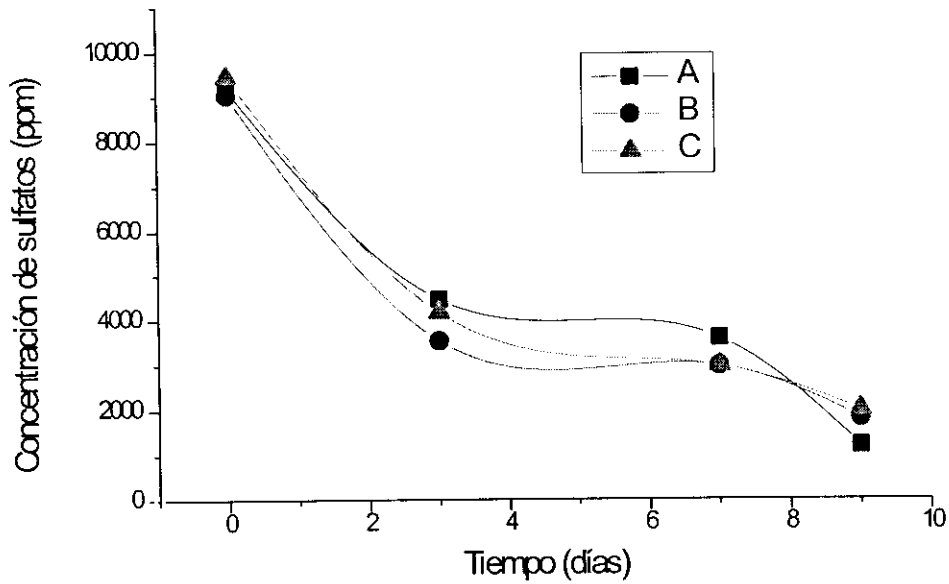


Figura 148: Reducción biológica de sulfatos a partir de cultivos naturales.  
Experimentos realizados a un pH inicial de 5

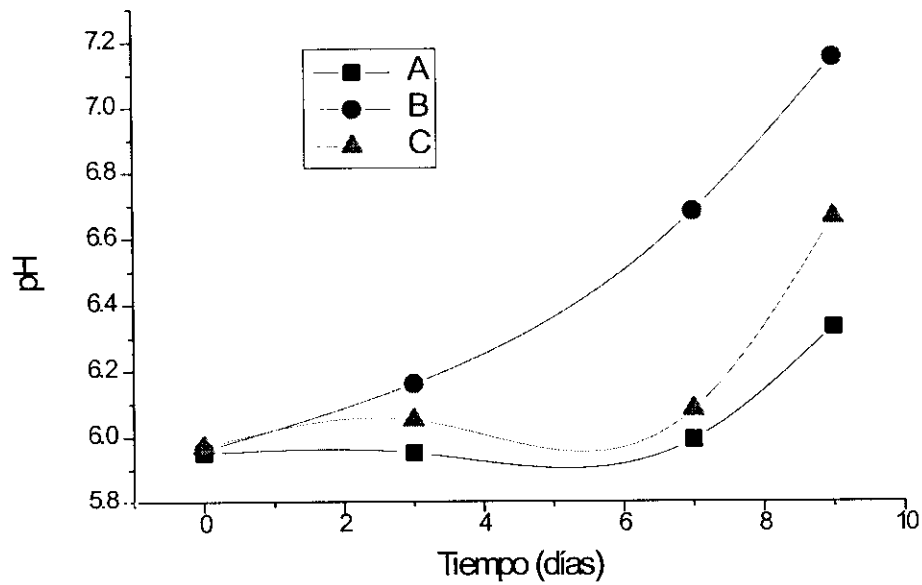


Figura 149: Evolución del pH en la reducción biológica de sulfatos  
a partir de cultivos naturales.  
Experimentos realizados a un pH inicial de 5

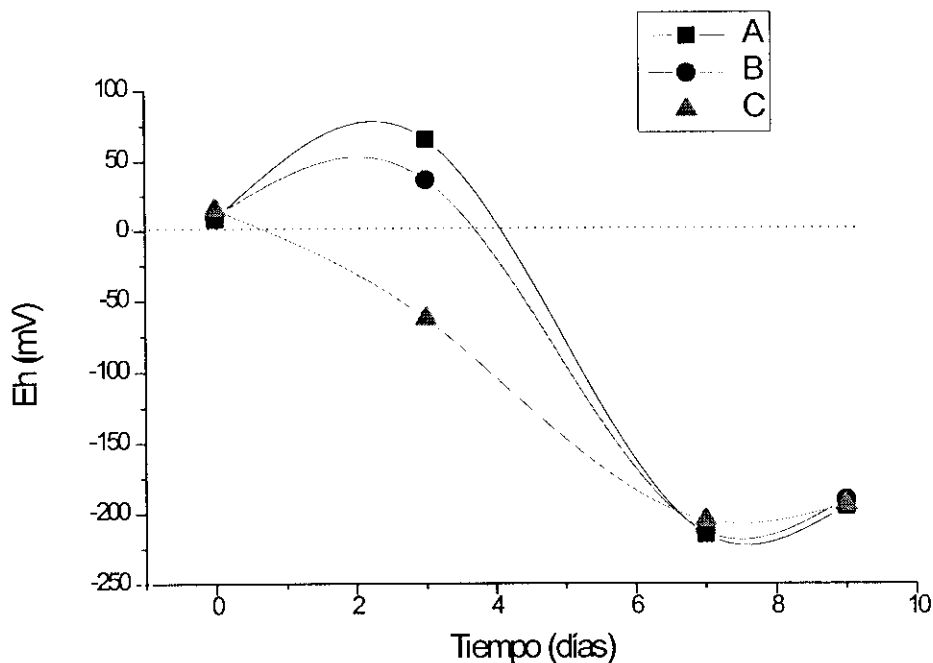


Figura 150: Evolución del Eh en la reducción biológica de sulfatos a partir de cultivos naturales.

Experimentos realizados a un pH inicial de 5

#### -Aplicación de las BRS al tratamiento del agua de la presa de estériles

A la vista de los resultados obtenidos se trató el agua de la presa de estériles mediante las BRS ensayadas. Se van a considerar tres efectos: la precipitación de metales, la eliminación de sulfatos y la alcalinización del medio.

Por un lado, el contenido en metales de las aguas de la presa fue siempre muy inferior a 20 ppm de cobre y ligeramente superior a 30 ppm de hierro. Potenciar la actividad de las BRS tendría sentido, en principio, puesto que nos estaríamos moviendo en niveles de concentración en los que las bacterias mostraron un comportamiento óptimo. Con concentraciones de cobre del orden de las 25 ppm y valores de pH del orden de 5 las bacterias crecieron muy favorablemente (Figuras 151 y 152). En aproximadamente quince días, se eliminaron las 25 ppm de cobre en solución.

Por otro lado, el contenido en sulfatos medido en la presa fue siempre muy inferior a la concentración de sulfatos ensayada en experimentos previos (que correspondió al nivel de sulfatos procedente del medio de cultivo). Este contenido en sulfatos puede ser un factor

limitante para el crecimiento de las bacterias: hay que asegurar una fuente de sulfatos suficiente para que las bacterias se muestren activas. Ahora bien, no hay que olvidar varios aspectos: por un lado, que en la presa existe siempre una concentración remanente de sulfatos del orden de las 2.000 ppm y que existen además otras especies intermedias del azufre (sulfitos, tiosulfatos, etc), potenciales sustratos para las BRS -se ha comprobado que el ion sulfito es un sustrato para ciertas especies de BRS (Särner, 1990)-. Además, no hay que olvidar tampoco que las bacterias utilizadas en los experimentos procedían del medio natural en el que se encontraban activas, como se puso de manifiesto en las condiciones reductoras y pH alcalino medidos en el fondo de la presa de donde fueron aisladas. Luego, si en condiciones naturales se encontraban activas, es señal de que la concentración de sulfatos de que disponían era suficiente.

Otro posible factor limitante al crecimiento de las BRS podría estar en la fuente de carbono necesaria para su crecimiento. Del mismo modo que se ha razonado anteriormente, es lógico pensar que en el medio natural debe existir alguna fuente de suministro de compuestos orgánicos (productos excretados por otros microorganismos, materia orgánica arrastrada por el viento y depositada en el fondo e incluso compuestos químicos de naturaleza orgánica procedentes del proceso de flotación que no sean letales para este tipo de bacterias) que las proveen suficientemente para un adecuado desarrollo. Actualmente, se está investigando en este sentido y se están realizando experimentos con aguas de mina naturales a las cuales se las suplementa con diferentes compuestos con el fin de conocer exactamente los requerimientos de las BRS aisladas en el sistema objeto de estudio.

Ahora bien, el verdadero factor limitante para el tratamiento de las aguas de la presa podría estar en el valor del pH que se alcanza (3,0-3,5) cuando el agua se remansa (muestras Si y CV-2, ver Figura 3). Un valor de pH tan ácido inhibe el crecimiento de las bacterias. Sin embargo, si analizamos el comportamiento del residuo en el sistema (Figura 17: evolución del pH en el sistema), se puede ver que la pulpa llega a la presa con un valor de pH siempre superior a 5, y es en la presa cuando el pH desciende y las condiciones se hacen más ácidas. Pues bien, la reducción biológica de sulfatos y sulfitos, la consiguiente precipitación de metales y la alcalinización del medio deberían promoverse justamente en el punto de llegada de la pulpa a la presa, cuando las condiciones aún no se han hecho tan extremas.

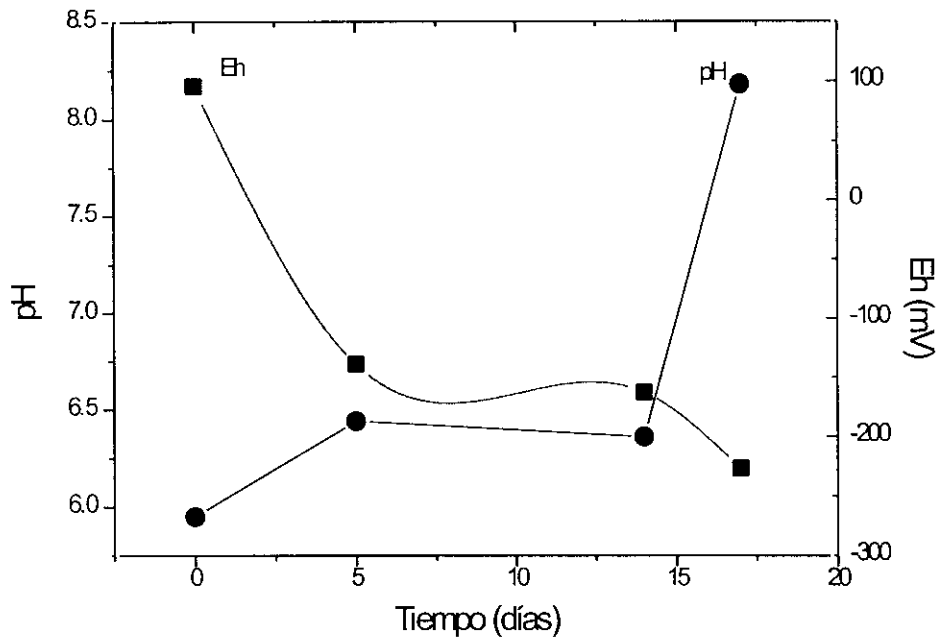


Figura 151: Alcalinización del medio en presencia de BRS

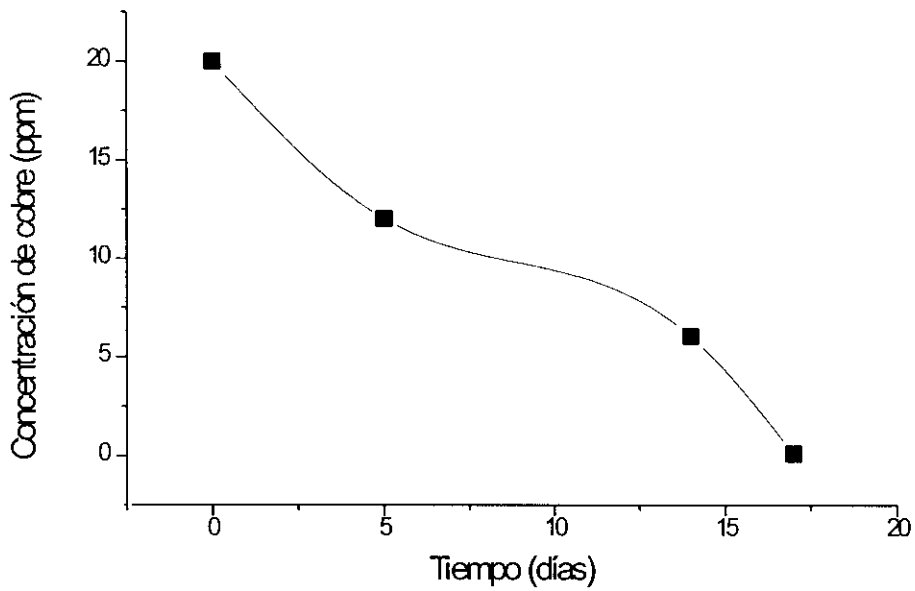


Figura 152: Eliminación biológica de metales

*Conclusiones*

#### 4.- CONCLUSIONES

1°.- Los residuos procedentes de la planta de flotación, que se almacenaron en la presa de decantación de estériles, sufrieron importantes transformaciones durante su confinamiento dando lugar a un empeoramiento en la calidad del agua. Estas transformaciones tuvieron lugar en la presa, ya que fue aquí donde se dispuso de un tiempo de reacción suficiente para que sucedieran. A pesar de la importante oxigenación de la pulpa en su caída desde la planta de tflotación hasta la presa, no se han observaron cambios a lo largo del recorrido que indicaran que las transformaciones se iniciaron antes del estancamiento.

2°.- Las transformaciones en el sistema estudiado consistieron básicamente en una importante acidificación del agua que acompañaba a la pulpa, la cual llegó a alcanzar valores de pH del orden de 2,5-3,0, así como en un incremento notable en la concentración de metales y sulfatos disueltos. Por su parte, el ion sulfito, presente en el punto de vertido en concentración del orden de las 100 ppm, desapareció durante el estancamiento en la presa.

3°.- La disposición de la pulpa en la presa hizo que se estableciera además un gradiente químico con la profundidad, de tal manera que las muestras más superficiales eran las más ácidas, y en ellas la concentración de metales y sulfatos disueltos fué superior a la encontrada en las muestras más profundas, donde los niveles de estos parámetros resultaron ser mucho menores, en consonancia con las condiciones reductoras que se establecieron en el fondo.

Desde un punto de vista microbiológico, la meteorización del residuo potenció el desarrollo de microorganismos que crecen en estrecha relación con las características físico-químicas establecidas. Así, superficialmente, predominaron las bacterias litoautótrofas S- y Fe-oxidantes. Correspondientes a este grupo, se identificaron varias cepas de las especies *Thiobacillus ferrooxidans* y *Thiobacillus thiooxidans*. En el fondo de la presa, se encontraron bacterias anaerobias reductoras de sulfatos.

Existía además una amplia variabilidad de microorganismos heterótrofos distribuidos en todo el sistema: bacterias, levaduras y hongos acompañaron al mineral desde la salida de la planta.

4°.- De los tres factores evaluados para investigar las causas de la transformación del residuo: oxidación del ion sulfito, oxidación de la pirita y participación microbiológica en

ambos procesos, el primero de ellos fué el factor determinante, ya que su presencia creó un medio reductor que condicionó el estado físico-químico del sistema. La oxidación de la pirita fue también un factor importante aunque quedó encubierto mientras el ion sulfito estuvo presente.

5°.- La oxidación química del ion sulfito en el laboratorio estuvo acompañada de una disminución de pH que alcanzó unos valores (3,5) que se correspondieron con los medidos en el agua de la presa de estériles. Esta oxidación transcurrió a través de una cinética de primer orden en la que diversos cationes metálicos ejercieron un efecto catalítico positivo, como pudo comprobarse al observar la mejora de la cinética de reacción en los experimentos realizados con agua de mina, en la que existían en solución metales como hierro y cobre.

La cinética de oxidación del ion sulfito fue también dependiente del pH, siendo muy rápida a pH alcalino y desacelerándose en el intervalo de pH entre 3,5 y 6. Este comportamiento permitió explicar por qué es tan difícil eliminar totalmente el ión sulfito presente en el agua de la presa a pH 3,5. A este pH la cinética de oxidación es mucho más lenta.

La oxidación del ion sulfito transcurrió a través de mecanismos químicos. Las bacterias no participaron en una cinética tan rápida de reacción.

6°.- La oxidación de la pirita fué también otro factor que contribuyó a la transformación del residuo. En esta oxidación existió una participación importante de los microorganismos que se encontraron en el sistema, de tal manera que la oxidación espontánea del mineral generó unas condiciones de acidez, con una concentración de metales y sulfatos en solución y una población bacteriana similar a si se hubiera provocado o inducido la actividad microbiológica. Ahora bien, esta situación sólo se puso de manifiesto cuando el ion sulfito no estuvo presente en el sistema, esto es, cuando la presa dejó de recibir aportaciones de pulpa (“presa abandono”).

En ausencia de ion sulfito, se desencadenaron los fenómenos de oxidación microbiológica catalizados por bacterias S- y Fe-oxidantes, generándose unas condiciones de acidez (pH del orden de 2) y concentración de metales y sulfatos en solución muy superiores a los encontrados en situación de “planta activa”, esto es, en presencia del ion sulfito. En condiciones de “presa abandono”, fueron las bacterias litoautótrofas las que condicionaron el estado físico-químico de la presa.

En condiciones de “planta activa” el estado físico-químico de la presa estuvo controlado por la presencia del ion sulfito. Mientras existió sulfito en las colas de flotación, se mantuvieron las condiciones reductoras que impidieron la oxidación de la pirita en la presa.

Cabe hablar, por tanto, de un cierto “efecto beneficioso” del ion sulfito, puesto que su presencia previno la generación de aguas ácidas, al imponer unas condiciones reductoras. Sin embargo, su oxidación fue incontrolable y con ella la disminución del pH.

7°.- La disposición de la pulpa en la presa generó dos situaciones o ambientes bien distintos: la mayor parte de la pulpa quedó bajo agua, pero una fracción de pirita se mantuvo expuesta superficialmente al aire, de tal manera que la meteorización se desarrolló de distinta manera en ambas situaciones. Por un lado, la difusión del oxígeno en el agua no fué lo suficientemente importante como para oxidar la pirita del fondo, que permaneció inalterada. Por otro, la pirita superficial que sí sufrió degradación, no mostró, sin embargo, un grado de deterioro importante debido que estuvo sometida al riego continuo del propio agua de la presa y a las condiciones reductoras impuestas por el ion sulfito disuelto.

La evolución de la pirita en cada una de las zonas de la presa, así como la evolución de la pulpa bajo la influencia de factores concretos (presencia del ion sulfito, influencia de la oxidación microbiológica, etc), se pudieron reproducir adecuadamente a través de un modelo en columna que permitió estudiar el comportamiento del residuo bajo la influencia de cada uno de estos factores. Los resultados aportados por la experimentación en columnas de meteorización corroboraron lo descrito acerca del comportamiento del residuo bajo la influencia del ion sulfito y bajo la influencia de la oxidación microbiológica, y permitieron también reproducir el comportamiento de la pirita en cada una de las zonas o ambientes del sistema.

De estos resultados caben destacarse dos aspectos importantes: por un lado, que la fracción de mineral sumergida no contribuyó a la generación de acidez. Por otro, que siempre que hubo oxidación de la pirita expuesta superficialmente (condiciones de “presa abandono”), existió una contribución microbiológica importante a dicha oxidación.

8°.- Los cambios químicos que acompañaron al residuo de pirita cuando se abandonó están relacionados con cambios microbiológicos importantes, de tal manera que distintas especies se fueron seleccionando y sucediéndose de modo paralelo a las condiciones químicas que se establecieron. El modelo en columna (columna SM) elegido para simular el deterioro progresivo del residuo reprodujo bien estos cambios, y permitió conocer

además la selección microbiológica que se estableció en función de las distintas condiciones químicas generadas, tanto a nivel superficial como en el fondo de la presa. La altura de columna fue, sin embargo, insuficiente para reproducir el gradiente químico que se estableció en la capa de agua sobre el mineral.

9°.- Finalmente, se propone como método de tratamiento del agua de la presa la aplicación de la reducción biológica a partir de bacterias anaerobias reductoras de sulfatos aisladas del propio sistema. Los resultados que aportaron los experimentos realizados mostraron que este método es eficaz en cuanto a la precipitación de los metales disueltos, en cuanto a la reducción y eliminación de los sulfatos e incluso en cuanto a la alcalinización de las aguas. Ahora bien, siempre que éstas no tengan un valor extremo de pH, ya que el verdadero factor limitante del método propuesto está en la adaptación de las bacterias a condiciones extremadamente ácidas.

## ***Bibliografía***

## 5.- BIBLIOGRAFIA

**Amandola, G. y Terreni, V.**, 1967. *Analisi chimica strumentale e tecnica*. Vol 1. Tamburini editore. Milano. (Italia)

**Arkesteyn, G. y Bont, J.**, 1980. *Thiobacillus acidophilus: a study of its presence in Thiobacillus ferrooxidans cultures*. *Can. J. Microbiol.* 26: 1057-1065

**Arnesen, R.T. y Iversen, E.R.**, 1991. Monitoring water quality during filling on the Lokken mine: a possible role of sulfate - reducing bacteria in metals removal. *Second International Conference on the abatement of acidic drainage*. Montreal. MEND Program. CANMET. Ontario. (Canadá)

**Babij, T., Goodman, A., Khalid, A.M. y Ralph, B.J.**, 1980. Environmental studies of flooded opencuts. *Biogeochemistry of ancient and modern environments*. Australian Academy of Science. Canberra. (Australia)

**Ballester, A., Pla, F. y Llorente, E.**, 1991. Minería química. Cap. XIII. Instituto Tecnológico y Geominero de España. Madrid. (España)

**Bassett, H. y Parker, W.**, 1951. The oxidation of sulphurous acid. *J. Chem. Society: 1540-1560*

**Béchar, G., Rajan, S., Saley, J. y McCreedy, R.**, 1990. An anaerobic microbial ecosystem for the treatment of acid mine drainage. *92nd Cim Annual General Meeting*. Canadá

**Béchar, G., Rajan, S. y McCreedy, R.**, 1990. Microbiological treatment of acid mine drainage. Laboratory and field update. *Mineral Sciences Laboratories. Division Report MSL 90-106 (TR)*. CANMET

**Béchar, G., Rajan, S. y Gould, W.D.**, 1993. Characterization of a microbiological process for the treatment of acidic drainage. *Biohydrometallurgical Technologies*. Edtrs. A.E.Torma, J.E. Wey y V.L.Lakshmanan. The Minerals, Metals and Materials Society.USA

**Belin, D., Dinsdales, B. y Altringer, P.**, 1993. Arsenic removal from mining waste waters using sulfate-reducing bacteria in a 2-stage bioreactor. *Biohydrometallurgical Technologies*. Edtrs. A.E.Torma, J.E. Wey y V.L.Lakshmanan. The Minerals, Metals and Materials Society.USA

**Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 1989. Willians & Wilkins. Baltimore. USA.

**Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth** edition, 1994. Williams & Wilkins. Baltimore, U.S.A.

**Bassett, H. y Parker, W.**, 1951. The oxidation of sulphurous acid. *J. Chem. Society: 1540-1560*

**Bhaskara, K. y Rao, G.**, 1955. Oxidimetric methods for the volumetric estimation of sulphite. *Analytica Chimica Acta 13: 313-322*

**Brady, K., Perry, E., Beam, R.**, 1994. Evaluation of acid-base accounting to predict the quality of drainage at surface coal mines in Pennsylvania, USA. *International land reclamation and mine drainage conference and third international conference on the abatement of acidic drainage . Vol 1: 214-222*. United States Environmental Protection Agency. Pennsylvania Department of Environmental Resources. Tennessee Valley Authority. USDA Soil Conservation Service. Canada's MEND Program. United States Department of the Interior. Bureau of Mines Special Publication SP 06D-94

**British Columbia Acid Mine Drainage Task Force**, 1989. Draft acid rock drainage technical guide, Vol 1. *British Columbia Acid Mine Drainage Task Force Report*. Biotech Publishers Ltd. Vancouver, B.C. (Canadá)

**Burriel, F., Lucena, F., Arribas, S. y Hernández, J.**, 1985. Química analítica cualitativa. 12ª edición. Ed. Paraninfo. Madrid (España)

**Cairns, J., McCready, R. y Kalin, M.**, 1991. Integrated field and laboratory experiments in ecological engineering methods for acid mine drainage treatment. *Second International Conference on the abatement of acidic drainage. Montreal*. MEND Program. CANMET. Ontario (Canadá)

- Calabrese, J.P. y Sextone, A.**, 1991. Application of constructed cattail wetlands for the removal of iron from acid mine drainage. *Second International Conference on the abatement of acidic drainage*. Montreal. MEND Program. CANMET. Ontario (Canadá)
- Carlson, L., Vuorinen, A., Lahermo, P. y Tuovinen, O.**, 1980. Mineralogical, geomicrobiological and microbiological aspects of iron deposition from groundwater. Australian Academy of Science. Canberra. (Australia)
- Clarke, A.G.**, 1981. Electrolyte theory and the oxidation rate of sulphur dioxide in water. *Atmospheric Environment* 15(9): 1591-1595
- Collings, C.H.**, 1969. Métodos en microbiología. Acribia. Zaragoza.
- Cooke, W.B.**, 1966. The occurrence of fungi in acid mine drainage. *Proceedings of the Industrial Waste Conference*, Purdue University, 21: 258-274. Indiana. (USA)
- Coto Pérez, O.**, 1994. Caracterización de cultivos nativos ferrooxidantes. Biolixiviación de un concentrado de calcopirita. Tesis doctoral. Universidad de La Habana (Cuba)
- Cotton y Wilkinson**, 1988. Advanced inorganic chemistry. J.Wiley & Sons, Inc. New York (USA)
- Dave, S.R. y Natarajan, K.A.**, 1987. Microbial ecology of some Indian sulphidic mines. *Transactions of the Indian Institute of metals*, 40(4):315-327
- Doepker, R.**, 1991. Column leach study IV: factors affecting the dissolution of metals from sulfidic metal-mine tailings. *Second International Conference on the abatement of acidic drainage*. Montreal. MEND Program. CANMET. Ontario (Canadá)
- Doepker, R. y Drake, P.**, 1991. Laboratory study of submerged metal-mine tailings 3: factors influencing the dissolution of metals. *Second International Conference on the abatement of acidic drainage*. Montreal. MEND Program. CANMET. Ontario (Canadá)
- Donovan, J.**, 1994. Early weathering behaviour of pyritic coal spoil piles interstratified with chemical amendments. *International land reclamation and mine drainage conference and third international conference on the abatement of acidic drainage*. Vol 1: 214-222. United States Environmental Protection Agency. Pennsylvania Department of Environmental

Resources. Tennessee Valley Authority. USDA Soil Conservation Service. Canada's MEND Program. United States Department of the Interior. Bureau Of Mines Special Publication SP 06D-94.USA

**Dugan, P.**, 1975. Bacterial ecology of strip mine areas and its relationship to the production of acidic mine drainage. *The Journal of Science*, 75(6): 265-279

**Dudenhov, S.V., Shubov, L.Y., Glazunov.**, 1980. Fundamentos de la teoría y la práctica de empleo de reactivos de flotación. Ed.Mir (U.R.S.S.)

**Dvorak, D.H.**, 1991. Treatment of metal-contaminatd water using bacterial sulfate reduction: results from pilot-scale reactors. *Second International Conference on the abatement of acidic drainage* . Montreal. MEND Program. CANMET. Ontario (Canadá)

**East, D.R., Filipek, L.H. y Wildeman, T.R.**, 1994. Design of a tailing facility to mitigate potential acid rock drainage. *Hydrometallurgy 1994. Vol. 1: 961-969*. Institution of Mining and Metallurgy and the Society of Chemical Industry. Chapman & Hall. Cambridge (Inglaterra)

**Ferguson, K. y Morin, K.**, 1991. The prediction of acid rock drainage- Lessons from the database. *Second International Conference on the abatement of acidic drainage*. Montreal. MEND Program. CANMET. Ontario (Canadá)

**Fdez- Rubio, R.**, 1986. Abandono de minas e impacto hidrológico. Ed. Instituto Geológico y Minero de España y la E.T.S de Ingenieros de Minas de Madrid (España)

**Filion, M.P., Sirois, L.L. y Ferguson, K.**, 1992. Acid mine drainage research in Canada. Proceedings of the First International Conference on *Environmetal Issues and Waste Management in Energy and Minerals Production*. Edtrs. T.M. Yegulalp y Kunsoo Kim. Co-Sponsored: U.S. Bureau of Mines, Asarco, Mitsubishi Materials Corporation y New York State Mining and Mineral Resources Research Institute. Secaucus.USA

**Fuller, E.C. y Crist, R.H.**, 1941. The rate of Oxidation of Sulfite Ions by Oxygen. *Journal of American Society* 63: 1644-1650

**Gazea, B., Adam, K. y Kontopoulos, A.**, 1996. A review of passive systems for the treatment of acid mine drainage. *Minerals Engineering, Vol 9(1):23-42*

- Gómez, E.**, 1993. Aislamiento y caracterización de microorganismos de aguas de minas: Aplicación a la lixiviación de sulfuros complejos polimetálicos. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid (España)
- Greenwood, N.N. and Earnshaw, A.**, 1984. Chemistry of the elements. Pergamon Press Ltd; Heading Hill Hall, Oxford (England)
- Groudev, S.N., Genchev, F.N. y Gaidarjev, S.S.**, 1978. Observation of the microflora in an Industrial Copper Dump Leaching Operation. *Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena* . Eds Murr L.E. , Torma A.E. y Brierley J.A. .Academic Press. New York (USA)
- Groudev, S.N. y Groudeva, V.I.**, 1993. Microbial communities in four industrial copper dump leaching operations in Bulgaria. *FEMS Microbiology Reviews*, (11) 261-268
- Hammack, R. y Edenborn, H.**, 1992. The removal of nickel from mine waters using bacterial sulfate reduction. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37: 674-678
- Hammack, R., Dvorak, D. y Ederborn, H.**, 1994. Bench-scale test to selectively recover metals from metal mine drainage using biogenic H<sub>2</sub>S. *International land reclamation and mine drainage conference and third international conference on the abatement of acidic drainage, 1: 214-222*. United States Environmental Protection Agency. Pennsylvania Department of Environmental Resources. Tennessee Valley Authority. USDA Soil Conservation Service. Canada's MEND Program. United States Department of the Interior. Bureau of Mines Special Publication SP 06D-94. USA
- Handbook on Mining Chemicals**, 1986. Ed. Cyanamid. Madrid (España)
- Harrison, A.**, 1978. Microbial Succession and mineral leaching in an artificial coal spoil. *Applied and Environmental Microbiology*, 36(6): 861-869
- Harrison, A.**, 1984. The acidophilic thiobacilli and other acidophilic bacteria that share their habitat. *Ann. Rev. Microbiol.*, 28: 265-292
- Hegg, D.A. y Hobbs, P.**, 1978. Oxidation of sulfur dioxide in aqueous systems with particular reference to the atmosphere. *Atmospheric Environment*, 12: 241-253

- Hendricks, A.C.**, 1991. The use of an artificial wetland to treat acid mine drainage. *Second International Conference on the abatement of acidic drainage*. Montreal. MEND Program. CANMET. Ontario (Canadá)
- Herrera, L., Ruiz, P., Aguillón, J.C. y Fehrmann, A.**, 1989. A new spectrophotometric method for the determination of ferrous iron in the presence of ferric iron. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 44: 171-181
- Higginson, W. y Marshall, J.**, 1957. Equivalence changes in oxidation-reduction reactions in solution: some aspects of the oxidation of sulphurous acid. *J. Chem. Soc.* 447-458
- Hiskey, J.B. y Schlitt, W.J.**, 1981. Aqueous oxidation of pyrite. *Interfacing Technologies in Solution Mining*. Proceedings of the second SME-SPE International Solution Mining Symposium. Edtrs. W.J. Schlitt y J.B. Hiskey. Denver, Colorado. USA
- Hood, W.C. y Oertel, A.O.**, 1984. A leaching column method for predicting effluent quality from surface mines. *Symposium on Surface Mining, Hydrology, Sedimentology and Reclamation*. Lexington, Kentucky. USA
- Huss, A., Lim, P. y Eckert, C.**, 1982. Oxidation of aqueous sulfur dioxide. 1.- Homogeneous Manganese (II) and Iron (II). Catalysis at low pH. *J. Phys. Chem.*, 86: 4224-4228
- Hutchinson, K.I., Johnstone, A. y White, D.**, 1969. Taxonomy of the genus *Thiobacillus*: the outcome of numerical taxonomy. Applied to the groups as a whole. *J. Gen. Microbiol.*, 57:397-410
- Johnson, B.**, 1992. Diversity of microbial life in highly acidic, mesophilic environments. *Diversity of environmental biogeochemistry*. Ed. J. Berthelin. Elsevier: 225-238
- Kalin, M. y Smith, M.P.**, 1991. Biological amelioration of acidic seepage streams. *Second International Conference on the abatement of acidic drainage*. Montreal. MEND Program. CANMET. Ontario (Canadá)

- Kalin, M., Fyson, A. y Smith, M.P.**, 1993. ARUM- acid reduction using microbiology. *Biohydrometallurgical Technologies*. Edtrs. A.E.Torma, J.E. Wey y V.L.Lakshmanan. The Minerals, Metals and Materials Society, Warrendale, PA. (USA)
- Kalin, M., Fyson, A. y Smith, M.P.**, 1995. Passive treatment processes for the mineral sector. *Proceedings of the International Symposium on Waste Processing and Recycling in Mineral and Metallurgical Industries II*. Minerals Science and Engineering Section and the Non-Ferrous Pyrometallurgy Section of the Metallurgical Society of CIM. Vancouver, British Columbia (Canada)
- Kelley, B.C. y Tuovinen, O.H.**, 1988. Microbiological oxidations of minerals in mine tailings. *Chemistry and biology of solid waste. Dredged material and mine tailings*. Springer-Verlag. Berlin (Alemania)
- Kelly, D.P. y Harrison, A.P.**, 1989. Genus *Thiobacillus*. En : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 3. Williams & Wilkins. Baltimore (USA), pág. 1842-1858
- Kleinmann, R. y Crerar, D.** 1979. *Thiobacillus ferrooxidans* and the formation of acidity in simulated coal mine environments. *Geomicrobiology Journal*, 1(4): 373-388
- Kleinmann, R., Hedin, R. y Edenborn, H.**, 1991. Biological treatment of mine water- An overview. *Second International Conference on the abatement of acidic drainage*. Montreal.MEND Program. CANMET. Ontario (Canadá)
- Kodama, A. y Mori, T.** 1968. Studies on the metabolism of a sulfur-oxidizing bacterium V. Comparative studies on sulfur and sulfite oxidizing systems of *Thiobacillus thiooxidans*. *Plant and Cell Physiol.*, 9: 725-734
- Kolthoff, I.M., Sandell, E.B., Meehan, E.J. y Bruckenstein, S.**, 1976. Análisis químico cuantitativo. 3ª edición. Ed. Nigar. Buenos Aires (Argentina)
- Kuenen, G. y Bos, P.** 1991. Habitats and ecological niches of chemolithoautotrophic bacteria. *Ecology of Chemolithoautotrophic Bacteria* . Cap 4
- Kuyacak, N., Shemerata, T.W. y Wheeland, K.G.** 1990. Evaluation of improved lime neutralization processes. *Second International Conference on the abatement of acidic drainage*. Montreal. MEND Program. CANMET. Ontario (Canadá)

**Kuyacak, N., Lyew, D., St-Germain, P. y Wheeland, K.G.** 1991. In situ bacterial treatment of amd in open pits . *Second International Conference on the abatement of acidic drainage* . Montreal. MEND Program. CANMET. Ontario (Canadá)

**Kuyacak, N. y St-Germain, P.**, 1994. In situ treatment of acid mine drainage by sulphate reducing bacteria in open pits: scale-up experiences. *International land reclamation and mine drainage conference and third international conference on the abatement of acidic drainage , 1: 214-222*. United States Environmental Protection Agency. Pennsylvania Department of Environmental Resources. Tennessee Valley Authority. USDA Soil Conservation Service. Canada's MEND Program. United States Department of the Interior. Bureau of Mines Special Publication SP 06D-94 (USA)

**Lapakko, K.**, 1990. Solid phase characterization in conjunction with dissolution experiments for prediction of drainage quality. *Mining and mineral processing wastes: proceedings of the regional symposium on Mining and Mineral Processing Wastes*. Editor: F. Doyle. Continuing Education in Engineering, University Extension, University of California at Berkeley (USA)

**Lapakko, K.**, 1994. Subaqueous disposal of mine waste: laboratory investigation. *International land reclamation and mine drainage conference and third international conference on the abatement of acidic drainage , 1: 214-222*. United States Environmental Protection Agency. Pennsylvania Department of Environmental Resources. Tennessee Valley Authority. USDA Soil Conservation Service. Canada's MEND Program. United States Department of the interior. Bureau Of Mines Special Publication SP 06D-94

**\*Lawrence, R.**, . Prediction of the behaviour of mining and processing wastes in the environment. *Mining and mineral processing wastes. Cap. 14*

**Lindahl, Lars-Ake**, 1991. Who's going to pay the bill?. Regulatory aspects and financing of remedial actions in Sweden. *Second International Conference on the abatement of acidic drantage*. Montreal. MEND Program. CANMET. Ontario (Canadá)

**López, A.**, 1994. Estudio de la comunidad microbiana de un ecosistema extremo: el río Tinto. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid (España)

- López-Archilla, A.I., Marín, Y. y Amils, R., 1995.** Microbial ecology of an acidic river: biotechnological applications. *Biohydrometallurgical Processing*. Ed. C.A. Jerez, T. Vargas, H. Toledo y J.V. Wiertz. Universidad de Chile (Chile)
- Lorbach, S., Buonfiglio, V., Bauld, J. y Shively, J., 1993.** Oxidation of reduced sulfur compounds by *Thiobacillus ferrooxidans* 23270 y *Thiobacillus ferrooxidans* fc. *Biohydrometallurgical Technologies*. Eds. Torma A.E., Apel M.L. y Brierly C. L. . The Minerals, Metals and Materials Society (USA)
- Lorenzo, P.** 1990, Microorganismos implicados en la biolixiviación, aislamiento y caracterización preliminar de especies presentes en una población natural. Tesina presentada en la Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas (España)
- Lundgren, D.G. y Silver, M., 1980.** Ore leaching by bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 34: 263-283
- Mansferrer, J.A., 1994.** Tratamiento de aguas ácidas de mina mediante drenaje anóxico en caliza. *IX Congreso Internacional de Minería y Metalurgia. León (España)*
- Mier, J.L.** 1993. Estudios de catálisis y toxicidad con iones metálicos en la biolixiviación de la calcopirita por organismos termófilos. Tesis doctoral . Universidad Complutense de Madrid (España)
- Miller, S., Jefery, J. y Wong, J., 1991.** Use and misuse of the acid-base account for AMD prediction. *Second International Conference on the abatement of acidic drainage . Montreal.* MEND Program. CANMET. Ontario (Canadá)
- Miller, S., Jeffery, J. y Donohue, T., 1994.** Developments and management of acid forming mine wastes in Australia and South Asia. *International land reclamation and mine drainage conference and third international conference on the abatement of acidic drainage* , 1: 214-222. United States Environmental Protection Agency. Pennsylvania Department of Environmental Resources. Tennessee Valley Authority. USDA Soil Conservation Service. Canada's MEND Program. United States Department of the Interior. Bureau of Mines Special Publication SP 06D-94 (USA)

- Moses, C., Nordstrom, D., Herman, J. y Mills, A.**, 1987. Aqueous pyrite oxidation by dissolved oxygen and by ferric iron. *Geochemica et Cosmochimica Acta*, 51, 1561-1571
- Norton, P.J.**, 1993. Engineered wetlands and AMD. *Mining Environmental Management*
- Nyavor, K., Egiebor, N.O. y Feodorak, P.M.**, 1996. Bacteria oxidation of sulfides during acid mine drainage formation: a mechanism study. *EPD Congress*. Ed. Garry W. Warren. The Minerals, Metals and Materials Society (USA)
- Orava, D. y Swider, R.**, 1996. Inhibiting acid mine drainage throughout the mine life cycle. *Cim Bulletin*, 89, 999: 52-56
- Pasiuk-Bronikowska, W.** 1988. Kinetics of tetravalent sulphur oxidation. Peculiarities important for desulphurization process designers. *Chemia Stosowana*, 32(1): 3-13
- Pochon, J. y Tardiex, P.**, 1974. Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Collection techniques de base. Editions de le Tourelle. Seine (Francia)
- Postgate, J.R.**, 1993. The sulphate-reducing bacteria: contemporary perspectives. Eds. J.R. Odom y Rivers Singleton Jr. Springer-Verlag. New York (EEUU)
- Price, W.A. y Errington, J.C.**, 1994. ARD policy for mine sites in British Columbia. *International land reclamation and mine drainage conference and third international conference on the abatement of acidic drainage* . United States Environmental Protection Agency. Pennsylvania Department of Environmental Resources. Tennessee Valley Authority. USDA Soil Conservation Service. Canada's MEND Program. United States Department of the Interior. Bureau of Mines Special Publication SP 06D-94 (USA)
- Raraz, A.**, 1995. Biological and biotechnological waste management in materials processing. *JOM.*, 47(2)56-63
- Reichnbach, I.**, 1994. Review of Canadian legislation relevant to decommissioning acid mine drainage sites. *International land reclamation and mine drainage conference and third international conference on the abatement of acidic drainage* . United States Environmental Protection Agency. Pennsylvania Department of Environmental Resources. Tennessee Valley Authority. USDA Soil Conservation Service. Canada's MEND Program.

United States Department of the Interior. Bureau of Mines Special Publication SP 06D-94 (USA)

**Ritcey, G.M. y Silver, M.**, 1982. Lysimeter investigations on uranium tailings at Canmet. *Cim Bulletin*, 75(846): 134-143

**Ritcey, G.M.**, 1991. Deep water disposal of pyritic tailings.- A simulation for acid prediction. *International Conferences on the abatement of acid mine drainage. Montreal.* MEND Program. CANMET. Ontario (Canadá)

**Rose, A. W. y Daub, G.A.**, 1994. Simulated weathering of pyritic shale with added limestone and lime. *International land reclamation and mine drainage conference and third international conference on the abatement of acidic drainage* . Vol 1: 214-222. United States Environmental Protection Agency. Pennsylvania Department of Environmental Resources. Tennessee Valley Authority. USDA Soil Conservation Service. Canada's MEND Program. United States Department of the Interior. Bureau of Mines Special Publication SP 06D-94 (USA)

**Rowley, M., Warkentin, D., Yan, V. y Piroscio, B.**, 1994. The biosulphide process: integrated biological/chemical acid mine drainage treatment.- Results of laboratory piloting. *International land reclamation and mine drainage conference and third international conference on the abatement of acidic drainage* . Vol 1: 214-222. United States Environmental Protection Agency. Pennsylvania Department of Environmental Resources. Tennessee Valley Authority. USDA Soil Conservation Service. Canada's MEND Program. United States Department of the Interior. Bureau of Mines Special Publication SP 06D-94 (USA)

**Särner, E.**, 1990. Removal of sulphate and sulphite in an anaerobic trickling (antric) filter. *Water Science and Tecnology*, 22 (1/2) 395-404

**Schroeter, L.C.**, 1963 (I). Kinetics of air oxidation of sulforous acid salts. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 52(6): 559-563

**Schroeter, L.C.**, 1963 (II). Potentiometric determination of Sulfite Oxidation Rates. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 52(6): 564-568

**Schroeter, L.C.**, 1966. Sulfur dioxide. Ed.Pergamon Press Inc.

**Silver, M. y Ritcey, G.M.**, 1985. Effects of iron-oxidizing bacteria and vegetation on acid generation laboratory lysimeter tests on pyrite-containing uranium tailings. *Hydrometallurgy*, 15: 255-264

**Silver, M.**, 1985. Water leaching characteristics of uranium tailings from Ontario and northern Saskatchewan. *Hydrometallurgy*, 14: 189-217

**Silver, M., Ritcey, G.M. y Cauley, M.P.**, 1985. A lysimeter comparison of the effects of uranium tailings deposition methods on the release of environmental contaminants. *Hydrometallurgy*, 15:159-172

**Silverman, M.P. y Ehrlich, H.**, 1964. Microbial formation and degradation of minerals. *Advances in Applied Microbiology*, 6: 153:199

**Silverman, M.P. y Lundgren, D.G.**, 1959. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I An improved medium and harvesting procedures for securing high cell yields. *J. Bacteriol.*, 77: 642

**Singer, P.C. y Stumm, W.**, 1970. Acidic Mine Drainage: the rate-determining step. *Science* 167:1121-1123

**Singh, G. y Rawat, N.**, 1985. Removal of trace elements from acid mine drainage. *International Journal of Mine Water*, 4(1):17-23

**Smith, A. y Barton-Bridges, J.**, 1991. Some considerations in the prediction and control of acid mine drainage impact on groundwater from mining in North America. *Proceedings of the EPPIC Water Symposium, Johannesburg (South Africa)*

**Sobek, A., Schuller, W., Freeman, J.R. y Smith, R.M.**, 1978. Field and laboratory methods applicable to overburdens and mine soils. *US Environmental Protection Agency, EPA 600/2-78-054, 45-55*. Cincinnati (USA)

**Stainer, R.Y., Adelberg, E.A., e Ingraham, J.L.**, 1984. Microbiología. Ed. Reverté S.A. Barcelona (España)

**Standard Methods for the examination of Water and Wastewater**, 1985. 16th edit. APHA AMWA WPCF

**Stumm, W. y Lee, F.**, 1961. Oxygenation of ferrous iron. *Industrial and engineering chemistry*, 53(2):143-146

**Suzuki, I., Chan, C.W., Vilar, R. y Takeuchi, T.L.**, 1993. Sulfur and sulfide oxidation by *Thiobacillus thiooxidans*. *Biohydrometallurgical Technologies*. Eds. Torma A.E., Apel M.L. y Brierly C. L. . The Minerals, Metals and Materials Society (USA)

**Tuttle, J., Randles, C.I. y Dugan, P.R.**, 1968. Activity of microorganisms in acid mine water. I. Influence acid water on aerobic heterotrophs of a normal stream. *Journal of Bacteriology*, 95: 1945-1503

**Tuttle, J., Dugan, P., Macmillan, C. y Randles, C.**, 1969. Microbial dissimilatory sulfur cycle in acid mine water. *Journal of Bacteriology*, 97(2): 594-602

**Walsh, F. y Mitchell, R.**, 1972. A pH-dependent succession of iron bacteria. *Environmental Science and Technology*, 6 (9):809-812

**Wang, W. y Lee, W.**, 1992. The change of water quality tested by lysimeter: a case study at Chinkuashi. *Environmental Issues and Waste Management in Energy and Minerals Production* . 489-491. Singhal et al. (eds.). Balkema, Rotterdam (Holanda)

**Welch, D.E. y Firlotte, F.W.**, 1989. Tailings management in the gold mining industry. *Proceedings of the International Symposium en Tailings and Effluent Management 4*:7-22. Eds. Chalkey M.E., Conard B.R., Lakshmanan V.I. y Wheeland K.G.. Hydrometallurgy Section of the Metallurgical Society of CIM . Halifax (Canada)

**Williams, W.J.**, 1979. Handbook of anion determination. Butterworth & Co (Publishers) Ltd. 88 Kingsway. London (Reino Unido)

**Wisnieswsky, J.**, 1990. Oxidation of sulphites in aqueous solutions. *Environment Protection Engineering*, 16(1): 25-33