



## TÍTULO

# PROCESOS BIOGEOQUÍMICOS DE SULFATO-REDUCCIÓN INVOLUCRADOS EN LA REMEDIACIÓN DE LOS DRENAJES ÁCIDOS DE MINA Y LAS BALSAS DE FOSFOYESO

## AUTOR

**Julio César Castillo Hernández**

|                 |   |
|-----------------|---|
|                 | <b>Esta edición electrónica ha sido realizada en 2013</b>   |
| Directores      | Rafael Pérez López y José Miguel Nieto Liñán  |
| Instituciones   | Universidad Internacional de Andalucía y Universidad de Huelva.<br>Facultad de Ciencias Experimentales. Departamento de Geología<br>Tesis presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias en la<br>Universidad Internacional de Andalucía. |
| ISBN            | 978-84-7993-915-1   |
| ©               | Julio César Castillo Hernández  |
| ©               | De esta edición: Universidad Internacional de Andalucía   |
| Fecha documento | Enero de 2013   |



## Reconocimiento-No comercial-Sin obras derivadas

### Usted es libre de:

- Copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra.

### Bajo las condiciones siguientes:

- **Reconocimiento.** Debe reconocer los créditos de la obra de la manera especificada por el autor o el licenciador (pero no de una manera que sugiera que tiene su apoyo o apoyan el uso que hace de su obra).
  - **No comercial.** No puede utilizar esta obra para fines comerciales.
  - **Sin obras derivadas.** No se puede alterar, transformar o generar una obra derivada a partir de esta obra.
- 
- *Al reutilizar o distribuir la obra, tiene que dejar bien claro los términos de la licencia de esta obra.*
  - *Alguna de estas condiciones puede no aplicarse si se obtiene el permiso del titular de los derechos de autor.*
  - *Nada en esta licencia menoscaba o restringe los derechos morales del autor.*

**Tesis Doctoral**

**PROCESOS BIOGEOQUÍMICOS DE SULFATO-  
REDUCCIÓN**

**INVOLUCRADOS EN LA REMEDIACIÓN DE LOS  
DRENAJES ÁCIDOS DE MINA  
Y LAS BALSAS DE FOSFOYESO**

**Julio César Castillo Hernández**

**Universidad Internacional de Andalucía  
y Universidad de Huelva  
Huelva, Enero 2013**





---

Universidad Internacional de Andalucía y Universidad de Huelva  
Facultad de Ciencias Experimentales  
Departamento de Geología

**“PROCESOS BIOGEOQUÍMICOS DE SULFATO-  
REDUCCIÓN INVOLUCRADOS EN LA REMEDIACIÓN  
DE LOS DRENAJES ÁCIDOS DE MINA Y LAS BALSAS  
DE FOSFOYESO.”**

**Julio César Castillo Hernández**

Tesis presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias en la Universidad  
Internacional de Andalucía

**DIRECTORES:**



**Universidad  
de Huelva**

**Dr. Rafael Pérez López**

Contratado Ramón y Cajal  
Dpto. de Geología  
del Área de Cristalografía  
y Mineralogía de la  
Universidad de Huelva

**Dr. José Miguel Nieto Liñán**

Profesor Titular de Universidad  
del Área de Cristalografía y  
Mineralogía del Dpto. de  
Geología de la Universidad de  
Huelva



Esta Tesis se ha desarrollado en el grupo de investigación “Tharsis” del Dpto. de Geología, Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Huelva, a los que agradezco por facilitarme la infraestructura y el apoyo material y humano para la realización de toda mi tesis doctoral y por permitirme dar mis primeros pasos como investigador.

Además, esta tesis doctoral ha sido financiada por diferentes proyectos de investigación en el transcurso de su desarrollo, a los cuales agradezco por que sin su apoyo no hubiera sido posible la finalización de esta.

Los proyectos de investigación que han financiada el desarrollo de este estudio y la consecución de los resultados obtenidos son:

- Proyecto **INTERREG, “TRASAGUA”** (*Subproyecto de I2TEP*).
- Proyecto **CTM2007-66724-C02-02/TECNO** del Ministerio Español de Ciencia y Tecnología: *“Atenuación natural y tratamiento pasivo del drenaje ácido de mina en la cuenca del Río Odiel”*.
- Proyecto **Ref. P06-HUM-01658** de la Universidad de Huelva y Universidad de Granada: *“Impacto medio ambiental y cambio social en el sur de la Península Ibérica durante la reciente prehistoria”*.
- Proyecto **CTM2006-28148-E/TECNO** del Ministerio Español de Ciencia y Tecnología: *“Implementación de un sistema tratamiento pasivo y estudio de la atenuación natural en la cuenca del Río Odiel”*.





Durante estos cuatro años he buscado una frase adecuada para describir lo vivido, lo aprendido y lo descubierto. Yo creo que esta frase (\*) es la correcta. Mis bichos me han dado alegrías, preocupaciones y problemas que han hecho de mí un geomicrobiólogo junior con ansias de seguir aprendiendo de ellos. Aunque mucho de este conocimiento lo debo a mi base y respaldo, José Miguel, Rafa, Manu y Francisco, que han depositado siempre su confianza en mí y espero que en los próximos años pueda retribuir todo el apoyo que me han brindado.

\*La ciencia no conoce país, porque el conocimiento pertenece a la humanidad, y es la antorcha que ilumina el mundo (*Louis Pasteur*).



## AGRADECIMIENTO

Recuerdo mis primeros pasos en el aeropuerto de barajas, tiritaba de frio, llevaba puesto una camisa de lino, un pantalón corto y unas chanclas. Madrid me esperaba a 3°C, una temperatura poco habitual para mí. Sin embargo, pude sentir el calor de un país que me ha llenado de alegrías. Alguien me esperaba con ilusión, pues iba a ser su cocinero, cosa que aprendí con el pasar del tiempo. Mi amigo Dino, un quechua de pura cepa. Un querido amigo que mediante sus consejos de hermano mayor ha ayudado a que mi vida mejore. Pero si de aconsejar se trata, Marco era mejor aun, sí cabe. Un panameño menos chocolatón que Dino, un hombre, mejor dicho un padre, que ha guiado mis pasos en el devenir de mis días en España. Qué puedo decirle a marco “Simplemente, gracias por estar a mí lado”. Pero cómo conocí a estos buenos amigos ¡Claro, en la Universidad Internacional de Andalucía (UNIA)!, donde José Miguel, Rafa, Reinaldo, Gabriel, Carlos y otros profesores en complicidad con Ricardo, María (Peinado y Benítez) y Marivi nos atormentaban con clases a las 2 y 3 de la tarde. Realmente, gracias a todos porque en aquellos días, semanas y meses descubrí poco a poco el mundo de la investigación. Agradezco a la UNIA por darme la oportunidad de cursar mis estudios doctorales en sus aulas y por el apoyo constante que he recibido de todo su personal. Así mismo, mi sincero agradecimiento a la Universidad de Huelva por darme la oportunidad de crecer profesionalmente y darme las facilidades y las herramientas necesarias para poder realizar mi doctorado. Inicialmente, tengo que agradecer a seis grandes personas que motivaron mi camino hacia la investigación.

Gracias José Miguel Nieto, por confiar en mí, por ser mi director de tesis, por darme la oportunidad de forjarme como investigador, por ser un amigo y cuidar de mí. Te estoy eternamente agradecido. Gracias Rafa Pérez López, por acogerme como un hijo y guiarme en estos 5 años como mi director de tesis. Tú junto a José Miguel han sido y serán mis ejemplos a seguir como investigador y persona. Gracias por tu amistad y por ilusionarse con mis pequeños descubrimientos y por corregirme mis grandes fallos. Pero para completar los tres pilares de mi tesis tengo que agradecer a Manuel Caraballo quien ha estado preocupado de mi orientación profesional desde el inicio de mi tesis. Gracias manu porque por ti ahora soy un poco más geomicrobiologo. Gracias por tu ayuda incesable, por escuchar mis ideas y por ser un gran amigo. Sin ustedes no hubiera sido posible esta tesis.

Para comenzar hablar de Reinaldo debo mencionar a Carmen, una mujer sencilla, vivaz y llena de alegría. Ambos me apoyaron desde un principio a seguir este maravilloso camino y con su cariño y afecto apartaron de mí la nostalgia por tener lejos a mi gente. A Gabriel o Grabiél, nunca lo sabré con certeza. Él es el gran padre de esta familia universitaria y desde

nuestra llegada nos hizo parte de ella. Gracias por estar siempre atento a nuestro presente y a nuestro futuro.

Así también, agradecerles de todo corazón a Paco Nocete, Manuel Olias y Juan Carlos Ceron por confiar en mí, por su amistad y apoyar la realización de mi tesis.

En este largo camino que está llegando a su fin, he tenido la dicha de contar con muchísima ayuda más cercana o más lejana, no importa, simplemente amigos míos que han dado alegría a mi vida. Mi Comunidad A (Will, Carlos, Javi, Lorenzo, Paul, Capica, Guille, Hector y Miky) con los que puedo contar siempre y sus emails que tantas carcajadas me han robado y han alegrado mis días. Gracias Chicos su fuerza siempre ha estado conmigo.

Mi familia universitaria con mi mama pato “la Lola” y mi consuegros “Francisquillo y Diana”, con Hans, un alemán totalmente andaluz, Sandrita la geoloka, Awi con su salero y no puedo dejar de mencionar a Joaquín, Felipe, Carlos, Berta, Irene y desde hace poco a Sergio y Pablo que con su chispa han alegrado mis días. También debo agradecer por su ayuda y amistad al grupo de química de la universidad de Huelva, siempre me ayudaron y facilitaron la vida, al grupo de bioquímica de la universidad de Huelva, gracias chicas por su amistad, paciencia y por permitirme dar mi primeros pasos en genética y por último al grupo de arqueología, ¡como extraño las salidas de campo dirigidas por Moises!, chicos sinceramente gracias su amistad es un gran tesoro para mí.

Muchas gracias, a mis amigos de HuelvaYork Sara, Carlos, Dani, Manuel, Luis, Conce, Roberto, Javi, Maria y Jose Luis porque siempre he podido contar con su apoyo y amistad.

Todo esto no hubiera sido posible sin la ayuda de mi familia peruana y ahora de mi familia española. Gracias papá Jesús y mamá Gladys por apoyar mis sueños, los quiero. Gracias tía Mirella porque sin sus consejos y ayuda no sería quien soy. Gracias a mis hermanas Geral y Lizzeth por motivarme siempre a seguir adelante. A mis Abuelos Salomón y Julia, a mis primos, tíos y a Lito, gracias por su apoyo moral y su cariño a pesar de la distancia.

A Angela Arias, suegra y amiga, tus palabras, apoyo y consejo siempre me han ayudado a seguir adelante, te quiero. A la familia española porque me han acogido con todo el amor del mundo, los quiero.

Debo de agradecer a Dios por toda la dicha que tengo, porque ha puesto en mi vida a la mujer que amo, y aunque no mencionada dentro de los pilares de mi tesis ella ha sido el cimiento en el cual he apoyado mis pilares. Alba, tú has sido la pila que enciende mi linterna cuando la noche ha estado más oscura, mi serenidad en mis días de stress y la persona que trabajando junto a mí, ha sacado esta tesis adelante. Gracias Cariño el trabajo fue más llevadero

contigo a mi vera, Te amo. Y por último, a mi niña Delia que me da la ilusión y el amor necesario para seguir adelante. Ustedes son y serán indispensables en mí vida. Su apoyo y comprensión han permitido también la realización de esta tesis. **LAS AMO.**



## RESUMEN

El estuario de Huelva (SO España) representa un claro ejemplo de ecosistema acuático contaminado por metales. Los principales residuos sólidos que actúan como fuente continua de contaminación son, principalmente, aquellos que existen en zonas mineras abandonadas de la Faja Pirítica Ibérica (FPI) y, secundariamente, las balsas de fosfoyesos de la industria de fertilizantes del Polo Químico de Huelva. La presente Tesis Doctoral (**Capítulo 1**) examina el uso potencial de bacterias sulfato-reductoras (BSR) para mitigar la contaminación relacionada con estos residuos mineros e industriales.

La FPI es una de las mayores provincias de sulfuros masivos del mundo. La minería ha generado un gran volumen de residuos ricos en sulfuros que, después de su oxidación, producen lixiviados ácidos que contienen altas concentraciones de sulfato y metales conocidos como drenajes ácidos de mina (AMD, siglas en inglés de *acid mine drainage*). El AMD impacta fuertemente en la calidad de las principales cuencas hidrográficas de la región, ríos Tinto y Odiel. Se han probado algunas estrategias de restauración mediante el uso de reactivos alcalinos (caliza y magnesia) para tratar con este problema ambiental. Sin embargo, estos sistemas presentan graves deficiencias en la eliminación de altas concentraciones de sulfato.

El **Capítulo 2** se centra en demostrar en el laboratorio la eficacia de un tratamiento con BSR para tratar los efluentes finales de un sistema de tratamiento calizo. Estos efluentes exhiben un pH casi neutro, y altas concentraciones de sulfato (3000 mg/L) y Zn (260 mg/L). Hasta ahora, concentraciones de Zn por encima de 150 mg/L habían sido letales para las BSR. Sin embargo, los resultados mostraron que el sulfato se redujo a sulfuro y disminuyeron las concentraciones en solución. Posteriormente, la concentración de Zn disminuyó de 260 mg/L a valores por debajo del límite de detección. Ambos descensos fueron consistentes con la precipitación de esfalerita y wurtzita (ZnS). Por tanto, las BSR toleraron las altas concentraciones de Zn. Estos resultados recomiendan el diseño de un sistema pasivo de dos pasos - alcalino (caliza) y biológico (BSR) - como estrategia para el tratamiento del AMD en entornos mineros de la FPI.

Por otro lado, la producción de ácido fosfórico mediante ataque húmedo conduce a la acumulación de un sub-producto conocido como fosfoyeso. La balsa de fosfoyeso cubre un área de 1200 ha sobre las marismas saladas del río Tinto. Esta balsa no es totalmente estanca en la actualidad. Así que los efluentes procedentes de su lixiviación pueden contaminar los sistemas medioambientales circundantes.

El **Capítulo 3** se centra en la comprensión de los procesos que controlan la liberación y la movilidad de los contaminantes en el perfil de meteorización de la balsa de fosfoyeso. Se tomaron muestras de sólidos y agua de poro a diferentes profundidades hasta llegar al suelo de marisma. Los elementos traza fueron altamente móviles y biodisponibles en la zona superficial bajo condiciones ácidas y oxidantes. Sin embargo, la concentración de contaminantes disminuyó en el agua de poro de la zona más profunda bajo condiciones neutras y anaeróbicas, inferidas por los sedimentos ricos en materia orgánica de la marisma y por la actividad de BSR. La eliminación de los elementos traza en las soluciones anóxicas de poro se produjo por la precipitación de sulfuros neoformados, siendo este proceso el principal responsable de la atenuación natural de la contaminación. Esta disminución en la movilidad de metales minimiza significativamente el impacto del fosfoyeso en las marismas.

Finalmente, el **Capítulo 4** propone una estrategia para la biorremediación de los contaminantes asociados con la lixiviación del fosfoyeso. Esta estrategia está inspirada en los procesos de atenuación que ocurren naturalmente en la balsa asociados con la actividad de BSR. La idea fue demostrar en el laboratorio la presencia de BSR usando fosfoyeso como inóculo natural mediante la estimulación de su crecimiento, en soluciones altamente contaminadas por metales, con diferentes sustratos orgánicos de bajo coste. Bajo estas condiciones, el sulfato se redujo a sulfuro debido al desarrollo de BSR, y las concentraciones significativamente disminuyeron. Las concentraciones de metales también se redujeron a valores por debajo del límite de detección debido a la precipitación de sulfuros neoformados. Por tanto, en un tratamiento futuro de biorremediación, la aplicación de enmiendas orgánicas, como el estiércol de caballo, a cubiertas de suelo natural podría incentivar la inmovilización de contaminantes.



## ABSTRACT

The Estuary of Huelva (SW Spain) represents a clear example of metal-polluted aquatic ecosystem. The main solid wastes acting as a continuous source of pollution are, mainly, those from abandoned mining districts of the Iberian Pyrite Belt (IPB) and, secondarily, the phosphogypsum stacks from the present fertilizer industry of the Huelva Industrial State. The present Ph. D. Thesis (**Chapter 1**) examines the potential use of sulfate-reducing bacteria (SRB) to mitigate the pollution related to both mining and industrial wastes.

The IPB is one of the most outstanding massive sulfide provinces in the world. The mining has generated a large volume of sulfide-rich wastes that, after oxidation, produce acidic leachates containing high concentrations of sulfate and metals known as acid mine drainage (AMD). The AMD has a strong impact on the quality of the main watersheds of this region, Tinto and Odiel river basins. Some restoration strategies using alkaline reagents (limestone and magnesia) have been tested to deal with this environmental problem. However, these systems exhibit serious deficiencies in removing high concentrations of sulfate.

The **Chapter 2** is focuses on demonstrating in the laboratory the effectiveness of a treatment with SRB to deal with final effluents from a limestone treatment system. These effluents exhibit a near-neutral pH, and high concentrations of sulfate (3000 mg/L) and zinc (260 mg/L). So far, zinc concentrations above 150 mg/L had been lethal for SRB. However, results showed that sulfate was reduced to sulfide and concentrations in solution decreased. Subsequently, Zn concentrations decreased from 260 mg/L to values below detection limit. Both decreases were consistent with the precipitation of sphalerite and wurtzite (ZnS). Hence, SRB tolerated the high Zn concentrations. These findings recommend the design of a two-steps passive system - alkaline (limestone) and biological (SRB) - as a treatment strategy for the AMD at IPB mining environments.

On the other hand, the production of phosphoric acid via wet attack leads to the stockpiling of a waste by-product known as phosphogypsum. The phosphogypsum stack covers an area of 1200 ha on the salt marshes of the Tinto river. This stack is not totally watertight at present. So that the effluents coming from its leaching may pollute the surrounding environmental systems.

The **Chapter 3** is focused on the understanding of the processes controlling the release and mobility of contaminants in the weathering profile of the phosphogypsum stack. Samples of solids and pore-waters were taken at different depths to reach the marsh-ground. Trace elements were highly mobile and bioavailable in the superficial zone under acidic and oxidizing

conditions. However, concentration of contaminants decreased in pore-water in the deeper zone under neutral and anaerobic conditions, inferred by the organic matter-rich marsh sediments and the SRB activity. Trace element removal from anoxic pore solutions occurred by precipitation of newly-formed sulfides, being this process main responsible for the natural attenuation of contamination. This decrease in metal mobility significantly minimizes the impact of phosphogypsums on the salt-marshes.

Finally, the **Chapter 4** proposes a strategy for bioremediation of the contaminants associated with the leaching of phosphogypsum. This strategy is inspired in the attenuation processes that naturally occur in the stack associated with the SRB activity. The idea was to prove in the laboratory the presence of SRB using phosphogypsum as natural inoculum by stimulating their growth, in highly metal-polluted solutions, with different low-cost organic substrates. Under these conditions, sulfate was reduced to sulfide due to the SRB development, and concentrations significantly decreased. Metal concentrations also decreased to values below the detection limit by precipitation of newly-formed sulfides. Hence, in a future bioremediation treatment, the application of organic amendments, such as horse manure, to natural soil covers could enhance the contaminant immobilization effects.

## ÍNDICE

### AGRADECIMIENTOS

|          |     |
|----------|-----|
| RESUMEN  | i   |
| ABSTRACT | iii |

### CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN 1

|   |    |
|---|----|
| 1. ESTUARIO DE LA RÍA DE HUELVA                   | 3  |
| 2. GEOQUÍMICA DEL DRENAJE ÁCIDO DE MINA           | 5  |
| 2.1. Oxidación de sulfuros y generación de AMD    | 5  |
| 2.2. Tratamientos de remediación                  | 7  |
| 2.2.1. <i>Tratamientos pasivos químicos</i>       | 8  |
| 2.2.2. <i>Tratamientos pasivos biológicos</i>     | 9  |
| 3. GEOQUÍMICA DEL FOSFOYESO                       | 11 |
| 3.1. Producción                                   | 11 |
| 3.2. Proceso de atenuación de los contaminantes   | 13 |
| 4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS                      | 14 |
| 4.1. Biorremediación de los drenaje ácido de mina | 14 |
| 4.2. Biorremediación del fosfoyeso                | 16 |

### CAPÍTULO 2: PRECIPITACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ESFALERITA-WURTZITA INDUCIDA BIOLÓGICAMENTE POR BACTERIAS SULFATO-REDUCTORAS: IMPLICACIONES PARA EL TRATAMIENTO DE DRENAJES ÁCIDOS DE MINA 18

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN                                       | 23 |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS                               | 25 |
| 2.1. Inóculos y enriquecimiento bacteriano            | 25 |
| 2.2. Experimentos de tolerancia y eliminación de zinc | 26 |
| 2.3. Metodología de análisis                          | 27 |
| 3. RESULTADOS   | 28 |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.1. Evolución química de las soluciones   | 28        |
| 3.2. Caracterización mineralógica  | 31        |
| 4. DISCUSIÓN   | 33        |
| 5. CONCLUSIONES  | 38        |
| <br>   |           |
| <b>CAPÍTULO 3: EVALUACIÓN DEL IMPACTO DE FOSFOYESO<br/>SOBRE LAS MARISMAS DEL RÍO TINTO<br/>(SUROESTE DE ESPAÑA): EL PAPEL DE LOS<br/>PROCESOS DE ATENUACIÓN NATURAL</b> | <b>40</b> |
| <br>   |           |
| 1. INTRODUCCIÓN  | 45        |
| 2. MARCO AMBIENTAL Y OBJETIVOS   | 47        |
| 3. METODOLOGÍA   | 48        |
| 3.1. Toma y preparación de muestras  | 48        |
| 3.2. Muestreo y análisis del agua de poro  | 49        |
| 3.3. Análisis del fosfoyeso  | 50        |
| 3.4. Modelización geoquímica   | 51        |
| 4. RESULTADOS  | 52        |
| 4.1. Parámetros sensibles a las condiciones redox  | 52        |
| 4.2. Agua de poro y concentraciones totales  | 54        |
| 4.3. Movilidad de metales en el fosfoyeso  | 57        |
| 5. DISCUSIÓN   | 60        |
| 6. CONCLUSIONES  | 63        |
| <br>   |           |
| <b>CAPÍTULO 4: EVALUACIÓN DE SUSTRATOS ORGÁNICOS PARA<br/>MEJORAR LA ACTIVIDAD SULFATO-REDUCTORA<br/>EN EL FOSFOYESO</b>   | <b>64</b> |
| <br>   |           |
| 1. INTRODUCCIÓN  | 69        |
| 2. METODOLOGÍA   | 71        |
| 2.1. Muestreo del fosfoyeso  | 71        |
| 2.2. Sustratos orgánicos   | 72        |
| 2.3. Diseño experimental   | 72        |
| 2.4. Metodología de análisis   | 73        |

|   |            |
|---|------------|
| 2.5. Modelización geoquímica                              | 75         |
| <b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>                          | <b>75</b>  |
| 3.1. Caracterización química de los materiales de partida | 75         |
| 3.2. Evolución de los experimentos batch                  | 76         |
| 3.2.1. <i>pH</i> y <i>Eh</i>                              | 76         |
| 3.2.2. <i>Sulfato-reducción y eliminación de metales</i>  | 77         |
| 3.2.3. <i>Cuantificación de BSR</i>                       | 79         |
| 3.3. Productos sólidos de reacción                        | 80         |
| <b>4. CONCLUSIONES</b>                                    | <b>83</b>  |
| <br>  |            |
| <b>CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES GENERALES</b>                 | <b>85</b>  |
| <br>  |            |
| <b>CAPÍTULO 5: GENERAL CONCLUSIONS</b>                    | <b>88</b>  |
| <br>  |            |
| <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                         | <b>91</b>  |
| <br>  |            |
| <b>PUBLICACIONES</b>                                      | <b>113</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### CAPÍTULO 1

**Figura 1.1:** Mapa de la provincia de Huelva que muestra las cuencas hidrográficas de los ríos Tinto y Odiel y la ubicación de las fuentes de contaminación más importantes: las principales minas abandonadas generadoras de AMD y las balsas de fosfoyeso).

**Figura 1.2:** Diagrama representativo de los pasos de la generación de AMD.

**Figura 1.3:** Esquema del proceso de producción del ácido fosfórico y de la generación de fosfoyeso.

## CAPÍTULO 2

**Figura 2.1:** Fotografías de campo de los arroyos ácidos de dos minas abandonadas de las FPI de donde se obtuvieron las muestras de inóculo CM y ME: (a) el inóculo CM procede del flujo de salida del pozo subterráneo de Cueva de la Mora (flecha blanca) y (b) el inóculo ME procede de la salida del túnel de Mina Esperanza.

**Figura 2.2:** Evolución temporal de (a) pH, (b) Eh y (c) concentración de sulfatos en los medios durante los experimentos de enriquecimiento [SS: inóculo procedente de una planta de tratamiento de aguas residuales, ME: inóculo procedente de Mina Esperanza y CM: inóculo procedente de Cueva de la Mora]. Los datos son la media de duplicados y las barras de error son más pequeñas que los símbolos, y por tanto no se muestran.

**Figura 2.3:** Evolución temporal de (a) pH, (b) Eh y (c) concentración de zinc en los medios durante los experimentos de tolerancia y eliminación de zinc [SS: inóculo procedente de una planta de tratamiento de aguas residuales, ME: inóculo procedente de Mina Esperanza y CM: inóculo procedente de Cueva de la Mora]. Los datos son la media de duplicados y las barras de error son más pequeñas que los símbolos, y por tanto no se muestran.

**Figura 2.4:** Imágenes de microscopio óptico de luz transmitida de la biopelícula de BSR en los experimentos de tolerancia/eliminación de zinc: de (a) a (d) partículas esféricas con contornos oscuros (flechas negras) asociadas a los grupos de bacterias y polímeros orgánicos (flechas blancas). En (c) y (d), las muestras se tiñeron mediante la técnica de tinción Gram para observar la presencia de bacterias Gram negativas o positivas. En este caso, el color rojo-rosa es indicativo de la presencia de colonias Gram negativas.

**Figura 2.5:** Imágenes de SEM de esferoides de ZnS de los experimentos de tolerancia/eliminación de zinc. Es de interés resaltar que las partículas esféricas están compuestas por azufre y zinc según el espectro de EDS.

**Figura 2.6:** (a) Espectros de  $\mu$ -DRX con radiación sincrotrón de las partículas de ZnS de los experimentos de tolerancia al zinc. (b) Ejemplo de descomposición del espectro de DRX del experimento con el inóculo SS en el rango de  $7.5$  a  $9^\circ 2\theta$ . En (b), el solapamiento de los picos esfalerita y wurtzita se separó numéricamente utilizando el

programa DECOMPXR (Lanson, 1993). S: esfalerita, W: wurtzita.

**Figura 2.7:** Imágenes de SEM y EMP de los esferoides de ZnS (flechas negras) asociados con polímeros orgánicos y células bacterianas (flechas blancas). Imágenes (a) retrodispersada y (b) secundaria de SEM de la misma área: la comparación revela claramente que los precipitados de ZnS aparecen como partículas brillantes y los polímeros orgánicos como áreas más oscuras en (b) con respecto a (a). El rectángulo pequeño es ampliado en (c). (c) Imagen de SEM del recubrimiento orgánico sobre los esferoides de ZnS. (d) Imagen de SEM de abundantes células bacterianas. (e) - (f) Imágenes de EMP de una sección transversal de las células bacterianas con incrustaciones superficiales de agregados de ZnS (flechas blancas).

### CAPÍTULO 3

**Figura 3.1:** Mapa de situación del estuario de los ríos Tinto y Odiel, con la localización de las balsas de fosfoyeso y la ubicación de los tres sondeos realizados para el muestreo.

**Figura 3.2:** Evolución con la profundidad del (a) pH y (b) potencial redox en las soluciones de agua de poro de las muestras de fosfoyeso.

**Figura 3.3:** Evolución con la profundidad de las concentraciones de Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, S, U y Zn en las soluciones de agua de poro de las muestras de fosfoyeso.

**Figura 3.4:** Porcentaje de Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn extraído en cada paso del procedimiento de extracción secuencial para el promedio de las muestras de (a) la zona superficial no saturada (P1, P2, P4, P5, P6, P8 y P9) y (b) la zona saturada más profunda (P3, P7 y P10). Nota: el uranio estuvo por debajo del límite de detección del ICP-OES para todos los extractantes.

**Figura 3.5:** Imágenes de SEM y espectros de EDS de sulfuros metálicos neoformados [(a-b) pirita framboidal, (c) sulfuro de cobre y (d) sulfuro de arsénico] encontrados en las muestras de fosfoyeso localizadas en el contacto con la marisma.

**Tabla 3.1:** Procedimiento de extracción secuencial BCR usado para la especiación.

**Tabla 3.2:** Resultados obtenidos de la especiación de azufre reducido (AVS: azufre

ácido volátil, S-py: azufre pirítico y S0: azufre elemental) y algunos parámetros químicos (FeR: Fe reactivo, DOP: grado de piritización, DOS: grado de sulfidización, DORS: grado de sulfidización reactiva y ME: metales extraídos) de las muestras examinadas de fosfoyeso.

**Tabla 3.3:** Análisis del contenido pseudo-total de elementos en las muestras de fosfoyeso.

**Tabla 3.4:** Resultados obtenidos mediante la extracción secuencial BCR de las muestras de fosfoyesos: F1 (fracción fácilmente soluble), F2 (fracción reducible), F3 (fracción oxidable) y F4 (fracción residual).

## CAPÍTULO 4

**Figura 4.1:** Evolución temporal de (a) pH y (b) Eh para el control negativo (sin fuente de carbono), control positivo (con lactato), estiércol de caballo, cubierta vegetal y compost de leguminosas durante los experimentos batch.

**Figura 4.2:** Evolución temporal de las concentraciones de (a) azufre total, (b) sulfatos, (c) hierro, (d) cobre, (e) zinc y (f) cadmio para el control negativo (sin fuente de carbono), control positivo (con lactato), estiércol de caballo, cubierta vegetal y compost de leguminosas durante los experimentos batch.

**Figura 4.3:** Imágenes de SEM de sulfuros neoformados [(a) pirita framboidal, (b) pirita poliédrica aislada, (c) calcopirita framboidal y (d) galena y pirita framboidal] encontrados en los productos de reacción después de los experimentos.

**Tabla 4.1:** Caracterización química de los sustratos orgánicos (L: lignina, C: celulosa, SFD: sustancias fácilmente disponibles, SV: sólidos volátiles, y FB: fracción biodegradable).

**Tabla 4.2:** Resultados obtenidos de la especiación de azufre reducido (AVS: azufre ácido volátil), S-py: Azufre pirítico, y S0: azufre elemental y algunos parámetros químicos (FeR: Fe reactivo, DOP: grado de piritización, DOS: grado de sulfidización y MS: metales ligado a sulfuros) de los productos de la reacción después del experimento batch.



# CAPÍTULO

# 1

---

## INTRODUCCIÓN

---

**J. Castillo. Tesis doctoral: Procesos biogeoquímicos de sulfato-reducción involucrados en la remediación de los drenajes ácidos de mina y las balsas de fosfoyesos. Universidad Internacional de Andalucía y Universidad de Huelva, 2013.**



# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

---

|                   |  |
|-------------------|--|
| <b>CONTENIDO:</b> | <b>1. ESTUARIO DE LA RÍA DE HUELVA</b>                 |
|                   | <b>2. GEOQUÍMICA DEL DRENAJE ÁCIDO DE MINA</b>         |
|                   | <b>2.1. Oxidación de sulfuros y generación de AMD</b>  |
|                   | <b>2.2. Tratamientos de remediación</b>                |
|                   | <i>2.2.1. Tratamientos pasivos químicos</i>            |
|                   | <i>2.2.2. Tratamientos pasivos biológicos</i>          |
|                   | <b>3. GEOQUÍMICA DEL FOSFOYESO</b>                     |
|                   | <b>3.1. Producción</b>                                 |
|                   | <b>3.2. Proceso de atenuación de los contaminantes</b> |
|                   | <b>4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>                    |
|                   | <b>4.1. Biorremediación del AMD</b>                    |
|                   | <b>4.2. Biorremediación de las balsas de fosfoyeso</b> |

---

### 1. ESTUARIO DE LA RÍA DE HUELVA

La desembocadura de los ríos Tinto y Odiel forma un estuario de aprox. 15 km conocido como Ría de Huelva, localizado en la Provincia de Huelva (Suroeste de España). Este sistema estuarino se caracteriza desde el punto de vista ambiental porque recibe dos fuentes continuas de contaminación: principalmente la actividad minera abandonada de la Faja Pirítica Ibérica (FPI) y secundariamente la actividad industrial actual del Polo Químico de Huelva.

Por un lado, la FPI es una de las mayores provincias de sulfuros masivos del mundo (Sáez et al., 1999), y se localiza a unos 50 km al Norte del estuario. En esta región, existen indicios de actividad minera desde hace unos 5000 años (Leblanc et al., 2000; Nocete et al., 2005). Sin embargo, en la actualidad la actividad prácticamente ha cesado y la única herencia para la población de la provincia es la existencia de aprox. 150 Hm<sup>3</sup> de residuos mineros ricos en sulfuros (IGME, 1998). Este enorme volumen de residuos ha producido un impacto

paisajístico severo. No obstante, el principal problema medioambiental causado por la actividad minera es la producción de drenaje ácido de mina (AMD, siglas en inglés de *acid mine drainage*) derivado de la oxidación superficial de los sulfuros que están contenidos en estos residuos. Estos lixiviados extremadamente ácidos y con elevados contenidos en sulfatos y metales pesados son drenados por los ríos Tinto y Odiel, provocando la fuerte contaminación de sus cuencas fluviales y finalmente del estuario (Fig. 1.1) (Sainz et al., 2004; Olías et al., 2006; Nieto et al., 2007).

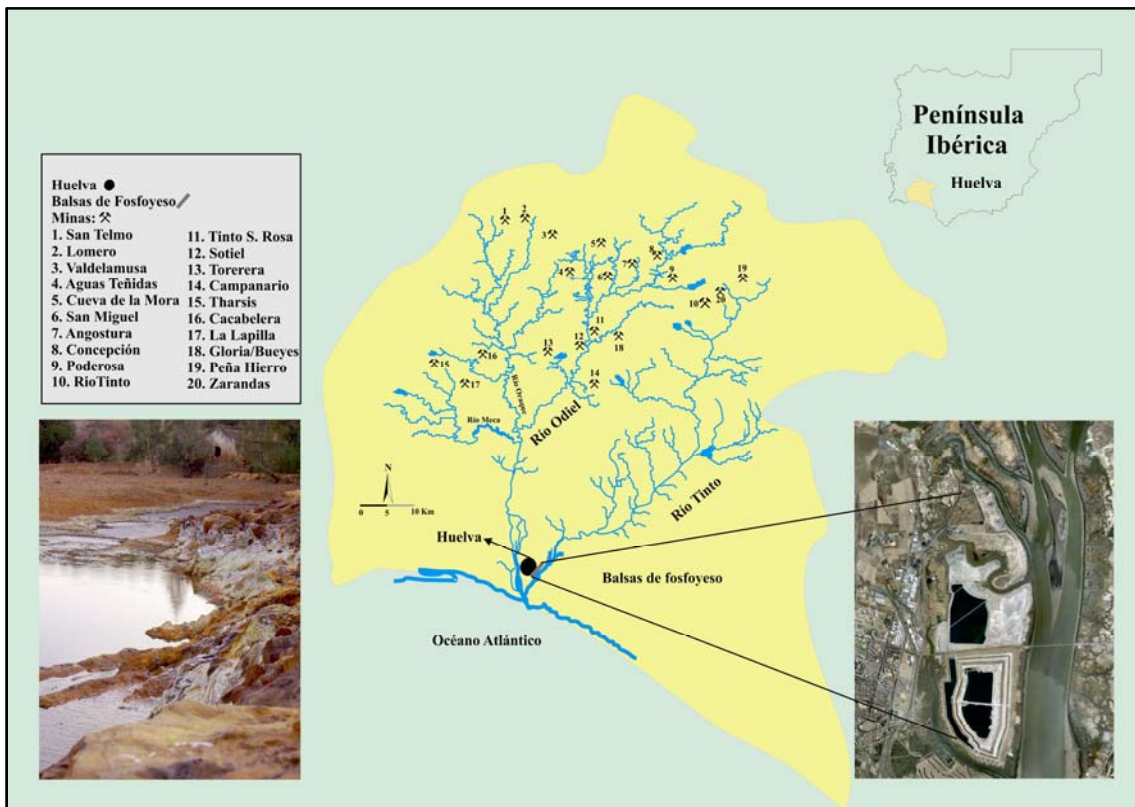


Figura 1.1. Mapa de la provincia de Huelva que muestra las cuencas hidrográficas de los ríos Tinto y Odiel y la ubicación de las fuentes de contaminación más importantes: las principales minas abandonadas generadoras de AMD y las balsas de fosfoyeso).

Por otro lado, la superficie relativamente plana del sistema estuarino, la disponibilidad de agua cercana y la proximidad del mar como vía de comunicación hicieron que esta área, así como otras aéreas estuarinas de Europa, sufriese un extenso proceso de industrialización desde los años 1960 con el desarrollo de un enorme complejo químico-metalúrgico de industrias localizado a 1-2 km de la ciudad de Huelva. Una de las principales actividades industriales está enfocada a la producción de ácido fosfórico para fertilizantes a partir del tratamiento químico de roca fosfatada con ácido sulfúrico (fábricas Fertiberia-Huelva y FMC-Foret). Durante el proceso químico se genera un subproducto conocido como fosfoyeso que hereda parte de las impurezas tóxicas existentes en la roca fosfatada (Rutherford et al., 1994). En Huelva, las balsas de

acumulación de fosfoyeso se localizan sobre las marismas asociadas a la margen derecha del río Tinto y a menos de 300 m de la periferia de la ciudad (Fig. 1.1.) (Bolívar et al., 1995). En estas balsas se acumula un promedio de 2.5 Mt de fosfoyeso al año desde que se inició la producción de ácido fosfórico en 1968 (Bolívar et al., 2009). Las balsas ocupan una extensión de 1200 hectáreas de superficie y 5 m de altura media y almacenan aproximadamente 120Mt de fosfoyeso altamente enriquecido en metales pesados y radionúclidos (Pérez-López et al., 2007; Dueñas et al., 2010). La meteorización del fosfoyeso por acción del agua de precipitación y la acción de las mareas del propio estuario, generan lixiviados con altas concentraciones de elementos potencialmente tóxicos, que con el paso del tiempo han dejado su huella en el agua y los sedimentos de los sistemas ambientales circundantes (Bolívar et al., 2002; Villa et al., 2009). Además, las balsas han causado la degradación total de las marismas del estuario del río Tinto. Sin embargo, marismas similares pero no ocupadas con fosfoyeso en el estuario del río Odiel fueron declaradas Reserva de la Biosfera por la UNESCO en 1983 y humedal de especial conservación y protección por el convenio RAMSAR-NATURA en 1989.

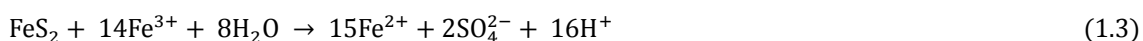
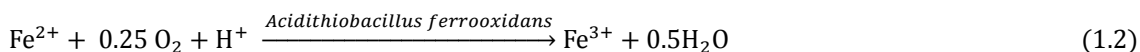
## **2. GEOQUÍMICA DEL DRENAJE ÁCIDO DE MINA**

### **2.1. Oxidación de sulfuros y generación de AMD**

Los procesos mineros alteran las condiciones geológicas estables de un área explotada al permitir la entrada de oxígeno atmosférico a ambientes geológicos profundos y, por tanto, la oxidación de minerales que están en estado reducido (Banks et al., 1997). Además, los subproductos generados durante el tratamiento de los minerales extraídos supone un problema no sólo por su volumen, sino porque a menudo son compuestos químicamente reactivos (Salomons, 1995). La familia más común de estos minerales son los sulfuros que al quedar expuestos a oxígeno y agua se oxidan y generan AMD.

La pirita ( $\text{FeS}_2$ ) es el sulfuro más abundante y el que produce mayor cantidad de acidez, por esto es el mineral comúnmente empleado para describir los procesos de generación de agua ácida. De hecho, el proceso de oxidación de pirita ha sido objeto de numerosos estudios (Lowson, 1982; Evangelou y Zhang, 1995; Nordstrom y Southam, 1997; Nordstrom y Alpers, 1999; y Rimstidt y Vaughan, 2003). La oxidación de pirita y, por tanto, el proceso de generación de AMD, puede reproducirse en 4 pasos: (1) oxidación del sulfuro, (2) oxidación del  $\text{Fe}^{+2}$ , (3) incremento de la oxidación del  $\text{Fe}^{+2}$  y de la acidez por la actividad microbiana y (4) hidrólisis y precipitación de  $\text{Fe}^{3+}$  (Banks et al., 1997).

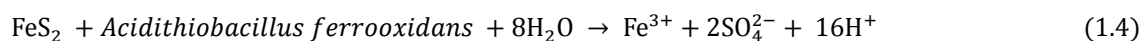
La oxidación de pirita en un medio acuoso puede expresarse por medio de las siguientes reacciones:



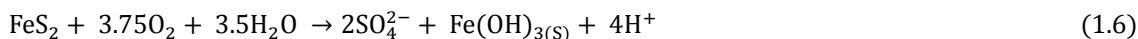
Inicialmente, la pirita al entrar en contacto con oxígeno atmosférico y agua se oxida, liberando  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  y protones (Ec. 1.1). Según esto, la hidroquímica del agua tras la disolución oxidativa de la pirita pasará a estar controlada por el sistema  $\text{SO}_4^{2-}$ -Fe, a un rango de pH entre 1 y 4 (Bigam y Nordstrom, 2000). Una vez oxidada la pirita, el  $\text{Fe}^{2+}$  liberado es rápidamente oxidado a  $\text{Fe}^{3+}$  por la actividad microbiana, la cual cataliza la reacción aumentando su velocidad de  $10^4$  a  $10^6$  veces (Ec. 2; Starkey, 1945; Singer y Stumm, 1970; Murr, 1980; Taylor et al., 1984). La bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans* es uno de los principales microorganismos catalizadores de esta reacción. La estabilidad del  $\text{Fe}^{3+}$  generado depende del pH. A pH inferiores a 3.5, el  $\text{Fe}^{3+}$  permanece mayoritariamente en solución, lo que le permite actuar como otro agente oxidante de la pirita (Ec. 1.3).

La reacción 1.3 implica una reducción de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , por tanto, para que pueda producirse debe existir una re-oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  por oxígeno disuelto y actividad bacteriana (Ec. 1.2), constituyendo así un ciclo de disolución de pirita. En ambientes mineros (pH inferiores a 4.5), la oxidación de la pirita mediante  $\text{Fe}^{3+}$  es mucho más rápida que mediante oxígeno disuelto y libera más protones, siendo por tanto el principal agente de producción de acidez. En estos procesos, la actividad de bacterias como *Acidithiobacillus ferrooxidans*, de manera indirecta, facilita la iniciación de la oxidación de pirita y otros sulfuros metálicos (pirrotina, calcopirita, arsenopirita, etc.) mediante la oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$  (Moses et al., 1987; Schippers y Sand, 1999).

Sin embargo, Ingledew (1986), Moses et al. (1987) y Rawlings et al. (1999) sugieren que las células bacterianas pueden ligar al  $\text{Fe}^{3+}$  con sustancias poliméricas extracelulares (EPS, siglas en inglés de *extracellular polymeric substance*) cuando estas atacan la superficie de la pirita. De esta manera, las bacterias se posicionan en el lugar del  $\text{Fe}^{3+}$  y pueden atacar de manera directa a la pirita generando también su oxidación, representado por la siguiente reacción (Ec. 1.4):



A pH mayores de 3.5, el  $\text{Fe}^{3+}$  se hidroliza (Ec.1.5; Bigham et al., 1996). La hidrólisis de  $\text{Fe}^{3+}$  es también productora de acidez. Simplificando las reacciones 1.1, 1.2 y 1.5 en la ecuación 1.6, se determina que cada mol de pirita oxidada libera 4 moles de  $\text{H}^+$ , lo cual explica el carácter extremadamente ácido del AMD.



En conclusión, la generación de AMD es el resultado de un proceso biogeoquímico catalizado por microorganismos (Dold, 2003, Schippers et al., 2010). Todo este proceso se ha representado de forma concreta en La Figura 1.2.

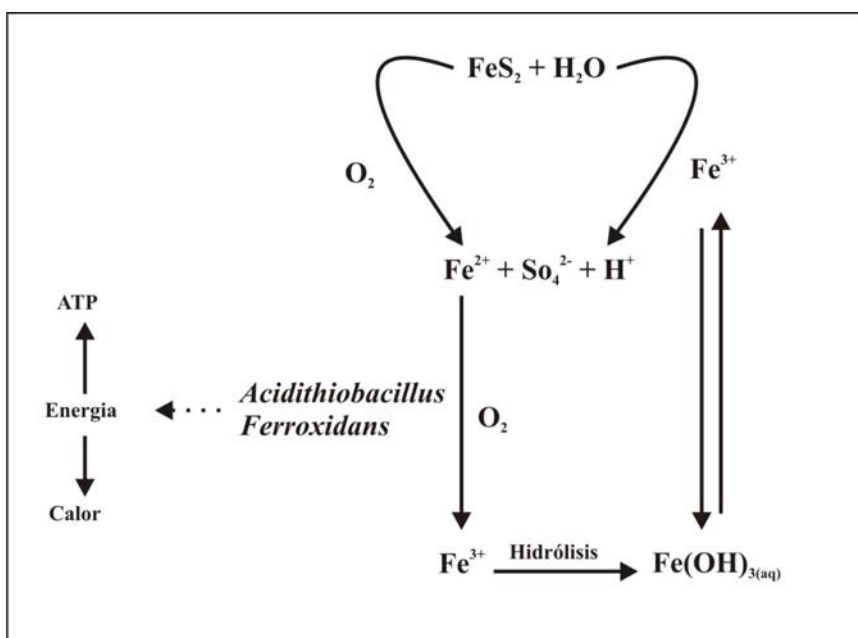


Figura 1.2. Diagrama representativo de los pasos de la generación de AMD.

## 2.2. Tratamientos de remediación

Existen numerosas investigaciones enfocadas al estudio de la mejora de la calidad del agua de los drenajes ácidos que se originan en los entornos mineros. El tratamiento se puede subdividir a su vez en dos tipos: tratamiento activo y tratamiento pasivo (Younger et al., 2002). Por un lado, el tratamiento activo consiste en la aplicación de métodos que requieren el suministro continuo de energía eléctrica y reactivos químicos para la mejora de la calidad del agua. Este tratamiento, aunque eficaz, suele ser muy costoso por los reactivos y equipos que se necesitan, la energía que consume y la mano de obra necesaria durante el tratamiento (Kleinmann, 1990; Phipps et al., 1991; Skousen et al., 1998). Todas estas características

demuestran que los tratamientos activos, a pesar de mejorar la calidad del AMD, no son viables económica y medioambientalmente, sobre todo en zonas mineras abandonadas.

Por otro lado, el tratamiento pasivo de AMD se realiza en sistemas estáticos (sin bombeo) que contienen materiales naturales fácilmente disponibles y de bajo coste (abono, caliza, etc.). Estos sistemas son alimentados por gravedad y provocan la mejora de la calidad del agua por reacciones biogeoquímicas sin el uso de reactivos sintéticos y sin la aplicación de energía externa (Younger et al., 2002; Sheoran y Sheoran, 2006). Además, pueden considerarse estrategias sostenibles para el tratamiento de aguas de mina a largo plazo, reconociendo que el AMD es un fenómeno que suele durar siglos y hasta milenios (Younger, 1997). Estas ventajas permiten su uso en minas abandonadas y de difícil acceso. Por estos motivos, actualmente las investigaciones centran sus objetivos en la optimización de estos sistemas de tratamiento. De forma general, las tecnologías de tratamiento pasivo pueden dividirse en químicas y biológicas.

### ***2.2.1. Tratamientos pasivos químicos***

Los tratamientos pasivos químicos o abióticos de aguas ácidas se basan en procesos de neutralización a partir de materiales alcalinos con una gran capacidad para consumir acidez y una rápida disolución en el medio (Sverdrup, 1990; Jambor y Blowes, 1998). El mineral más utilizado es la calcita ( $\text{CaCO}_3$ ) y en base a este compuesto se han desarrollado algunos sistemas de remediación como los drenajes anóxicos de caliza (ALDs, siglas en inglés de *anoxic limestone drains*; Turner y McCoy, 1990), y actualmente el sustrato alcalino disperso (DAS, siglas en inglés de *dispersed alkaline substrate*; Rötting et al., 2008).

Las descargas ácidas que se generan en los entornos mineros de la FPI se caracterizan por presentar valores de pH entre 2 y 3, de cientos a miles de mg/L de metales trivalentes (principalmente Fe y Al) y de decenas a cientos de mg/L de metales divalentes (principalmente Zn, Mn, Cu, Pb y Cd) (Sarmiento et al., 2009a). Sin embargo, los ALDs fueron desarrollados para tratar aguas con concentraciones menores a 1 mg/L de Fe y Al, lo cual los hace ineficaces para los AMD de la FPI (Santoro et al., 1987; Robbins et al., 1996; Younger et al., 2002a; Watzlaf et al., 2004). El sistema DAS fue creado para el tratamiento de drenajes con altas concentraciones de metales trivalentes y divalentes, y estaría formado por al menos dos subsistemas conectados en serie. El primero sería el DAS-calizo, el cual está creado para la eliminación de metales trivalentes, retirando por tanto la mayoría de Fe y Al (Rötting et al., 2008; Caraballo et al., 2011). El segundo sería el DAS-magnésico ( $\text{MgO}$ ), que permite la precipitación de la mayor parte de los metales divalentes, los cuales son insolubles bajo las condiciones de pH que se alcanzarían en este sistema (Macías et al., 2012a). Sin embargo, el



sistema DAS tiene importantes deficiencias a la hora de eliminar el sulfato contenido en el AMD.

### ***2.2.2. Tratamientos pasivos biológicos***

La base de la biorremediación de AMD deriva de la capacidad de algunos microorganismos para generar alcalinidad e inmovilizar metales, con lo que esencialmente invierten las reacciones responsables de la génesis de AMD (López et al., 2003; Johnson y Hallberg, 2005). Los tratamientos pasivos biológicos se pueden clasificar según la actividad metabólica de los microorganismos en que se basen, pudiendo ser aeróbicos y anaeróbicos. Cada una de estas condiciones agrupa una determinada comunidad microbiana, por un lado, las bacterias acidófilas oxidantes (tratamiento pasivo aeróbico), y por otro lado, las bacterias sulfato-reductoras (BSR; tratamiento pasivo anaeróbico). Ambas comunidades cumplen un papel fundamental en los procesos de atenuación natural, y en base a estos se han creado sistemas de biorremediación pasivos que realmente son complementarios a los químicos ya que facilitarían la eliminación de metales pesados y sulfatos.

En cuanto a los tratamientos pasivos aeróbicos, la oxidación biológica de  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  es uno de los grandes procesos de inmovilización de metales que ocurre en humedales aeróbicos para el tratamiento de aguas con pH de 4-5 (Johnson y Hallberg, 2005). En el caso de los AMD de la FPI, los cuales presentan pH de 2-3, los humedales aerobios no son utilizados y han sido reemplazados por la laguna natural de oxidación de Fe (NFOL, siglas en inglés de *natural Fe-oxidizing lagoon*) que han dado muy buenos resultados como un pre-tratamiento al químico, permitiendo eliminar hasta el 38% del  $\text{Fe}^{3+}$  en forma de schwertmanita y co-precipitar hasta un 80% de As (Macías et al., 2012b).

En cuanto a los procesos anaeróbicos, la sulfato-reducción bacteriana es el mecanismo más importante de inmovilización de metales dentro de los procesos de atenuación natural y de los tratamientos de biorremediación de AMD (Johnson y Hallberg, 2005). Estos procesos constituyen la base de esta Tesis Doctoral y por lo tanto su descripción será más amplia. Las BSR son microorganismos procariotas, bacterias y arqueas, que pueden utilizar el sulfato como aceptor terminal de electrones en su metabolismo de energía, es decir, que son capaces de reducir de forma desasimilatoria los sulfatos. Algunas BSR son incluso capaces de respirar aeróbicamente (Dannenberg et al., 1992; Lemos et al., 2001), aunque en sistemas aeróbicos no existe un aparente crecimiento, y probablemente los microorganismos estén en un periodo de latencia. Dado que la reducción desasimilatoria de sulfato es inhibida mediante procesos aeróbicos, las BSR pueden crecer a expensas de la reducción de sulfato sólo en ausencia

completa de moléculas de oxígeno. Por tanto, las BSR son microorganismos anaerobios estrictos y se encuentran principalmente en hábitats anóxicos ricos en sulfato (Sass et al., 1992; Cypionka, 2000; Fareleira et al., 2003). Además, debemos considerar parámetros termodinámicos como pH, potencial redox y temperatura que determinan las interacciones entre los posibles donantes de electrones y el sulfato como aceptor. Los valores óptimos de pH, potencial redox y temperatura son de 6 a 7, de -120 a -270 mV, y de 25 °C en condiciones estándar para el desarrollo de las BSR. Sin embargo, las variaciones de estos parámetros y la concentración de sulfatos en el medio pueden alterar su comportamiento (Thauer et al., 2007).

Los organismos incluidos en la comunidad de BSR son filogenéticamente y metabólicamente versátiles y cumplen un papel fundamental en la biogeoquímica de los diversos ambientes que habitan. Las BSR han logrado adaptarse a casi todos los ecosistemas del planeta, incluidos nichos extremos, como respiraderos hidrotermales de aguas profundas, entornos de yacimientos petrolíferos o AMD. Hasta el momento, se han descrito más de 220 especies de 60 géneros de BSR (Barton y Fauque, 2009). Las BSR contribuyen a la oxidación completa de la materia orgánica y participan a través de la producción de sulfuro y/o la reducción de metales en la biogeoquímica global de estos ambientes extremos (Barton y Fauque, 2009).

Además, la generación de sulfuro tiene una serie de consecuencias que son relevantes para la eliminación biotecnológica de metales (Woolfolk y Whiteley, 1962; Lovley y Phillips, 1992; Lovley et al., 1993). Estas consecuencias son la eliminación de la acidez por formación de bicarbonatos durante la oxidación de materia orgánica, la reducción de sulfato y principalmente la precipitación de metales en solución como sulfuros metálicos. El uso de estos microorganismos en biorremediación depende de tres factores importantes: (1) la tolerancia a altas concentraciones de metales (2) un buen sustrato que sirva como fuente de carbono para promover la sulfato-reducción y (3) la cinética de precipitación. Aunque, el factor más limitante para el desarrollo de sistemas de tratamiento en base a BSR es la tolerancia a altas concentraciones de metales pesados.

La actividad de las BSR ha sido aprovechada en diferentes sistemas de biorremediación, tales como humedales anaeróbicos (Machemer y Wildeman, 1992; Wieder 1993; Younger et al., 2002b), sistemas reductores y productores de alcalinidad (RAPS siglas en inglés de *reducing and alkalinity-producing systems*; Kepler y McCleary, 1994; Younger et al., 2003), barreras reactivas permeables para aguas subterráneas (PRB, siglas en inglés de *permeable reactive barriers*; Blowes et al., 1997) y biorreactores (Gusek, 2004; Tsukamoto y Miller, 2004).

En los últimos años se han desarrollado, aunque solo en fase experimental, algunos sistemas pasivos mixtos (químico-biológico), los cuales permiten primero neutralizar los AMD mediante el uso de calcita y posteriormente tratarlos con un sistema basado en BSR (Pagnanelli et al., 2008; Martins et al., 2010). Estos sistemas han dado buenos resultados eliminando en el sistema químico la mayor parte de metales trivalentes como Fe y Al (Pagnanelli et al., 2008; Rötting et al., 2008) y en el sistema biológico una eliminación significativa de metales divalentes como Cu, Cd, Mn y Zn a concentraciones moderadas. Sin embargo, en estos sistemas mixtos se debe optimizar la parte biológica para el tratamiento del AMD de la FPI mediante la adaptación de inóculos tolerantes a altas concentraciones de metales divalentes, principalmente Zn (Martins et al., 2009), el cual alcanza a menudo concentraciones tan altas que inhiben el desarrollo de las BSR.

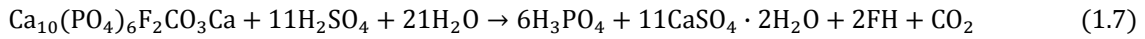
Muchos estudios (Reisman et al., 2004; Doshi, 2006; Kaksonen y Puhakka, 2007; Bilek y Wagner, 2012) sugieren que la dinámica de las reacciones de reducción promovidas por comunidades bacterianas anaerobias y en consecuencia la eliminación de metales pueden dar buenos resultados. Si bien, los procesos cinéticos enzimáticos de reducción y los de inhibición requieren una investigación detallada. Así mismo, se debe realizar un estudio minucioso del comportamiento de los microorganismos de estas comunidades, ya que pese a las similitudes genéticas, los microbios en diferentes ambientes pueden mostrar ciertos cambios evolutivos en sus tipos y comportamientos, muchos de los cuales aún se desconoce. Además, estos microorganismos tienen diferentes niveles de tolerancia y preferencias de sustratos, que se deben tomar en cuenta en el momento de desarrollar un sistema pasivo en base a BSR. El conocimiento y aplicación correcta de estos aspectos tienen el potencial de mejorar drásticamente la biorremediación, que se asocia normalmente con baja velocidad de reacción, períodos de inhibición microbiana, y por tanto, la obtención de resultados no deseados.

### **3. GEOQUÍMICA DEL FOSFOYESO**

#### **3.1. Producción**

La producción de ácido fosfórico para fertilizantes es una de las principales actividades industriales en el Polo Químico de Huelva. El subproducto obtenido durante el proceso de producción contiene impurezas tóxicas heredadas de la roca fosfatada (impurezas metálicas tales como As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn, y radionucléidos de la serie de desintegración de U y Th; Rutherford et al., 1994), lo cual convierte este residuo en un problema medioambiental por la dificultad de su almacenamiento.

Este subproducto conocido como fosfoyeso es generado durante el tratamiento de la roca fosfatada sedimentaria proveniente principalmente de Marruecos (Bolívar et al., 1996). La roca fosfatada es triturada y disuelta con ácido sulfúrico para obtener ácido fosfórico mediante un proceso di-hidratado. El proceso de producción de ácido fosfórico puede ser descrito estequiométricamente mediante la siguiente reacción química (Ec. 1.7):



Para optimizar la producción, el ácido fosfórico generado inicialmente es recirculado con la finalidad de eliminar las capas de sulfato de calcio que se depositan sobre las partículas de la roca fosfatada, generando en esta reacción monofosfato cálcico (Ec. 1.8). Luego, este reacciona con ácido sulfúrico nuevamente y forma ácido fosfórico (Ec. 1.9). Finalmente, el fosfoyeso (sulfato de calcio insoluble) se separa del ácido fosfórico por filtración. El diagrama de la Figura 1.3 resume todos los pasos que tienen lugar en la producción de fosfoyeso.



Fertiberia y FMC Foret S.A. producían anualmente alrededor de 2.5 y 0.5 millones de toneladas de fosfoyeso, y aproximadamente 0.5 y 0.1 millones de toneladas de ácido fosfórico, a partir de 1.5 y 0.3 millones de toneladas de roca fosfatada, respectivamente. El fosfoyeso es un producto inevitable del proceso por vía húmeda utilizado para la obtención de ácido fosfórico.

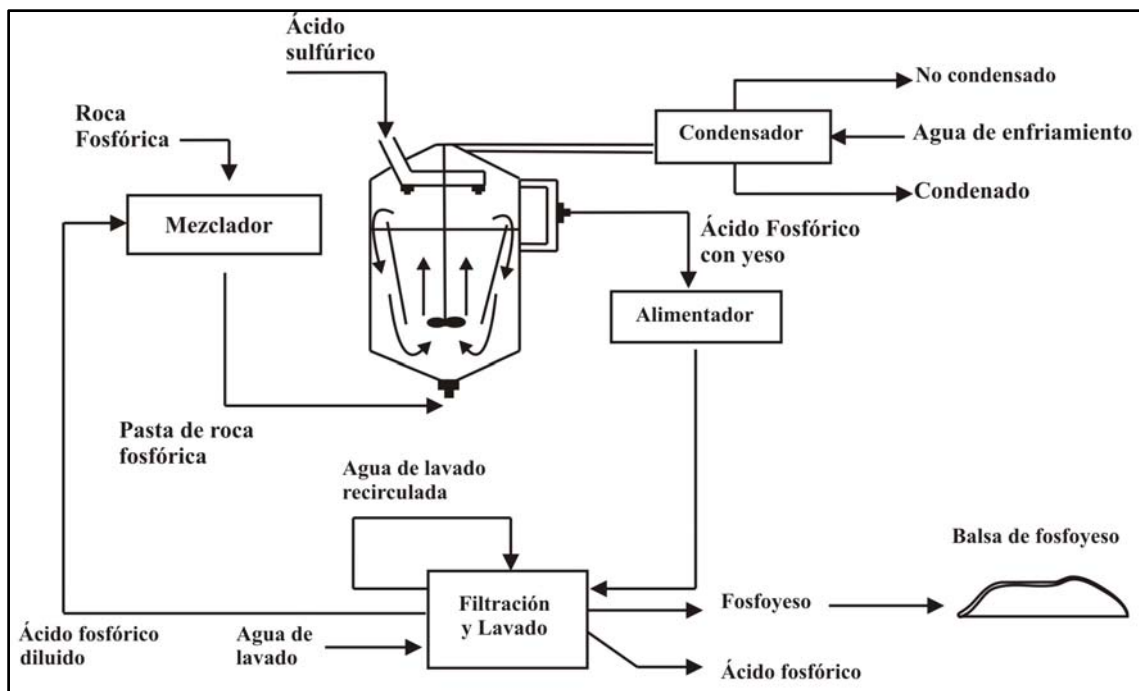


Figura 1.3. Esquema del proceso de producción del ácido fosfórico y de la generación de fosfoyeso.

### 3.2. Proceso de atenuación de los contaminantes

En 1998, se impusieron una serie de prohibiciones para minimizar la contaminación asociada a la producción de fosfoyeso: (1) la descarga directa de fosfoyeso al mar, (2) el uso de agua de mar en el proceso de transporte del fosfoyeso hacia las balsas y (3) el almacenamiento de fosfoyeso en balsas cercanas a la ciudad (Bolívar et al., 2009). A pesar de esto, Fertiberia obtuvo un permiso para seguir acumulando fosfoyesos en las balsas asentadas sobre la marisma del río Tinto. Estas balsas, donde se ha acumulado fosfoyeso en los últimos 40 años, son un problema medioambiental por los lixiviados que se generan durante la meteorización de este residuo (Gitzinger et al., 2009). Dichos lixiviados llegan con relativa facilidad y afectan a las aguas y sedimentos del sistema estuarino (Periañez et al., 1996).

Para aplacar la meteorización y la liberación de los contaminantes a las aguas y sedimentos del estuario, la Junta de Andalucía propuso en 1990 la restauración de algunas zonas de la balsa, específicamente, la zona conocida como Marisma del Pinar. La tecnología adoptada para la restauración fue cubrir la superficie de la balsa con una cubierta de suelo vegetal de aprox. 25 cm (Mas et al., 2001). Sin embargo, esta técnica es preventiva y solo evita la meteorización de las balsas en la superficie, sin impedir la disolución del fosfoyeso por la subida de la marea, lo cual permite la liberación de las impurezas tóxicas en lixiviados que provocan un fuerte impacto ambiental en estos ecosistemas.

Actualmente no existen sistemas de tratamiento en sí para los lixiviados generados por la disolución de fosfoyeso. Sin embargo, se han realizado algunos estudios (Pérez-López et al., 2007) con el objetivo de determinar la dinámica de las principales impurezas tóxicas en el fosfoyeso así como su impacto potencial sobre el medioambiente circundante. Los resultados de estos estudios demostraron que el estado de oxidación y el potencial redox en estos residuos pueden afectar a la solubilidad y, por tanto, a la movilidad de las impurezas (Li et al., 2007). Además, demostraron que en condiciones oxidantes, la característica ácida del fosfoyeso proporcionada por el ácido fosfórico, sulfúrico y fluoruro residual puede definir la química del agua de poro en esta zona. Mientras que, al acercarse al basamento de las balsas, las condiciones reductoras desarrolladas debido al estancamiento del agua y a la oxidación de la materia orgánica del propio fosfoyeso, pueden modificar el comportamiento geoquímico de las impurezas (Rutherford et al., 1994; Pérez-López et al., 2010). Probablemente, en estos ambientes anóxicos se generan procesos de sulfidización asociados a BSR que promuevan la formación de sulfuros metálicos poco solubles y que permitan la precipitación de gran parte de las impurezas metálicas.

Los procesos de sulfidización pueden ser estimulados por las marismas donde se sitúan las balsas ya que, en condiciones anaeróbicas y debido a su alto contenido de materia orgánica, las marismas pueden representar un medio adecuado para el desarrollo de BSR (Pons et al., 1982). Muchos estudios han confirmado la existencia de los procesos de sulfidización en este tipo de ambientes y su importancia en el control de la solubilidad de los elementos (Andrade et al., 2002 y 2004; Vega et al., 2008; Sarmiento et al., 2009b).

#### **4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

La presente Tesis Doctoral investiga los mecanismos biogeoquímicos relacionados con la actividad de BSR en sistemas altamente contaminados por metales. Estos mecanismos pueden acontecer naturalmente en dichos sistemas y constituir la base de procesos de atenuación natural de la contaminación. Además, el entendimiento de los procesos de sulfato-reducción puede ayudar a la optimización de sistemas de tratamientos basados en la biorremediación. Concretamente, este estudio centra sus esfuerzos en la búsqueda de soluciones óptimas para los dos tipos de residuos sólidos que actúan como fuente de contaminación por metales en el estuario de la Ría de Huelva: los residuos mineros de la FPI y la balsa de fosfoyesos.

##### **4.1. Biorremediación del AMD**

Los tratamientos de AMD en la FPI han ido evolucionando con el paso del tiempo. Las características hidroquímicas de la mayoría de las descargas ácidas, es decir elevadas concentraciones de sulfato y metales trivalentes, principalmente Fe y Al, hacen que los sistemas de tratamiento pasivo se basen en reactores con caliza (Caraballo et al., 2011). La capacidad de los tratamientos para inmovilizar metales pesados se basa y depende directamente del incremento del pH en el AMD tratado. Sin embargo, el sulfato no es dependiente del pH y los efluentes finales del tratamiento continúan teniendo elevadas concentraciones en solución. Adicionalmente, algunos drenajes de la FPI tienen concentraciones extremadamente altas de metales divalentes, principalmente Zn. En estos casos, los lixiviados procedentes del tratamiento calizo presentan un pH casi neutro, y elevadas concentraciones no solo de sulfato sino también de Zn. Aunque se ha optimizado un tratamiento químico para la retirada total del Zn basado en el uso de magnesia (Macías et al., 2012a), las elevadas concentraciones de sulfato siguen siendo causa de preocupación ambiental.

La sulfato-reducción a priori podría ser una alternativa eficaz y de bajo coste para tratar las elevadas concentraciones de sulfato y zinc de los efluentes finales de los sistemas calizos

instalados en la FPI (Doshi, 2006). Este proceso biológico podría inmovilizar simultáneamente sulfato y zinc mediante la precipitación de sulfuros metálicos. No obstante, las altas concentraciones de Zn pueden inhibir la actividad sulfato-reductora. Concentración de Zn superiores a 150 mg / L han sido descritas como tóxicas para las BSR (Martins et al., 2009). De hecho, este metal puede sustituir a iones esenciales y bloquear grupos funcionales de moléculas importantes en las BSR, como las enzimas (Sandrin y Hoffman, 2007). Esto da lugar a la desnaturalización y la inactivación de enzimas, así como la alteración de la integridad de la membrana celular y las organelas (Sani et al., 2001; Cabrera et al., 2006). Las BSR pueden desarrollar diversas estrategias que les confiera una cierta tolerancia a un determinado metal, por ejemplo, la formación de biofilms, el desarrollo de mecanismos de resistencia mediados por plásmidos o codificados cromosómicamente o la generación de sulfuros que sirvan para reducir las concentraciones metálicas por precipitación y, por tanto, reducir su efecto tóxico (Zinkevich et al., 1996; Rensing et al., 1999; White y Gadd, 2000). Los inóculos obtenidos en ambientes extremos de la FPI podrían presentar estos mecanismos y aprovecharse directamente para los tratamientos de biorremediación. Además de la acción inhibitoria del Zn, el pH es decisivo para la actividad sulfato-reductora. El pH óptimo para el desarrollo de BSR está entre 6 y 7, lo cual las hace inapropiadas para el tratamiento directo de AMD. Por este motivo, es también necesario incluir un tratamiento previo basado en caliza que neutralice el pH y retire los metales trivalentes como Fe y Al. Por tanto, debemos remarcar que los sistemas de remediación deben de ser mixtos, es decir químicos y biológicos, ya que los procesos de neutralización de los lixiviados son vías de remediación necesarias para optimizar la actividad sulfato-reductora en estos sistemas.

Partiendo de estas premisas, el principal objetivo del Capítulo 2 de esta Tesis Doctoral es la optimización de un sistema basado en la actividad sulfato-reductora para tratar las altas concentraciones de sulfato y Zn del AMD pre-tratado en un sistema químico de remediación. En este capítulo, se persiguen los siguientes sub-objetivos específicos:

- a) Aislar y enriquecer poblaciones de BSR altamente tolerantes a los ambientes extremos de la FPI, usando inóculos naturales obtenidos en distritos mineros abandonados y en una planta de tratamiento de aguas residuales.
- b) Someter los cultivos de BSR a elevadas concentraciones de sulfato y Zn, y monitorizar la evolución de los contaminantes con el tiempo así como el crecimiento bacteriano.

- c) Determinar los diferentes mecanismos de tolerancia utilizados por las comunidades bacterianas con actividad sulfato-reductora y los periodos de inhibición del crecimiento bacteriano durante el proceso de eliminación de Zn.
- d) Caracterizar desde el punto de vista mineralógico los precipitados neoformados resultantes de la actividad sulfato-reductora y su posible relación con los microorganismos existentes en el medio.

#### **4.2. Biorremediación de las balsas de fosfoyeso**

En diciembre de 2010 por decisión de la Audiencia Nacional Española cesó la acumulación de fosfoyeso en las balsas. Sin embargo, el fosfoyeso continúa siendo una amenaza para la seguridad medioambiental de su entorno. Esto se debe a que se encuentra asentado sobre las marismas del río Tinto y la acción mareal del estuario causa su meteorización, generando lixiviados ricos en impurezas potencialmente tóxicas. Parte de la carga metálica de estos lixiviados podría ser atenuada de forma natural en las marismas, si partimos de la hipótesis de que estos medios presentan actividad sulfato-reductora como demuestran algunos estudios previos (Andrade et al., 2002 y 2004; Vega et al., 2008; Sarmiento et al., 2009b). Además, es de suponer la presencia de procesos biogeoquímicos de sulfato-reducción también en zonas profundas de las balsas de fosfoyeso, ya que estas zonas de aguas estancadas presentan probablemente condiciones anóxicas debido al consumo del oxígeno disuelto por oxidación de materia orgánica.

Esta Tesis Doctoral estudia dos puntos clave para la biorremediación de los lixiviados generados en el fosfoyeso y los divide en dos capítulos. En el Capítulo 3 se evalúan los cambios en la movilidad de los contaminantes con la profundidad, haciendo especial hincapié en el estudio de la contribución de la comunidad biológica en los procesos de atenuación natural de la contaminación al contacto con el basamento de marisma. Hasta la fecha no existe ningún estudio integrado de geoquímica, ecología microbiana y calidad ambiental en la balsa de fosfoyesos, lo cual justifica su realización. Este objetivo a su vez persigue los siguientes sub-objetivos específicos:

- a) Determinar la composición total de metales presentes tanto en el fosfoyeso sólido como en el agua de poro, y su distribución espacial con la profundidad.
- b) Estimar la movilidad de dichos contaminantes en diferentes escenarios ambientales de lixiviación. Esto nos permitirá cuantificar la capacidad de la balsa de fosfoyeso como reservorio de metales móviles según las condiciones de meteorización.



c) Describir en detalle los cambios biogeoquímicos que se producen en la columna de fosfoyeso, estudiando especialmente cambios en las condiciones redox que afecten a los procesos de precipitación/disolución de minerales y, por tanto, a los mecanismos de atenuación natural de la contaminación.

d) Estimar el posible aporte de contaminantes desde la balsa al medioambiente circundante.

El Capítulo 4 tiene como objetivo principal elaborar una estrategia de biorremediación tomando como base el sistema de restauración adoptado por la Junta de Andalucía que consiste en aplicar una cobertera vegetal a las balsas de fosfoyeso. La idea es buscar fuentes de carbono orgánico de bajo coste, que usadas como enmienda en esa cubierta vegetal, estimulen el proceso bacteriano de sulfato-reducción, y por tanto, la acción inmovilizadora de contaminantes. En este capítulo también se pretende lograr los siguientes sub-objetivos:

a) Determinar la biodegradabilidad de los sustratos orgánicos a utilizar como fuentes de carbono, lo cual permitirá evaluar su capacidad para fomentar el crecimiento bacteriano.

b) Comprobar la presencia de poblaciones autóctonas de BSR que existan de forma natural en la balsa de fosfoyeso.

c) Monitorizar la evolución temporal de soluciones altamente contaminadas y el desarrollo bacteriano en medios dopados con fosfoyeso y sustratos orgánicos. Esto permitirá comprobar la capacidad del sustrato utilizado para incentivar la actividad sulfato-reductora y la inmovilización de metales en el medio.

d) Determinar el grado de sulfidización resultante de la interacción del fosfoyeso con los sustratos orgánicos como medida indirecta de la biodisponibilidad de metales y la toxicidad del medio.

e) Proponer recomendaciones para la bioremediación in situ de la balsa de fosfoyeso mediante estrategias ambientalmente sostenibles y de bajo coste.

# CAPÍTULO

# 2

---

**PRECIPITACIÓN DE NANOPARTÍCULAS  
DE ESFALERITA-WURTZITA INDUCIDA  
BIOLÓGICAMENTE POR BACTERIAS  
SULFATO-REDUCTORAS: IMPLICACIONES  
PARA EL TRATAMIENTO DE DRENAJES  
ÁCIDOS DE MINA**

---

**Basado en:**

**J. Castillo, R. Pérez-López, M.A. Caraballo, J.M. Nieto, 2012. Biologically-induced precipitation of sphalerite-wurtzite nanoparticles by sulfate-reducing bacteria: Implications for acid mine drainage treatment. Science of the Total Environment, 423:176-184.**



# ***Biologically-induced precipitation of sphalerite–wurtzite nanoparticles by sulfate-reducing bacteria: Implications for acid mine drainage treatment***

## ***Abstract***

---

*Several experiments were conducted to evaluate zinc-tolerance of sulfate-reducing bacteria (SRB) obtained from three environmental samples, two inocula from sulfide-mining districts and another inoculum from a wastewater treatment plant. The populations of SRB resisted zinc concentrations of 260 mg/L for 42 days in a sulfate-rich medium. During the experiments, sulfate was reduced to sulfide and concentrations in solution decreased. Zinc concentrations also decreased from 260 mg/L to values below detection limit. Both decreases were consistent with the precipitation of newly-formed sphalerite and wurtzite, two polymorphs of ZnS, forming 2.5- $\mu$ m-diameter spherical aggregates identified by microscopy and synchrotron- $\mu$ -XRD. Sulfate and zinc are present in high concentrations in acid mine drainage (AMD) even after passive treatments based on limestone dissolution. The implementation of a SRB-based zinc removal step in these systems could completely reduce the mobility of all metals, which would improve the quality of stream sediments, water and soils in AMD-affected landscapes.*

---

*Keywords: Sulfate-reducing bacteria (SRB), Zinc tolerance, ZnS nanocrystals, Treatment, Acid mine drainage.*



# CAPÍTULO 2

## PRECIPITACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ESFALERITA-WURTZITA INDUCIDA BIOLÓGICAMENTE POR BACTERIAS SULFATO-REDUCTORAS: IMPLICACIONES PARA EL TRATAMIENTO DE DRENAJES ÁCIDOS DE MINAS

---

|                   |   |
|-------------------|---|
| <b>CONTENIDO:</b> | <b>1. INTRODUCCIÓN</b>                                |
|                   | <b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>                        |
|                   | 2.1. Inóculos y enriquecimiento bacteriano            |
|                   | 2.2. Experimentos de tolerancia y eliminación de zinc |
|                   | 2.3. Metodología de análisis                          |
|                   | <b>3. RESULTADOS</b>                                  |
|                   | 3.1. Evolución química de las soluciones              |
|                   | 3.2. Caracterización mineralógica                     |
|                   | <b>4. DISCUSIÓN</b>                                   |
|                   | <b>5. CONCLUSIONES</b>                                |
|                   | <b>6. REFERENCIAS</b>                                 |

---

**RESUMEN:** Se realizaron varios experimentos para evaluar la tolerancia al zinc de bacterias sulfato-reductoras (BSR) obtenidas a partir de tres muestras ambientales, dos inóculos extraídos de distritos mineros de sulfuros masivos y el otro inóculo procedente de una planta de tratamiento de aguas residuales. Las poblaciones de BSR resistieron concentraciones de zinc de 260 mg/L durante 42 días en un medio rico en sulfato. Durante los experimentos, el sulfato se reduce a sulfuro y disminuye su concentración en el medio de cultivo. La concentración de zinc también disminuyó de 260 mg/L a valores por debajo del límite de detección.

Ambos descensos concuerdan con la precipitación de esfalerita y wurtzita neoformadas, dos polimorfos de ZnS, que forman agregados esféricos <2.5nm de diámetro identificados mediante microscopía y  $\mu$ -DRX usando radiación sincrotrón. Sulfato y zinc están presentes en altas concentraciones en los drenajes ácidos de mina (AMD, siglas en inglés de *acid mine drainage*), incluso después de un tratamiento pasivo convencional basado en la disolución de calcita. La implementación de un paso posterior basado en el uso de BSR para la eliminación de zinc en estos sistemas podría reducir la movilidad de todos los metales, mejorando la calidad de sedimentos, agua y suelos afectados por AMD.

**Palabras claves:** bacterias sulfato-reductoras, tolerancia al zinc, nanopartículas de ZnS, tratamiento, drenaje ácido de mina.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los residuos mineros ricos en sulfuros metálicos al interactuar con el agua y el aire producen lixiviados extremadamente ácidos que contienen altas concentraciones de metales pesados y sulfatos, conocidos como drenajes ácidos de mina (AMD, siglas en inglés de *acid mine drainage*). Las tecnologías de tratamiento de los AMD basadas en la adición de reactivos químicos están disponibles, pero son relativamente caras, en zonas donde la minería está activa. Sin embargo, tales tecnologías son prácticamente insostenibles en minas abandonadas donde no existe una clara responsabilidad legal del tratamiento. En cambio, las tecnologías de tratamiento pasivo proporcionan una alternativa viable y de bajo costo de mantenimiento (Johnson y Hallberg, 2005).

La mayoría de las estrategias pasivas de restauración promueven la neutralización de la acidez y la eliminación de metales en reactores químicos mediante el uso de caliza como aditivo alcalino, lo que causa la precipitación eficaz de hidróxidos de metales trivalentes tales como Fe y Al. Estas fases minerales pueden retener elementos trazas por procesos de adsorción y/o coprecipitación (Biggam y Nordstrom, 2000). Sin embargo, los AMD también muestran altas concentraciones de metales divalentes como Zn y Mn (de decenas a cientos de mg/L) y menores concentraciones, pero tóxicas, de Cd, Co y Ni (de decenas a cientos de  $\mu$ g/L). La precipitación inducida químicamente de dichos metales divalentes requiere valores de pH que varían entre 8 y 10, lo cual es imposible alcanzar mediante disolución de caliza en el AMD, ya que, debido a la

alta concentración de Ca en estas aguas, el equilibrio con calcita se alcanza a pH entre 6 y 7 (Cortina et al., 2003).

El tratamiento biológico pasivo basado en el uso de bacterias sulfato-reductoras (BSR) ha surgido recientemente como una solución atractiva para el tratamiento del AMD. Las BSR son un grupo taxonómico diverso de bacterias estrictamente anaeróbicas, capaces de reducir el sulfato y oxidar los sustratos orgánicos al mismo tiempo (véase la revisión de Barton y Fauque, 2009). La sulfato-reducción conduce a la producción de sulfuros que fácilmente pueden reaccionar con metales divalentes para formar precipitados de sulfuros metálicos insolubles (Gadd y White, 1993). Debido a la capacidad de inmovilizar metales tóxicos, las BSR juegan un papel importante en la remediación de residuos contaminados, tanto en procesos de atenuación natural (Sarmiento et al., 2009b) como en sistemas de tratamiento artificial (Jong y Parry, 2003). Por tanto, las BSR son una de las comunidades bacterianas más importantes dentro de la biodiversidad microbiana existente debido a su gran importancia económica, medioambiental y biotecnológica.

Las tecnologías de tratamiento pasivo, basadas en el uso de BSR, típicamente emplean una mezcla de material alcalino (principalmente caliza u otros carbonatos para aumentar y mantener un pH neutro) y un sustrato orgánico (como fuente de carbono para el metabolismo bacteriano) para remediar la contaminación de los AMD. El enfoque común empleado en el campo es someter a la mezcla reactiva, y consecuentemente a las comunidades bacterianas, directamente al AMD sin ningún pre-tratamiento para disminuir o eliminar una parte de la carga metálica. Este criterio de diseño somete a las comunidades de BSR a un gran estrés no solo por el efecto tóxico de cada metal sino también por el efecto sinérgico de la presencia de varios metales en la misma solución. En consecuencia, los tratamientos pasivos basados en BSR para AMD moderados o con alta carga metálica no logran las condiciones favorables para la eliminación de los metales incluso después de algunas semanas o meses de operación (Caraballo et al., 2010). Para resolver este problema, algunos autores han propuesto el uso de un pre-tratamiento alcalino previo a la utilización de un tratamiento basado en BSR (Pagnanelli et al., 2008). Las tecnologías de tratamiento pasivo que utilizan reactivos alcalinos han sido eficientemente probadas para la completa eliminación de altas concentraciones de metales trivalentes en los AMD (Caraballo et al., 2009). Sin embargo, existe una falta clara de información sobre el uso de BSR para remediar los efluentes contaminados con elevadas concentraciones de metales divalentes procedentes de un pre-tratamiento alcalino.

La falta de tolerancia de las células bacterianas a altas concentraciones de metales pesados es uno de los principales factores que limitan su uso en la biorremediación (Utgikar et al., 2001). Los metales divalentes tales como Zn y Mn a menudo permanecen en altas



concentraciones en los efluentes mineros, incluso después de la utilización de un pretratamiento alcalino (Ríos et al., 2008; Caraballo et al., 2009). El efecto inhibitor del Mn en el crecimiento de las BSR es más débil en comparación al Zn, y hasta 200 mg/L pueden ser totalmente eliminados de las soluciones sin afectar el consorcio microbiano (Yoo et al., 2004). Sin embargo, algunos estudios han encontrado que concentraciones de 210 mg/L de Zn pueden ser letales para las BSR (Radhika et al., 2006). En este sentido, la identificación de cepas de BSR resistentes a altas concentraciones de zinc es crucial para el desarrollo de sistemas de biorremediación eficaces en aguas altamente contaminadas. El objetivo principal de este capítulo de la tesis es demostrar la eficacia de un tratamiento biológico con BSR para tratar efluentes que contienen altas concentraciones de sulfato y zinc. Con este fin, algunos experimentos de laboratorio se llevaron a cabo para obtener consorcios de BSR que puedan ser capaces de: (1) tolerar concentraciones de zinc superiores a 210 mg/L, y (2) eliminar el zinc de la solución mediante la precipitación de sulfuros metálicos insolubles.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Inóculos y enriquecimiento bacteriano**

Las comunidades bacterianas se obtuvieron de dos muestras sólidas que actuaron como inóculos bacterianos y de un cultivo mixto de BSR obtenido previamente por Martins et al. (2009). Las muestras sólidas se tomaron de sedimentos de arroyos ácidos que drenan dos distritos mineros de la Faja Pirítica Ibérica (FPI), en los cuales las concentraciones de zinc corresponden a los contenidos mínimos y máximos que se encuentran comúnmente en esta región (Fig. 2.1): Cueva de la Mora (CM) y Mina Esperanza (ME) con 400 y 30 mg/L de Zn, respectivamente. La concentración de zinc en el drenaje ácido de Cueva de la Mora es a priori tóxica para las BSR (Azabou et al., 2007). El cultivo mixto de BSR se utilizó porque contiene bacterias altamente resistentes a los metales pesados, siendo capaces de tolerar concentraciones de zinc de hasta 150 mg/L (Martins et al., 2009). Estos límites de resistencia sugieren que el inóculo puede ser incluso tolerante a mayores concentraciones de zinc, típicas de los entornos mineros de la FPI. Esta comunidad bacteriana se cultivó y se mantuvo en un medio *Postgate B* (Postgate, 1984) en condiciones anaeróbicas y a temperatura ambiente, a partir de una muestra de lodo (SS) de la planta de tratamiento de aguas residuales de Montenegro situada en la región del Algarve (Sur de Portugal), relativamente cerca de la FPI (alrededor de 50 km).

El enriquecimiento bacteriano se llevó a cabo en experimentos *batch* bajo condiciones anaeróbicas, como describe Martins et al. (2009). En los experimentos se utilizaron viales de suero de 120 mL que se llenaron con 100 mL de medio de cultivo modificado *Postgate B* a pH

6-7 y se inocularon con 5% del inóculo. El medio *Postgate* B con resazurina como indicador redox (0.03g/L) se preparó anaeróbicamente como describe Postgate (1984). Posteriormente, el medio se burbujeó con N<sub>2</sub> durante 3 min para eliminar el oxígeno disuelto y 10 mL de parafina líquida estéril se añadió para cubrirlo e impedir la difusión de oxígeno atmosférico. Después de la inoculación, los viales se sellaron con tapones de caucho de butilo y cierres de aluminio, y luego se incubaron a temperatura ambiente ( $\pm 21^\circ \text{C}$ ) durante 35 días. Durante el experimento, los cultivos se monitorizaron una vez por semana. El recuento de BSR se realizó mediante la técnica del número más probable (NMP) (n= 3) utilizando el medio *Postgate* E (Postgate, 1984) a la mitad y al final del experimento. Después del enriquecimiento bacteriano, las BSR se concentraron por centrifugación a 4000 rpm durante 10 min, se lavaron con el mismo medio de cultivo y finalmente se transfirieron a los experimentos de tolerancia/eliminación de zinc.

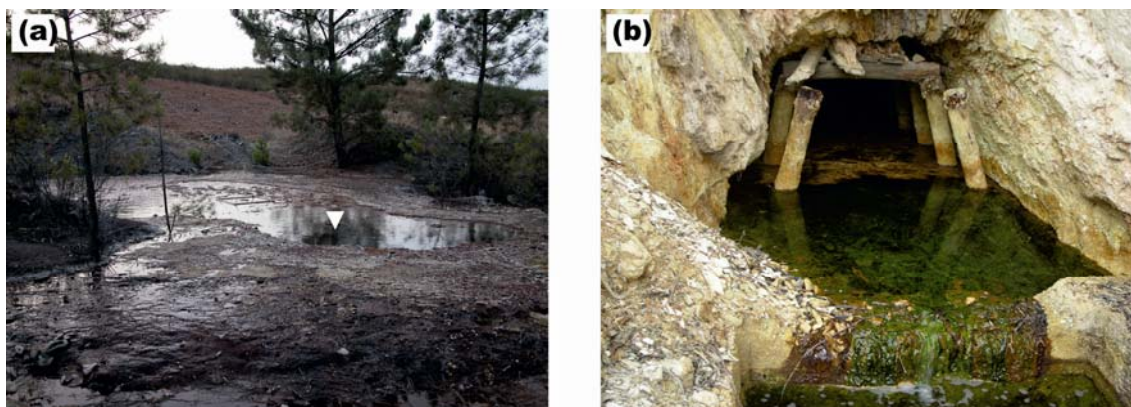


Figura 2.1. Fotografías de campo de los arroyos ácidos de dos minas abandonadas de las FPI de donde se obtuvieron las muestras de inóculo CM y ME: (a) el inóculo CM procede del flujo de salida del pozo subterráneo de Cueva de la Mora (flecha blanca) y (b) el inóculo ME procede de la salida del túnel de Mina Esperanza.

## 2.2. Experimentos de tolerancia y eliminación de zinc

Estos experimentos se llevaron a cabo durante 42 días para investigar la actividad y tolerancia de los inóculos de BSR, previamente enriquecidos, en presencia de una concentración inicial de Zn de 260 mg/L. Las características químicas en estos experimentos fueron: pH neutro con altas concentraciones de sulfato (aprox. 3000 mg/L) y zinc (aprox. 260 mg/L), las cuales reflejan exactamente el lixiviado real de salida de un sistema pasivo alcalino instalado para tratar un AMD extremadamente contaminado en la FPI (Caraballo et al., 2009). Hasta la fecha, ningún estudio ha encontrado inóculos de BSR capaces de tolerar esta concentración de zinc. Los ensayos se realizaron en matraces con 200 mL de medio cultivo base (Martins et al., 2010). El medio base contiene 0.05 g/L de extracto de levadura, 1 g/L de NH<sub>4</sub>Cl, 0.06 g/L CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O,

1 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2 g/L  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y 5g /L de lactato de sodio. El sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; aprox. 1100 mg/L) se añadió al medio en cada experimento para ajustar la concentración inicial de zinc al valor deseado, posteriormente las concentraciones de zinc y sulfato se monitorizaron en el tiempo. El pH del medio de cultivo se ajustó a 7 con una solución 1 M de NaOH, y la solución final se burbujeó con  $\text{N}_2$  y se cubrió con parafina líquida estéril. Además, los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente dentro de una caja de guantes purgada con  $\text{N}_2$  para evitar la difusión de  $\text{O}_2$  atmosférico. La monitorización se realizó tomando una muestra líquida una vez por semana. Además, la actividad bacteriana como una evaluación indirecta de la eficacia de eliminación de zinc se analizó mediante el contaje de BSR mediante la técnica del NMP a la mitad y al final de los experimentos.

### 2.3. Metodología de análisis

El material de vidrio y plástico y el medio de cultivo se esterilizaron a 120°C durante 20 min usando un autoclave modelo AES-28 antes de los experimentos. Para el seguimiento de cada experimento, se extrajo con una jeringa 5 mL de muestra para los ensayos de enriquecimiento y 10 mL para los ensayos de tolerancia. Las soluciones extraídas se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min y se filtraron a través de un filtro de 0.2  $\mu\text{m}$ . Los valores de pH, potencial redox (Eh) y la concentración de sulfato se midieron inmediatamente para evitar los efectos de la disolución de  $\text{CO}_{2(\text{g})}$  y  $\text{O}_{2(\text{g})}$  en estos parámetros. El pH se midió con un instrumento marca Crison y el Eh con un equipo Hanna con electrodos de Pt y Ag/AgCl (Crison). Las mediciones de Eh se corrigieron con respecto al electrodo estándar de hidrógeno. La concentración de sulfato se analizó mediante un espectrofotómetro Hach (modelo DR/890 colorímetro) según el método turbidimétrico descrito en el Manual de Procedimientos de Hach - Método 8051. En los experimentos de tolerancia/eliminación de zinc, las muestras filtradas se acidificaron a  $\text{pH} < 2$  con  $\text{HNO}_3$  (2%) Suprapur y se almacenaron a 4°C hasta el análisis de azufre total y zinc por espectroscopía de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES, siglas en inglés de *inductively coupled plasma-optical emission spectrometry*) con un espectrómetro Jobin Yvon (modelo JY ULTIMA 2).

Después de la centrifugación, los productos sólidos finales se congelaron y se liofilizaron hasta completa sequedad usando un liofilizador de mesa VirTis (Hucoa-Erlöss, España). Los sólidos finales se estudiaron usando un microscopio óptico equipado con una cámara digital (Nikon modelo Eclipse LV100POL), un microscopio electrónico de barrido equipado con un sistema de energía dispersiva (SEM-EDS, siglas en inglés de *Scanning Electron Microscopy-Energy Dispersive Spectrometry*; modelo JEOL JSM-5410), y una

microsonda de electrones equipada con cuatro espectrómetros (EMP, siglas en inglés de *electron probe microanalyzer*; modelo JEOL-8200 JXA). De forma complementaria, la mineralogía de los precipitados neoformados se determinó mediante difracción de rayos X (DRX). Se utilizó DRX convencional para la caracterización mineralógica, sin embargo, las pequeñas cantidades de muestra y la pobre cristalinidad debido a su naturaleza biogénica mostró amplios picos de difracción que impidieron una identificación detallada de las fases. Microdifracción de rayos X ( $\mu$ -DRX) usando radiación sincrotrón ayudó a superar este inconveniente en la línea de haz ID18F del ‘*European Synchrotron Radiation Facility*’ (ESRF, Grenoble, Francia). Un detector CCD bidimensional, a una distancia de la muestra de 112.1131 mm, se utilizó para recoger los patrones de DRX en modo transmisión. La longitud de onda de los rayos X fue de 0.443 Å, y se refinó usando un estándar de Si. Los anillos de difracción Debye-Scherrer de los patrones 2D se integraron en función del ángulo acimutal para generar un patrón de difracción 1D convencional usando el software Fit2D del ESRF (Hammersley et al., 1996).

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Evolución química de las soluciones**

En los experimentos de enriquecimiento, el pH de la solución aumentó rápidamente de 7.1 a un valor promedio de 7.6 y luego se mantuvo casi constante, mientras que el Eh disminuyó gradualmente desde 400 mV a un valor promedio de -220 mV (Figs. 2a, b). Las concentraciones de sulfato en solución para todos los experimentos también disminuyeron desde un contenido inicial de 2155 mg/L a valores por debajo del límite de detección (Fig. 2.2c). Estos valores mostraron una tendencia inversa en relación con el crecimiento poblacional de las BSR, como se muestra mediante la técnica del NMP. De hecho, la concentración de BSR aumentó de cero al inicio a valores de  $4.7 \cdot 10^5$  y  $4 \cdot 10^5$  UFC/mL (unidades formadoras de colonia por mililitro) al final de los experimentos con los inóculos ME y CM, respectivamente. El inóculo SS proviene de un consorcio primario que contenía una población bacteriana inicial de  $5.3 \cdot 10^5$  UFC/mL y que, posteriormente, creció favorablemente durante el experimento de enriquecimiento hasta un valor de  $1.3 \cdot 10^6$  UFC/mL. Por tanto, parece ser que las condiciones del medio fueron adecuadas para la sulfato-reducción bacteriana.

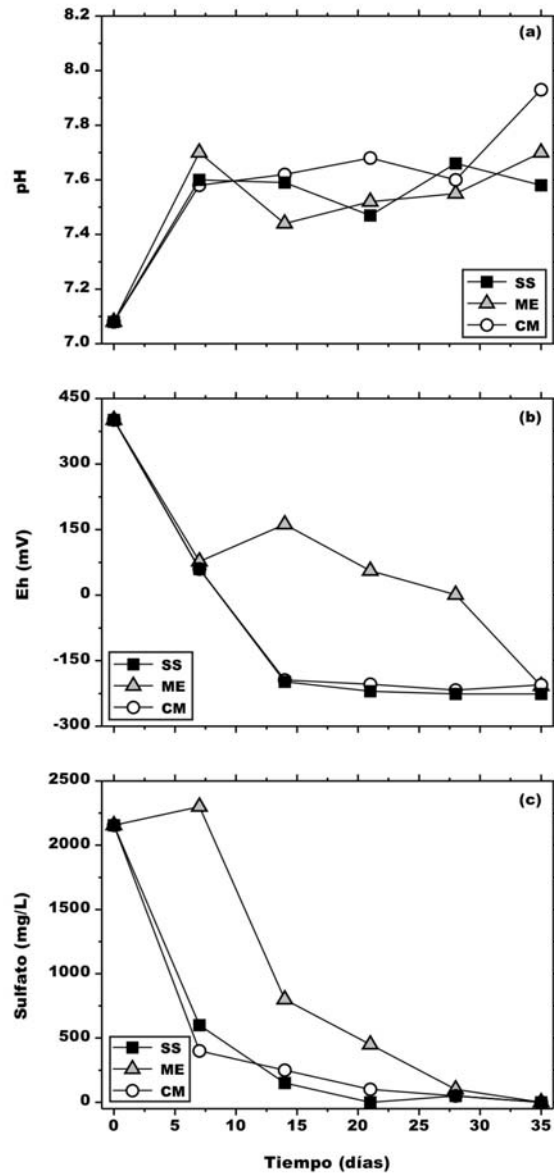


Figura 2.2. Evolución temporal de (a) pH, (b) Eh y (c) concentración de sulfatos en los medios durante los experimentos de enriquecimiento [SS: inóculo procedente de una planta de tratamiento de aguas residuales, ME: inóculo procedente de Mina Esperanza y CM: inóculo procedente de Cueva de la Mora]. Los datos son la media de duplicados y las barras de error son más pequeñas que los símbolos, y por tanto no se muestran.

Los tres consorcios bacterianos previamente enriquecidos se transfirieron a los experimentos de tolerancia y eliminación de altas concentraciones de zinc (aprox. 260 mg/L). Nuevamente, el pH final de las soluciones aumentó ligeramente con respecto a los valores iniciales en todos los experimentos, aunque con valores que oscilan entre 5.5 y 8.0 (Fig. 2.3a), mientras que el Eh disminuyó desde 420 hasta -100 mV para el experimento con el inóculo SS, y hasta 55 mV para los experimentos con los inóculos CM y ME (Fig. 2.3b). Las concentraciones totales de azufre en solución también decrecieron, mostrando un porcentaje de

eliminación promedio del 28% (desde 467 a 337 mg/L), de las cuales sólo las concentraciones de sulfato disminuyeron un 83% (desde 1400 hasta 233 mg/L), como se muestra en la Fig. 2.3c. Como se observó en los experimentos de enriquecimiento, la disminución de las concentraciones de sulfato está inversamente correlacionada con el aumento de la concentración bacteriana. El recuento de BSR aumenta en los experimentos desde  $6.5 \cdot 10^4$ ,  $2.4 \cdot 10^4$  y  $2 \cdot 10^4$  UFC/mL al inicio hasta  $1 \cdot 10^7$ ,  $1.3 \cdot 10^6$  y  $1.7 \cdot 10^6$  UFC/mL al final para los inóculos SS, ME y CM, respectivamente. No obstante, cabe señalar que las poblaciones de BSR disminuyeron ligeramente al inicio de los experimentos. El recuento de BSR después de 14 días de experimento fue de  $1.4 \cdot 10^4$ ,  $3.7 \cdot 10^3$  y  $1.6 \cdot 10^3$  UFC/mL para los inóculos SS, ME y CM, respectivamente. Por último, la disminución de la concentración de sulfato junto con el crecimiento final de las BSR es concomitante con la disminución de la concentración de zinc en el tiempo (Fig. 2.3d). Después de 14, 35 y 42 días para los experimentos con los inóculos SS, ME y CM, respectivamente, el porcentaje de eliminación de zinc en solución alcanzó el 100%, es decir, las concentraciones disminuyeron desde 260 mg/L a valores por debajo del límite de detección.

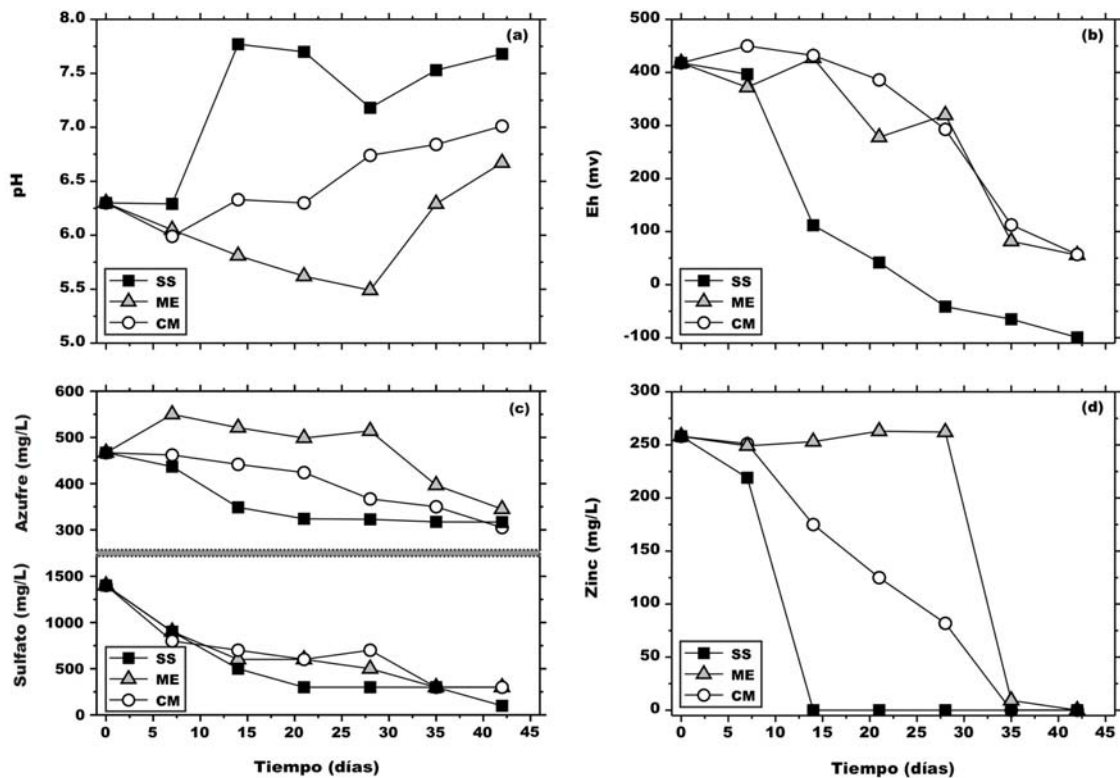


Figura 2.3. Evolución temporal de (a) pH, (b) Eh y (c) concentración de zinc en los medios durante los experimentos de tolerancia y eliminación de zinc [SS: inóculo procedente de una planta de tratamiento de aguas residuales, ME: inóculo procedente de Mina Esperanza y CM: inóculo procedente de Cueva de la Mora]. Los datos son la media de duplicados y las barras de error son más pequeñas que los símbolos, y por tanto no se muestran.

### 3.2. Caracterización mineralógica

Los productos sólidos finales para todos los experimentos de tolerancia al zinc mostraron una biopelícula de color blanquecino-marrón claro visible en muestra de mano. Según los análisis, no se encontraron diferencias entre los precipitados obtenidos con los diferentes inóculos. Las imágenes obtenidas mediante microscopía óptica muestran la presencia de partículas esféricas asociadas a los grupos de bacterias que forman la biopelícula (Fig. 2.4). Las imágenes de SEM revelan que los esferoides típicamente son  $<2.5 \mu\text{m}$  de diámetro y están compuestos exclusivamente de azufre y zinc, como muestran los espectros de EDS (Fig. 2.5).

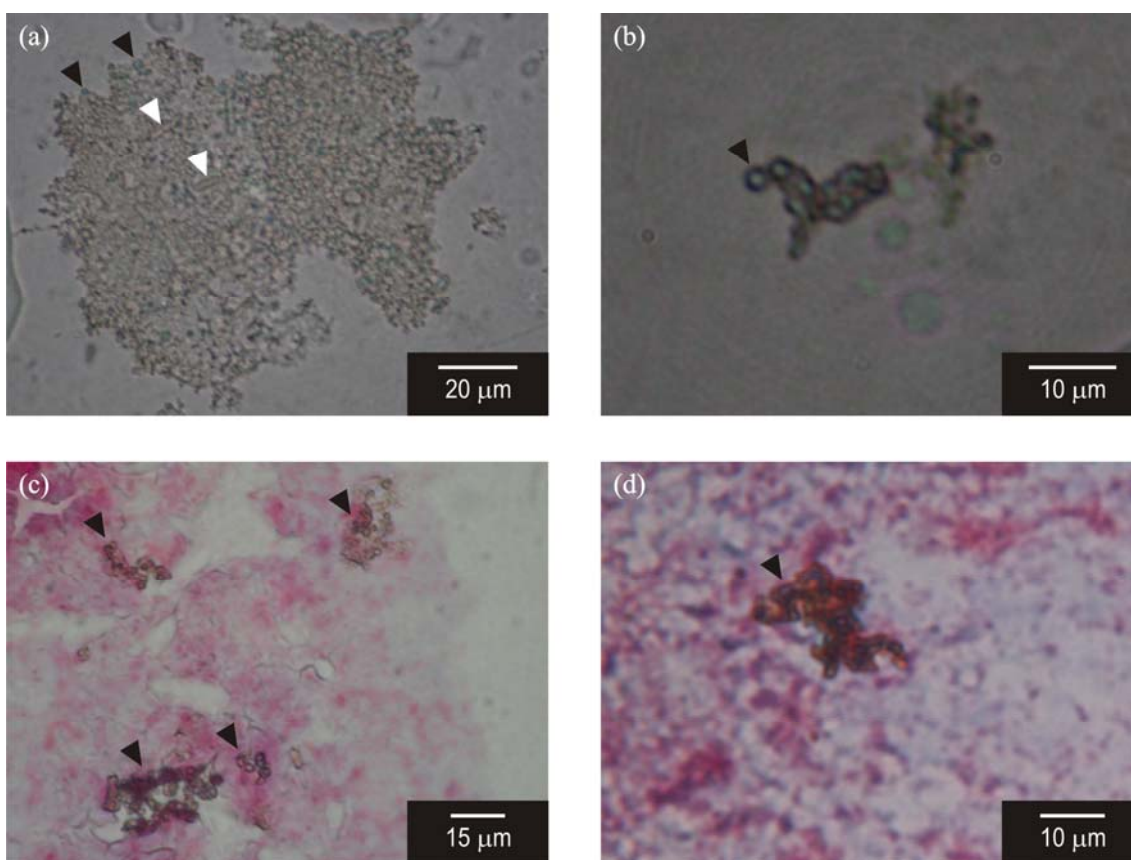


Figura 2.4. Imágenes de microscopio óptico de luz transmitida de la biopelícula de BSR en los experimentos de tolerancia/eliminación de zinc: de (a) a (d) partículas esféricas con contornos oscuros (flechas negras) asociadas a los grupos de bacterias y polímeros orgánicos (flechas blancas). En (c) y (d), las muestras se tiñeron mediante la técnica de tinción Gram para observar la presencia de bacterias Gram negativas o positivas. En este caso, el color rojo-rosa es indicativo de la presencia de colonias Gram negativas.

Los patrones de  $\mu$ -DRX por sincrotrón sugieren que las fases minerales neoformadas precipitadas corresponden a dos formas polimórficas de ZnS: esfalerita y wurtzita (Fig. 2.6). La mayoría de los principales picos de DRX de ambas fases se solapan o están cerca unos de otros. Sin embargo, la wurtzita se identifica por un pico exclusivo alrededor de  $14.5^\circ 2\theta$  (para  $\lambda = 0.443 \text{ \AA}$ ) correspondiente al plano (103) (Fig. 2.6a). Con el fin de asegurar la presencia de

esfalerita en los espectros, la región entre 7.5 y 9° 2θ se descompuso en curvas elementales Gaussian-Lorentzian utilizando el código DECOMPXR, según Lanson (1993). La calidad de los espectros es lo suficientemente alta como para descomponerlos sin suavizado ni sustracción del fondo. Como muestra la descomposición, esta amplia región resulta de la suma de cuatro reflexiones primarias, las cuales pueden atribuirse a una reflexión mayor del plano (111) de esfalerita y a las reflexiones menores de los planos (100), (002) y (101) de wurtzita (Fig. 2.6b). Los factores de fiabilidad son superiores a 99% para todos los espectros, lo que indica una buena concordancia en los ajustes. La contribución del plano (111) de esfalerita es absolutamente necesaria para explicar y ajustar dicha región. Además, esfalerita y wurtzita comúnmente aparecen juntas en agregados esféricos por acción de BSR en condiciones similares, como se discute posteriormente.

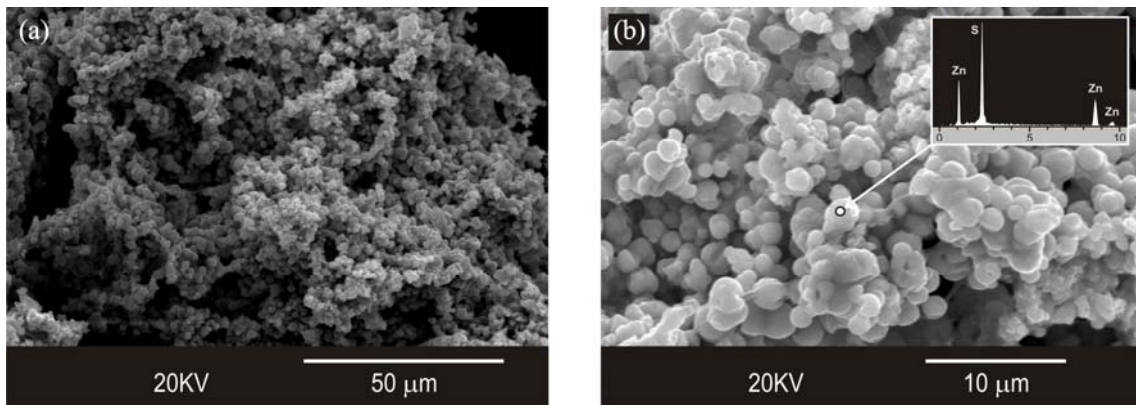


Figura 2.5. Imágenes de SEM de esferoides de ZnS de los experimentos de tolerancia/eliminación de zinc. Es de interés resaltar que las partículas esféricas están compuestas por azufre y zinc según el espectro de EDS.

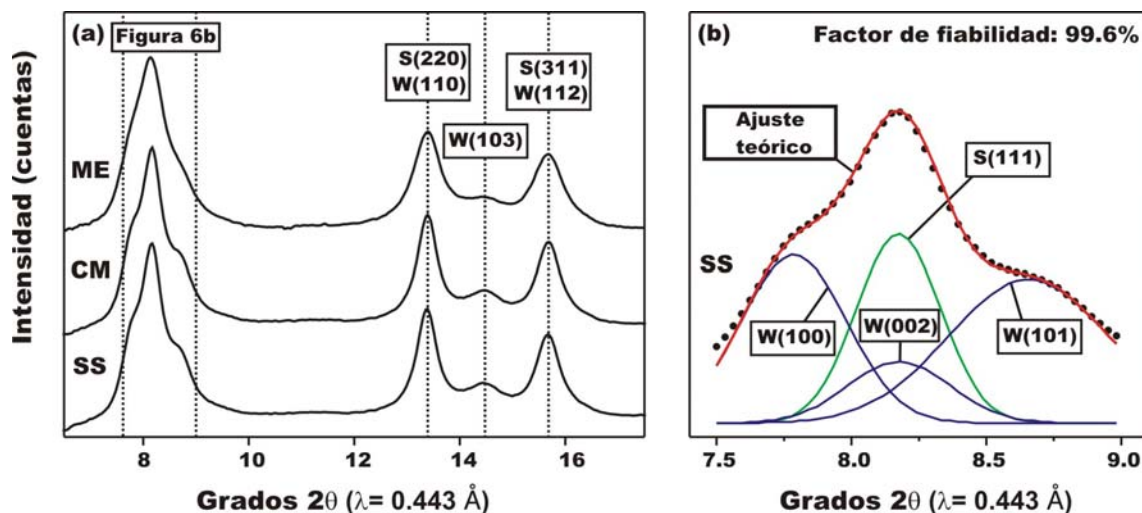


Figura 2.6. (a) Espectros de  $\mu$ -DRX con radiación sincrotrón de las partículas de ZnS de los experimentos de tolerancia al zinc. (b) Ejemplo de descomposición del espectro de DRX del experimento con el inóculo SS en el rango de 7.5 a 9° 2θ. En (b), el solapamiento de los picos esfalerita y wurtzita se separó numéricamente utilizando el programa DECOMPXR (Lanson, 1993). S: esfalerita, W: wurtzita.



El tamaño del cristal en la dirección normal a cualquier plano de DRX como una estimación del tamaño de grano se puede calcular utilizando el parámetro FWHM (anchura total a mitad de altura) y el dato de intensidad de las reflexiones integradas mediante la ecuación de Scherrer (Klug y Alexander, 1974). De acuerdo a esta ecuación, los esferoides se componen de partículas nanocristalinas de ZnS con un tamaño que oscila entre 3 y 6 nm. Es importante tener en cuenta que la presencia de agregados de nanopartículas poco distantes entre sí podrían dar una apariencia rugosa en la superficie del esferoide. Además, algunas imagen microscópicas muestran cantidades abundantes de polímeros orgánicos (Figs. 7a-c) y células bacterianas con forma abastona de un tamaño aprox. de 3 μm de largo (Fig. 2.7d) que están estrechamente asociadas con los agregados esféricos. Estas imágenes muestran que incluso algunas bacterias contienen esferoides de ZnS alrededor e incrustados aparentemente en su pared celular (Figs. 7e, f).

#### 4. DISCUSIÓN

Como se indicó en la introducción de este capítulo, las BSR catalizan la reducción de sulfato a sulfuro en presencia de materia orgánica bajo condiciones anaeróbicas (Heijs y van Gemerden, 2000). Aunque los procesos de reducción abióticos son termodinámicamente favorables, la transformación de sulfato a sulfuro sería notablemente más lenta en condiciones ambientales sin catálisis bacteriana (Trudinger et al., 1985). El proceso de reducción bacteriana implica el uso de sulfato como aceptor final de electrones para oxidar compuestos orgánicos. Posteriormente, los sulfuros generados reaccionan con los metales divalentes en solución, y son capaces de inmovilizar estos metales en forma de sulfuros insolubles. Los detalles completos sobre este proceso se pueden encontrar en numerosos estudios publicados en la literatura (por ejemplo, Gadd y White, 1993; Rickard y Morse, 2005). Las reacciones generales se describen a continuación:

1. Durante el proceso metabólico, las BSR oxidan los compuestos orgánicos simples (representados por CH<sub>2</sub>O), produciendo sulfuro de hidrógeno e iones bicarbonatos (Ec. 1).



2. El sulfuro de hidrógeno reacciona con los cationes metálicos (Me<sup>2+</sup>) para formar precipitados de sulfuros metálicos insolubles (MeS<sub>(s)</sub>; Ec. 2).



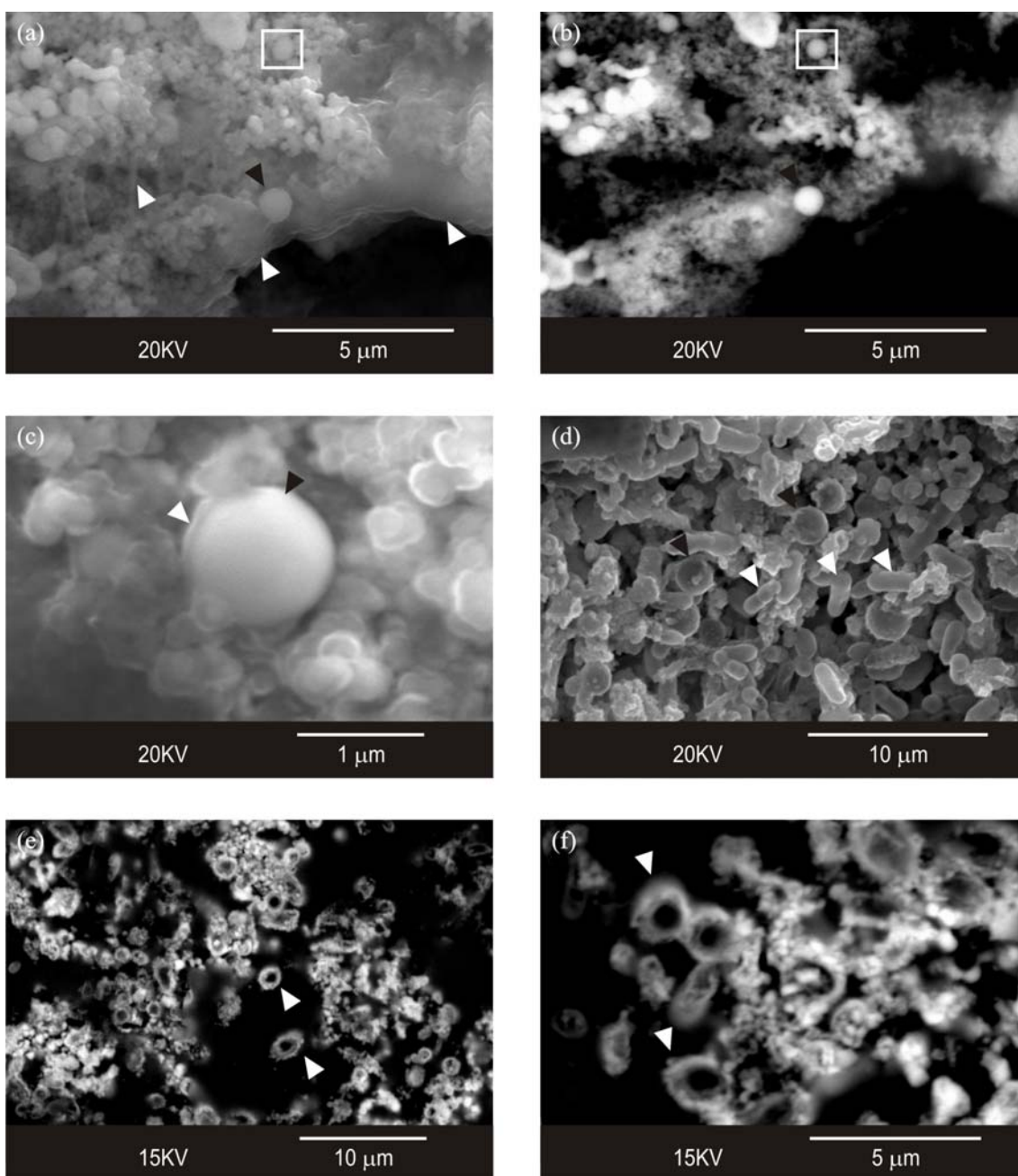


Figura 2.7. Imágenes de SEM y EMP de los esferoides de ZnS (flechas negras) asociados con polímeros orgánicos y células bacterianas (flechas blancas). Imágenes (a) retrodispersada y (b) secundaria de SEM de la misma área: la comparación revela claramente que los precipitados de ZnS aparecen como partículas brillantes y los polímeros orgánicos como áreas más oscuras en (b) con respecto a (a). El rectángulo pequeño es ampliado en (c). (c) Imagen de SEM del recubrimiento orgánico sobre los esferoides de ZnS. (d) Imagen de SEM de abundantes células bacterianas. (e) - (f) Imágenes de EMP de una sección transversal de las células bacterianas con incrustaciones superficiales de agregados de ZnS (flechas blancas).

De acuerdo con las reacciones (1) y (2), la tendencia en la química de las soluciones y el crecimiento de las BSR son indicativos de un proceso bacteriano de sulfato-reducción en los experimentos de enriquecimiento. Bajo condiciones anaeróbicas, la mayor parte del sulfato se reduce a sulfuro y, posteriormente, disminuye su concentración al precipitar con los cationes

metálicos presentes en el medio de cultivo ( $Me^{2+}$ ). La transformación de sulfato a sulfuro libera iones bicarbonatos en la solución, lo que explica el incremento del pH. La caída en los valores de Eh y en las concentraciones de sulfato, junto con el crecimiento bacteriano, en los experimentos de enriquecimiento con los inóculos SS y CM se produce prácticamente desde el principio. Sin embargo, el crecimiento de la población de BSR se produce relativamente más tarde en el experimento con el inóculo ME, pero termina siendo tan eficaz como con los inóculos SS y CM (Fig. 2.2). En estos experimentos, el medio de cultivo para el enriquecimiento bacteriano contiene  $Fe^{2+}$  como catión metálico en solución, lo que promueve la precipitación de partículas sólidas de FeS como sulfuro insoluble (Postgate, 1984; Gramp et al., 2010). En ambientes sedimentarios, las sales de hierro están presentes en grandes cantidades y la precipitación de FeS en condiciones anaeróbicas por la acción catalítica de BSR es un proceso ampliamente conocido (Pósfai y Dunin-Borkowski, 2006). Incluso en entornos afectados por los AMD, las altas concentraciones de hierro no son suficientes para erradicar estos microorganismos, atenuando la contaminación por precipitación de FeS, ya sea en sistemas naturales (Sarmiento et al., 2009b) o reactores de biorremediación (Caraballo et al., 2010). De hecho, las especies de hierro parecen ser no tóxicas para las BSR hasta concentraciones de 400 mg/L (Tabak et al., 2004). En cuanto a la concentración de zinc y su toxicidad, los resultados publicados por Azabou et al. (2007) muestran que concentraciones superiores a 150 mg/L producen una respuesta tóxica en los cultivos de BSR. Por tanto, este estudio pretende trasladar la tolerancia bacteriana al zinc a nuevos límites utilizando inóculos diferentes previamente enriquecidos, y posteriormente sometidos a un medio de cultivo donde se sustituye  $Fe^{2+}$  por  $Zn^{2+}$  a una concentración de 260 mg/L, hasta ahora considerada letal para estos microorganismos (Radhika et al., 2006).

En los experimentos de tolerancia y eliminación de zinc, la evolución temporal de las soluciones, el crecimiento bacteriano final y la caracterización mineralógica de los productos sólidos sugieren que la reducción de los sulfatos por acción de las BSR fue un éxito. En este caso, el medio de cultivo inicialmente contuvo  $Zn^{2+}$  como catión metálico y precipitaron partículas sólidas de ZnS en forma de nanocristales de esfalerita y wurtzita (Fig. 2.6). Las imágenes microscópicas indirectamente apoyan la idea de que la precipitación de ZnS es exclusivamente inducida por un proceso biológico ya que la mayoría de los agregados se encuentran en estrecha asociación con la biopelícula y a veces aparentemente incrustados en las bacterias (Fig. 2.7). La precipitación de agregados esféricos de nanopartículas de esfalerita y wurtzita inducida por la actividad metabólica de BSR se ha definido previamente en biopelículas desarrolladas de forma natural en aguas procedentes de una mina abandonada de Pb-Zn situada en Tennyson, Wisconsin (Labrenz et al., 2000; Druschel et al., 2002; Moreau et al., 2004). Labrenz et al. (2000) demostraron cómo estos microorganismos controlan las

concentraciones de zinc en aguas subterráneas y en sistemas de remediación basados en humedales y sugieren rutas biológicas para la formación de algunos depósitos a baja temperatura de ZnS. Druschel et al. (2002) desarrollaron un modelo termodinámico para explicar la precipitación de partículas biogénicas in situ de ZnS dentro de estas biopelículas. Moreau et al. (2004) determinaron usando datos de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución que los nanocristales y agregados esféricos de esfalerita y wurtzita contienen múltiples defectos de apilamiento sobre el plano {111} de esfalerita, lo cual causa un desorden que resulta en capas de wurtzita intercaladas entre dominios de esfalerita. Estos últimos autores también encontraron que los agregados son esferas de ZnS cuya estructura interna está en detalle compuesta de finas bandas concéntricas, lo que sería un reflejo de (1) procesos de post-precipitación, floculación y agregación, (2) diferentes episodios de actividad bacteriana y/o alternativamente (3) fuerzas de atracción entre las nanopartículas no cargadas y restos hidrófobos en los polímeros orgánicos.

Los consorcios de BSR utilizados en los experimentos respondieron favorablemente a pesar de la extremada concentración de zinc. Al inicio de los experimentos, la concentración total de azufre (467 mg/L) es igual a la concentración de azufre como sulfato (1400 mg/L), es decir, aproximadamente 14.6 mM, si se considera como concentración molar. Esto es obvio porque el medio de cultivo se preparó con sales sulfatadas. Durante el transcurso de los experimentos, la diferencia entre azufre total y sulfato, es decir, principalmente iones de sulfuro producidos por sulfato reducción, aumenta hasta un valor promedio de 8.1 mM en todos los inóculos. Al final de los experimentos, la precipitación de zinc no es suficiente para eliminar totalmente el azufre reducido, y por tanto, un exceso permanece en solución. Las altas concentraciones de sulfuros en solución también pueden tener efectos tóxicos sobre las bacterias, aunque las BSR tiene una resistencia relativamente alta y los niveles máximos de tolerancia no se han alcanzado en estos experimentos (alrededor de 1000 mg/L de H<sub>2</sub>S libre pueden inhibir solo un 50% de las BSR; Isa et al., 1986). De acuerdo con la estequiometría de la reacción, la cantidad de azufre consumido por la precipitación de ZnS más la cantidad de azufre total que permanece en solución coincide en todo momento con la cantidad de azufre inicial introducida al comienzo de los experimentos. Por tanto, la cantidad de especies volátiles de azufre que potencialmente se pueden perder es insignificante.

Al final de los experimentos de tolerancia y eliminación de zinc, la población de BSR cultivadas a partir del inóculo SS creció 6 y 8 veces más que las de los inóculos CM y ME, respectivamente, según los datos obtenidos mediante la técnica del NMP. Además, el crecimiento bacteriano con respecto al comienzo también fue mayor en los experimentos con el inóculo SS, lo cual coincide con la rápida disminución en los valores de Eh y las concentraciones de sulfato y zinc en solución (Fig. 2.3). La disminución en la población

bacteriana que se produce durante las primeras semanas en todos los experimentos podría ser explicada por la toxicidad del zinc que afecta ligeramente al crecimiento y actividad de las BSR. Parece ser que las primeras generaciones de bacterias lucharon por desarrollarse en altas concentraciones de zinc y respondieron al stress sometido formando una superficie para adsorberlo y, por tanto, disminuir su biodisponibilidad. En este sentido, las células bacterianas desarrollaron una biopelícula como estrategia para sobrevivir y tolerar las altas concentraciones de zinc. La biopelícula es un agregado de microorganismos en el que las células se adhieren a la superficie de sustancias poliméricas extracelulares (EPS, siglas en inglés de *extracellular polymeric substance*) (White y Gadd, 2000). El EPS es una mezcla de polisacáridos, mucopolisacáridos y proteínas que varía su composición según las especies y condiciones del cultivo (Zinkevich et al., 1996). Estas sustancias pueden adherir metales solubles por complejación. Posteriormente, el desarrollo de la biopelícula como un mecanismo de defensa para la adaptación de las bacterias junto con la disminución de la concentración de zinc por precipitación como sulfuro metálico ayudó a reducir los efectos tóxicos, y las poblaciones bacterianas aumentaron de nuevo en los experimentos. Sin embargo, la adaptación una vez más parece ser menos traumática en la población del inóculo SS debido a que presenta una menor tasa de muerte celular. Por tanto, el consorcio de BSR del inóculo SS parece ser el más tolerante y eficaz en el proceso de eliminación y tolerancia al zinc en las soluciones.

De acuerdo a la química de las soluciones, la sulfato-reducción bacteriana sería el proceso principal que explicaría la eliminación de zinc en los experimentos de tolerancia/eliminación. Sin embargo, es importante destacar otros procesos bacterianos que también puede eliminar el zinc de la solución. Por ejemplo, la biosorción de metales o partículas metálicas sólidas en la superficie de la pared celular (Jalali y Balwin, 2000). Ngwenya (2007) también propuso que la muerte bacteriana o autólisis de la pared celular por peptidoglucano hidrolasas y la producción de ácidos nucleicos, polisacáridos, lípidos y principalmente de proteínas son capaces de acomplejar metales en solución. Estos mecanismos de eliminación estarían también apoyados por nuestras observaciones de agregados esféricos de sulfuros de zinc en estrecha relación con las células bacterianas y los polímeros orgánicos extracelulares (véase por ejemplo la Fig. 2.7).

La precipitación de sulfuros metálicos en la superficie bacteriana puede cubrir y aislar a las BSR, protegiéndolas de los efectos tóxicos de los metales pesados. Sin embargo, este mecanismo de tolerancia pueden inhibir la actividad metabólica de las BSR (Utgikar et al., 2002). Radhika et al. (2006) observaron un crecimiento de BSR en presencia de concentraciones bajas de zinc, sin embargo, la población bacteriana decreció en el número de células a partir de 210 mg/L. Estos autores utilizan el revestimiento con los precipitados de sulfuros sobre las células como una posible hipótesis para explicar la inhibición del crecimiento bacteriano.

Aunque en nuestros experimentos algunas bacterias pueden estar en contacto con agregados esféricos de ZnS (ver por ejemplo las Figs. 7e, f), es evidente que el recubrimiento de sulfuro no impide la actividad metabólica de las bacterias. Hasta donde sabemos, esta sería la primera confirmación de tolerancia y eliminación total de zinc por BSR a tan altas concentraciones.

La extrapolación de los resultados experimentales de laboratorio a tratamientos a escala real requiere el control de algunas variables como la naturaleza del inóculo de BSR y la temperatura. Para estimular la biorremediación en sistemas de tratamiento pasivo, los reactores se inoculan normalmente con consorcios de BSR obtenidos en ambientes reductores ricos en sulfatos tales como sedimentos lacustres y humedales, estiércol de ganado y sedimentos de arroyos afectados por aguas residuales o AMD (Doshi, 2006). El inóculo de BSR puede afectar significativamente al éxito del tratamiento, especialmente en condiciones ambientales muy extremas. Por esta razón, se recomienda el uso de consorcios de BSR obtenidos en sedimentos afectados por AMD por contener comunidades bacterianas previamente expuestas a contaminación, y por tanto, con una mayor tolerancia (Johnson y Hallberg, 2005). En este estudio, los resultados obtenidos con el inóculo de la planta de tratamiento de aguas residuales fueron mejores que los resultados mostrados por los dos inóculos de la FPI, por contener una concentración inicial de BSR significativamente más elevada. Sin embargo, los inóculos de los distritos mineros de la FPI deberían ser seriamente considerados para futuras aplicaciones a gran escala, especialmente el inóculo de Cueva de la Mora, por contener probablemente bacterias más tolerantes a las altas concentraciones metálicas. Como se menciona, la temperatura es otro factor que afecta el crecimiento de las BSR. Las bajas temperaturas reducen la actividad en general de las BSR. Excepto el grupo de BSR psicrófilas o termófilas, los grupos taxonómicos restantes (mesófilos) típicamente crecen en condiciones ambientales y tienen temperaturas de crecimiento óptimas que van desde 20 a 40°C (Doshi, 2006). Las BSR aisladas en este estudio deberían contribuir a mejorar las estrategias de remediación de AMD en la FPI, donde la temperatura media está cerca del rango óptimo de crecimiento durante la mayor parte del año.

## 5. CONCLUSIONES

Algunos sistemas de tratamiento pasivo de drenaje ácido de minas (AMD) muestran una eliminación completa de Fe y Al en drenajes altamente contaminados. Sin embargo, estos sistemas muestran graves deficiencias en la eliminación de zinc. Este estudio recomienda el uso de bacterias sulfato-reductoras (BSR) para remediar un medio que contenga una concentración inicial de zinc de hasta 260 mg/L. La concentración de zinc se eliminó por completo del medio de cultivo debido a la precipitación de nanopartículas de esfalerita-wurtzita (ZnS) según se

identificó mediante microscopía y  $\mu$ -DRX con radiación sincrotrón. Esta información resalta la importancia del potencial medioambiental de la precipitación de sulfuros metálicos insolubles en la captación de zinc para el tratamiento de aguas contaminadas.

# CAPÍTULO

# 3

---

## **EVALUACIÓN DEL IMPACTO DE FOSFOYESO SOBRE LAS MARISMAS DEL RÍO TINTO (SUROESTE DE ESPAÑA): EL PAPEL DE LOS PROCESOS DE ATENUACIÓN NATURAL**

---

**Basado en:**

**R. Pérez-López, J. Castillo, A.M. Sarmiento, J.M. Nieto, 2011. Assessment of phosphogypsum impact on the salt-marshes of the Tinto river (SW Spain): Role of natural attenuation processes. *Marine Pollution Bulletin*, 62:2787-2796.**





# ***Assessment of phosphogypsum impact on the salt-marshes of the Tinto river (SW Spain): Role of natural attenuation processes***

## ***Abstract***

---

*About 120 Mton of phosphogypsum from the fertiliser industry were stack-piled on the salt-marshes of the Tinto river (Spain). This paper investigates the capacity of salt-marshes to attenuate contamination due to downward leaching from phosphogypsum. Solids and pore-waters were characterized at different depths of the pile to reach the marsh-ground. In superficial zones, metals were highly mobile, and no reduced sulphur was found. However, pollutant concentration decreased in the pore-water in deeper oxygen-restricted zones. Metal removal occurred by precipitation of newly formed sulphides, being this process main responsible for the contamination attenuation. Pyrite-S was the main sulphide component (up to 2528 mg/kg) and occurred as framboids, leading to high degrees of pyritization (up to 97%). The sulphidization reaction is Fe-limited; however, excess of acid-volatile sulphide over other metals cause precipitation of other sulphides, mainly of Cu and As. This decrease in metal mobility significantly minimises the impact of phosphogypsums on the salt-marshes.*

---

*Keywords: Phosphogypsum, Metal pollution, Salt-marshes, Natural attenuation, Sulphate reduction.*



# CAPÍTULO 3

## EVALUACIÓN DEL IMPACTO DE FOSFOYESO SOBRE LAS MARISMAS DEL RÍO TINTO (SUROESTE DE ESPAÑA): EL PAPEL DE LOS PROCESOS DE ATENUACIÓN NATURAL

---

|                   |  |
|-------------------|--|
| <b>CONTENIDO:</b> | <b>1. INTRODUCCIÓN</b>                                   |
|                   | <b>2. MARCO AMBIENTAL Y OBJETIVOS</b>                    |
|                   | <b>3. METODOLOGÍA</b>                                    |
|                   | <b>3.1. Toma y preparación de muestras</b>               |
|                   | <b>3.2. Muestreo y análisis del agua de poro</b>         |
|                   | <b>3.3. Análisis del fosfoyeso</b>                       |
|                   | <b>3.4. Modelización geoquímica</b>                      |
|                   | <b>4. RESULTADOS</b>                                     |
|                   | <b>4.1. Parámetros sensibles a las condiciones redox</b> |
|                   | <b>4.2. Agua de poro y concentraciones totales</b>       |
|                   | <b>4.3. Movilidad de metales en el fosfoyeso</b>         |
|                   | <b>5. DISCUSIÓN</b>                                      |
|                   | <b>6. CONCLUSIONES</b>                                   |
|                   | <b>7. REFERENCIAS</b>                                    |

---

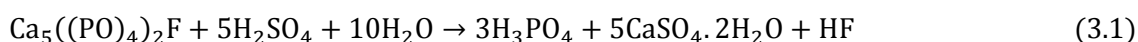
**RESUMEN:** Aproximadamente 120 Mton de fosfoyeso de la industria de fertilizantes permanecen apilados sobre las marismas del río Tinto (España). Este estudio investiga la capacidad de las marismas para atenuar la contaminación resultante de la lixiviación del fosfoyeso. Muestras sólidas y agua de poro se obtuvieron a diferentes profundidades de la balsa hasta alcanzar la interfase entre la marisma y el fosfoyeso. En la zona superficial, los metales son extremadamente móviles, y no se encontró azufre reducido. Sin embargo, la

concentración de contaminantes disminuye en el agua de poro de zonas más profundas bajo condiciones limitadas en oxígeno. En estas condiciones, se produce la eliminación de metales pesados por precipitación de sulfuros neoformados, siendo este mecanismo el principal responsable de la atenuación de la contaminación. El azufre pirítico es el principal componente de azufre reducido (hasta 2528 mg/kg) y se presenta como framboides, dando lugar a un alto grado de piritización (hasta 97%). La reacción de sulfidización está limitada por el Fe, sin embargo, el exceso de sulfuros ácidos volátiles con respecto a otros metales permite la precipitación de otros sulfuros, principalmente de Cu y As. Esta disminución en la movilidad de los metales minimiza significativamente el impacto del fosfoyeso sobre las marismas.

**Palabras claves:** fosfoyeso, metales contaminantes, marismas, atenuación natural, sulfato-reducción.

## 1. INTRODUCCIÓN

El fosfoyeso hace referencia al yeso formado como un residuo procedente del procesado de roca fosfatada para fabricación de fertilizantes a través de un proceso químico húmedo. La reacción química para la producción de ácido fosfórico como fertilizante puede describirse como:



El ataque de la roca fosfatada, principalmente fluorapatita ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ ), con ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) produce ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), fluoruro de hidrógeno (HF) y fosfoyeso ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). El método húmedo genera alrededor de 5 toneladas de fosfoyeso por cada tonelada de ácido fosfórico fabricado. La producción de fosfoyeso en todo el mundo es de alrededor de 100-280 Mton al año (Yang et al., 2009). Estos residuos están altamente enriquecidos en impurezas metálicas y radionucléidos de las series de desintegración del uranio (Rutherford et al., 1994).

Los fosfoyesos se apilan normalmente en grandes depósitos expuestos a procesos de meteorización en las zonas costeras cercanas a la planta de ácido fosfórico, donde pueden causar graves daños ambientales (Tayibi et al., 2009). Las marismas saladas ubicadas en el lado

occidental del estuario del río Tinto (Huelva, SO España) representan un claro ejemplo de un paisaje cubierto por fosfoyeso. La balsa de fosfoyeso en la actualidad contiene cerca de 120 Mton y está dentro del prisma de mareas del estuario. Estudios recientes han evaluado la capacidad de las balsas de fosfoyeso como reservorio y fuente de impurezas tóxicas móviles en varios escenarios ambientales (Pérez-López et al., 2010). Sin embargo, este trabajo no considera el destino a largo plazo de los contaminantes y su posible interacción con el ecosistema. La información disponible hasta la fecha es útil para establecer criterios de evaluación de riesgos y diseñar estrategias de restauración. No obstante, los estudios sobre dinámica de contaminantes en el medio ambiente requieren la estimación de los cambios espacio-temporales de los parámetros que controlan la interacción suelo-contaminante (Martínez y McBride, 1999).

El estado de oxidación de los suelos y los sedimentos puede afectar a la solubilidad y, por tanto, la movilidad de los contaminantes. El destino de los metales está fuertemente influenciado por los cambios en el potencial redox, lo que controla su distribución entre las fracciones móviles y no móviles (Li et al., 2007). El fosfoyeso localizado en Huelva se encuentra apilado sobre las depresiones de la marisma local sin diques de contención que protejan sus flancos ni una base impermeable que evite la lixiviación en profundidad. Por tanto, las pilas de fosfoyeso están colocadas directamente sobre el suelo de marismas. Las marismas generalmente tienen alto contenido en materia orgánica, cuya descomposición oxidativa propicia la existencia de condiciones anaeróbicas en este medio (Vega et al., 2009; y sus referencias). Hay que tener en cuenta que la solubilidad de oxígeno en agua es baja y la oxidación de pequeñas cantidades de materia orgánica es suficiente para agotar o consumir el oxígeno disuelto en el ambiente.

Las condiciones anaeróbicas pueden favorecer la actividad de las bacterias sulfato-reductoras, las cuales juegan un papel importante en la fijación de los metales y, por tanto en el descenso de su movilidad, en suelos y sedimentos contaminados (Heijs y van Gemerden, 2000; Sarmiento et al., 2009). De hecho, estos procesos de sulfidización ocurren a menudo en los sedimentos de la marisma, lo que resulta en una atenuación natural de la contaminación (Andrade et al., 2002, 2004; Vega et al., 2008). Por tanto, este estudio asume como hipótesis de partida que las marismas del estuario del río Tinto podrían cumplir con los requisitos necesarios para la existencia de procesos redox que atenúen naturalmente los contaminantes disponibles procedentes de la lixiviación del fosfoyeso que las cubre. Así, los cambios en la movilidad de metales con la profundidad se estudiaron mediante muestreo de agua de poro y extracciones químicas secuenciales en muestras de fosfoyeso tomadas en perfiles de profundidad hasta llegar al contacto con la marisma salada. Además, la posible existencia de procesos de sulfato-reducción que atenúen la contaminación se evaluó mediante modelización termodinámica de las soluciones de agua de poro y determinación de especies de azufre reducido en las muestras

sólidas. Hasta donde sabemos, no existen estudios sobre los procesos de atenuación natural de la contaminación liberada por la meteorización de fosfoyesos en ninguna zona de vertidos a nivel mundial. Por tanto, este estudio presenta un enfoque innovador en investigaciones sobre este tipo de residuos industriales.

## **2. MARCO AMBIENTAL Y OBJETIVOS**

El complejo industrial de fertilizantes y las balsas de fosfoyeso se localizan en el estuario formado por la confluencia de los ríos Tinto y Odiel (Fig. 3.1). La producción de ácido fosfórico se inició en 1968 y desde entonces hasta 1997, alrededor del 20% del fosfoyeso se vertió directamente en el río Odiel, mientras que el 80% restante se depositó en pilas, de aprox. 5-6 m de altura y con más de 1.200 hectáreas de extensión, en el margen derecho del río Tinto, a menos de 300 m de distancia de la periferia de la ciudad (Bolívar et al., 1995). La fábrica de fertilizantes anualmente procesa alrededor de 2 Mton de roca fosfatada y produce 3 Mton de fosfoyeso. Aguas fluviales se utilizaron para bombear el fosfoyeso a las balsas y, después de la decantación, esta agua se vertía en sistemas medioambientales cercanos hasta 1997.

El sistema estuarino contiene uno de los ecosistemas de marisma salada más importantes de Europa. Dado que los ecosistemas de marisma son extremadamente sensibles a la contaminación, la zona de marismas ocupada por la balsa está totalmente degradada. Sin embargo, existen marismas semejantes, no ocupadas por fosfoyeso, en el estuario del río Odiel que fueron declaradas Reserva de la Biosfera por la UNESCO en 1983 y humedal acogido al convenio RAMSAR-NATURA en 1989.

Como consecuencia de la acción de los agentes naturales, tales como los factores meteorológicos y las aguas mareales, la escorrentía procedente de la lixiviación de las balsas de fosfoyeso puede representar un riesgo potencial para los receptores ecológicos. El agua que percola se almacena en las balsas como un acuífero no confinado, aunque puede fluir lateralmente como agua subterránea y alcanzar el estuario.

En 1992, un área de la balsa de 400 hectáreas se restauró mediante una capa de 25 cm de suelo natural y cubierta vegetal; y otras zonas se encuentran actualmente en proceso de restauración. Sin embargo, los suelos como barreras no impiden la infiltración de agua de lluvia y de mareas, y por tanto, la lixiviación de impurezas sigue siendo posible incluso después de las tareas de restauración.

El vertido directo de fosfoyeso y las descargas indirectas procedentes de la lixiviación de las balsas por el agua meteórica o mareal han liberado contaminantes con el tiempo,

impactando en la calidad de los sedimentos y aguas (Martínez-Aguirre y García-León, 1991; Bolívar et al., 2002). En 1997, la política de gestión de residuos cambió. La introducción de un circuito cerrado de agua dulce y el almacenamiento de todo el fosfoyeso en las balsas fueron las principales acciones llevadas a cabo para minimizar los impactos sobre el medio ambiente marino. La técnica de depósito también mejoró con la formación de una pila piramidal grande de aprox. 150 ha y una altura de 30 m. El sistema de reciclado de aguas incluye un canal perimetral alrededor de la pila piramidal para recoger los lixiviados de la balsa y evitar su descarga en el río Tinto. Sin embargo, este canal no se implantó en la parte no piramidal de la balsa existente antes de 1997. Después del cambio en la política de tratamiento de residuos, la contaminación de la ría ha disminuido claramente (Villa et al., 2009). La planta de fertilizantes cesó de verter fosfoyeso sobre la marisma en Diciembre de 2010 bajo una decisión de la Audiencia Nacional Española.

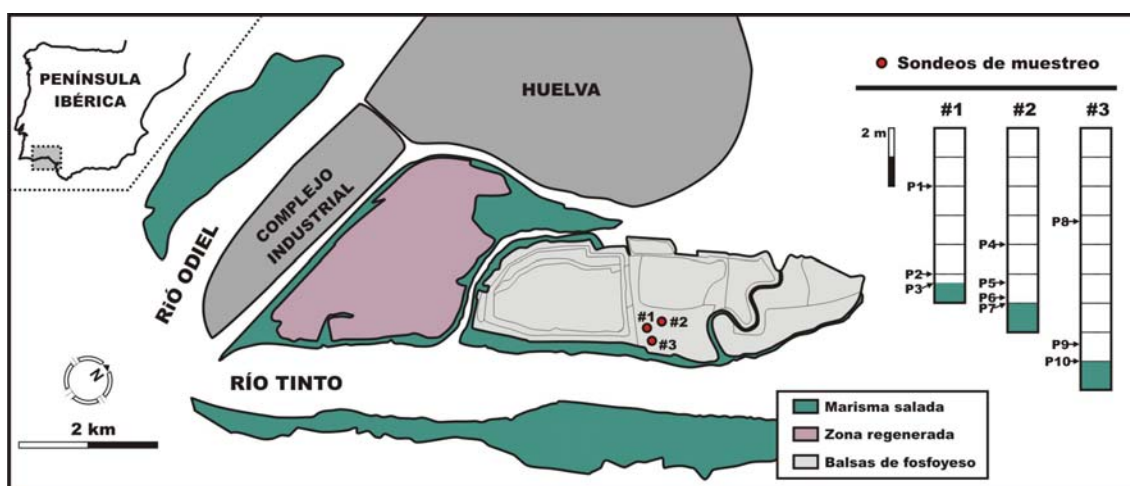


Figura 3.1. Mapa de situación del estuario de los ríos Tinto y Odiel, con la localización de las balsas de fosfoyeso y la ubicación de los tres sondeos realizados para el muestreo.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Toma y preparación de muestras

Las muestras de fosfoyeso se recogieron a diferentes profundidades a partir de tres perforaciones llevadas a cabo mediante una barrena para el muestreo de suelos en Noviembre de 2009. Las profundidades muestreadas (P) fueron de 2 m, 5 m y 5.3 m en el sondeo #1; 4 m, 5.3 m, 5.8 m y 6 m en el sondeo #2; y 3.2 m, 7.4 m y 8 m en el sondeo #3 (Fig. 3.1). Los tres puntos de muestreo se llevaron a cabo en un área cercana situada dentro del mismo módulo de vertido. La última profundidad del muestreo en cada uno de los sondeos corresponde al contacto entre los fosfoyesos y el suelo de la marisma (Fig. 3.1). Las muestras se colocaron en bolsas de



polipropileno, se llevaron rápidamente al laboratorio (en 15 minutos) y se almacenaron en una cabina anóxica con atmósfera de nitrógeno.

### 3.2. Muestreo y análisis del agua de poro

El agua de poro de cada muestra se extrajo inmediatamente usando un lisímetro de succión (muestreador Rhizon; Eijkelkamp Agrisearch Equipment, Holanda). El muestreador Rhizon consiste en una membrana porosa de polietersulfona que actúa como filtro en el interior de un tubo cilíndrico de polietileno (5-10 cm de longitud y 2.5 mm de diámetro) que se inserta en la muestra húmeda y extrae el agua de poro por succión mediante un tubo de vacío o una jeringa. En las muestras de agua de poro, se analizó pH, potencial redox (Eh), especies  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ , y concentración de  $H_2S$ , azufre total y cationes. La extracción y preparación para los análisis se llevó a cabo dentro de la cabina anóxica para evitar oxidación. El pH se midió usando un equipo Crison y el Eh usando un medidor Hanna con electrodos de Pt y Ag/AgCl (Crison). Las medidas de Eh se corrigieron con respecto al electrodo estándar de hidrógeno (Nordstrom y Wilde, 1998). La especiación de  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  se determinó usando el método de la fenantrolina (Rodier, 1996). Las concentraciones de sulfuro de hidrógeno se analizaron mediante un espectrofotómetro Hach (colorímetro modelo DR/890) de acuerdo con el método colorimétrico descrito en el Manual de Procedimientos de Hach, método de análisis 8131.

Una alícuota de agua de poro de cada muestra se acidificó a  $pH < 2$  con  $HNO_3$  (2%) Suprapur y se almacenó a  $4\text{ }^\circ\text{C}$  hasta su análisis por espectroscopía óptica de emisión con fuente de plasma acoplado por inducción (ICP-OES, siglas en inglés de *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*) con un espectrómetro Jobin Yvon (modelo JY ULTIMA 2). Los elementos analizados por ICP-OES fueron: Al, As, Ca, Cd, Cr, Cs, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, U, Zn y S. Soluciones multielementales preparadas a partir de estándares certificados individuales suministrados por *SCP SCIENCE* se utilizaron para la calibración. Estas soluciones se analizaron al principio y al final de cada secuencia de análisis. Además, se analizaron algunos materiales de referencia certificados (aguas naturales SRM-1640 NIST y aguas residuales IRMM-N3, *European Commission Institute for Reference Materials and Measurements*). Los límites de detección se calcularon mediante promedio y desviación estándar de diez blancos. El rango del límite de detección fue desde 0.33 mg/L para Cu hasta 181 mg/L para U. El error promedio de medición estuvo por debajo del 5%.

### 3.3. Análisis del fosfoyeso

Después de la extracción del agua de poro, las muestras sólidas se congelaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y luego se secaron al vacío con un liofilizador de mesa marca VirTis (Hucoa-Erlöss, España). De esta forma, se evita la oxidación de las especies reducidas durante la preparación de las muestras para su caracterización, la cual incluye el estudio de la movilidad de metales mediante extracción secuencial, el análisis de Fe reactivo y la determinación de las especies de azufre reducido. La extracción secuencial de las muestras de fosfoyeso se realizó a partir del procedimiento BCR descrito por Rauret et al. (1999), adicionando un cuarto paso con agua regia. Las soluciones extraídas de cada paso se analizaron por ICP-OES, como se describió anteriormente. Según el protocolo de extracción secuencial BCR (Tabla 3.1), los metales pueden especiarse en fracción soluble en agua (F1), fracción reducible (F2), fracción oxidable (F3), y fracción residual (F4). Para estas muestras, la suma de las cuatro fracciones es aproximadamente igual al contenido pseudo-total de cada elemento, ya que después del procedimiento de extracción secuencial no queda ningún residuo sólido sin digerir.

Tabla 3.1. Procedimiento de extracción secuencial BCR usado para la especiación.

| Pasos | Fracción  | Reactivos  | Procedimientos   |
|-------|-----------|--|--|
| F1    | Soluble   | 0.11M $\text{CH}_3\text{COOH}$   | 40 mL de $\text{CH}_3\text{COOH}$ + 1 g de muestra agitado durante 16 h  |
| F2    | Reducible | 0.5M $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$<br>(pH 2)                                   | 40 mL de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ + el residuo del paso 1 agitado durante 16 h  |
| F3    | Oxidable  | 8.8M $\text{H}_2\text{O}_2$ y 1M<br>$\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ (pH 2) | 10 mL de $\text{H}_2\text{O}_2$ + el residuo del paso 2 llevado a $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a casi sequedad + 50 mL de $\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ agitado durante 16 h |
| F4    | Residual  | Agua regia 3:1 (12M<br>$\text{HCl}$ :15.8M $\text{HNO}_3$ )                            | 10 mL de agua regia + el residuo del paso 3 (primero 20 h y luego 1 h a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ )  |

El Fe reactivo ( $\text{Fe}_R$ ) se determinó a través del método basado en la extracción de  $\text{Fe}^{3+}$  usando como agente extractante una sal ascórbica (Kostka y Lutero, 1994). Esta fracción de Fe se define como la cantidad de Fe en el sólido que fácilmente reacciona con el sulfuro disuelto para producir monosulfuros de hierro y eventualmente pirita. El  $\text{Fe}_R$  incluye el Fe presente en los monosulfuros de Fe y oxihidróxidos de Fe (Canfield, 1989). Por último, el azufre se especió en azufre ácido volátil (AVS, siglas en inglés de *acid-volatile sulphur*; que incluye monosulfuros amorfos de Fe ( $\text{FeS}$ ), mackinawita, greigita así como otros sulfuros solubles en  $\text{HCl}$ ), azufre pirítico (S-py, siglas en inglés de *pyritic sulphur*) y azufre elemental ( $\text{S}^0$ ) mediante una digestión secuencial de tres pasos, y sus concentraciones se determinaron según el método descrito por Duan et al. (1997). Fe-AVS hace referencia al Fe enlazado a monosulfuros y Fe-py al Fe enlazado a pirita, y sus valores se determinaron estequiométricamente a partir de los resultados del azufre inorgánico reducido.

El grado de piritización (DOP, siglas en inglés de *degree of pyritization*) y el grado de sulfidización (DOS, sigla en inglés de *degree of sulphidization*) son parámetros que pueden utilizarse para distinguir entre situaciones donde la formación de pirita y sulfuros de Fe está limitada por la cantidad de C o Fe (Raiswell y Berner, 1985), y para medir la efectividad de la reacción de Fe reactivo con sulfuro acuoso. DOP se define como:

$$\text{DOP} = 100(\text{py} - \text{Fe})/(\text{Fe}_R + \text{py} - \text{Fe}) \quad (3.2)$$

En las muestras que contienen cantidades significativas de monosulfuros de Fe, el parámetro DOP subestima la cantidad de Fe que ha reaccionado con H<sub>2</sub>S (Boesen y Postma, 1988). En cambio, el DOS representa el grado de transformación del Fe reactivo en sulfuros, por lo que proporciona una mejor indicación de condiciones limitadas por la cantidad de Fe. DOS se define como:

$$\text{DOS} = 100 (\text{AVS} - \text{Fe} + \text{py} - \text{Fe})/(\text{Fe}_R + \text{py} - \text{Fe}) \quad (3.3)$$

El valor de DOS incluye tanto el Fe reactivo como el Fe pirítico menos lábil. Además, es útil también determinar el grado de sulfidización reactiva de Fe asociado a la fase no-pirítica. Esto puede determinarse mediante el cálculo del grado de sulfidización reactiva o DORS (siglas en inglés de *degree of reactive sulphidization*; Burton et al., 2006)

$$\text{DORS} = 100 (\text{AVS} - \text{Fe}/\text{Fe}_R) \quad (3.4)$$

Las muestras de fosfoyesos se observaron también usando un microscopio electrónico de barrido equipado con un sistema de energía dispersiva (SEM-EDS; siglas en inglés de *Scanning Electron Microscopy-Energy Dispersive Spectrometry*; JEOL modelo JSM-5410). Para tal finalidad, las muestras secas se homogeneizaron y fueron esparcidas sobre una porción de cinta pre-tratada con una mezcla de carbono y pegamento y posteriormente recubiertas por una delgada capa de carbono usando la técnica de evaporación.

### 3.4. Modelización geoquímica

La química del agua de poro se interpretó con la ayuda del modelo geoquímico PHREEQC-2 (Parkhurst y Appelo, 2005) y usando la base de datos termodinámicos MINTeq (Allison et al., 1991). Los cálculos de especiación-solubilidad se llevaron a cabo, a partir de los datos analíticos, para determinar la especiación acuosa de las soluciones y los índices de saturación de los minerales que podrían controlar las concentraciones de especies disueltas en el agua de poro. El índice de saturación (IS) se define de acuerdo a:  $\text{IS} = \log (\text{IAP}/\text{K}_S)$ , donde IAP

(siglas en inglés de *Ionic Activity Product*) es el producto de la actividad de los iones y  $K_S$  es la constante de solubilidad. Valores de IS iguales a cero, negativos o positivos indican equilibrio, subsaturación y sobresaturación, respectivamente, entre la fase sólida y la solución.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Parámetros sensibles a las condiciones redox

Durante el muestreo, en la balsa de fosfoyeso hubo aparentemente una homogeneidad general y falta de diferenciación de horizontes con la profundidad. Sin embargo, las variaciones de los parámetros físico-químicos analizados en el agua de poro fueron significativas a lo largo del perfil. La variación en el pH con la profundidad fue muy pronunciada, incrementando desde 2 en el agua de poro de las muestras más superficiales a valores circumneutrales de aprox. 6 en el contacto con la marisma salada (Fig. 3.2a). El encharcamiento de agua con la profundidad fue evidente, sugiriendo la ausencia de drenaje dentro del perfil y condiciones restringidas de oxígeno en las zonas más profundas de la balsa con aguas estancadas o de bajo flujo. De hecho, los valores de Eh en las soluciones de agua de poro disminuyeron de 400 a 30 mV con la profundidad (Fig. 3.2b). Esta disminución podría estar asociada con el consumo del oxígeno disuelto en el agua de poro de las muestras más profundas, causado por la descomposición de la concentración generalmente elevada de materia orgánica existente en los sedimentos de marisma (Vega et al., 2009). Además, el fosfoyeso también contiene un cierto porcentaje de materia orgánica heredada de la roca fosfatada (1.5-5%; según Singh et al., 1995). Por tanto, las balsas de fosfoyeso podrían dividirse en dos zonas bien definidas desde el punto de vista hidrológico: (a) una zona superficial no saturada con condiciones de meteorización ácida y oxidante, y (b) una zona más profunda saturada con condiciones neutras y reductoras.

Las condiciones de oxidación-reducción a lo largo de las balsas de fosfoyeso deben influir en los procesos geoquímicos que se produzcan y, por tanto, en las concentraciones del elemento predominante, es decir, el azufre, cuya especiación es fuertemente dependiente de las condiciones redox del medio. La variabilidad de las especies de azufre en el sólido depende de los diferentes factores limitantes, tales como la concentración de  $S^{2-}$  disuelto en el agua de poro, la fracción de hierro reactivo, y la disponibilidad de  $S^0$  y C orgánico potencialmente biodegradable (Henneke et al., 1997). En este estudio, no hay datos disponibles de carbono orgánico; sin embargo, los parámetros restantes pueden ser indicativos de si la materia orgánica puede limitar la distribución de especies de azufre reducido (véase la Sección 5). Las concentraciones de  $Fe^{2+}$  en el agua de poro fueron elevadas a lo largo de todo el perfil. La relación  $Fe^{2+}/Fe_{Total}$  aumenta con la profundidad desde 0.6 en muestras superficiales a 1 en

muestras cercanas al suelo de marisma (Fig. 3.3). En cambio, las concentraciones  $\Sigma S^{2-}_{(aq)}$  en el agua de poro fue baja y sólo se detectó en las muestras más profundas (alrededor de 5 mg/L). La concentración de Fe reactivo fuertemente incrementó a lo largo de los perfiles desde 52 a 4408 mg/kg para el sondeo #1, desde 13 a 4297 mg/kg para el sondeo #2, y desde 10 a 7868 mg/kg para el sondeo #3 (Tabla 3.2).

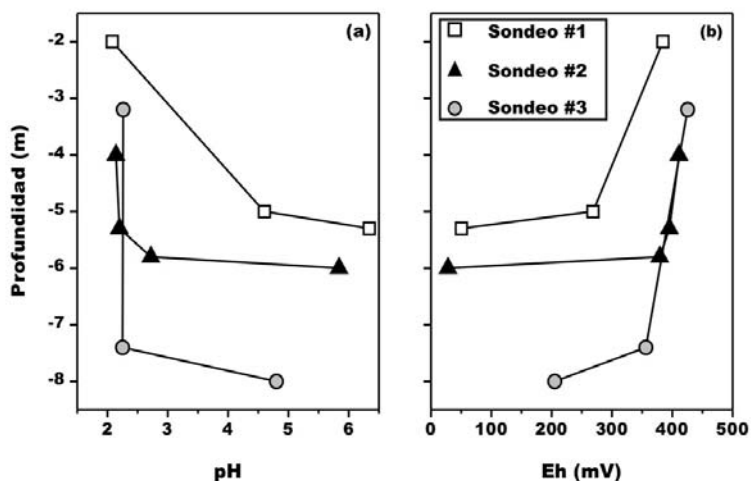


Figura 3.2. Evolución con la profundidad del (a) pH y (b) potencial redox en las soluciones de agua de poro de las muestras de fosfoyeso.

La partición de especies de azufre (AVS,  $S^0$ , S-py) en las muestras de fosfoyeso se muestra en la Tabla 3.2. Los monosulfuros de hierro son los minerales de sulfuro de Fe iniciales formados bajo condiciones reductoras, y con frecuencia son precursores necesarios para la rápida formación de pirita (Berner, 1970; Rickard, 1975). La concentración de AVS fue inexistente en los fosfoyesos superficiales, incrementándose a lo largo de los tres perfiles hasta 768, 960 y 320 mg/kg en los sondeos #1, 2 y 3, respectivamente (Tabla 3.2). El  $S^0$  fue menos abundante que el AVS, excepto en el sondeo #3. Estas concentraciones de  $S^0$  superiores a AVS son indicativas de oxidación de azufre inorgánico reducido (Troelsen y Jørgensen, 1982), lo cual es consistente con los valores ligeramente más altos de potencial redox a lo largo de este tercer perfil (Fig. 3.2b). El S-py fue el compuesto de azufre reducido más abundante a lo largo de los perfiles, aumentando con la profundidad desde valores no detectables en los fosfoyesos superficiales hasta valores de 1568, 2432 y 2528 mg/kg para los sondeos #1, #2 y #3, respectivamente (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Resultados obtenidos de la especiación de azufre reducido (AVS: azufre ácido volátil, S-py: azufre piritico y S<sup>0</sup>: azufre elemental) y algunos parámetros químicos (Fe<sub>R</sub>: Fe reactivo, DOP: grado de piritización, DOS: grado de sulfidización, DORS: grado de sulfidización reactiva y ME: metales extraídos) de las muestras examinadas de fosfoyeso.

|                                 | P1    | P2    | P3   | P4    | P5   | P6   | P7   | P8    | P9   | P10  |
|---------------------------------|-------|-------|------|-------|------|------|------|-------|------|------|
| <b>AVS (mg/kg)</b>              | <l.d. | <l.d. | 768  | <l.d. | 544  | 278  | 960  | <l.d. | 202  | 320  |
| <b>S<sup>0</sup> (mg/kg)</b>    | <l.d. | <l.d. | 205  | <l.d. | 384  | 186  | 352  | 320   | 704  | 736  |
| <b>S-py (mg/kg)</b>             | <l.d. | 352   | 1568 | <l.d. | 1568 | 928  | 2432 | <l.d. | 864  | 2528 |
| <b>Fe<sub>R</sub> (mg/kg)</b>   | 52    | 485   | 4408 | 13    | 55   | 173  | 4297 | 10    | 61   | 7868 |
| <b>Fe-AVS (mg/kg)</b>           | 0     | 0     | 781  | 0     | 536  | 279  | 949  | 0     | 201  | 318  |
| <b>Fe-py (mg/kg)</b>            | <l.d. | 352   | 1562 | <l.d. | 1562 | 949  | 2455 | <l.d. | 837  | 2511 |
| <b>DOP (%)</b>                  | 0.00  | 42    | 26   | 0.00  | 97   | 85   | 36   | 0.00  | 94   | 24   |
| <b>DOS (%)</b>                  | 0.00  | 42    | 40   | 0.00  | >100 | >100 | 51   | 0.00  | >100 | 27   |
| <b>DORS (%)</b>                 | 0.00  | 0.00  | 18   | 0.00  | >100 | >100 | 23   | 0.00  | >100 | 4.1  |
| <b>AVS/S-py</b>                 | -     | -     | 0.50 | -     | 0.34 | 0.30 | 0.40 | -     | 0.24 | 0.13 |
| <b>ME (mg/kg)</b>               | 62    | 307   | 576  | 19    | 11   | 31   | 230  | 11    | 42   | 634  |
| <b>[ME/AVS]<sub>molar</sub></b> | -     | -     | 0.28 | -     | 0.01 | 0.05 | 0.12 | -     | 0.10 | 0.91 |

<l.d.: por debajo del límite de detección

## 4.2. Agua de poro y concentraciones totales

A fin de facilitar la descripción de los resultados, las muestras de las tres perforaciones se describen en una escala de profundidad relativa de acuerdo a su proximidad al suelo de la marisma. Las concentraciones de S<sub>T</sub>, Fe y Mn en las soluciones de agua de poro mostraron una tendencia no específica con la profundidad, con poca diferencia entre las muestras más superficiales y las más profundas (Fig. 3.3). Sin embargo, las concentraciones de P y los metales restantes en solución decrecieron drásticamente con el aumento de la profundidad a lo largo de los perfiles (Fig. 3.3), con variaciones desde 2237 (P1) a 583 (P10) mg/L para P, 81 a 3.8 mg/L para Zn, 33 a 9.7 mg/L para As, 7.5 a 0.09 mg/L para Cr, 2.8 a 0.14 mg/L para Cd, 2.3 a 0.38 mg/L para Pb, 1.9 a 0.14 mg/L para Ni, 1.8 mg/L a valores por debajo del límite de detección para U, 1.7 a 0.54 mg/L para Al y 0.67 a 0.05 mg/L para Cu. Es preciso indicar que las concentraciones de algunos de estos elementos (Al, As, Cu, P y U) fueron ligeramente superiores en la muestra de 3.20 m que en la muestra de 2 m de profundidad; sin embargo, la tendencia posterior fue también a descender hasta llegar a la base de la marisma salada.

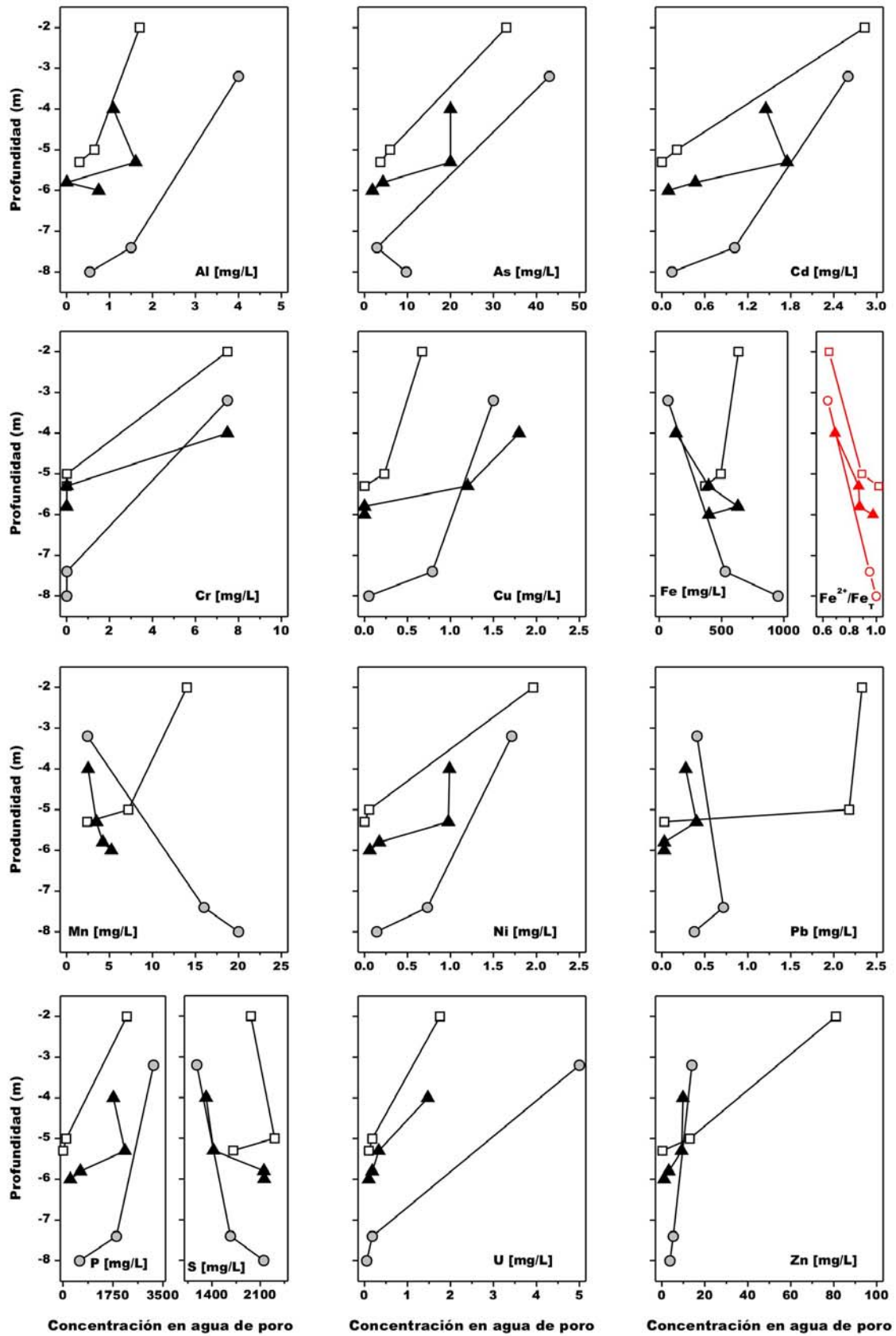


Figura 3.3. Evolución con la profundidad de las concentraciones de Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, S, U y Zn en las soluciones de agua de poro de las muestras de fosfoyeso.

Las concentraciones pseudo-totales de elementos en las muestras sólidas de fosfoyeso no fueron uniformes a lo largo de los perfiles, a excepción del S (promedio de 22 wt% de SO<sub>3</sub>) y Ca (promedio de 17 wt% de CaO) (Tabla 3.3). Tanto el S como el Ca dominan la composición de todas las muestras de fosfoyeso, ya que el residuo contiene más del 80% de yeso (Berish, 1990). Las concentraciones pseudo-totales de Al, As, Cu, Fe, Mn, Pb y P fueron mucho menores en los fosfoyesos superficiales que en los profundos (Tabla 3.3). Esta tendencia fue claramente opuesta a la observada en el agua de poro para Al, As, Cu, Pb, y P. Para el resto de metales, es decir, Cd, Cr, Ni, Zn y U, las concentraciones pseudo-totales oscilaron sin una tendencia específica, aunque también mostraron con frecuencia valores más altos en las zonas profundas de la balsa.

Tabla 3.3. Análisis del contenido pseudo-total de elementos en las muestras de fosfoyeso.

| Muestras   | CONTENIDO DE METALES PSEUDO-TOTALES (mg/kg) |              |  |       |     |      |     |     |       |      |     |       |      |      |
|------------|---|--------------|--|-------|-----|------|-----|-----|-------|------|-----|-------|------|------|
|            | SO <sub>3</sub><br>(wt%)                    | CaO<br>(wt%) | P <sub>2</sub> O <sub>5</sub><br>(wt%) | Al    | As  | Cd   | Cr  | Cu  | Fe    | Mn   | Ni  | Pb    | U    | Zn   |
| <b>P1</b>  | 19  | 15           | 0.80                                   | 873   | 19  | 0.95 | 94  | 21  | 529   | 4.8  | 6.0 | 11    | 4.5  | 193  |
| <b>P2</b>  | 25  | 20           | 0.92                                   | 579   | 75  | 1.8  | 6.4 | 426 | 25174 | 7.3  | 2.2 | 930   | 3.6  | 374  |
| <b>P3</b>  | 19  | 15           | 1.6                                    | 9459  | 398 | 2.6  | 52  | 325 | 41502 | 97   | 7.5 | 943   | n.d. | 1138 |
| <b>P4</b>  | 28  | 22           | 0.74                                   | 557   | 11  | 1.1  | 18  | 5.5 | 1238  | 0.17 | 1.8 | 3.1   | 3.0  | 149  |
| <b>P5</b>  | 22  | 17           | 0.57                                   | 180   | 6.0 | 0.77 | 1.6 | 2.0 | 74    | 0.44 | 2.7 | <l.d. | n.d. | 90   |
| <b>P6</b>  | 21  | 16           | 0.51                                   | 843   | 4.6 | 0.63 | 29  | 7.5 | 445   | 1.7  | 2.8 | 2.9   | n.d. | 251  |
| <b>P7</b>  | 18  | 16           | 0.79                                   | 11603 | 24  | 0.87 | 158 | 105 | 6088  | 39   | 17  | 27    | 16   | 264  |
| <b>P8</b>  | 26  | 20           | 0.77                                   | 881   | 18  | 1.9  | 21  | 26  | 305   | 1.1  | 17  | 6.6   | n.d. | 7987 |
| <b>P9</b>  | 26  | 19           | 0.65                                   | 359   | 3.4 | 0.64 | 2.5 | 2.9 | 111   | 2.2  | 1.3 | 0.92  | n.d. | 64   |
| <b>P10</b> | 15  | 13           | 5.0                                    | 15446 | 579 | 3.0  | 32  | 194 | 64261 | 285  | 4.9 | 436   | 10   | 2428 |

<l.d.: por debajo del límite de detección; n.d.: no detectado

Es crucial calcular el porcentaje de elementos disueltos en el agua de poro con respecto a las concentraciones pseudo-totales para establecer comparaciones entre muestras. Así, las concentraciones de elementos en el agua de poro se transformaron en base al peso multiplicando por la humedad de las muestras y dividiendo por la densidad del fosfoyeso. A su vez, estos valores se dividieron por las concentraciones pseudo-totales en el sólido y se multiplicaron por 100 (Beesley et al., 2010). La humedad de los fosfoyesos solamente se midió en la muestra más superficial (aprox. 30wt%) y en aquella que se encontraba en contacto con la marisma (aprox. 65wt%) mediante el secado de las muestras hasta alcanzar un peso estable. La densidad media



de los fosfoyesos es alrededor de 1 kg/L (Dueñas et al., 2007). De acuerdo con esto, las muestras de la zona no saturada oxidante mostraron mayor proporción de metales solubles en el agua de poro que las muestras de la zona saturada reducida; a pesar de tener más bajas concentraciones pseudo-totales de la mayoría de los metales. Esta notable disminución se produjo en todos los metales, incluyendo aquellos que no mostraron esta tendencia en su concentración absoluta en el agua de poro como Fe y Mn. Los porcentajes de metales disueltos en el agua de poro con respecto a los contenidos pseudo-totales en la muestra de 2 m de profundidad son alrededor de 94, 93, 54, 38, 13, 12, 10, 6.8, 2.5, 1.0 y 0.06% para Cd, Mn, As, Fe, Zn, U, Ni, Pb, Cr, Cu, Zn y Al, respectivamente. Sin embargo, los fosfoyesos en contacto con las marismas mostraron porcentajes de 5.2, 3.5, 2.4, 2.0 y 0.8% para Mn, Cd, As, Fe y Ni, y valores despreciables para el resto de los metales.

### **4.3. Movilidad de metales en el fosfoyeso**

El contenido de metales extraídos para todas las muestras de fosfoyesos en cada etapa de la extracción secuencial se muestra en la Tabla 3.4. Los valores porcentuales extraídos de estos elementos con respecto a la suma de las 4 fracciones para el promedio de las muestras de la zona no saturada superficial y de la zona saturada profunda se muestran en la Fig. 3.4a y 3.4b, respectivamente. La suma de las tres primeras fracciones (F1 + F2 + F3) corresponde a los metales extraídos en las fases móviles de los fosfoyesos. La fracción 1 (fácilmente soluble) se refiere a los metales asociados con sales evaporíticas fosfatadas y sulfatadas; la fracción 2 (reducible) a los metales enlazados a óxidos de Fe y Mn que podrían liberarse si las condiciones cambian de ambiente óxico a anóxico; y la fracción 3 (oxidable) a los metales enlazados a sulfuros y materia orgánica que podrían liberarse en condiciones oxidantes (Pérez-López et al., 2010). La fracción 4 (residual) se compone de metales no-móviles que están fuertemente asociados con las estructuras cristalinas de los minerales y por tanto es poco probable que se liberen de la muestra a menos que estén expuestos a condiciones extremas de meteorización.

En la zona superficial de las balsas de fosfoyeso, las concentraciones medias de metales en términos de su abundancia relativa en la fracción móvil aconteció en el siguiente orden: Cd (90%) > Cu (86%) > Al = As (82%) > Ni (81%) > Zn (79%) > Pb (77%) > Mn (74%) > Cr (68%) > Fe (52%); mientras que en la zona saturada más profunda, los porcentajes de metales de la fracción móvil fueron los siguientes: Zn (90%) > Cd (89%) > Cu (75%) > Ni (72%) > Mn (68%) > As (63%) > Cr (62%) > Pb (56%) > Fe (44%) > Al (39%) (Fig. 3.4). Estos resultados demostraron una vez más el elevado contenido relativo de metales móviles bajo condiciones ácidas oxidantes con respecto a las condiciones reductoras. Esta disminución relativa es aún más

significativa si se considera que el contenido pseudo-total absoluto de la mayoría de los metales aumenta notablemente con la profundidad, como se mencionó anteriormente. La disminución de la movilidad de los metales con la profundidad fue debido principalmente a un descenso en el porcentaje de metales asociados a la fracción soluble en agua, con tasas de disminución de hasta un 39%, 19%, 18%, 17%, 14%, 11% y 10 % de Mn, Cu, Ni, Pb, As, Cd y Al, respectivamente, y menores proporciones de los metales restantes. Esto es razonable porque las sales sulfatadas y fosfatadas, solubles en el primer paso de la extracción secuencial, precipitan principalmente por evaporación en las zonas superficiales no saturadas de la balsa durante períodos cálidos (Pérez-López et al., 2010), y su presencia disminuye en profundidad. Estos resultados podrían considerarse beneficiosos ya que la fracción fácilmente soluble tiene el enlace más débil al residuo sólido y, por tanto, es la más peligrosa y biodisponible para el medio ambiente.

El porcentaje de metales enlazado a las fracciones reducibles y oxidables no muestra un comportamiento común de disminuir o aumentar con la profundidad (Tabla 3.4 y Fig. 3.4). Por el contrario, se podría esperar al menos un aumento con la profundidad de la fracción oxidable asociada con los sulfuros metálicos que precipitan probablemente en condiciones reductoras, de acuerdo con los datos de especies reducidas de azufre en el sólido. Si bien, la fracción oxidable o tercer paso del procedimiento BCR extrae conjuntamente los metales enlazados a los sulfuros y a la materia orgánica. De hecho, elevadas concentraciones de materia orgánica residual de la roca fosfatada todavía están presentes en las balsas de fosfoyeso y pueden ser capaces de adsorber y/o formar complejos metálicos (Rutherford et al., 1994). Los metales enlazados a la materia orgánica por complejación o adsorción pueden extraerse en la fracción oxidable y enmascarar a aquellos metales enlazados a sulfuros.

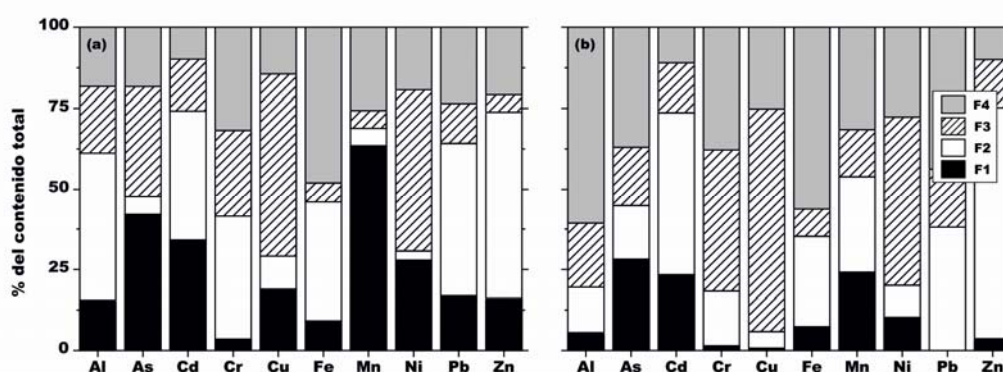


Figura 3.4. Porcentaje de Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn extraído en cada paso del procedimiento de extracción secuencial para el promedio de las muestras de (a) la zona superficial no saturada (P1, P2, P4, P5, P6, P8 y P9) y (b) la zona saturada más profunda (P3, P7 y P10). Nota: el uranio estuvo por debajo del límite de detección del ICP-OES para todos los extractantes.

Tabla 3.4. Resultados obtenidos mediante la extracción secuencial BCR de las muestras de fosfoyesos: F1 (fracción fácilmente soluble), F2 (fracción reducible), F3 (fracción oxidable) y F4 (fracción residual).

| Muestras   | Pasos     | METALES (mg/kg) |       |       |      |       |       |       |       |       |       |      |
|------------|-----------|-----------------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
|            |           | Al              | As    | Cd    | Cr   | Cu    | Fe    | Mn    | Ni    | Pb    | U     | Zn   |
| <b>P1</b>  | <b>F1</b> | 48              | 13    | 0.95  | 23   | 7.5   | 20    | 4.5   | 2.0   | <l.d. | n.d.  | 22   |
|            | <b>F2</b> | 283             | 1.4   | <l.d. | 22   | 2.2   | 262   | <l.d. | 0.57  | 6.0   | <l.d. | 159  |
|            | <b>F3</b> | 123             | 3.2   | <l.d. | 32   | 10    | 98    | <l.d. | 3.5   | 3.1   | n.d.  | 9.8  |
|            | <b>F4</b> | 420             | 2.2   | n.d.  | 17   | 0.5   | 149   | 0.23  | <l.d. | 1.7   | 4.5   | 1.9  |
| <b>P2</b>  | <b>F1</b> | 109             | 3.7   | 0.24  | n.d. | 155   | 50    | 2.4   | 0.13  | 14    | n.d.  | 29   |
|            | <b>F2</b> | 284             | 17    | 0.36  | 1.3  | 47    | 708   | 0.33  | <l.d. | 669   | n.d.  | 158  |
|            | <b>F3</b> | 79              | 5.2   | 0.21  | 1.5  | 127   | 36    | 0.17  | 0.69  | 139   | n.d.  | 33   |
|            | <b>F4</b> | 107             | 50    | 1.0   | 3.6  | 96    | 24381 | 4.3   | 1.4   | 108   | 3.6   | 153  |
| <b>P3</b>  | <b>F1</b> | 1319            | 99    | <l.d. | n.d. | n.d.  | 5012  | 28    | 0.75  | 0     | n.d.  | 19   |
|            | <b>F2</b> | 1847            | 94    | 1.2   | 5.7  | 11    | 9685  | 37    | 0.75  | 415   | n.d.  | 754  |
|            | <b>F3</b> | 1507            | 23    | 0.80  | 26   | 181   | 612   | 9.5   | 3.2   | 205   | n.d.  | 137  |
|            | <b>F4</b> | 4786            | 182   | 0.68  | 20   | 133   | 26192 | 22    | 2.8   | 323   | n.d.  | 228  |
| <b>P4</b>  | <b>F1</b> | 63              | 3.6   | 0.39  | n.d. | 0.87  | 5.5   | <l.d. | 0.22  | n.d.  | n.d.  | 27   |
|            | <b>F2</b> | 125             | n.d.  | 0.35  | 1.2  | 0.70  | 18    | 0.04  | 0.00  | 0.91  | n.d.  | 110  |
|            | <b>F3</b> | 164             | 2.4   | 0.33  | 2.8  | 2.8   | 13    | n.d.  | 1.3   | n.d.  | n.d.  | 9.0  |
|            | <b>F4</b> | 205             | 5.4   | n.d.  | 14   | 1.1   | 1202  | 0.13  | 0.28  | 2.2   | 3.0   | 3.6  |
| <b>P5</b>  | <b>F1</b> | 76              | 3.4   | n.d.  | n.d. | n.d.  | 19    | 0.33  | 0.85  | n.d.  | n.d.  | 16   |
|            | <b>F2</b> | 104             | n.d.  | 0.58  | 0.81 | <l.d. | 18    | n.d.  | <l.d. | <l.d. | n.d.  | 68   |
|            | <b>F3</b> | n.d.            | 2.6   | 0.19  | 0.53 | 1.5   | 1.8   | 0.07  | 1.6   | n.d.  | n.d.  | 4.5  |
|            | <b>F4</b> | <l.d.           | <l.d. | n.d.  | 0.24 | 0.42  | 35    | 0.04  | 0.25  | n.d.  | n.d.  | 1.4  |
| <b>P6</b>  | <b>F1</b> | 43              | 1.8   | <l.d. | n.d. | n.d.  | 62    | 1.5   | <l.d. | <l.d. | n.d.  | 38   |
|            | <b>F2</b> | 513             | <l.d. | 0.63  | 16   | <l.d. | 251   | <l.d. | <l.d. | 1.7   | n.d.  | 202  |
|            | <b>F3</b> | 169             | 2.8   | <l.d. | 7.9  | 6.9   | 35    | 0.12  | 2.5   | <l.d. | n.d.  | 8.8  |
|            | <b>F4</b> | 119             | <l.d. | n.d.  | 4.8  | 0.59  | 97    | 0.17  | 0.35  | 1.3   | n.d.  | 2.3  |
| <b>P7</b>  | <b>F1</b> | 215             | 4.9   | 0.47  | 7.0  | 2.4   | 162   | 11    | 0.99  | n.d.  | n.d.  | 22   |
|            | <b>F2</b> | 1975            | 2.8   | 0.40  | 54   | 11    | 1896  | 7.0   | 1.2   | 16    | 6.6   | 187  |
|            | <b>F3</b> | 2617            | 8.9   | <l.d. | 74   | 82    | 1383  | 9.7   | 13    | 5.3   | 5.6   | 47   |
|            | <b>F4</b> | 6795            | 7.1   | n.d.  | 23   | 11    | 2647  | 12    | 1.6   | 6.1   | 4.3   | 8.1  |
| <b>P8</b>  | <b>F1</b> | 75              | 12    | 0.83  | n.d. | 7.9   | 8.5   | 0.64  | 5.9   | n.d.  | n.d.  | 36   |
|            | <b>F2</b> | 454             | 1.7   | 0.42  | 15   | 2.7   | 259   | 0.11  | 1.7   | 4.6   | n.d.  | 268  |
|            | <b>F3</b> | 326             | 4.1   | 0.42  | 5.5  | 13    | 38    | 0.15  | 6.9   | 2.0   | n.d.  | 10   |
|            | <b>F4</b> | 27              | 0.64  | 0.25  | n.d. | 2.7   | <l.d. | 0.22  | 2.5   | n.d.  | n.d.  | 7673 |
| <b>P9</b>  | <b>F1</b> | 64              | 1.1   | 0.30  | n.d. | 0.37  | 19    | 2.2   | 1.00  | 0.92  | n.d.  | 27   |
|            | <b>F2</b> | 163             | <l.d. | 0.20  | 0.85 | 0.78  | 42    | n.d.  | n.d.  | n.d.  | n.d.  | 30   |
|            | <b>F3</b> | 105             | 2.3   | 0.15  | 0.69 | 1.3   | <l.d. | n.d.  | n.d.  | <l.d. | n.d.  | 5.4  |
|            | <b>F4</b> | 27              | <l.d. | n.d.  | 0.96 | 0.44  | 50    | <l.d. | 0.27  | <l.d. | n.d.  | 2.1  |
| <b>P10</b> | <b>F1</b> | 129             | 226   | 0.47  | n.d. | n.d.  | 4732  | 47    | 0.72  | <l.d. | n.d.  | 29   |
|            | <b>F2</b> | 853             | 85    | 1.8   | 1.7  | 3.5   | 18759 | 94    | 0.60  | 53    | n.d.  | 1876 |
|            | <b>F3</b> | 3251            | 65    | 0.47  | 11   | 143   | 906   | 26    | 1.8   | 57    | n.d.  | 356  |
|            | <b>F4</b> | 11213           | 203   | 0.22  | 19   | 47    | 39864 | 118   | 1.7   | 326   | 10    | 167  |

<l.d.: por debajo del límite de detección; n.d.: no detectado

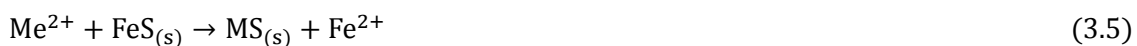
Por otra parte, algunos trabajos previos han demostrado que los sulfuros no son totalmente extraídos en el paso asociado con la fracción oxidable de la extracción secuencial BCR, y una parte podría ser digerida con la fracción residual (Förstner, 1985). Por tanto, el aumento sustancial en el porcentaje de metales asociados a la fracción no móvil de las muestras de la zona más profunda reducida con respecto a la zona no saturada superficial puede ser también un indicador de la precipitación de sulfuros metálicos.

## 5. DISCUSIÓN

Los cálculos de DOP (Ec. (2)), DOS (Ec. (3)) y DORS (Ec. (4)) a partir de los datos de especiación de azufre permiten examinar el estado redox de las balsas de fosfoyeso. Los valores de estos parámetros fueron cero en las muestras más superficiales de los tres sondeos. Posteriormente, el DOP aumentó hasta alcanzar valores superiores al 90% en zonas más profundas, aunque luego disminuyó a alrededor del 35% en el contacto con la marisma. Los valores de DOS fueron ligeramente más elevados pero siguieron la misma tendencia que el DOP. Estos valores de DOS generalmente altos indican que gran parte de la suma del Fe reactivo y pirítico se asocia a las fases de sulfuro, y los valores similares entre DOS y DOP indican que la mayoría del sulfuro es pirita. De acuerdo con estos parámetros, el principal factor limitante en la formación de pirita en el fosfoyeso parece ser la disponibilidad del Fe, y no la materia orgánica. Los valores de DORS también siguen la misma tendencia, aumentando de 0 a 18% en el sondeo #1 y de 0 a 100% en los sondeos #2 y #3 (Tabla 3.2). Los valores altos de DORS (> 100%) indican que todo el Fe reactivo estuvo presente como FeS (suponiendo que la fase sólida de AVS tiene una relación estequiométrica 1:1 Fe:S). En contraste, los valores bajos de DORS indican que todo el Fe reactivo no fue sulfidizado.

Basado en un análisis amplio de antiguas formaciones de pizarra, Raiswell et al. (1988) propuso que los sedimentos con DOP < 46% indican condiciones aerobias de aguas profundas; con DOP entre 46 y 75% implica condiciones disóxicas; y con DOP > 75% sugiere condiciones euxínicas. En consecuencia, la zona más superficial en las balsas de fosfoyeso presentaría condiciones aeróbicas, mientras que el resto presentaría condiciones restringidas de oxígeno, lo cual concuerda con lo observado en los parámetros físico-químicos del agua de poro. Los valores de DOP de las zonas profundas y saturadas de las balsas indican condiciones euxínicas, a excepción del fosfoyeso en contacto directo con la marisma que está en condiciones cercanas a las disóxicas (Tabla 3.2). Los valores de DOP de las zonas que se encuentran en contacto con la marisma son típicos de sedimentos marinos normales con muy bajas concentraciones de oxígeno eventualmente renovable por acción de las mareas (Raiswell et al., 1988).

La conversión de minerales de monosulfuro de Fe a pirita se apoya en la relación entre AVS y pirita, siendo  $\leq 0.5$  en todas las muestras y aumentando con la profundidad (Tabla 3.2). Además, Van der Berg et al. (1998) encontró que concentraciones de AVS incluso inferiores a 6  $\mu\text{mol/g}$  son lo suficientemente elevadas como para reaccionar con cantidades significativas de otros metales pesados distintos de hierro. Estos metales pueden reemplazar al Fe de los monosulfuros para formar sulfuros metálicos insolubles y, por tanto, dejarían de ser biodisponibles (Yu et al., 2001). Este proceso se basa en una reacción de intercambio:



Mientras que exista FeS, la concentración de metales en solución no aumentaría y los sedimentos no deberían ser tóxicos con respecto a estos metales (Cooper y Morse, 1998). Los sulfuros son la fase sólida predominante que controla la concentración de metales como As, Cd, Cu, Ni, Pb y Zn en sedimentos anóxicos (Simpson et al., 1998). A partir de los metales extraídos en el paso 3 de la extracción secuencial, asociados con compuestos orgánicos y sulfuros, se puede predecir la biodisponibilidad y toxicidad de los metales pesados en los sedimentos, asumiendo que estos metales están exclusivamente ligados a sulfuros. La relación molar de los metales extraídos en el paso 3 (ME, relacionado con As, Cd, Cu, Ni, Pb y Zn) con el AVS ha sido utilizado por varios autores (Allen et al., 1993; Clarisse et al., 2003). Un valor de relación molar inferior a 1 sugiere que hay un exceso de AVS y, por tanto, los metales no estarían disponibles. El ME calculado incrementa a lo largo de los tres perfiles desde 62 a 576 mg/kg en el sondeo #1, desde 19 a 230 mg/kg en el sondeo #2 y desde 11 a 634 mg/kg en el sondeo #3 (Tabla 3.2). La ausencia de AVS en el fosfoyeso más superficial de los tres perfiles y el elevado valor de ME sugieren una alta biodisponibilidad y toxicidad de metales. Sin embargo, las concentraciones de AVS en las zonas más profundas exceden el valor de ME correspondiente (relación molar  $< 1$ ), lo cual indica que la biodisponibilidad de estos elementos debe ser baja (Tabla 3.2). Dado que la reacción de piritización está limitada por el Fe, el exceso de AVS podría causar la precipitación potencial de sulfuros neoformados de otros metales distintos al Fe.

Los datos de DOP y la relación de ME/AVS como indicadores de la atenuación natural de la contaminación en las zonas más profundas de las balsas de fosfoyeso concuerdan con la disminución de la movilidad de los elementos traza en las aguas de poro y su modelización termodinámica, así como con la caracterización mineralógica de las muestras. De acuerdo con los cálculos de PHREEQC, las concentraciones de las especies acuosas en el agua de poro de las muestras de la zona no saturada no excedieron el valor de saturación de ninguna fase mineral, es decir, termodinámicamente no se produce la precipitación de fases neoformadas a partir de los lixiviados del fosfoyeso. En consecuencia, todos los contaminantes serían móviles en solución

bajo condiciones ácidas y oxidantes. Sin embargo, las bajas concentraciones de  $\Sigma S^{2-}_{(aq)}$  detectadas en el agua de poro de la zona saturada parecen indicar que las soluciones están al menos en equilibrio con sulfuros amorfos de acuerdo a los datos de solubilidad publicados a pH circumneutral por Morse et al. (1987). De hecho, los índices de saturación mostraron en las zonas profundas sobresaturación de algunos sulfuros metálicos comunes tales como pirita (IS  $\approx$  18), oropimente (IS  $\approx$  18), calcopirita (IS  $\approx$  16), NiS (IS  $\approx$  6), covellina (IS  $\approx$  6), esfalerita (IS  $\approx$  5), calcosina (IS  $\approx$  5), greenockita (IS  $\approx$  4), galena (IS  $\approx$  4), mackinawita (IS  $\approx$  1). Los análisis y observaciones con SEM-EDS revelaron la presencia de abundantes granos fambroidales de pirita (Fig. 3.5a, b). Además, también se encontraron otros sulfuros neoformados tales como sulfuros de cobre (Fig. 3.5c) y sulfuros de arsénico (Fig. 3.5d).

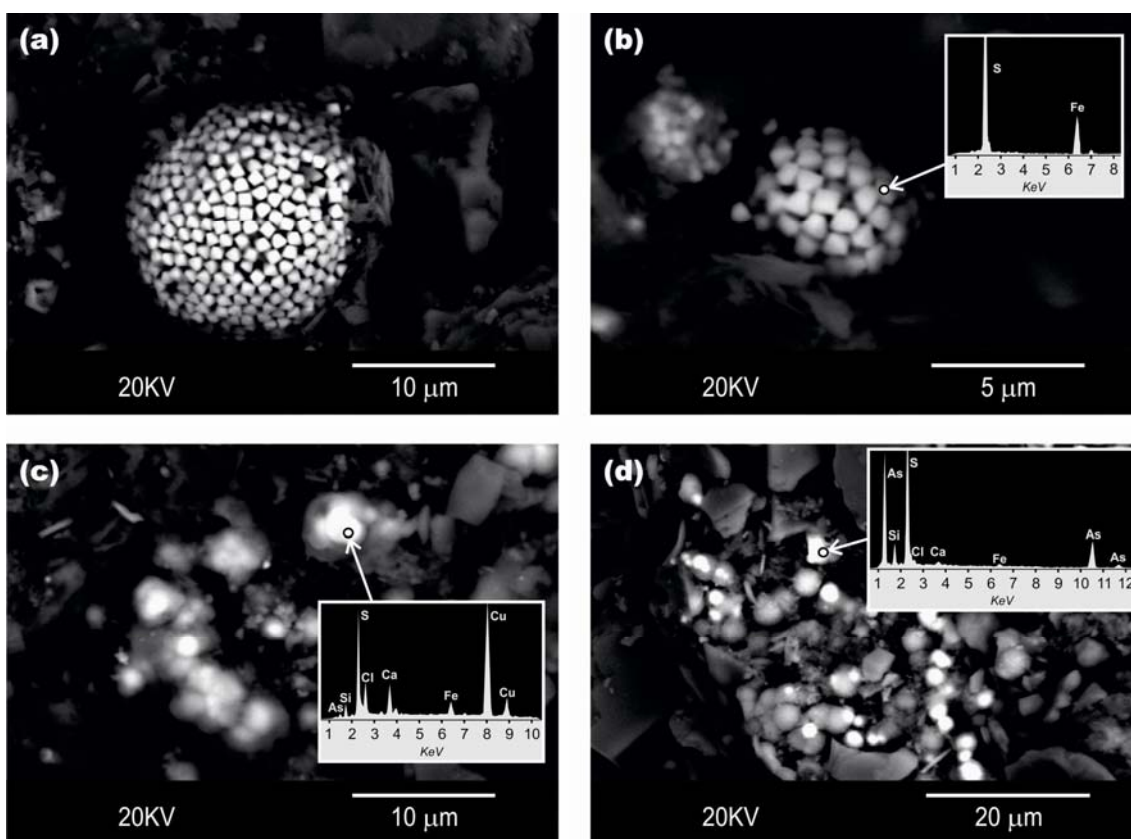


Figura 3.5. Imágenes de SEM y espectros de EDS de sulfuros metálicos neoformados [(a-b) pirita framboidal, (c) sulfuro de cobre y (d) sulfuro de arsénico] encontrados en las muestras de fosfoyeso localizadas en el contacto con la marisma.

Estos resultados demuestran el importante papel que juegan los precipitados de sulfuros metálicos en las zonas más profundas de la balsa de fosfoyeso para atenuar la contaminación de los lixiviados que percolan hacia la marisma. Las condiciones geoquímicas favorables para estos procesos naturales incluyen la disponibilidad de sulfato y hierro reactivo, así como ambientes reductores inducidos por el suelo de marisma con altos contenidos de carbono orgánico y microorganismos reductores. Aunque termodinámicamente es posible, como

demuestran los cálculos con PHREEQC, los procesos de reducción abiótica de sulfato y precipitación de sulfuros metálicos serían notablemente más lentos en condiciones ambientales sin catálisis bacteriana (Trudinger et al., 1985). En cambio, la actividad de bacterias sulfato-reductoras, típicas de las marismas, catalizan estos procesos naturales (Santana, 2008). Algunos consorcios de bacterias sulfato-reductoras también pueden eliminar eficazmente los radionucléidos asociados generalmente al fosfoyeso, tales como U (Spear et al., 2000) y Po (Larock et al., 1996), y reducir su concentración en solución bajo condiciones anóxicas. Sin embargo, estas bacterias pueden favorecer la liberación de otros radionucléidos tales como el radio (Landa, 2003).

## **6. CONCLUSIONES**

En Huelva (suroeste de España), las balsas de fosfoyeso derivadas de la fabricación de ácido fosfórico descansan sobre el suelo de las marismas saladas del río Tinto. Los resultados de este estudio indican que las marismas constituyen una barrera altamente eficaz para el movimiento de los contaminantes derivados del fosfoyeso hacia el agua subterránea y el medio ambiente circundante. A partir de la caracterización geoquímica de las muestras de agua de poro y las muestras sólidas de fosfoyeso a diferentes profundidades, los procesos de atenuación natural de la contaminación en las balsas han sido bien comprendidos. El encharcamiento y la presencia de altos contenidos de materia orgánica en el suelo de la marisma causan el agotamiento del oxígeno en las zonas más profundas de las balsas de fosfoyeso. Las concentraciones pseudo-totales de la mayoría de los contaminantes en las muestras de fosfoyeso aumentan con la profundidad, sin embargo, los contenidos disueltos en el agua de poro disminuyen hasta alcanzar el contacto con la marisma. Los mecanismos involucrados en la inmovilización de los contaminantes incluyen la reducción de sulfato a sulfuro probablemente por la acción de bacterias sulfato-reductoras y la precipitación de sulfuros metálicos insolubles. Si bien, no podemos ignorar que algunas zonas de la balsa no son totalmente estancas y parte del agua que se infiltra puede fluir lateralmente sin alcanzar la marisma y, por tanto sin atenuar la contaminación, hasta descargarse directamente al estuario.

# CAPÍTULO

# 4

---

## EVALUACIÓN DE SUSTRATOS ORGÁNICOS PARA MEJORAR LA ACTIVIDAD SULFATO-REDUCTORA EN EL FOSFOYESO

---

**Basado en:**

**J. Castillo, R. Pérez-López, A.M. Sarmiento, J.M. Nieto, 2012. Evaluation of organic substrates to enhance the sulfate-reducing activity in phosphogypsum. *Science of the Total Environment*, 439:106-113.**





# ***Evaluation of organic substrates to enhance the sulfate-reducing activity in phosphogypsum***

## ***Abstract***

---

*Several experiments were conducted to evaluate the activity and growth of sulfate-reducing bacteria (SRB) in a metal-rich culture medium (approx. 250 mg/L Fe, 75 mg/L Zn and Cu, 10 mg/L Cd) with phosphogypsum as bacterial inoculum. Phosphogypsum was collected from the stack covering the salt-marshes of the Tinto river (SW Spain). Three organic amendments were used as carbon sources, two low-cost wastes (horse manure and legume compost) and one sample of natural soil (vegetal cover). In the experiments, sulfate was reduced to sulfide during the growth of SRB populations, and concentrations were decreased in the solution. Metal concentrations also decreased to values below the detection limit. Metal removal took place by precipitation of newly-formed sulfides. Pyrite-S was the main sulfide component (approx. 200  $\mu\text{mol/g}$  and 80% of pyritization) and occurred mainly as framboidal grains and rarely as isolated polyhedral crystals. Horse manure was the most successful organic substrate to promote SRB activity (sulfate removal of 61%), followed by vegetal cover (49%) and legume compost (31%). These findings propose the possibility of using naturally-occurring SRB in the phosphogypsum for bioremediation strategies based on natural soil covers with organic amendments.*

---

*Keywords: Phosphogypsum, Metal pollution, Salt-marshes, Natural attenuation, Sulphate reduction.*



# CAPÍTULO 4

## EVALUACIÓN DE SUSTRATOS ORGÁNICOS PARA MEJORAR LA ACTIVIDAD SULFATO-REDUCTORA EN EL FOSFOYESO

---

|                   |   |
|-------------------|---|
| <b>CONTENIDO:</b> | <b>1. INTRODUCCIÓN</b>                                    |
|                   | <b>2. METODOLOGÍA</b>                                     |
|                   | 2.1. Muestreo del fosfoyeso                               |
|                   | 2.2. Sustratos orgánicos                                  |
|                   | 2.3. Diseño experimental                                  |
|                   | 2.4. Metodología de análisis                              |
|                   | 2.5. Modelización geoquímica                              |
|                   | <b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>                          |
|                   | 3.1. Caracterización química de los materiales de partida |
|                   | 3.2. Evolución de los experimentos <i>batch</i>           |
|                   | 3.2.1. <i>pH</i> y <i>Eh</i>                              |
|                   | 3.2.2. <i>Sulfato-reducción y eliminación de metales</i>  |
|                   | 3.2.3. <i>Cuantificación de BSR</i>                       |
|                   | 3.3. Productos sólidos de reacción                        |
|                   | <b>4. CONCLUSIONES</b>                                    |
|                   | <b>5. REFERENCIAS</b>                                     |

---

**RESUMEN:** Se realizaron varios experimentos para evaluar la actividad y el crecimiento de bacterias sulfato-reductoras (BSR) en un medio de cultivo rico en metales (aprox. 250 mg/L de Fe, 75 mg/L de Zn y Cu, 10 mg/L de Cd) con fosfoyeso como inóculo bacteriano. El fosfoyeso se recogió de las balsas que cubren las marismas del río Tinto (SO de España). Tres enmiendas orgánicas se utilizaron como fuentes de carbono, dos residuos de bajo coste (estiércol de caballo y compost de

leguminosas) y una muestra de suelo natural (cubierta vegetal). En los experimentos, el sulfato se redujo a sulfuro durante el crecimiento de las poblaciones de BSR, disminuyendo las concentraciones en solución. Las concentraciones de metales también decrecieron a valores por debajo del límite de detección. La eliminación de metales tuvo lugar por precipitación de sulfuros neoformados. El azufre pirítico fue el principal componente de sulfuro (aprox. 200  $\mu\text{mol/g}$  y 80% de piritización) en los precipitados finales y se presentó principalmente como granos framboidales y a veces como cristales poliédricos aislados. El estiércol de caballo fue el sustrato orgánico con más éxito para promover la actividad de las BSR (con una tasa de eliminación de sulfatos de 61%), seguido por la cubierta vegetal (49%) y el compost de leguminosas (31%). Estos resultados proponen la posibilidad de utilizar las BSR autóctonas del fosfoyeso en estrategias de biorremediación basadas en cubiertas de suelo natural con enmiendas orgánicas.

**Palabras clave:** bacterias sulfato-reductoras (BSR), fosfoyesos, sustratos orgánicos, sulfato-reducción y eliminación de metales.

## 1. INTRODUCCIÓN

La roca fosfatada (principalmente fluorapatita,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ ) se utiliza para la fabricación de ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) en la industria de fertilizantes, y a menudo contiene altas concentraciones de impurezas metálicas tales como As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn, y radionucléidos de la serie de desintegración de U y Th (Rutherford et al., 1994). El proceso global implica el ataque químico por vía húmeda de la roca fosfatada con ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) y genera un subproducto conocido como fosfoyeso ( $\text{CaSO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ). El fosfoyeso hereda parte de los elementos potencialmente tóxicos del mineral fosfatado y, por tanto, sus potenciales efectos sobre el medio ambiente (Pérez-López et al., 2010; Silva et al., 2010; Oliveira et al., 2012a). Los esfuerzos para evaluar la capacidad del fosfoyeso como fuente de elementos tóxicos se centran en simular los procesos de meteorización mediante experimentos de lixiviación de laboratorio (Santos et al., 2006; Al-Hwaiti et al., 2010; Pérez-López et al., 2010). La presencia de estas impurezas en el fosfoyeso cuestiona fuertemente su reutilización y almacenamiento.

Las opciones de eliminación del fosfoyeso incluyen el vertido directo al mar, el relleno de minas a cielo abierto o el apilamiento en grandes áreas de depósito (Frazier et al., 1977; Komnitsas et al., 1999; Oliveira et al., 2012b). La práctica más extendida es la de apilar los fosfoyesos cerca de la planta industrial, la cual a menudo se sitúa en zonas costeras (Tayibi et al., 2009). Los estudios sobre la dinámica de los contaminantes en el fosfoyeso deberían considerar que las grandes balsas de vertido pueden exhibir diferentes gradientes químicos con la profundidad. Las zonas superficiales no saturadas probablemente muestran condiciones de meteorización ácidas y oxidantes; mientras que en las zonas saturadas profundas sería esperable la existencia de condiciones de meteorización neutras y anaeróbicas (Lottermoser, 2007). En zonas profundas, el agua estancada y no renovable cerca de la base de la balsa podría favorecer el desarrollo de comunidades de bacterias anaerobias. Estas bacterias generan condiciones reductoras por descomposición de la materia orgánica contenida en los suelos o sedimentos donde se apoyan las balsas (Pérez-López et al., 2011), junto con la materia orgánica residual procedente de la roca fosfatada original (Rutherford et al., 1994).

Los cambios de condiciones aeróbicas a anaeróbicas en el perfil de meteorización del fosfoyeso deben influir fuertemente en la movilidad de los contaminantes en las aguas subterráneas. Bajo condiciones anóxicas por estancamiento de agua, el sulfato acuoso del fosfoyeso podría reducirse a sulfuro por actividad de bacterias sulfato-reductoras (BSR), causando una retención sustancial de elementos traza por precipitación de sulfuros metálicos insolubles (Carbonell-Barrachina et al., 2002; Lottermoser, 2007; Pérez-López et al., 2011). Estos últimos autores recientemente mostraron la existencia de baja biodisponibilidad y toxicidad de contaminantes bajo condiciones restringidas de oxígeno en una balsa de fosfoyeso debido a la inmovilización bacteriana. Por tanto, el diseño de una estrategia de tratamiento basada en la posible actividad de BSR autóctonas en el fosfoyeso podría ser una alternativa viable para atenuar la liberación de contaminantes en el medio ambiente. Al final de la vida útil de cualquier balsa de fosfoyeso, la restauración incluye una cubierta de suelo natural y vegetación para reducir el impacto paisajístico y la erosión. La hipótesis de partida sería investigar el uso potencial de enmiendas orgánicas que, adicionadas a la cubierta de suelo natural, sirvan como fuente de carbono para promover el crecimiento de BSR en las balsas de fosfoyeso.

Bajo condiciones anaeróbicas, las BSR oxidan compuestos orgánicos simples tales como ácidos carboxílicos o alcoholes como fuentes de carbono y energía para reducir el sulfato a sulfuro (Widdel y Bak, 1992; White y Gadd, 1996). Clásicamente, las investigaciones sobre el crecimiento de BSR recomiendan el uso de lactato como fuente de carbono puro en experimentos *in vitro* (Postgate, 1984; Barnes, 1998; El Bayoumy et al., 1999). Sin embargo, no es económicamente viable el uso de lactato para un tratamiento de biorremediación a gran

escala. Por esta razón, numerosas investigaciones se han centrado en la búsqueda de residuos orgánicos de bajo coste para reemplazar al lactato como fuente de carbono, por ejemplo, melaza, bagazo, virutas de madera, estiércol animal, abono vegetal (Dvorak et al., 1992; Hammack et al., 1994; Christensen et al., 1996; Waybrant et al., 1998; Annachhatre y Suktrakoolvait, 2001; Costa y Duarte, 2005; Coetser et al., 2006; Cerqueira et al., 2011; Cerqueira et al., 2012). La selección de una fuente de carbono óptima para la biorremediación por actividad de BSR depende de la reactividad y degradabilidad del sustrato orgánico, así como de su disponibilidad en el área de restauración (Martins et al., 2009; Ribeiro et al., 2010).

En este estudio, se llevaron a cabo algunos experimentos de laboratorio con los objetivos de (1) demostrar la presencia de BSR en los fosfoyesos apilados sobre un suelo de marismas altamente contaminado y (2) promover el crecimiento y la actividad de BSR usando un sustrato orgánico de bajo coste para inmovilizar los elementos potencialmente tóxicos que son actualmente liberados de estos subproductos al medio ambiente.

## **2. METODOLOGÍA**

### **2.1. Muestreo del fosfoyeso**

Un conjunto de muestras se tomaron a diferentes profundidades a lo largo de un sondeo realizado en las balsas de fosfoyeso apiladas en las marismas del río Tinto (Huelva, Andalucía, SO de España). Esta balsa cubre unas 1200 hectáreas con aprox. 120 millones de toneladas de fosfoyeso (Pérez-López et al., 2010; Pérez-López et al., 2011). El vertido de fosfoyeso cesó en 1997, después de cuatro décadas de procesado en la industria de fertilizantes. Se restauraron cerca de 400 hectáreas en 1992 con la aplicación directa de una capa de suelo fértil sobre el sustrato de yeso y la posterior creación de una cubierta vegetal (Pérez-López et al., 2011). El sondeo, con una longitud de 8 m desde la superficie hasta la base de la marisma, se llevó a cabo en la zona no restaurada. Las muestras se transportaron inmediatamente al laboratorio y se almacenaron a temperatura ambiente en una caja de guantes purgada con N<sub>2</sub> para evitar la reacción con el oxígeno atmosférico. Cabe destacar que un estudio previo reveló evidencias de actividad sulfato-reductora a una profundidad de 7.4 m en este sondeo (Pérez-López et al., 2011). Basado en esta hipótesis, la idea de este estudio sería demostrar la presencia de comunidades de BSR utilizando una muestra representativa de fosfoyeso como inóculo natural, estimulando su crecimiento en soluciones altamente contaminadas con metales con diferentes sustratos orgánicos naturales.

## 2.2. Sustratos orgánicos

Tres sustratos orgánicos diferentes se utilizaron como fuentes potenciales de carbono en los experimentos de laboratorio: estiércol de caballo, compost de leguminosas y cubierta vegetal. El estiércol de caballo fue elegido debido a su disponibilidad inmediata y su bajo coste en el área de estudio. La comunidad de Andalucía tiene la mayor población de caballos en España, con alrededor de 228,000 animales registrados en 2010, aprox. 7000 kg de estiércol cada año por cada 500 kg de peso vivo (MARM, 2010). El compost de leguminosas se compone de dos géneros, *Leucaena sp.* y *Tagaste sp.*, y ambos son subproductos de bajo coste procedentes de la limpieza y compostaje de residuos agrícolas. La cubierta vegetal corresponde a una muestra del suelo fértil (con plantas de crecimiento espontáneo) que se aplicó en la zona restaurada de las balsas de fosfoyeso situadas en las marismas del río Tinto. Esta muestra servirá para comprobar si actualmente está actuando como una fuente de carbono que incentive la actividad de BSR.

Algunas sub-muestras representativas de los tres sustratos orgánicos se tomaron para analizar el contenido en lignina/celulosa usando el método de extracciones sucesivas descrito por Rahn et al. (1999), la fracción de sustancias fácilmente disponibles (SFD) según el método propuesto por Prasad et al. (1999), y el contenido de sólidos volátiles de acuerdo con los procedimientos descritos en el *Standars Methods* (APHA, 1992). La fracción biodegradable de los sustratos orgánicos se calculó a partir del contenido en lignina y sólidos volátiles mediante la expresión matemática propuesta por Chandler et al. (1980). La fracción de SFD se considera como la fracción orgánica que los microorganismos pueden utilizar fácilmente. Sin embargo, no todos los constituyentes presentes en la fracción de SFD pueden ser utilizados por las BSR, y por tanto, esta fracción debe tomarse solamente como un valor aproximado.

## 2.3. Diseño experimental

Se realizaron experimentos *batch* para evaluar el potencial de los sustratos orgánicos como fuente de carbono para el crecimiento de BSR utilizando fosfoyeso como inóculo natural. Estos experimentos se llevaron a cabo también para comprobar si las posibles poblaciones de BSR son capaces de tolerar y eliminar altas concentraciones de metales por precipitación como sulfuros insolubles. Los cultivos se realizaron en matraces de vidrio de 250 mL con 5 g de fosfoyeso como inóculo y 200 mL de medio de cultivo (MTM; Sani et al., 2001). El medio de cultivo, ligeramente modificado para este estudio, contenía 0.25 g/L de extracto de levadura, 1 g/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.06 g/L de  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 g/L de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 5 g/L de lactato de sodio (con 0.05% de sulfato) y 0.25 g/L de citrato de sodio. El pH del medio de



cultivo estuvo entre 6.5 y 7. La disolución final se burbujeó con nitrógeno durante 3-5 min y después se selló con 10 mL de parafina líquida estéril para evitar la difusión de oxígeno durante la ejecución del experimento.

Cinco ensayos *batch* se llevaron a cabo simultáneamente, cada uno con una fuente de carbono diferente en el medio de cultivo: (1) con 5 g/L de lactato de sodio como se ha descrito anteriormente para la composición del medio de cultivo MTM, (2) con 10 g de estiércol caballo reemplazando al lactato, (3) con 10 g de cubierta vegetal reemplazando al lactato, (4) con 10 g de compost de leguminosas reemplazando al lactato, y (5) sin ninguna fuente de carbono. El experimento con lactato corresponde a un control positivo donde se espera actividad sulfato-reductora, mientras que el experimento sin fuente de carbono corresponde a un control negativo. Todos los experimentos *batch* se realizaron por duplicado para comprobar la reproducibilidad, y estos duplicados confirmaron los resultados obtenidos con desviaciones estándar en el estado estacionario inferiores al 5%.

Las soluciones de agua de poro de las balsas de fosfoyeso presentan concentraciones de metales entre un rango de cientos a miles de mg/L de Fe, decenas a cientos de mg/L de Zn y concentraciones menores pero tóxicas (de decenas a cientos de  $\mu\text{g/L}$ ) de otros metales tales como As, Cu, Cr, Cd, Pb, Mn y Ni (Pérez-López et al., 2011). Con el fin de simular condiciones extremas, además de los metales contenidos en el fosfoyeso, cantidades adicionales de algunos de estos metales se añadieron al medio de cultivo en cada experimento. Para ello, se usaron algunas sales sulfatadas metálicas de grado analítico tales como  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y  $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  para dopar al medio de cultivo con concentraciones de Fe, Zn, Cu y Cd de aprox. 250, 75, 75 y 10 mg/L, respectivamente. Los experimentos se llevaron a cabo dentro de una caja de guantes purgada con  $\text{N}_2$  y se incubaron a temperatura ambiente durante 8 semanas.

#### **2.4. Metodología de análisis**

Los experimentos se monitorizaron mediante un muestreo en serie de 10 mL de solución del medio con una jeringa a intervalos de tiempo designados. Las soluciones se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min y se filtraron a través de un filtro de 0.2  $\mu\text{m}$ . Los valores de pH, potencial redox (Eh) y concentración de sulfato se midieron inmediatamente para evitar los efectos de disolución de  $\text{CO}_{2(\text{g})}$  y  $\text{O}_{2(\text{g})}$  en estos parámetros. El pH se midió usando un instrumento Crison y el Eh se midió usando un medidor Hanna con electrodos de Pt y Ag/AgCl (Crison). Las mediciones de Eh se corrigieron con respecto al electrodo estándar de hidrógeno. Las concentraciones de sulfato se analizaron mediante un espectrofotómetro Hach (modelo

DR/890 colorímetro) de acuerdo con el método turbidimétrico que se describe en el Manual de Procedimientos de Hach, método de análisis 8051. Posteriormente, las muestras filtradas se acidificaron a  $\text{pH} < 2$  con  $\text{HNO}_3$  (2%) Suprapur y se almacenaron a  $4\text{ }^\circ\text{C}$  hasta el análisis de Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, S (total), Se y Zn por espectroscopía óptica de emisión con fuente de plasma acoplado por inducción (ICP-OES, siglas en inglés de *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*) con un espectrómetro Jobin Yvon (modelo JY ULTIMA 2).

Soluciones estándares multielementales preparados a partir de patrones individuales certificados por SCP SCIENCE se utilizaron para la calibración del ICP-OES. Estas soluciones se analizaron al principio y al final de cada serie de análisis. También se analizaron algunas muestras de referencia de aguas naturales SRM-1640 NIST y aguas residuales IRMM-N3 (*European Commission Institute for Reference Materials and Measurements*). Los límites de detección se calcularon mediante promedio y desviación estándar de diez blancos. Los límites de detección para los elementos mayoritarios oscilan entre  $0.16\text{ mg/L}$  (Fe) y  $2.99\text{ mg/L}$  (S), y para elementos minoritarios entre  $0.14\text{ }\mu\text{g/L}$  (Mn) y  $13.2\text{ }\mu\text{g/L}$  (Pb). El error promedio de medida estuvo por debajo del 5%. Después de los experimentos, las muestras se congelaron inmediatamente y se secaron al vacío por liofilización utilizando un liofilizador de mesa marca VirTis (Hucoa-Erlöss, España) para determinar hierro reactivo y especies reducidas de azufre, y para examinar el sólido final mediante microscopio electrónico de barrido equipado con un sistema dispersivo de energía (SEM-EDS, siglas en inglés de *Scanning Electron Microscopy - Energy Dispersive Spectrometry*; JEOL modelo JSM-5410) (Oliveira et al., 2012b; Quispe et al., 2012). El proceso de liofilización puede ayudar a minimizar la posible oxidación de las especies reducidas. El Fe reactivo ( $\text{Fe}_R$ ) se determinó a través del método basado en la extracción de  $\text{Fe}^{3+}$  usando como agente extractante una sal ascórbica (Kostka y Luther, 1994). Esta fracción de hierro se define como la cantidad de Fe en el sólido que reacciona con facilidad con el sulfuro disuelto para producir monosulfuros de hierro y eventualmente pirita.  $\text{Fe}_R$  incluye Fe presente en monosulfuro de Fe y oxihidróxidos de Fe (Canfield, 1989). Por último, el azufre se especió en azufre ácido volátil (AVS, siglas en inglés de *acid-volatile sulphur*; que incluye monosulfuros amorfos de Fe ( $\text{FeS}$ ), mackinawita, greigita así como otros sulfuros solubles en HCl), azufre pirítico (S-py, siglas en inglés de *pyritic sulphur*) y azufre elemental ( $\text{S}^0$ ) mediante una digestión secuencial de tres pasos, y sus concentraciones se determinaron según el método descrito por Duan et al. (1997). El Fe enlazado tanto a monosulfuros (Fe-AVS) como a pirita (Fe-py) se determinó estequiométricamente a partir de los resultados de azufre inorgánico reducido.

Las poblaciones de BSR se enumeraron mediante la técnica del número más probable (NMP) al inicio, en medio y al final de los experimentos. Los ensayos se realizaron por

triplicado con diluciones en serie en un medio *Postgate E* (Postgate, 1984). Los tubos del NMP se incubaron a temperatura ambiente durante 5 días hasta la lectura de los resultados.

## 2.5. Modelización geoquímica

El modelo PHREEQC-2 de especiación geoquímica (Parkhurst y Appelo, 2005) junto con la base de datos termodinámicos MINTEQA2 (Allison et al., 1991) se utilizó para determinar, a partir de los datos químicos, la especiación acuosa de las soluciones y los índices de saturación (IS) de las fases sólidas que puedan controlar la concentración de las especies disueltas en los experimentos [ $IS = \log(IAP/K_S)$  donde IAP (siglas en inglés de *Ionic Activity Product*) es el producto de la actividad iónica y  $K_S$  es la constante de solubilidad]. Valores de IS igual a cero, negativos o positivos indican equilibrio, subsaturación y sobresaturación entre la fase sólida y la solución, respectivamente.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Caracterización química de los materiales de partida

La caracterización química de los sustratos orgánicos seleccionados se muestra en la Tabla 4.1. Los detalles completos de la química del fosfoyeso utilizado como inóculo se puede encontrar en el capítulo anterior (también en Pérez-López et al., 2011). Los contenidos de lignina y celulosa (w/w) de los sustratos orgánicos varían entre 12-21% y 21-50%, respectivamente. El estiércol de caballo mostró con diferencia el contenido más bajo de lignina/celulosa, y tanto la cubierta vegetal como el compost de leguminosas el más alto. El contenido de SFD osciló entre 35% para la cubierta vegetal y el compost de leguminosas, y 45% para el estiércol de caballo. Basado en la relación publicada por Chandler et al. (1980) entre lignina y sólidos volátiles, los sustratos orgánicos pueden ordenarse de acuerdo a su fracción biodegradable en el siguiente orden: estiércol de caballo (0.46) > cubierta vegetal (0.17) > compost de leguminosas (0.15).

Gilbert et al. (2004) correlacionó la composición química de sustratos orgánicos naturales (compost, estiércoles de ovejas y avícola y hojas de roble) y su capacidad para promover la sulfato-reducción y la eliminación de metales. Con el mismo protocolo de análisis, estos autores obtuvieron resultados en el mismo rango que los obtenidos en el presente estudio (Tabla 4.1), y observó que cuanto menor sea el contenido de lignina en el sustrato orgánico, mayor es su biodegradabilidad y capacidad para promover el desarrollo de la actividad

bacteriana. De acuerdo con las observaciones de Gilbert et al. (2004), entre los tres sustratos orgánicos, el estiércol de caballo mostró la mayor eficiencia para promover con éxito la actividad de BSR por sí mismo en los experimentos.

Tabla 4.1. Caracterización química de los sustratos orgánicos (L: lignina, C: celulosa, SFD: sustancias fácilmente disponibles, SV: sólidos volátiles, y FB: fracción biodegradable).

|   | L (%w/w) | C (%w/w) | SFD (%w/w) | SV (%w/w) | FB   |
|---|----------|----------|------------|-----------|------|
| <b>Estudio actual:</b>                      |          |          |            |           |      |
| <i>Estiércol de caballo</i>                 | 12       | 21       | 45         | 91        | 0.46 |
| <i>Cubierta vegetal</i>                     | 20       | 45       | 36         | 86        | 0.17 |
| <i>Compost de leguminosa</i>                | 21       | 50       | 35         | 86        | 0.15 |
| <b>Resultados de Gilbert et al. (2004):</b> |          |          |            |           |      |
| <i>Compost</i>                              | 15       | 37       | 34         | 59        | 0.10 |
| <i>Hojas de roble</i>                       | 15       | 34       | 26         | 93        | 0.37 |
| <i>Estiércol avícola</i>                    | 11       | 24       | 30         | 71        | 0.40 |
| <i>Estiércol de oveja</i>                   | 8.3      | 7.5      | 45         | 87        | 0.56 |

### 3.2. Evolución de los experimentos *batch*

La actividad metabólica de BSR provoca la oxidación simultánea de compuestos orgánicos simples, liberación de bicarbonato, y la reducción de sulfato a sulfuro en solución. La reacción es controlada por el par redox  $\text{SO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{S}$  y resulta en una disminución del Eh; mientras que la liberación de iones bicarbonato provoca un aumento del pH. En presencia de metales divalentes disueltos, el sulfuro de hidrógeno reacciona fácilmente con ellos para precipitar sulfuros metálicos insolubles. Estas reacciones reacondicionan el medio con el tiempo para estimular aún más el crecimiento de BSR (Cabrera et al., 2006; Figueroa, 2005). En los experimentos *batch*, tanto la existencia de las BSR como la eficacia de los procesos de eliminación de metales pueden ser evaluadas mediante la monitorización del pH, Eh, sulfato, metales y el recuento de bacterias en solución.

#### 3.2.1. pH y Eh

En el experimento de control negativo sin fuente de carbono, el pH se mantuvo alrededor de 4 y el Eh aumentó de 310 a 475 mV durante 8 semanas (Fig. 4.1), siendo valores no óptimos para la actividad de las BSR. Sin embargo, en los experimentos *batch* con fuente de carbono, después de 24 h, el pH de las soluciones aumentó de 5.5 a valores de alrededor de 8.0 al final, mientras que el Eh disminuyó gradualmente desde 300-200 mV a un valor promedio de

-200 mV (Fig. 4.1). Esta tendencia es independiente de la fuente de carbono utilizada y podría estar relacionada con el crecimiento y la actividad óptima de las BSR.

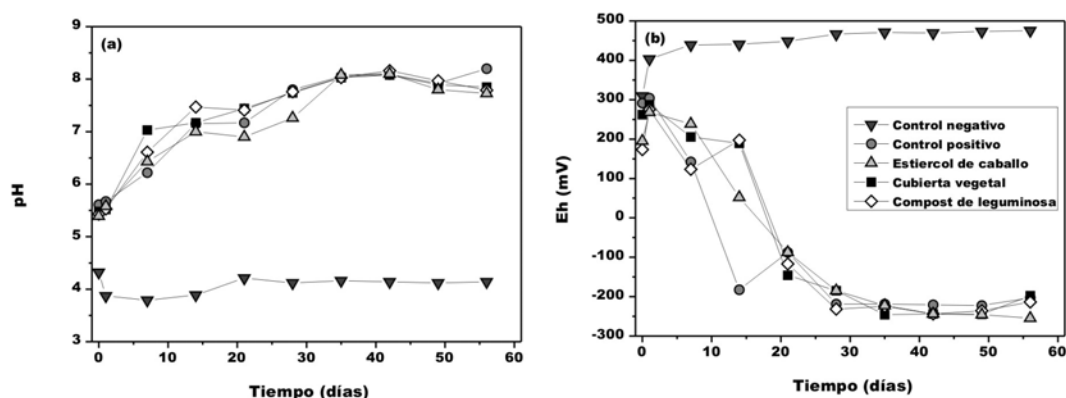


Figura 4.1. Evolución temporal de (a) pH y (b) Eh para el control negativo (sin fuente de carbono), control positivo (con lactato), estiércol de caballo, cubierta vegetal y compost de leguminosas durante los experimentos *batch*.

### 3.2.2. Sulfato-reducción y eliminación de metales

La concentración de sulfato en el experimento sin fuente de carbono aumentó rápidamente en la primera semana de 1500 a 3200 mg/L, y después permaneció casi constante (Fig. 4.2). De acuerdo con los cálculos de PHREEQC, esta tendencia se produce debido a una disolución inicial del yeso ( $IS < 0$ ) contenido en los residuos ( $> 80\%$ ; Berish, 1990) hasta que se alcanza el equilibrio entre la solución y el mineral ( $IS \approx 0$ ). Las variaciones de la concentración de sulfato junto con el pH y el Eh no respaldan la idea de la existencia de BSR ni de la precipitación de sulfuros metálicos en este experimento.

Por el contrario, el proceso de sulfato-reducción sí se produce claramente a un ritmo apreciable en los experimentos con fuente de carbono desde el principio. Las concentraciones de azufre total en solución disminuyeron, mostrando porcentajes finales de eliminación del 42%, 32%, 26% y 21% para los experimentos con lactato (control positivo), estiércol de caballo, compost de leguminosas y cubierta vegetal, respectivamente (Fig. 4.2a). De estos valores, sólo las concentraciones de sulfato decrecieron 61%, 59%, 49% y 31% para los experimentos con estiércol de caballo, lactato, cubierta vegetal y compost de leguminosas, respectivamente (Fig. 4.2b). Al comienzo de los experimentos, la concentración molar de azufre total es casi igual a la concentración molar de azufre como especie sulfato. Esto es evidente ya que tanto el medio de cultivo como el fosfoyeso sólo contienen sales sulfatadas y yeso. Durante los experimentos, la diferencia entre azufre total y especies sulfatadas aumenta, y se puede atribuir principalmente a la producción de iones sulfuro por el crecimiento y la actividad de las BSR.

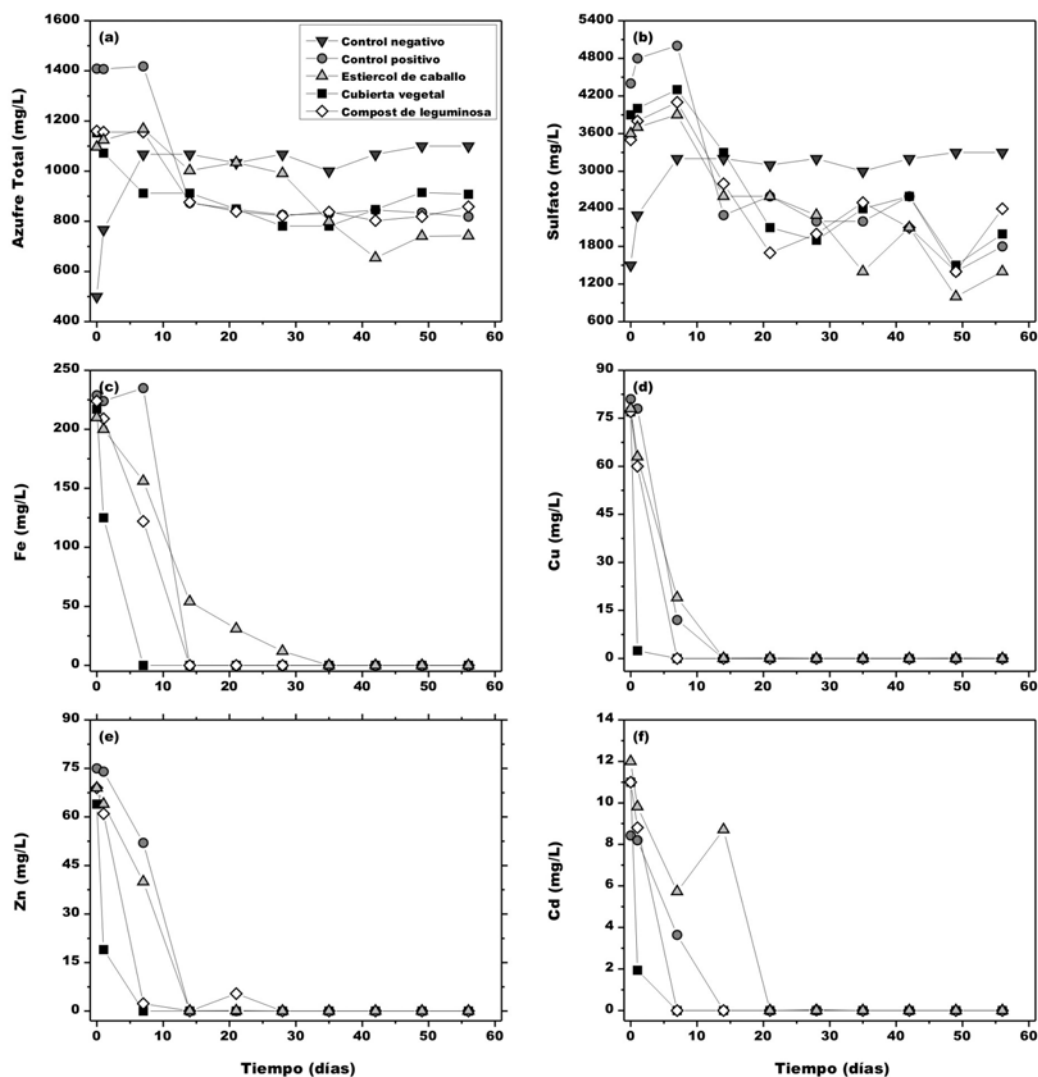


Figura 4.2. Evolución temporal de las concentraciones de (a) azufre total, (b) sulfatos, (c) hierro, (d) cobre, (e) zinc y (f) cadmio para el control negativo (sin fuente de carbono), control positivo (con lactato), estiércol de caballo, cubierta vegetal y compost de leguminosas durante los experimentos *batch*.

La disminución con el tiempo de la concentración de sulfato está asociada con la disminución en la concentración de los metales añadidos a los experimentos. Durante la primera semana para el experimento con cubierta vegetal, segunda semana para los experimentos con lactato y compost de leguminosas, y tercera semana para el experimento con estiércol de caballo, los porcentajes de eliminación de Fe, Cu, Zn y Cd en solución alcanzaron un 100%, es decir, las concentraciones disminuyeron de 220, 80, 70 y 10 mg/L a valores por debajo del límite de detección del ICP-OES, respectivamente (Figs. 4.2c-f). Otras impurezas minoritarias contenidas en el fosfoyeso, y no adicionadas al medio de cultivo, pueden liberarse durante los experimentos. Con respecto a la concentración máxima alcanzada en solución, los porcentajes de eliminación final de Pb, Mn, Ni, As y Cr fueron también altos, con valores promedio que

oscilaron entre 70% (As) y 100% (Pb) para todos los experimentos. Por tanto, parece ser que los metales están reaccionando con los iones sulfuro y precipitando como sulfuros metálicos neoformados.

La neoformación de sulfuros metálicos como un mecanismo para la eliminación de metales de las soluciones en los experimentos con fuente de carbono puede predecirse a partir de los cálculos termodinámicos. De acuerdo con la modelización geoquímica, las soluciones están subsaturadas con respecto a sulfuros metálicos comunes al inicio de los experimentos. Sin embargo, conforme los valores de Eh disminuyen y comienza la reducción de sulfato a sulfuro, las soluciones muestran sobresaturación para minerales como pirita (promedio de IS  $\approx$  13 en el estado estacionario para todos los experimentos), calcopirita (IS  $\approx$  9), greenockita (IS  $\approx$  2), esfalerita (IS  $\approx$  0.5), covellina (IS  $\approx$  0.2), y otros sulfuros de metales minoritarios como galena, NiS y oropimente. Es importante resaltar que la transformación abiótica de sulfato a sulfuro es termodinámicamente favorable pero cinéticamente muy lenta sin catálisis bacteriana bajo condiciones ambientales (Trudinger et al., 1985).

### ***3.2.3. Cuantificación de BSR***

En los experimentos de control negativo y positivo, las concentraciones de BSR al comienzo fueron aprox.  $1.9 \cdot 10^2$  y  $5.0 \cdot 10^2$  UFC/mL (unidades formadoras de colonia por mililitro), respectivamente, lo que demuestra la existencia de comunidades bacterianas de origen natural en las balsas de fosfoyeso. En el resto de experimentos, los sustratos orgánicos naturales también podrían contribuir adicionando BSR al medio. Como era de esperar, la falta de fuente de carbono y energía en el experimento de control negativo causa la muerte de las células bacterianas. De hecho, el conteo de BSR fue cero a mitad y al final del experimento. La variación de las concentraciones de sulfato y metales en los experimentos con los sustratos orgánicos mostraron sin embargo una tendencia inversa con respecto al crecimiento de la población de BSR, tal como se comprueba mediante el método del NMP. La concentración de BSR aumentó desde  $2.1 \cdot 10^2$  UFC/mL en el inicio a valores de  $2.5 \cdot 10^4$  UFC/mL en el medio y luego  $3.2 \cdot 10^4$  UFC/mL al final del experimento con estiércol de caballo. Para los experimentos con cubierta vegetal y compost de leguminosas, la población de BSR también aumentó desde  $9.0 \cdot 10^2$  y  $4.0 \cdot 10^2$  UFC/mL en el inicio hasta valores de  $1.6 \cdot 10^5$  y  $1.2 \cdot 10^5$  UFC/mL en el medio, pero luego disminuyó ligeramente a valores de  $2.4 \cdot 10^4$  y  $4.2 \cdot 10^3$  UFC/mL al final de los experimentos, respectivamente. El crecimiento de la población de BSR al menos en la primera mitad de los experimentos con fuente de carbono es simultáneo con la principal eliminación de sulfato y metales y, por tanto, es indicativo de sulfato-reducción bacteriana.

### 3.3. Productos sólidos de reacción

Las predicciones termodinámicas descritas anteriormente concuerdan con los resultados obtenidos en la extracción de especies de azufre reducido y el SEM-EDS de los productos sólidos de reacción. La especiación de azufre (AVS, S<sup>0</sup>, S-py) en los precipitados estudiados se presenta en la Tabla 4.2. Las concentraciones de AVS fueron elevadas en todos los experimentos (entre 72-100 μmol/g de peso seco). El contenido de S<sup>0</sup> fue ligeramente menor que el AVS (entre 36-66 μmol/g de peso seco), lo que sugiere que la precipitación de S<sup>0</sup> es también un proceso importante en las transformaciones reductivas (Rickard y Morse, 2005; Schoonen, 2004). El S-py fue de lejos el componente más abundante de las especies reducidas de S en los productos finales de la reacción (entre 180-233 μmol/g de peso seco), representando el 60% del total de azufre reducible para todos los experimentos. De hecho, se observaron mediante SEM-EDS abundantes granos de pirita (Fig. 4.3a, b). Este sulfuro aparece principalmente en forma de agregados de pirita framboidal (Fig. 4.3a), y en ocasiones como cristales poliédricos aislados (Fig. 4.3b). En particular, los cristales aislados exhiben formas que resultan de la combinación de hábitos octaédricos y piritóédricos, lo cual indica una cristalización de alta energía en condiciones ricas en azufre (Barnard y Russo, 2009). Según la evolución observada en el control negativo, no se esperan especies de azufre reducido en este experimento. De hecho, no se observaron precipitados de sulfuros neoformados con el SEM-EDS en esta muestra.

Por definición, Fe<sub>R</sub> es la suma de Fe en monosulfuros (es decir, Fe-AVS) y otras fases tales como oxihidróxidos. En los experimentos, Fe<sub>R</sub> mostró concentraciones que oscilan entre 29 y 33 μmol/g de peso seco (Tabla 4.2). Según cálculos estequiométricos, las concentraciones de Fe-AVS están dentro del mismo orden de magnitud que el Fe<sub>R</sub>, con valores que oscilan entre 41 y 58 μmol/g de peso seco. Asumiendo las diferencias en los métodos analíticos, se puede admitir que el contenido total de Fe<sub>R</sub> listo para formar pirita está asociado con especies de azufre reducido. Esto confirma que los procesos de sulfato-reducción y precipitación de sulfuros promueven el agotamiento del hierro de las soluciones, descartando otros procesos como la oxidación del hierro y la precipitación de oxihidróxidos.

El grado de piritización (DOP, sigla en inglés de *degree of pyritization*) y el grado de sulfidización (DOS, sigla en inglés de *degree of sulphidization*) son parámetros que pueden utilizarse para distinguir entre situaciones donde la formación de pirita y sulfuros de Fe en general está limitada por C o Fe (Raiswell y Berner, 1985) y para medir la efectividad de la reacción de Fe reactivo con el sulfuro acuoso. DOP se define como:



$$\text{DOP} = 100 (\text{py} - \text{Fe}) / (\text{Fe}_R + \text{py} - \text{Fe}) \quad (4.1)$$

En las muestras que contienen cantidades significativas de monosulfuros de Fe, el parámetro DOP subestima la cantidad de Fe que ha reaccionado con H<sub>2</sub>S (Boesen y Postma, 1988). En cambio, el DOS representa el grado de transformación del Fe reactivo en sulfuros, por lo que proporciona una mejor indicación de las condiciones limitadas por la cantidad de Fe. DOS se define como:

$$\text{DOS} = 100 (\text{AVS} - \text{Fe} + \text{py} - \text{Fe}) / (\text{Fe}_R + \text{py} - \text{Fe}) \quad (4.2)$$

En los experimentos, los valores de DOS fueron ligeramente mayores que los valores de DOP (rangos de 106-116% y 75-82%, respectivamente). Los valores de DOP superiores a 40% son indicativos de sedimentos euxínicos (Morse y Emeis, 1990). Estos resultados indican que el Fe<sub>R</sub> no limita la formación de sulfuros de Fe y la conversión de FeS a piritita no está inhibida (Gagnon et al., 1995).

Tabla 4.2. Resultados obtenidos de la especiación de azufre reducido (AVS: azufre ácido volátil), S-py: Azufre pirítico, y S<sup>0</sup>: azufre elemental y algunos parámetros químicos (Fe<sub>R</sub>: Fe reactivo, DOP: grado de piritización, DOS: grado de sulfidización y MS: metales ligado a sulfuros) de los productos de la reacción después del experimento *batch*.

|                           | Lactato | Estiércol de caballo | Cubierta vegetal | Compost de leguminosa |
|---------------------------|---------|----------------------|------------------|-----------------------|
| S <sup>0</sup> (μmol/g)   | 66      | 56                   | 56               | 36                    |
| AVS (μmol/g)              | 89      | 101                  | 90               | 72                    |
| S-py (μmol/g)             | 233     | 201                  | 192              | 180                   |
| Fe <sub>R</sub> (μmol/g)  | 29      | 33                   | 33               | 33                    |
| Fe-AVS (μmol/g)           | 51      | 58                   | 52               | 41                    |
| Fe-py (μmol/g)            | 133     | 115                  | 110              | 103                   |
| DOP (%)                   | 82      | 78                   | 77               | 76                    |
| DOS (%)                   | 114     | 116                  | 113              | 106                   |
| MS (μmol/g)               | 220     | 82                   | 82               | 85                    |
| [MS/AVS] <sub>molar</sub> | 2.48    | 0.82                 | 0.91             | 1.18                  |

Debido a la alta capacidad de fijación de elementos traza, los sulfuros se pueden considerar como la principal fase sólida que controla la concentración de contaminantes en sedimentos anóxicos (Simpson et al., 1998). Concentraciones de AVS incluso inferiores a 6 μmol/g son suficientemente grandes como para inmovilizar cantidades significativas de metales pesados (van den Berg et al., 1998). Estos metales pueden sustituir al Fe de los monosulfuros para formar sulfuros metálicos insolubles, reduciendo así su biodisponibilidad (Yu et al., 2001). Mientras que haya presencia de FeS, la concentración de metales no debe aumentar en solución y los productos sólidos de reacción no deben ser tóxicos con respecto a estos metales (Cooper y Morse, 1998). Asumiendo que todos los metales que se añadieron al medio en forma de sales de

sulfato precipitan en forma de sulfuros minerales en los experimentos, se puede predecir la biodisponibilidad y la toxicidad de los sólidos finales. De hecho, la relación molar entre metales ligados a sulfuros (MS), relativo a Fe, Cu, Zn y Cd, y AVS se usa frecuentemente para obtener información sobre los efectos tóxicos de estos metales en sedimentos anóxicos (Clarisse et al., 2003; Otero y Macías, 2002). Un valor de relación molar menor que uno indica que hay un exceso de AVS y los metales no están disponibles.

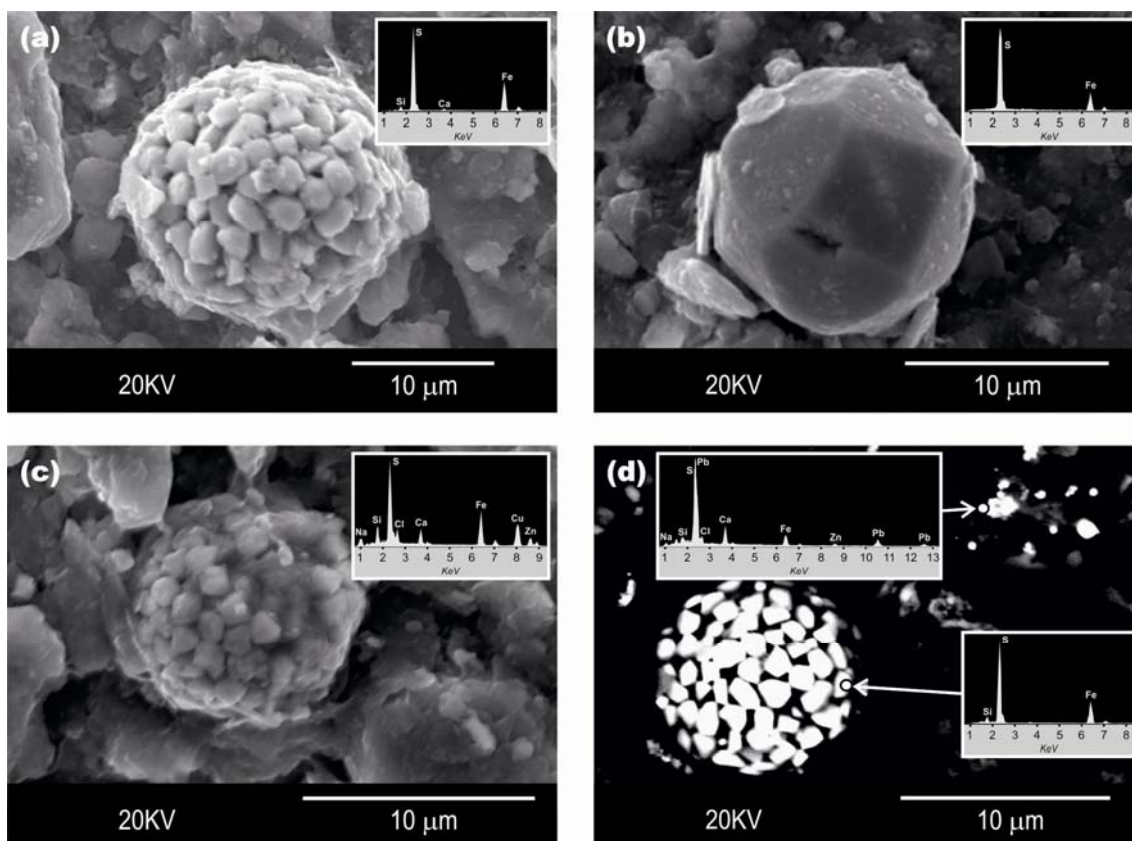


Figura 4.3. Imágenes de SEM de sulfuros neoformados [(a) pirita framboidal, (b) pirita poliédrica aislada, (c) calcopirita framboidal y (d) galena y pirita framboidal] encontrados en los productos de reacción después de los experimentos.

La relación MS/AVS en el experimento con el lactato excede en gran medida de la unidad (aprox. 2.5, Tabla 4.2), lo que indica que los metales están potencialmente disponibles. Por el contrario, las relaciones MS/AVS en los experimentos con sustrato orgánico natural son alrededor de 1, incluso inferiores en los experimentos con cubierta vegetal (aprox. 0.9) y estiércol de caballo (aprox. 0.8) (Tabla 4.2). Como las concentraciones molares de AVS exceden el MS correspondiente (relación molar  $< 1$ ), la biodisponibilidad de estos contaminantes en los productos sólidos de los experimentos con sustrato orgánico debe ser baja. Además de pirita, el exceso de AVS podría causar la precipitación de sulfuros neoformados con otros metales distintos de Fe (Pérez-López et al., 2011). De hecho, también se encontraron

sulfuros de Cu y Fe framboidal (Fig. 4.3c) y sulfuros de Pb (Fig. 4.3d) con SEM-EDS, los cuales probablemente corresponden a calcopirita y galena neoformadas, respectivamente. Ambas fases contienen también cantidades menores de Zn de acuerdo con los espectros de EDS. Las texturas de tipo framboidal en calcopirita se podrían interpretar como un reemplazamiento de pirita framboidal previa. Por otro lado, algunos autores sugieren que los procesos de adsorción de metales en pirita y monosulfuros de Fe metaestables también podrían desempeñar un papel importante en el control de su movilidad y toxicidad (Huerta-Díaz y Morse, 1992; Morse, 1994; Silva et al., 2011a, b).

#### **4. CONCLUSIONES**

La balsa de fosfoyeso situada en las marismas del río Tinto contiene BSR de forma natural que podrían contribuir a la inmovilización de los contaminantes mediante la reducción de sulfato a sulfuro y la precipitación de sulfuros metálicos insolubles en condiciones anóxicas. Esto confirmaría la evidencia de actividad sulfato-reductora previamente encontrada en las zonas profundas (Pérez-López et al., 2011). Además, estos resultados apoyan la posibilidad de un tratamiento de biorremediación para la balsa basado en la actividad de estos microorganismos. Así, la adición de una cubierta de suelo con una enmienda orgánica sobre las balsas de fosfoyesos contribuiría a: (1) expandir las condiciones reductoras por consumo de oxígeno a zonas más superficiales, (2) proporcionar carbono que fomentara el crecimiento de BSR, y (3) atenuar la contaminación procedente de la lixiviación del residuo.

Los sustratos orgánicos utilizados en este estudio actuaron como una fuente de carbono disponible para fomentar el crecimiento y la actividad de las BSR en el fosfoyeso, con resultados similares a los de un experimento control positivo con lactato. En todos los experimentos se produjo una completa eliminación de metales de la solución (hasta el 100%). Sin embargo, el estiércol de caballo fue el mejor donante de electrones (tasa de eliminación de sulfato del 61%), seguido por la cubierta vegetal (49%) y el compost de leguminosas (31%), como se esperaba de la caracterización química de los sustratos orgánicos. El experimento con estiércol de caballo también mostró un mayor crecimiento bacteriano y una gran concentración de especies de azufre reducido, así como una menor toxicidad de los productos sólidos de reacción.

El suelo fértil que actualmente cubre la zona regenerada de la balsa de fosfoyeso también parece promover la actividad de las BSR por sí mismo. Así, en una futura ampliación del tratamiento de biorremediación, el estiércol de caballo como enmienda orgánica en estas cubiertas de suelo natural podría aumentar los efectos de inmovilización de contaminantes.

Además, el uso de estiércol de caballo sería especialmente atractivo por dos razones, bajo coste y altas tasas de producción cercanas a las balsas de fosfoyeso, lo que abarataría el transporte. Esta tecnología de tratamiento, que podría ser extrapolada a otras balsas de fosfoyeso del mundo, ayudaría a mitigar la liberación de contaminantes a suelos y sistemas acuáticos circundantes.

# CAPÍTULO 5

## CONCLUSIONES GENERALES

El Estuario de la Ría de Huelva (SO España) está fuertemente antropizado, principalmente, por las actividades mineras abandonadas de la Faja Pirítica Ibérica (FPI) y, en segundo lugar, por el depósito del fosfoyeso procedente de la producción de ácido fosfórico en el Polo Químico de Huelva sobre marismas estuarinas. El principal propósito de esta **Tesis Doctoral** es analizar mediante experimentos de laboratorio y estudios de campo la eficacia de las bacterias sulfato-reductoras (BSR) para tolerar medios extremadamente contaminados y ejercer su actividad metabólica, la cual conduce a la inmovilización de metales. A este respecto, las principales conclusiones de este trabajo en orden de desarrollo se presentan a continuación.

El primer bloque de esta Tesis demuestra como la actividad de BSR puede ser una alternativa a considerar en el tratamiento de los drenajes ácidos de mina (AMD) de la FPI. Los resultados se publicaron en el artículo:

**Biologically-induced precipitation of sphalerite-wurtzite nanoparticles by sulfate-reducing bacteria: Implications for acid mine drainage treatment** (Science of the Total Environment 423 (2012) 176-184). Las conclusiones de este trabajo son:

- Las BSR están presentes en estado latente en los sedimentos de arroyos afectados por AMD de los entornos mineros abandonados de la FPI.
- Las bacterias fueron aisladas, toleraron e incluso crecieron favorablemente sometidas a concentraciones de sulfato y zinc de hasta 3000 y 260 mg/L, respectivamente.
- La actividad de sulfato-reducción bacteriana condujo a la eliminación total del Zn en solución. Hasta el momento, este resultado sería la primera confirmación de tolerancia y eliminación total de Zn por BSR a tan altas concentraciones.

- El mecanismo de inmovilización supuso la reducción de sulfato a sulfuro y la precipitación de Zn como partículas de ZnS, esfalerita y wurtzita. Debido a la baja cristalinidad, se necesitaron técnicas de radiación sincrotrón para su identificación.
- Los resultados fueron tan satisfactorios que concluyeron en una serie de recomendaciones para la optimización de un sistema de tratamiento pasivo mixto para el AMD de la FPI, basado en dos reactores: químico (calizo) y biológico (BSR).

El segundo bloque de esta Tesis demuestra la presencia de actividad natural de BSR en la balsa de fosfoyeso y como esta actividad puede aprovecharse para proponer futuras acciones de restauración de los terrenos afectados por este residuo. Los resultados se publicaron en dos artículos:

**Assessment of phosphogypsum impact on the salt-marshes of the Tinto river (SW Spain): Role of natural attenuation processes** (Marine Pollution Bulletin 62 (2011) 2787-2796). Las conclusiones de este trabajo son:

- Las zonas no saturadas más superficiales de la balsa (ácidas y oxidantes) presentan una mayor proporción de contaminantes solubles en el agua de poro que las zonas saturadas profundas próximas al basamento de marismas (neutras y reducidas).
- Existen indicios evidentes de BSR que están presentes de forma natural y en estado de actividad en las zonas más profundas, lo que conduce a procesos de sulfato-reducción e inmovilización de los contaminantes por precipitación de sulfuros neoformados.
- El mecanismo de inmovilización implica la precipitación principalmente de piritita. Si bien, la actividad es tan elevada que el exceso de azufre reducido conduce a la precipitación de sulfuros minoritarios con otros contaminantes tales como Cu y As.
- La intensa sulfidización al contacto con la marisma conduce a la existencia de una baja biodisponibilidad de elementos tóxicos y a la atenuación natural de la contaminación procedente de la lixiviación de la pila de fosfoyeso.

**Evaluation of organic substrates to enhance the sulfate-reducing activity in phosphogypsum** (Science of the Total Environment 439 (2012) 106-113). Las conclusiones de este trabajo son:

- La presencia de BSR autóctonas del fosfoyeso se comprobó mediante su cultivo, y las comunidades se sometieron a elevadas concentraciones de metales (250 mg/L Fe, 75 mg/L Zn and Cu y 10 mg/L Cd).

- Las bacterias toleraron y crecieron satisfactoriamente usando como fuente alimenticia algunos sustratos orgánicos: estiércol de caballo, compost de leguminosas y la propia cubierta vegetal que existe en algunas zonas restauradas de la balsa.
- La actividad sulfato-reductora implicó de nuevo la precipitación de sulfuros neoformados y la existencia de una baja biodisponibilidad de elementos tóxicos en los productos sólidos finales.
- Estos resultados alientan la posibilidad de un tratamiento in situ de la balsa de fosfoyeso mediante el uso de una cubierta de suelo natural con enmiendas orgánicas como medida para fomentar la actividad sulfato-reductora y, por tanto, la inmovilización de contaminantes.
- En ese caso, el uso de estiércol de caballo como sustrato orgánico sería especialmente atractivo por dos motivos: bajo coste y elevadas tasas de producción en las proximidades de la zona a remediar, lo que abarataría los costes del transporte.

# CHAPTER 5

## GENERAL CONCLUSIONS

The Estuary of Huelva (SW Spain) is strongly anthropized, mainly, by the abandoned mining activities of the Iberian Pyrite Belt (IPB) and, secondly, by the deposit of phosphogypsum from phosphoric acid production in the Huelva Industrial State on the estuarine marshes. The main purpose of this **Ph. D. Thesis** is to analyze by means of laboratory experiments and field studies the effectiveness of sulfate-reducing bacteria (SRB) to tolerate extremely contaminated-media and exert their metabolic activity, which leads to the immobilization of metals. In this regard, the main conclusions of this work in order of development are presented below.

The first section of this Thesis shows that the SRB activity may be an alternative to consider in the treatment of acid mine drainage (AMD) of the IPB. The results were published in the following paper:

**Biologically-induced precipitation of sphalerite-wurtzite nanoparticles by sulfate-reducing bacteria: Implications for acid mine drainage treatment** (Science of the Total Environment 423 (2012) 176-184). The conclusions of this work are:

- SRB is present in a latent state in sediments of AMD-affected streams from IPB abandoned mine sites.
- SRB were satisfactory isolated from natural samples. Then, bacteria tolerated and even grew favorably under sulfate and zinc concentrations of up to 3000 and 260 mg/L, respectively.
- Bacterial sulfate-reduction activity led to the complete removal of Zn from the solution. So far, this result would be the first confirmation of tolerance and elimination of Zn by SRB at very high concentrations.



- The mechanism of immobilization involved the reduction of sulfate to sulfide, and the precipitation of Zn as particles of sphalerite and wurtzite. Because of the low crystallinity, synchrotron-based techniques were decisive for the mineralogical characterization.
- These encouraging results led to a series of recommendations for the optimization of a combined passive treatment system for AMD in the IPB, based on two reactors: chemical (limestone) and biological (SRB).

The second section of this Thesis shows the natural occurrence of SRB activity in the phosphogypsum stack and how this activity can be used to propose future actions for the restoration of the marshes affected by this by-product. The results were published in two papers:

**Assessment of phosphogypsum impact on the salt-marshes of the Tinto river (SW Spain): Role of natural attenuation processes** (Marine Pollution Bulletin 62 (2011) 2787-2796). The conclusions of this work are:

- The upper unsaturated zones of the stack (acidic and oxidizing conditions) have higher proportion of water-soluble contaminants in the pore-solutions than the deeper saturated zones near the basement of salt-marsh (neutral and reducing conditions).
- There are clear evidences of naturally occurring, active SRB in the deeper zones, leading to sulfate-reduction processes and immobilization of contaminants by precipitation of newly-formed sulfides.
- The mechanism of immobilization involves the precipitation of mainly pyrite. Albeit, the activity is so high that the excess of reduced sulfur leads to the precipitation of sulfides with other minor contaminants such as Cu and As.
- The intense sulfidization in the contact with the marsh leads to the existence of low bioavailability of toxic elements and to the natural attenuation of contamination from the leaching of overlapping phosphogypsums.

**Evaluation of organic substrates to enhance the sulfate-reducing activity in phosphogypsum** (Science of the Total Environment 439 (2012) 106-113). The conclusions of this work are:

- The presence of autochthonous SRB in the phosphogypsum was checked by cultivation, and communities were subjected to high concentrations of metals (250 mg/L Fe, 75 mg/L Zn and Cu, and 10 mg/L Cd).

- Bacteria tolerated and grew satisfactorily using some organic substrates as carbon and energy sources: horse manure and legume compost, as well as the vegetal cover already existing in some restored areas of the phosphogypsum piles.
- The sulfate-reducing activity again involved the precipitation of newly-formed sulfides and the existence of a low bioavailability of toxic elements in the final solid products.
- These results encourage the possibility of an in-situ treatment strategy for the phosphogypsum stack using natural soil covers with organic amendments as a measure to enhance the sulfate-reducing activity and, therefore, the immobilization of contaminants.
- In that case, the use of horse manure as organic substrate would be particularly attractive for two reasons: low cost and high production rates close to the phosphogypsum pile, which would cheapen transportation costs.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Hwaiti MS, Ranville JF, Ross PE. Bioavailability and mobility of trace metals in phosphogypsum from Aqaba and Eshidiya, Jordan. *Chem Erde-Geochem* 2010;70:283-91.
- Allen HE, Fu G, Deng B. Analysis of acid-volatile sulfide (AVS) and simultaneously extracted metals (SEM) for the estimation of potential toxicity in aquatic sediments. *Environ Toxicol Chem* 1993;12:1441–1453.
- Allison JD, Brown DS, Novo-Gradac KJ. MINTEQA2/PRODEFA2, A geochemical assessment model for environmental systems. Version 3.0 User's Manual, Environmental Research Laboratory, Office of Research and Development, US Environmental Protection Agency, EPA/600/3-911021, Athens, Georgia; 1991.
- Andrade ML, Reyzábal ML, Marcet P, Montero MJ. Industrial impact on marsh soils at the Bahia Blanca Ria, Argentina. *J Environ Qual* 2002;31:532-8.
- Andrade ML, Covelo EF, Vega FA, Marcet P. Effect of the prestige oil spill on salt marsh soils on the coast of Galicia (North western Spain). *J Environ Qual* 2004;33:2103-2110.
- Annachatre AP, Suktrakoolvait S. Biological sulphate reducing using molasses as a carbon source. *Water Environ Res* 2001;73:118-26.
- APHA-AWWA-WEF. Standard Methods for the Examination of Waste and Wastewater, 18th Edition. American Public Health Association, Washington, DC; 1992. Barnard AS, Russo

SP. Modelling nanoscale FeS<sub>2</sub> formation in sulfur rich conditions. *J Mater Chem* 2009;19:3389-94.

Azabou S, Mechichi T, Sayadi S. Zinc precipitation by heavy-metal tolerant sulfate-reducing bacteria enriched on phosphogypsum as a sulfate source. *Miner Eng* 2007;20:173-8.

Banks D, Younger PL, Arnesen RT, Iversen ER, Banks SB. Mine-water chemistry: the good, the bad and the ugly. *Environ Geol* 1997;32:157-74.

Barnes LJ. Removal of heavy metals and sulphate from contaminated groundwater using sulphate-reducing bacteria: development of a commercial process. In: Sikdar SK, Irvine RL, editors. *Bioremediation Technologies*, vol. 3. Lancaster, USA: Technomic Publishing Company; 1998.

Barton LL, Fauque GD. *Biochemistry physiology and biotechnology of sulfate-reducing bacteria*. 1st ed. San Diego: Elsevier; 2009. p. 41-98.

Beesley L, Moreno-Jiménez E, Clemente R, Lepp N, Dickinson N. Mobility of arsenic, cadmium and zinc in a multi-element contaminated soil profile assessed by in-situ soil pore water sampling, column leaching and sequential extraction. *Environ Pollut* 2010;158:155–160.

Berish CW. Potential environmental hazards of phosphogypsum storage in central Florida. In: *Proc 3rd InternatSymp Phosphogypsum*, vol. 2. Orlando, USA: FIPR; 1990. p. 1-29.

Berner RA. Sedimentary pyrite formation. *Am J Sci* 1970;268:1–23.

Bigham JM, Schwertmann U, Traina SJ, Winland RL, Wolf M. Schwertmannite and the chemical modeling of iron in acid sulfate waters. *Geochim Cosmochim Ac* 1996;60:2111-21.

- Bigham JM, Nordstrom DK. Iron and aluminium hydroxysulfates from acid sulfate waters. In: Alpers CN, Jambor JL, Nordstrom DK, editors. Sulfate Minerals: crystallography, geochemistry and environmental significance. *Rev Mineral Geochem* 2000;40:351-403.
- Bilek F, Wagner S. Long term performance of an AMD treatment bioreactor using chemolithoautotrophic sulfate reduction and ferrous iron precipitation under in situ groundwater conditions. *Bioresour Technol* 2012;104:221-7.
- Blowes DW, Ptacek CJ, Jambor JL. In-Situ remediation of chromate contaminated groundwater using permeable reactive walls. *Environ Sci Technol* 1997;31:3348-57.
- Boesen C, Postma D. Pyrite formation in anoxic sediments of the Baltic. *Am J Sci* 1988;288:575-603.
- Bolívar JP, García-Tenorio R, García-León M. Fluxes and distribution of natural radionuclides in the production and use of fertilizers. *Appl Radiat Isot* 1995;46:717-718.
- Bolívar JP, García-Tenorio R, García-León M. Radioactive impact of some phosphogypsum piles in soils and salt marshes evaluated by gamma-ray spectrometry. *Appl Radiat Isot* 1996;47:1069-75.
- Bolívar JP, García-Tenorio R, Más JL, Vaca F. Radioactive impact in sediments from an estuarine system affected by industrial waste releases. *Environ Int* 2002;27:639-45.
- Bolívar JP, Martín JE, García-Tenorio R, Pérez-Moreno JP, Más JL. Behaviour and fluxes of natural radionuclides in the production process of a phosphoric acid plant. *Appl Radiat Isotopes* 2009;67:345-56.
- Burton ED, Bush RT, Sullivan LA. Fractionation and extractability of sulfur, iron and elements in sulfidic sediments. *Chemosphere* 2006;64:1421-1428.
- Cabrera G, Pérez R, Gómez JM, Ábalos A, Cantero D. Toxic effects of dissolved heavy metals on *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio* sp. strains. *J Hazard Mater* 2006;135:40-6.

- Canfield DE. Reactive iron in marine sediments. *Geochim Cosmochim Acta* 1989;53:619-32.
- Caraballo MA, Rötting TS, Macías F, Nieto JM, Ayora C. Field multi-step limestone and MgO passive system to treat acid mine drainage with high metal concentrations. *Appl Geochem* 2009;24:2301-11.
- Caraballo MA, Santofimia E, Jarvis PA. Metal retention mineralogy and design considerations of a mature Permeable Reactive Barrier (PRB) for acidic mine water drainage in Northumberland UK. *Am Mineral* 2010;95:1642-9.
- Caraballo MA, Macías F, Nieto JM, Ayora C, Castillo J, Quispe D. Hydrochemical performance and mineralogical evolution of a dispersed alkaline substrate (DAS) remediating the highly polluted acid mine drainage in the full scale passive treatment of Mina Esperanza (SW, Spain). *Am. Mineral* 2011;96:1270-7.
- Carbonell-Barrachina A, DeLaune RD, Jugsujinda A. Phosphogypsum chemistry under highly anoxic conditions. *Waste Manage* 2002;22:657-65.
- Cerqueira B, Vega FA, Serra C, Silva LFO, Andrade ML. Time of flight secondary ion mass spectrometry and high-resolution transmission electron microscopy/energy dispersive spectroscopy: A preliminary study of the distribution of Cu<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup>/Pb<sup>2+</sup> on a Bt horizon surfaces. *J Hazard Mater* 2011;195:422-31.
- Cerqueira B, Vega FA, Silva LFO, Andrade L. Effects of vegetation on chemical and mineralogical characteristics of soils developed on a decantation bank from a copper mine. *Sci Total Environ* 2012;421:220-9.
- Chandler JA, Jewell WJ, Gossett JM, Van Soest PJ, Robertson JB. Predicting methane fermentation biodegradability. *Biotechnol Bioeng Symp* 1980;10:93-107.
- Christensen B, Laake M, Lien T. Treatment of acid mine water by sulphate-reducing bacteria; results from a bench scale experiment. *Water Res* 1996;30:167-77.

- Clarisse O, Ouddane B, Fischer JC, Wartel M. Metals sediment toxicity: chemical approach by SEM/AVS ratio. Application on Seine estuary sediments. *J Physique IV* 2003;107:303-6.
- Coetser S, Pulles W, Heath R, Cloete T. Chemical characterisation of organic electron donors for sulfate reduction for potential use in acid mine drainage treatment. *Biodegradation* 2006;17:67-77.
- Cooper DC, Morse JW. Extractability of metal sulfide minerals in acidic solutions: application to environmental studies of trace metal contamination within anoxic sediments. *Environ Sci Technol* 1998;32:1076-78.
- Cortina JL, Lagreca I, De Pablo J, Cama J, Ayora C. Passive In Situ Remediation of Metal-Polluted Water with Caustic Magnesia: Evidence from Column Experiments. *Environ Sci Technol* 2003;37:1971-7.
- Costa MC, Duarte JC. Bioremediation of acid mine drainage using acidic soil and organic wastes for promoting sulphate-reducing bacteria activity on a column reactor. *Water Air Soil Pollut* 2005;165:325-45.
- Cypionka H. Oxygen respiration by *Desulfovibrio* species. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:827-48.
- Dannenberg S, Kroder M, Dilling W, Cypionka H. Oxidation of H<sub>2</sub>, organic-compounds and inorganic sulfur-compounds coupled to reduction of O<sub>2</sub> or nitrate by sulphate-reducing bacteria. *Arch Microbiol* 1992;158:93-9.
- Dold B. Speciation of the most soluble phases in a sequential extraction procedure adapted for geochemical studies of copper sulfide mine waste. *J Geochem Explor* 2003;80:55-68.
- Doshi SM. Bioremediation of Acid Mine Drainage Using Sulfate-Reducing Bacteria. Prepared for U.S. Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste and Emergency Response, Office of Superfund Remediation and Technology Innovation. 2006.

- Druschel GK, Labrenz M, Thomsen-Ebert T, Fowle A, Banfield JF. Geochemical modeling of ZnS in biofilms: An example of ore depositional processes. *Econ Geol* 2002;97:1319-29.
- Duan WM, Coleman ML, Pye K. Determination of reduced sulphur species in sediments – an evaluation and modified technique. *Chem Geol* 1997;141:185-94.
- Dueñas C, Liger E, Cañete S, Pérez M, Bolívar JP. Exhalation of <sup>222</sup>Rn from phosphogypsum piles located at the Southwest of Spain. *J Environ Radioact* 2007;95:63–74.
- Dueñas C, Fernández MC, Cañete S, Pérez M. Radiological impacts of natural radioactivity from phosphogypsum piles in Huelva (Spain). *Radiat Meas* 2010;45:242-6.
- Dvorak DH, Hedin RS, Edenborn HM, McIntire PE. Treatment of metal-contaminated water using bacterial sulfate reduction: results from pilot-scale reactors. *Biotechnol Bioeng* 1992;40:609-16.
- El Bayoumy MA, Bewtra JK, Ali HI, Biswas N. Sulfide production by sulfate reducing bacteria with lactate as feed in an upflow anaerobic fixed film reactor. *Water Air Soil Pollut* 1999;112:67-84.
- Evangelou VP, Zhang YL. A review: pyrite oxidation mechanisms and acid mine drainage prevention. *Crit Rev Env Sci Tec* 1995;25:141-99.
- Fareleira P, Santos BS, Antonio C. Response of a strict anaerobe to oxygen: survival strategies in *Desulfovibrio gigas*. *Microbiolog-SGM* 2003;149:1513-22.
- Figuerola L. Microbial ecology of anaerobic biosystems treating mining influenced waters. Presented at the Mine Water Treatment Technology Conference, Pittsburgh, PA; 2005.
- Förstner U. Chemical forms and reactivities of metals in sediments. In: Leschber, R., Davis, R.D., L'Hermite, P. (Eds.), *Chemical Methods for Assessing Bio-available Metals in Sludges and Soils*. London: Elsevier; 1985. p. 1–31.



- Frazier AW, Lehr JR, Dillard EF. Chemical behaviour of fluorine in production of wet process phosphoric acid. *Environ Sci Technol* 1977;11:1007-14.
- Gadd GM, White C. Microbial treatment of 459 metal pollution - a working biotechnology. *Trends Biotechnol* 1993;11:353-9.
- Gagnon C, Mucci A, Pelletier E. Anomalous accumulation of acid-volatile sulphides (AVS) in a coastal marine sediment, Saguenay Fjord, Canada. *Geochim Cosmochim Acta* 1995;59:2663-75.
- Gilbert O, de Pablo J, Cortina JL, Ayora C. Chemical characterization of natural organic substrates for biological mitigation of acid mine drainage. *Water Res* 2004;38:4186-96.
- Gitzinger C, Henrich E, Frichet JL, Vallet P. Verifications under the terms of article 35 of the Euratom treaty. HUELVA sites: Phosphogypsum piles and CRI-9, Spain. 2009.
- Gramp JP, Bigham JM, Jones FS, Tuovinen OH. Formation of Fe-sulfides in cultures of sulfate reducing bacteria. *J Hazard Mater* 2010;175:1062-7.
- Gusek JJ. Design challenges for large scale sulfate reducing bioreactors. *Soil Sediment Contam* 2004;13:169-80.
- Hammack TW, Edenborn HM, Dvorak DH. Treatment of water from an open-pit copper mine using biogenic sulfide and lime stone: a feasibility study. *Water Res* 1994;28:2321-9.
- Hammersley AP, Svensson SO, Han M, Fitch AN, Hausermann D. Two-dimensional detector software: from real detector to idealised image or two-theta scan. *High Pressure Res* 1996;14:235-48.
- Heijs SK, van Gernerden H. Microbiological and environmental variables involved in the sulfide buffering capacity along eutrophication gradient in a coastal lagoon (Bassin d'Arcachon France). *Hydrobiologia* 2000;437:121-31.

- Henneke E, Luther GW, DeLange GJ, Hoefs J. Sulfur speciation in anoxic hypersaline sediments from the Eastern Mediterranean. *Geochim Cosmochim Acta* 1997;61:307–321.
- Huerta-Diaz MA, Morse JW. Pyritization of trace metals in anoxic marine sediments. *Geochim Cosmochim Acta* 1992;56:2681-702.
- IGME. Inventario Nacional de Balsas y Escombreras. Unpublished database (in Spanish). 1998.
- IngledeW WJ. Ferrous iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. In: Ehrlich HL, Holmes DS, editors. *Biotechnology for the Mining, Metal Refining, and Fossil Fuel Processing Industries*. Biotechnol Bioeng Symp 16. New York: Wiley; 1986. p.23-33.
- Isa Z, Grusenmeyer S, Verstraete W. Sulfate reduction relative to methane production in high-rate anaerobic digestion: technical aspects. *Appl Environ Microb* 1986;51:572-6.
- Jalali K, Baldwin SA. The role of sulfate-reducing bacteria in copper removal from aqueous sulfate solutions. *Water Res* 2000;37:797-806.
- Jambor JL, Blowes DW. Theory and applications of mineralogy in environmental studies of sulfide-bearing mine waste. In: Cabri L J, Vaughan DJ editors. *Short Course Handbook on Ore and Environmental Mineralogy*. Canada: Mineralogical Association; 1998;27:367-401.
- Johnson DB, Hallberg KB. Acid mine drainage remediation options: a review. *Sci Total Environ* 2005;338:3-14.
- Jong T, Parry DL. Removal of sulfate and heavy metals by sulphate reducing bacteria in short-term bench scale upflow anaerobic packed bed reactor runs. *Water Res* 2003;37:3379-89.
- Kaksonen AH, Puhakka JA. Sulfate reduction based bioprocesses for the treatment of acid mine drainage and the recovery of metals. *Eng Life Sci* 2007;7:541–64.

- Kepler DA, McCleary EC. Successive Alkalinity Producing Systems (SAPS) for the Treatment of Acidic Mine Drainage. Proceedings of the International Land Reclamation and Mine Drainage Conference and the 3rd International Conference on the Abatement of Acidic Drainage. Mine Drainage 1994;1:195-204.
- Kleinmann RLP. Acid mine drainage in the United States. In: Proceedings of the First Midwestern Region Reclamation Conferenc. 1990.
- Klug HP, Alexander LE. Crystallite Size and Lattice Strains from Line Broadening. In: Klug HP, Alexander LE, editors. X-ray Diffraction Procedures for Polycrystalline and Amorphous Materials. New York: John Wiley & Sons Inc; 1974. p. 618-708.
- Komnitsas K, Lazar I, Petrisor IG. Application of a vegetative cover on phosphogypsum stacks. Miner Eng 1999;12:175-85.
- Kostka JE, Luther GW. Partitioning and speciation of solid phase iron in saltmarsh sediments. Geochim Cosmochim Acta 1994;58:1701-10.
- Labrenz M, Druschel GK, Thomsen-Ebert T, Gilbert 482 B, Welch SA, Kemner KM, Logan GA, Summons RE, De Stasio G, Bond PL, Lai B, Kelly SD, Banfield JF. Formation of sphalerite (ZnS) deposits in natural biofilms of Sulfate-Reducing Bacteria. Science 290;2000:1744-7.
- Landa ER. Mobilization of radionuclides from uranium mill tailings and related waste materials in anaerobic environments. J Radioanal Nucl Chem 2003;255:559–563.
- Lanson B. DECOMPXR X-ray Decomposition Program ERM Poitiers. France; 1993. Martins M, Faleiro ML, Barros RJ, Veríssimo AR, Barreiros MA, Costa MC. Characterization and activity studies of highly metal resistant sulphate-reducing bacteria to be used in acid mine drainage treatment. J Hazard Mater 2009;166:706-13.
- Larock P, Hyun JH, Boutelle S, Burnett WC, Hull CD. Bacterial mobilization of polonium. Geochim Cosmochim Acta 1996;60:4321–4328.

- Leblanc M, Morales JA, Borrego J, Elbaz-Poulichet F. 4500-year-old mining pollution in Southwestern Spain: long-term implications for modern mining pollution. *Econ Geol* 2000;65:655-62.
- Lemos RS, Gomes CM, Santana M, LeGall J, Xavier AV, Teixeira M. The “strict” anaerobe *Desulfovibrio gigas* contains a membrane-bound oxygen-reducing respiratory chain. *FEBS Lett* 2001;496:40-3.
- Li QS, Wu ZF, Chu B, Zhang N, Cai SS, Fang JH. Heavy metals in coastal wetland sediments of the Pearl River Estuary, China *Environ Pollut* 2007;149:158–164.
- López Fernández A, López Montenegro G, Romero Sousa J. Tratamiento de aguas de Minería en el río Odiel. *Medio Ambiente* 2003;44:52-5.
- Lottermoser BG. *Mine Wastes: Characterization, Treatment, Environmental Impacts*. 2nd ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2007.
- Lovley DR, Phillips EJP. Reduction of uranium by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Appl Environ Microbiol* 1992;58:850-6.
- Lovley DR, Roden EE, Phillips EJP, Woodard JC. Enzymatic iron and uranium reduction by sulfate-reducing bacteria. *Mar Geol* 1993;113:41-53.
- Lowson RT. Aqueous oxidation of pyrite by molecular oxygen. *Chem Rev*, 1982;82:461-97.
- Machemer SD, Wildeman TR. Adsorption compared with sulfide precipitation as metal removal processes from acid mine drainage in a constructed wetland. *J Contam Hydrol* 1992;9:115–31.
- Macías F, Carballo MA, Nieto JM, Rötting TS, Ayora C. Natural pretreatment and passive remediation of highly polluted acid mine drainage. *J Environ Manage* 2012a;104:93-100.

- Macías F, Caraballo MA, Rötting TS, Pérez-López R, Nieto JM, Ayora C. From highly polluted Zn-rich acid mine drainage to non-metallic waters: Implementation of a multi-step alkaline passive treatment system to remediate metal pollution. *Sci Total Environ* 2012b; 433:323-30.
- MARM. El sector equino en cifras, principales indicadores económicos del año 2009. Subdirección General de Productos Ganaderos. <http://www.marm.es>; 2010.
- Martínez-Aguirre A, García-León M. Natural radioactivity enhancement by human activities in rivers of south west of Spain. *J Radioanal Nucl Chem* 1991;155:97–106.
- Martínez CE, McBride MB. Dissolved and labile concentrations of Cd, Cu, Pb and Zn in aged ferrihydrite-organic matter systems. *Environ Sci Technol* 1999;33:745–750.
- Martins M, Faleiro ML, Barros RJ, Veríssimo AR, Barreiros MA, Costa MC. Characterization and activity studies of highly metal resistant sulphate-reducing bacteria to be used in acid mine drainage treatment. *J Hazard Mater* 2009;166:706–13.
- Martins M, Faleiro ML, Barros RJ, Veríssimo AR, Barreiros MA, Costa MC. Characterization and activity studies of highly heavy metal resistant sulphate-reducing bacteria to be used in acid mine drainage decontamination. *J Haz Mat* 2009;166:706-13.
- Martins M, Faleiro ML, Chaves S, Tenreiro R, Costa MC. Effect of uranium (VI) on two sulfate-reducing bacteria cultures from a uranium mine site. *Sci Total Environ* 2010;408:2621-8.
- Martins M, Santos ES, Pires C, Barros RJ, Costa MC. Production of irrigation water from bioremediation of acid mine drainage: comparing the performance of two representative systems. *J Clean Prod* 2010;18:248-53.
- Mas JL, Bolívar JP, Garcia-Tenorio R, Aguado JL, San Miguel EG, Gonzalez-Labajo J. A dosimetric model for determining the effectiveness of soil covers for phosphogypsum waste piles. *Health Phys* 2001;80 :34-40.

- Medfrcio SN, Leao VA, Teixeira MC. Specific growth rate of sulfate reducing bacteria in the presence of manganese and cadmium. *J Hazard Mater* 2007;143:593-6.
- Moreau JW, Webb RI, Banfield JF. Ultrastructure aggregation-state and crystal growth of biogenic nanocrystalline sphalerite and wurtzite. *Am Mineral* 2004;89:950-96.
- Morse JW, Millero FJ, Cornwell JC, Rickard D. The chemistry of the hydrogen sulfide and iron sulfide systems in natural waters. *Earth-Sci Rev* 1987;24:1-42.
- Morse JW, Emeis KC. Controls of C/S ratios in hemipelagic upwelling sediments. *Am J Sci* 1990;290:1117-35.
- Morse JW. Interactions of trace metals with authigenic sulfide minerals: implications for their bioavailability. *Mar Chem* 1994;46:1-6.
- Moses CO, Nordstrom DK, Herman JS, Mills AL. Aqueous pyrite oxidation by dissolved oxygen and by ferric iron. *Geochim Cosmochim Ac* 1987;51:1561-71.
- Murr LE. Theory and practice of copper sulphide leaching in dumps and in-situ. *Miner Sci Eng* 1980;12:121-89.
- Ngwenya BT. Enhanced adsorption of zinc is associated with aging and lysis of bacterial cells in batch incubations. *Chemosphere* 2007;67:1982-92.
- Nieto JM, Sarmiento AM, Olias M, Canovas CR, Riba I, Kalman J, Delvalls TA. Acid mine drainage pollution in the Tinto and Odiel rivers (Iberian Pyrite Belt, SW Spain) and bioavailability of the transported metals to the Huelva Estuary. *Environ Int* 2007;33:445-55.
- Nocete F, Alex E, Nieto JM, Sáez R, Bayona MR. An archaeological approach to regional environmental pollution in the south-western Iberian Peninsula related to Third millennium BC mining and metallurgy. *J Archaeol Sci* 2005;32:1566-76.

- Nordstrom DK, Southam G. Geomicrobiology of sulfide mineral oxidation. In: *Geomicrobiology: Interactions between Microbes and Minerals* 1997;35:361-90.
- Nordstrom DK, Wilde FD. Reduction-oxidation potential (electrode method). In: Wilde, F.D., Radtke, D.B., Gibs, J., Iwatsubo, R.T. (Eds.), *National Field Manual for the Collection of Water-Quality Data. U.S. Geological Survey Techniques of Water-Resources Investigations (Book 9, chapter 6.5)*; 1998.
- Nordstrom DK, Alpers CN. Geochemistry of acid mine waters. In: Plumlee GS, Logsdon MJ, editors. *The Environmental Geochemistry of Mineral Deposits*. Littleton: Society of Economic Geologists Inc. 1999. p. 133-57.
- Olías M, Cánovas CR, Nieto JM, Sarmiento AM. Evaluation of the dissolved contaminant load transported by the Tinto and Odiel rivers (South West Spain). *Appl Geochem* 2006;21:1733-49.
- Oliveira MLS, Ward CR, Izquierdo M, Sampaio CH, de Brum IAS, Kautzmann RM, Sabedot S, Querol X, Silva LFO. Chemical composition and minerals in pyrite ash of an abandoned sulphuric acid production plant. *Sci Total Environ* 2012a;430:34-47.
- Oliveira MLS, Ward CR, French D, Hower JC, Querol X, Silva LFO. Mineralogy and leaching characteristics of beneficiated coal products from Santa Catarina, Brazil. *Int J Coal Geol* 2012b;94:314-25.
- Otero XL, Macias F. Variation with depth and season in metal sulfides in salt marsh soils. *Biogeochemistry* 2002;61:247-68.
- Pagnanelli F, De Michelis I, Di Muzio S, Ferella F, Veglio F. Bioassessment of a combined chemical-biological treatment for synthetic acid mine drainage. *J Hazard Mater* 2008;159:567-73.
- Parkhurst DL, Appelo CAJ. PHREEQC-2 version 2.12: A hydrochemical transport model. <http://wwwbrr.cr.usgs.gov>; 2005.

- Pérez-López R, Álvarez-Valero A, Nieto JM. Changes in mobility of toxic elements during the production of phosphoric acid in the fertilizer industry of Huelva (SW Spain) and environmental impact of phosphogypsum wastes. *J Hazard Mater* 2007;148:745-50.
- Pérez-López R, Castillo J, Sarmiento AM, Nieto JM. Assessment of phosphogypsum impact on the salt-marshes of the Tinto river (SW Spain): role of natural attenuation processes. *Mar Pollut Bull* 2011;62:2787-96.
- Pérez-López R, Nieto JM, López-Coto I, Aguado JL, Bolívar JP. Dynamics of contaminants in phosphogypsum of the fertilizer industry of Huelva (SW Spain): From phosphate rock ore to the environment. *Appl Geochem* 2010;25:705-15.
- Periáñez R, Abril JM, García-León M. Modelling the dispersion of non-conservative radionuclides in tidal waters. Part 1: conceptual and mathematical model. *J Environ Radioactiv* 1996;31:127 -41.
- Phipps TT, Fletcher JJ, Fiske W, Skousen JG. A methodology for evaluating the costs of alternative AMD treatment systems. In: *Proceedings of the 12th Annual West Virginia Surface Mine Drainage Task Force Symposium*. 1991.
- Pons LJ, van Breeman N, Driessen PM. Physiography of coastal sediments and development of potential soil acidity. In: *Acid Sulfate Weathering*. Madison: Soil Science Society of America; 1982. p. 1-10.
- Pósfai M, Dunin-Borkowski RE. Sulfides in biosystems. *Rev Mineral Geochem* 2006;61:679-714.
- Postgate JR. *The sulphate-reducing bacteria*. 2nd ed. Cambridge: University Press Cambridge; 1984.
- Prasad D, Wai M, Bérubé P, Henry JG. Evaluating substrates in the biological treatment of acid mine drainage. *Environ Technol* 1999;20:449-58.



- Quispe D, Pérez-López R, Silva LFO, Nieto JM. Changes in mobility of hazardous elements during coal combustion in Santa Catarina power plant (Brazil). *Fuel* 2012;94:495-503.
- Radhika V, Subramanian S, Natarajan KA. Bioremediation of zinc using *Desulfotomaculum nigrificans*: Bioprecipitation and characterization studies. *Water Res* 2006;40:3628-36.
- Rahn CR, Bending GD, Lillywhite RD, Turner MK. Chemical characterisation of vegetable and arable crop residue materials: a comparison of methods. *J Sci Food Agric* 1999;79:1715-21.
- Raiswell R, Berner RA. Pyrite formation in euxinic and semi-euxinic sediments. *Am J Sci* 1985;285:710-24.
- Raiswell R, Buckley F, Berner RA, Anderson TF. Degree of pyritisation as a paleoenvironmental indicator of bottom-water oxygenation. *J Sediment Petrol* 1988;58:812-819.
- Rauret G, López-Sánchez JF, Sahuquillo A, Rubio R, Davidson CI, Ure A, Quevauviller P. Improvement of the BCR three step sequential extraction procedure prior to the certification of new sediment and soil reference materials. *J Environ Monit* 1999;1:54-61.
- Rawlings DE, Tributsch H, Hansford GS. Reasons why *Leptospirillum*-like species rather than *Thiobacillus ferrooxidans* are the dominant iron-oxidizing bacteria in many commercial processes for the biooxidation of pyrite and related ores. *Microbiology* 1999;145:5-13.
- Reisman D, Gusek J, Massey J. A constructed wetlands-bioreactor demonstration system to treat acid mine drainage waters. Portland: Proceedings of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry. 2004.
- Rensing C, Ghosh M, Rosen BP. Families of soft-metal-ion-transporting ATPases. *J Bacteriol* 1999;181:5891-7.

- Ribeiro J, Flores D, Ward CR, Silva LFO. Identification of nanominerals and nanoparticles in burning coal waste piles from Portugal. *Sci Total Environ* 2010;408:6032-41.
- Rickard D, Morse JW. Acid volatile sulfide (AVS). *Mar Chem* 2005;97:141-97.
- Rickard DT. The kinetics and mechanisms of pyrite formation at low temperatures. *Am J Sci* 1975;275:636-652.
- Rimstidt JD, Vaughan DJ. Pyrite oxidation: A state of the art assessment of the reaction mechanism. *Geochim Cosmochim Acta* 2003;67:873-80.
- Ríos CA, Williams CD, Roberts CL. Removal of heavy metals from acid mine drainage (AMD) using coal fly ash natural clinker and synthetic zeolites. *J Hazard Mater* 2008;156:23-35.
- Robbins EI, Nord GL, Savelle CE, Eddy JI, Livi KJT, Gullett CD, Nordstrom DK, Chou IM, Briggs KM. Microbial and mineralogical analysis of aluminum-rich precipitates that occlude porosity in a failed anoxic limestone drain, Monongalia County, West Virginia. Pittsburgh: 13th Annual International Pittsburgh Coal Conference; 1996. p. 761-7.
- Rodier J. L'analyse de l'eau: eaux naturelles, eaux résiduaires, eaux de mer, eighth ed. Dunod, Paris; 1996.
- Rötting TS, Thomas RC, Ayora C, Carrera J. Passive Treatment of Acid Mine Drainage with High Metal Concentration Using Dispersed Alkaline Substrate. *J Environ Qual* 2008;37:1741-51.
- Rutherford PM, Dudas MJ, Samek RA. Environmental impacts of phosphogypsum. *Sci Total Environ* 1994;149:1-38.
- Sáez R, Pascual E, Toscano M, Almodóvar GR. The Iberian type of volcano-sedimentary massive sulphide deposits. *Miner Deposita* 1999;34:549-70.

- Sáinz A, Grande JA, De la Torre ML 2004. Characterisation of heavy metal discharge into the Ria of Huelva. *Environ Int* 2004;30:557-66.
- Salomons. Environmental impact of metals derived from mining activities: Process, prediction, prevention. *J Geochem Explor* 1995;52:5-23.
- Sandrin TR, Hoffman DR. Bioremediation of Organic and Metal Co-contaminated Environments: Effects of Metal Toxicity, Speciation, and Bioavailability on Biodegradation. In: Singh SN, Tripathi RD, editors. *Environmental Bioremediation Technologies*. Berlin: Springer-Verlag; 2007. p. 1-34.
- Sani RK, Peyton BM, Brown LT. Copper-induced inhibition of growth of *Desulfovibrio desulfuricans* G20: assessment of its toxicity and correlation with those of zinc and lead. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:4765-72.
- Santana M. Presence and expression of terminal oxygen reductases in strictly anaerobic sulfate-reducing bacteria isolated from salt-marsh sediments. *Anaerobe* 2008;14:145–156.
- Santoro L, Volpicelli G, Caprio V. Limestone neutralization of acid waters in the presence of surface precipitates. *Water Res* 1987;21:641-7.
- Santos AJG, Mazzilli BP, Fávoro DIT, Silva PSC. Partitioning of radionuclides and trace elements in phosphogypsum and its source materials based on sequential extraction methods. *J Environ Radioactiv* 2006;87:52-61.
- Sarmiento AM, Nieto JM, Olías M, Cánovas CR. Hydrochemical characteristics and seasonal influence on the pollution by acid mine drainage in the Odiel river Basin (SW Spain). *Applied Geochemistry* 2009a;24:697-714.
- Sarmiento AM, Olías M, Nieto JM, Cánovas CR, Delgado J. Natural attenuation processes in two water reservoirs receiving acid mine drainage. *Sci Total Environ* 2009b;407:2051-62.

- Sass H, Steuber J, Kroder M, Kroneck PMH, Cypionka H. Formation of thionates by freshwater and marine strains of sulphatereducing bacteria. *Arch Microbiol*, 1992;158:418-21.
- Schippers A, Sand W. Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:319-21.
- Schippers A, Breuker A, Blazejak A, Bosecker K, Kock D, Wright TL. The biogeochemistry and microbiology of sulfidic mine waste and bioleaching dumps and heaps, and novel Fe(II)-oxidizing bacteria. *Hydrometallurgy* 2010;104:342-50.
- Schoonen MAA. Mechanisms of sedimentary pyrite formation. In: Amend JP, Edwards KJ, Lyons TW, editors. *Sulfur Biogeochemistry - Past and Present*, Special Paper 379. Geological Society of America; 2004. p. 117-34.
- Sheoran AS, Sheoran V. Heavy metal removal mechanism of acid mine drainage in wetlands: A critical review. *Mine Eng* 2006;19:105-16.
- Silva LFO, Hower JC, Izquierdo M, Querol X. Complex nanominerals and ultrafine particles assemblages in phosphogypsum of the fertilizer industry and implications on human exposure. *Sci Total Environ* 2010;408:5117-22.
- Silva LFO, Izquierdo M, Querol X, Finkelman RB, Oliveira MLS, Wollenschlager M, Towler M, Pérez-López R, Macias F. Leaching of potential hazardous elements of coal cleaning rejects. *Environ Monit Assess* 2011a;175:109-26.
- Silva LFO, Macias F, Oliveira MLS, da Boit MK, Waanders F. Coal cleaning residues and Fe-minerals implications. *Environ Monit Assess* 2011b;172:367-78.
- Simpson SL, Apte SC, Batley GE. Effect of short-term resuspension events on trace metal speciation in polluted anoxic sediments. *Environ Sci Technol* 1998;32:620-5.

- Singer PC, Stumm W. Acidic mine drainage: the rate determining step. *Science* 1970;167:1121-23.
- Singh M, Garg M, Verma CL, Handa SK, Kumar R. An improved process for the purification of phosphogypsum. *Constr Build Mater* 1996;10:597-500.
- Skousen J, Rose A, Geidel G, Foreman J, Evans R, Hellier W. A Handbook of technologies for the avoidance and remediation of acid mine drainage. Acid drainage technology initiative (ADTI). Morgantown: National mine land reclamation center; 1998. p. 131.
- Spear JR, Figueroa LA, Honeyman BD. Modeling reduction of uranium U(VI) under variable sulfate concentrations by sulfate-reducing bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:3711-3721.
- Starkey RL. Transformations of iron by bacterial in water. *J Am Water Works Ass* 1945;37:963-84.
- Sverdrup H. The Kinetics of base cation release due to chemical weathering. Lund University Press; 1990. p. 245.
- Tabak H, Holder E, Kupferle M, Haines J. Use of respirometry to determine metal toxicity through measurement of hydrogen consumption by sulfate reducing bacteria in the presence of heavy metals. Fourth SETAC World Congress, Portland, Oregon, USA, 14-18 November; 2004. p. 14-8.
- Tayibi H, Choura M, López FA, Alguacil FJ, López-Delgado A. Environmental impact and management of phosphogypsum. *J Environ Manage* 2009;90:2377-86.
- Taylor BE, Wheeler MC, Nordstrom DK. Stable isotope geochemistry of acid mine drainage: Experimental oxidation of pyrite. *Geochim Cosmochim Ac* 1984;48:2669-78.
- Thauer RK, Stackebrandt E, Hamilton WA. Energy metabolism and phylogenetic diversity of sulphate-reducing bacteria. In: Barton LL, Hamilton WA, editors. Sulphate-reducing

Bacteria Environmental and Engineered Systems. New York: Cambridge University Press; 2007. p. 2-3.

Troelsen H, Jørgensen BB. Seasonal dynamics of elemental sulfur in two coastal sediments. *Estuar Coast Shelf S* 1982;15:255-266.

Trudinger PA, Chambers LA, Smith JW. Low-temperature sulphate reduction: biological versus abiological. *Can J Earth Sci* 1985;22:1910-8.

Tsukamoto TK, Killion HA, Miller GC. Column experiments for microbiological treatment of acid mine drainage: low-temperature, low-pH and matrix investigations. *Water Res* 2004;38:1405-18.

Turner D, McCoy D. Anoxic alkaline drain treatment system, a low cost acid mine drainage treatment alternative. In: Graves DH, DeVore RW, editors. *Lexington: Symp. Surface Mining Hydrology, Sedimentology and Reclamation*; 1990. p.73-5.

Utgikar VP, Chen BY, Chaudhary N, Tabak HH, Haines JR, Govind R. Acute toxicity of heavy metals to acetate utilizing mixed cultures of sulphate-reducing bacteria. *Biotechnol Bioeng* 2001;82:306-12.

Utgikar VP, Harmon SM, Chaudhary N, Tabak HH, Govind R, Haines JR. Inhibition of sulfate reducing bacteria by metal sulphide formation in bioremediation of acid mine drainage. *Environ Toxicol* 2002;17:40-8.

van den Berg GA, Loch JPG, van der Heijdt LM, Zwolsman JJG. Vertical distribution of acid-volatile sulfide and simultaneously extracted metals in a recent sedimentation area of the river meuse in The Netherlands. *Environ Toxicol Chem* 1998;17:758-63.

van den Berg GA, Loch JPG, van der Heijdt LM, Zwolsman JJG. Vertical distribution of acid-volatile sulfide and simultaneously extracted metals in a recent sedimentation area of the river meuse in The Netherlands. *Environ Toxicol Chem* 1998;17:758-63.

- Vega FA, Covelo EF, Reigosa MJ, Andrade ML. Degradation of fuel oil in salt marsh soils affected by the prestige oil spill. *J Hazard Mater* 2008;116:1020-9.
- Vega FA, Covelo EF, Cerqueira B, Andrade ML. Enrichment of marsh soils with heavy metals by effect of anthropic pollution. *J Hazard Mater* 2009; 170:1056–1063.
- Villa M, Mosqueda F, Hurtado S, Mantero J, Manjón G, Periañez R, Vaca F, García-Tenorio R. Contamination and restoration of an estuary affected by phosphogypsum releases. *Sci Total Environ* 2009;408:69-77.
- Watzlaf GR, Schroeder KT, Kleinmann RLP, Kairies CL, Nairn RW. *The Passive Treatment of Coal Mine Drainage*. DOE/NETL-2004/1202, U.S. Pittsburgh: Department of Energy, National Energy Technology Laboratory; 2004.
- Waybrant KR, Blowes DW, Ptacek CJ. Selection of reactive mixtures for use in permeable reactive walls for treatment of mine drainage. *Environ Sci Technol* 1998;32:1972-9.
- White C, Gadd GM. Accumulation and effects of cadmium on sulphate-reducing bacterial biofilm. *Microbiology* 2000;144:1407-15.
- Wieder RK. Ion input/output budgets for five wetlands constructed for acid coal mine drainage treatment. *Water Air Soil Pollut* 1993;71:231-70.
- Woolfolk CA, Whiteley HR. Reduction of inorganic compounds with molecular hydrogen by *Micrococcus lactilyicus*. I. Stoichiometry with compounds of arsenic, selenium, tellurium, transition and other elements. *J Bacteriol* 1962;84:647-58.
- Yang J, Liu W, Zhang L, Xiao B. Preparation of load-bearing building materials from autoclaved phosphogypsum. *Constr Build Mater* 2009;23:687–693.
- Younger PL, Curtis TP, Jarvis AP, Pennell R. Effective passive treatment of aluminium-rich, acidic colliery spoil drainage using a compost wetland at Quaking Houses, County Durham. *J Chart Inst Water Environ Manage* 1997;11:200-20.

- Younger PL, Banwart SA, Hedin RS. Mine Water: Hydrology, Pollution, Remediation. Environmental Pollution Series. Netherland: Kluwer Academic Publishers; 2002a. p. 464.
- Younger PL. A reducing and alkalinity-producing system (RAPS) for the passive treatment of acidic, aluminium-rich leachates emanating from revegetated colliery spoil materials at Bowden Close, County Durham. In Proceedings of the CL: AIRE Annual Project Conference. London; 2002b. p. 21.
- Younger PL, Jayaweera A, Elliot A, Wood R, Amos P, Daugherty AJ. Passive treatment of acidic mine waters in subsurfaceflow systems: exploring RAPS and permeable reactive barriers. Land Contam Reclam 2003;11:127- 35.
- Yu KC, Tsai LJ, Chen SH, Ho ST. Chemical binding of heavy metals in anoxic river sediments. Water Res 2001;35:4086-4094.
- Zinkevich V, Bogdarina I, Kang H, Hill MAW, Tapper R, Beech IB. Characterization of exopolymers produced by different isolates of marine sulfate-reducing bacteria. Int Biodeter Biodegr 1996;37:163-72.



## PUBLICACIONES

Artículos publicados en revistas internacionales JCR-SCI derivados de esta tesis:

**Castillo J**, Pérez-López R, Sarmiento AM, Nieto JM. Evaluation of organic substrates to enhance the sulfate-reducing activity in phosphogypsum. *Sci Total Environ* 2012;439:106-113.

**Castillo J**, Pérez-López R, Caraballo MA, Nieto JM. Biologically-induced precipitation of sphalerite–wurtzite nanoparticles by sulfate-reducing bacteria: Implications for acid mine drainage treatment. *Sci Total Environ* 2012;423:176-184.

Pérez-López R, **Castillo J**, Sarmiento AM, Nieto JM. Assessment of phosphogypsum impact on the salt-marshes of the Tinto river (SW Spain): Role of natural attenuation processes. *Mar Pollut Bull* 2011;62:2787-2796.

Otras publicaciones internacionales JCR-SCI:

Caraballo MA, Macías F, Nieto JM, Ayora C, **Castillo J**, Quispe D. Hydrochemical performance and mineralogical evolution of a dispersed alkaline substrate (DAS) remediating the highly polluted acid mine drainage in the full scale passive treatment of Mina Esperanza (SW, Spain). *Am Mineral* 2011;96:1270-1277.

Pérez-López R, Quispe D, **Castillo J**, Nieto JM. Neutralization and retention of metals in acid mine drainage from the Iberian Pyrite Belt with Paper Waste Industry Huelva. *Am Mineral* 2011;96:781-791.

Pérez-López R, **Castillo J**, Quispe D, Nieto JM. Neutralization of acid mine drainage using the final product from CO<sub>2</sub> emissions capture with alkaline paper mill waste. *J Hazard Mater* 2010;177:1-3.



## Evaluation of organic substrates to enhance the sulfate-reducing activity in phosphogypsum

Julio Castillo <sup>a</sup>, Rafael Pérez-López <sup>a,\*</sup>, Aguasanta M. Sarmiento <sup>b</sup>, José M. Nieto <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Geology, University of Huelva, Campus 'El Carmen', 21071 Huelva, Spain

<sup>b</sup> Department of Geodynamics and Palaeontology, University of Huelva, Campus 'El Carmen', 21071 Huelva, Spain

### HIGHLIGHTS

- ▶ Evidences of sulfate-reducing bacteria (SRB) naturally occur in phosphogypsum.
- ▶ Experiments were conducted to enhance SRB activity using natural organic substrates.
- ▶ SRB were subjected to high Fe, Zn, Cu and Cd concentrations in a growth medium.
- ▶ Metal concentrations were depleted by precipitation of newly-formed sulfides.
- ▶ This paper confirms the potential role of SRB for bioremediation strategies.

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 4 August 2012

Received in revised form 16 September 2012

Accepted 16 September 2012

Available online 11 October 2012

#### Keywords:

Sulfate-reducing bacteria (SRB)

Phosphogypsum

Organic substrates

Sulfate reduction

Metal removal

### ABSTRACT

Several experiments were conducted to evaluate the activity and growth of sulfate-reducing bacteria (SRB) in a metal-rich culture medium (approx. 250 mg/L Fe, 75 mg/L Zn and Cu, 10 mg/L Cd) with phosphogypsum as bacterial inoculum. Phosphogypsum was collected from the stack covering the salt-marshes of the Tinto river (SW Spain). Three organic amendments were used as carbon sources, two low-cost wastes (horse manure and legume compost) and one sample of natural soil (vegetal cover). In the experiments, sulfate was reduced to sulfide during the growth of SRB populations, and concentrations were decreased in the solution. Metal concentrations also decreased to values below the detection limit. Metal removal took place by precipitation of newly-formed sulfides. Pyrite-S was the main sulfide component (approx. 200 μmol/g and 80% of pyritization) and occurred mainly as framboidal grains and rarely as isolated polyhedral crystals. Horse manure was the most successful organic substrate to promote SRB activity (sulfate removal of 61%), followed by vegetal cover (49%) and legume compost (31%). These findings propose the possibility of using naturally-occurring SRB in the phosphogypsum for bioremediation strategies based on natural soil covers with organic amendments.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Phosphate rock ore (mainly fluorapatite,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ ) for the manufacture of phosphoric acid ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) in the fertilizer industry often contains high concentration of hazardous impurities such as As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb, and Zn and radionuclides of the U- and Th-decay series (Rutherford et al., 1994). The overall process involves the wet chemical attack of phosphate rock with sulfuric acid ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) and generates a by-product gypsum known as phosphogypsum ( $\text{CaSO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ). Phosphogypsum inherits part of the potentially toxic elements from its parent phosphate ore, and hence, their potential effects on the environment (Oliveira et al., 2012a; Pérez-López et al., 2010; Silva et al., 2010). Efforts at assessing the phosphogypsum produced in large fertilizer plants around the world as a source of toxic elements focus on simulating its weathering by laboratory leaching experiments (Al-Hwaiti et al., 2010; Pérez-López et al., 2010;

Santos et al., 2006). The presence of impurities in the phosphogypsum leads to challenging its reutilization and storage.

The disposal options of phosphogypsum include direct pouring into the sea, backfill of open-pit mines or stacking in large areas (Frazier et al., 1977; Komnitsas et al., 1999; Oliveira et al., 2012b). The most widespread practice is to stack-pile the phosphogypsum near the industrial plant, which is often placed in coastal areas (Tayibi et al., 2009). Studies on the dynamic of contaminants in phosphogypsum should consider that the large disposal piles may exhibit different chemical gradients with depth. The unsaturated superficial zones likely show acidic and oxidizing weathering conditions; while water-saturation with neutral and anaerobic weathering conditions can be expected to develop in the deep zones of aged waste material (Lottermoser, 2007). In deep zones, stagnant and non-renewable waters near basement could lead to out-breaks of anaerobic bacteria communities that decompose the typically high concentration of organic matter contained in the soils or sediments supporting the stack (Pérez-López et al., 2011), along with the residual organic matter from phosphate rock ore (Rutherford et al., 1994).

\* Corresponding author. Tel.: +34 95 921 9819; fax: +34 95 921 9810.  
E-mail address: [rafael.perez@dgeo.uhu.es](mailto:rafael.perez@dgeo.uhu.es) (R. Pérez-López).



## Biologically-induced precipitation of sphalerite–wurtzite nanoparticles by sulfate-reducing bacteria: Implications for acid mine drainage treatment

Julio Castillo <sup>a</sup>, Rafael Pérez-López <sup>a,b,\*</sup>, Manuel A. Caraballo <sup>a,c</sup>, José M. Nieto <sup>a</sup>, Mónica Martins <sup>d</sup>, M. Clara Costa <sup>d</sup>, Manuel Olías <sup>e</sup>, Juan C. Cerón <sup>e</sup>, Rémi Tucoulou <sup>f</sup>

<sup>a</sup> Department of Geology, University of Huelva, Campus 'El Carmen', 21071, Huelva, Spain

<sup>b</sup> Institute of Environmental Assessment and Water Research, IDÆA-CSIC, Jordi Girona 18, 08034, Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Department of Geosciences, Virginia Tech, Blacksburg, VA 24061, USA

<sup>d</sup> Centro de Ciências do Mar, CCMAR, Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro, Portugal

<sup>e</sup> Department of Geodynamic and Palaeontology, University of Huelva, Campus 'El Carmen', 21071 Huelva, Spain

<sup>f</sup> European Synchrotron Radiation Facility, 6 Rue Jules Horowitz, Grenoble, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 December 2011

Received in revised form 9 February 2012

Accepted 9 February 2012

Available online 11 March 2012

#### Keywords:

Sulfate-reducing bacteria (SRB)

Zinc tolerance

ZnS nanocrystals

Treatment

Acid mine drainage

### ABSTRACT

Several experiments were conducted to evaluate zinc-tolerance of sulfate-reducing bacteria (SRB) obtained from three environmental samples, two inocula from sulfide-mining districts and another inoculum from a wastewater treatment plant. The populations of SRB resisted zinc concentrations of 260 mg/L for 42 days in a sulfate-rich medium. During the experiments, sulfate was reduced to sulfide and concentrations in solution decreased. Zinc concentrations also decreased from 260 mg/L to values below detection limit. Both decreases were consistent with the precipitation of newly-formed sphalerite and wurtzite, two polymorphs of ZnS, forming <2.5- $\mu\text{m}$ -diameter spherical aggregates identified by microscopy and synchrotron- $\mu$ -XRD. Sulfate and zinc are present in high concentrations in acid mine drainage (AMD) even after passive treatments based on limestone dissolution. The implementation of a SRB-based zinc removal step in these systems could completely reduce the mobility of all metals, which would improve the quality of stream sediments, water and soils in AMD-affected landscapes.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Wastes from the mining of sulfide-bearing ores interact with water and air to produce extremely acidic leachates containing high concentrations of sulfate and heavy metals known as acid mine drainage (AMD). AMD treatment technologies based on the addition of chemicals in plants are available, but relatively expensive, in zones where the mining industry is active. However, such technologies could be impracticable at abandoned mine sites with unclear legal responsibility for treatment. Instead, passive treatment technologies provide a viable low-cost and -maintenance alternative (Johnson and Hallberg, 2005).

Most of the passive restoration strategies promote acidity neutralization and metal removal in chemical reactors by the use of limestone as alkaline reagent, which causes efficient precipitation of hydroxides of trivalent metals such as Fe and Al. These secondary phases can retain trace elements by adsorption and/or co-precipitation processes (Bigham and Nordstrom, 2000). However, AMD waters can also show high concentrations of divalent metals like Zn and Mn (tens to

hundreds of mg/L) and minor but toxic concentrations of Cd, Co and Ni (tens to hundreds of  $\mu\text{g/L}$ ). Chemically induced precipitation of such divalent metals requires pH values ranging between 8 and 10, which is impossible to achieve in AMD by limestone dissolution because, due to the high Ca concentration in these waters, equilibrium with calcite is reached at pH between 6 and 7 (Cortina et al., 2003).

Biological passive treatment based on the use of sulfate-reducing bacteria (SRB) has recently emerged as an attractive solution for AMD treatment. SRB are a taxonomically diverse group of strictly anaerobic bacteria, capable of reducing sulfate and oxidizing organic substrates simultaneously (e.g., see review in Barton and Fauque, 2009). Sulfate-reduction leads to the production of sulfide that can easily react with divalent metals to form precipitates of insoluble metal sulfides (Gadd and White, 1993). Due to the ability to immobilize toxic metals via precipitation, SRB play an important role in the remediation of polluted wastes by both natural attenuation processes (e.g., Sarmiento et al., 2009) and engineered treatment technologies (e.g., Jong and Parry, 2003). Hence, SRB are one of the most important bacterial communities within the existing microbial biodiversity due to their great economic, environmental and biotechnological importance.

Passive treatment technologies, based on the use of SRB, typically employ a mixture of alkaline material (mainly limestone or other

\* Corresponding author at: Department of Geology, University of Huelva, Campus 'El Carmen', 21071, Huelva, Spain. Tel.: +34 95 921 9819; fax: +34 95 921 9810.

E-mail address: [rafael.perez@dgeo.uhu.es](mailto:rafael.perez@dgeo.uhu.es) (R. Pérez-López).



## Assessment of phosphogypsum impact on the salt-marshes of the Tinto river (SW Spain): Role of natural attenuation processes

Rafael Pérez-López<sup>a,b,\*</sup>, Julio Castillo<sup>b</sup>, Aguasanta M. Sarmiento<sup>b,c</sup>, José M. Nieto<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Institute of Environmental Assessment and Water Research, CSIC, Jordi Girona 18, 08034 Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Department of Geology, University of Huelva, Campus 'El Carmen', 21071 Huelva, Spain

<sup>c</sup> Department of Physicochemical, University of Cadiz, Polígono Río San Pedro s/n, 11510 Puerto Real, Cadiz, Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Phosphogypsum  
Metal pollution  
Salt-marshes  
Natural attenuation  
Sulphate reduction

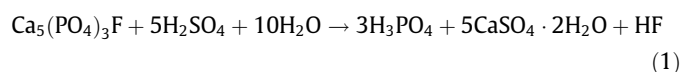
### ABSTRACT

About 120 Mton of phosphogypsum from the fertiliser industry were stack-piled on the salt-marshes of the Tinto river (Spain). This paper investigates the capacity of salt-marshes to attenuate contamination due to downward leaching from phosphogypsum. Solids and pore-waters were characterized at different depths of the pile to reach the marsh-ground. In superficial zones, metals were highly mobile, and no reduced sulphur was found. However, pollutant concentration decreased in the pore-water in deeper oxygen-restricted zones. Metal removal occurred by precipitation of newly formed sulphides, being this process main responsible for the contamination attenuation. Pyrite-S was the main sulphide component (up to 2528 mg/kg) and occurred as framboids, leading to high degrees of pyritization (up to 97%). The sulphidization reaction is Fe-limited; however, excess of acid-volatile sulphide over other metals cause precipitation of other sulphides, mainly of Cu and As. This decrease in metal mobility significantly minimises the impact of phosphogypsums on the salt-marshes.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Phosphogypsum refers to the gypsum formed as a waste by-product of processing phosphate ore into fertilizer through a wet chemical process. The chemical reaction for production of phosphoric acid for fertilizer can be described as:



The attack of phosphate rock, mainly fluorapatite ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ ), with sulphuric acid ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) yields phosphoric acid ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), hydrogen fluoride (HF) and phosphogypsum ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). The wet method generates about 5 ton of phosphogypsum per ton of phosphoric acid manufactured. Worldwide phosphogypsum production is of about 100–280 Mton per year (Yang et al., 2009). These wastes are highly enriched in metal impurities and radionuclides from U-decay series (Rutherford et al., 1994).

Phosphogypsum wastes are often disposed of in large stockpiles exposed to weathering processes in coastal areas close to phosphoric acid plants, where they may cause serious environmental damage (Tayibi et al., 2009). Salt-marshes on the western side of the Tinto river estuary (Huelva, SW Spain) represent a clear example

of a phosphogypsum-covered landscape. The phosphogypsum stack currently contains about 120 Mton and is situated within the tidal prism of the estuary. Recent studies assessed the theoretical capacity of this stack as a source of mobile toxic impurities into the environment (Pérez-López et al., 2010). However, that work did not consider the long-term fate of pollutants and their possible interaction with the ecosystem. The information available to date is useful to establish risk assessment criteria and to design restoration strategies. Nevertheless, studies on dynamic of contaminants in the environment require estimating the spatio-temporal changes of those parameters that control the soil-pollutant interaction (Martínez and McBride, 1999).

It has long been known that oxidation status of soils and sediments can affect the solubility, and hence, the mobility of contaminants. The fate of metals is strongly influenced by changes in redox potential, which controls their distribution between mobile and non-mobile fractions (Li et al., 2007). Phosphogypsums located in Huelva were more or less stack-piled over depressions of the local marsh without dams to protect their flanks and an impermeable basement to avoid leaching in depth. Therefore, the piles of gypsum by-product from fertilizer industry are directly supported on salt-marsh soils. Marshes generally have high content of organic matter whose oxidative decomposition makes this medium ideal for the existence of anaerobic conditions (Vega et al., 2009; and references therein). Note that oxygen solubility in water is low and small amounts of organic matter are enough to deplete or consume the aqueous oxygen in the environment.

\* Corresponding author at: Department of Geology, University of Huelva, Campus 'El Carmen', 21071 Huelva, Spain. Tel.: +34 95 921 9826; fax: +34 95 921 9810.

E-mail address: [rafael.perez@dgeo.uhu.es](mailto:rafael.perez@dgeo.uhu.es) (R. Pérez-López).

## **Hydrochemical performance and mineralogical evolution of a dispersed alkaline substrate (DAS) remediating the highly polluted acid mine drainage in the full-scale passive treatment of Mina Esperanza (SW Spain)**

**MANUEL A. CARABALLO,<sup>1,\*</sup> FRANCISCO MACÍAS,<sup>1</sup> JOSÉ MIGUEL NIETO,<sup>1</sup> JULIO CASTILLO,<sup>1</sup> DINO QUISPE,<sup>1</sup> AND CARLOS AYORA<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Geology Department, University of Huelva, Campus “El Carmen”, E-21071 Huelva, Spain

<sup>2</sup>Institute of Environmental Assessment and Water Research, IDÆA-CSIC, Jordi Girona 18, 08034 Barcelona, Spain

### **ABSTRACT**

Acid mine drainage remediation is an unresolved matter in abandoned mining districts around the world. Development and implementation of passive treatment systems in these areas are commonly focused on engineering and water quality aspects. Neoformed mineral phases precipitated within the reactive material of these passive treatments account for the removal of pollutants but also can cause clogging and passivation of the reactive substrate. After 20 months of operation and monitoring, the limestone-based passive treatment system implemented in Mina Esperanza (SW Spain) was sampled to study the relationship between water chemistry, mineral composition of the neoformed precipitates, and treatment performance. Water chemical profiles show the existence of three precipitation zones controlled by Fe, Al, and Zn hydrochemistry and also a migration with time of precipitation zones downward into the reactive material. These precipitation zones were also confirmed by a mineral study performed on the solid samples where either schwertmannite and goethite or hydrobasaluminite and Zn-rich green rust were the mineral phases that controlled the metal removal in the three precipitation (Fe, Al, or Zn) zones. Iron and Al precipitates were observed to play a critical role in the time evolution of the reactive material hydraulic conductivity. Furthermore, Al precipitates passivated to some extent the limestone grains by armoring, although migration of the Fe precipitation zone and Al redissolution later activated the limestone grains. A higher proportion of limestone in the reactive mixture and the addition of new reagents to the bottom section of the reactive material (to enhance the reducing environment and to promote divalent metal removal) are proposed on the basis of this hydrochemical and mineralogical study for a future design for the Mina Esperanza passive treatment system.

**Keywords:** Acid mine drainage, passive treatment system, schwertmannite, hydrobasaluminite, green rust

### **INTRODUCTION**

Acid mine drainage (AMD) is a widespread environmental problem that has resulted in one of the most extreme and unique environments on Earth. Polluted waters in mining areas typically exhibit low pH and high metal contents as a result of sulfide dissolution that occurred after the exposure of these minerals to oxic conditions (Bigham and Nordstrom 2000).

The Iberian Pyrite Belt (IPB) in the southwest Iberian Peninsula is one of the largest massive sulfide provinces in the world with original estimated reserves on the order of 1700 Mt of sulfide ore (Sáez et al. 1999). The region is also known as a world-class example of AMD pollution where the long-term effects are dated back to before Roman times (Nocete et al. 2005). The extensive exposure of sulfide rich residues and the lack of carbonate rocks in this region create a ubiquitous problem of AMD with very high metal content (Sarmiento et al. 2009a).

AMD at abandoned mine districts is typically remediated by the implementation of passive treatment technologies (Younger et al. 2002). Remediation techniques such as permeable reactive

barriers, vertical flow wetlands, or aerobic wetlands have been successfully used to improve water quality in coal mining areas affected by AMD (Caraballo et al. 2010b; Jarvis et al. 2006; Johnson and Hallberg 2005). However, the high metal content observed in the AMD from the IPB severely reduces the applicability of conventional passive treatment systems such as anoxic limestone drainages (ALD) (Hedin et al. 1994), or reducing and alkalinity producing systems (RAPS) (Jage et al. 2001). To address clogging and passivation problems resulting from the treatment of AMD with high metal contents by traditional reactive substrates, a novel reactive mixture known as dispersed alkaline substrate (DAS) was successfully tested in both laboratory (Rötting et al. 2008c) and field experiments (Caraballo et al. 2009a; Rötting et al. 2008b). Limestone DAS is a high-porosity, high-reactivity substrate comprised of a mixture of 80% v/v pine wood shavings and 20% v/v limestone sand.

Passive treatment studies are commonly focused on water chemistry improvement and metal removal, obviating the important role exerted by mineral precipitates in AMD water chemistry and passive treatment performance. Specifically, iron and aluminum precipitates play a key role in buffering water pH (Bigham and Nordstrom 2000), inducing reactive material

\* E-mail: manuel.caraballo@dgeo.uhu.es

## Acid neutralization by dissolution of alkaline paper mill wastes and implications for treatment of sulfide-mine drainage

RAFAEL PÉREZ-LÓPEZ,<sup>1,2,\*</sup> DINO QUISPE,<sup>2</sup> JULIO CASTILLO,<sup>2</sup> AND JOSÉ MIGUEL NIETO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Environmental Assessment and Water Research, ID/EA-CSIC, Jordi Girona 18, 08034, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Department of Geology, University of Huelva, Campus “El Carmen,” 21071, Huelva, Spain

### ABSTRACT

Metal removal and neutralization of acid mine drainage (AMD) in treatment systems is often controlled by addition of alkaline reagents and metal hydrolysis reactions. To overcome the disadvantage of high cost by conventional treatments, the use of paper mill wastes was evaluated as an alkaline additive to treat AMD at sites within the Iberian Pyrite Belt (IPB) through batch experiments in the laboratory. Paper wastes include three by-products from kraft pulping in a nearby mill: green liquor dregs, slacker grits, and lime mud. When paper mill wastes interacted with AMD, the initial pH increased up to circumneutral values and enhanced greatly the metal removal, reaching average ratios of up to 100% for Al, 98% for Fe, and 66% for Zn (major elements) and 100% for As, Cr, and Cu, 84% for Cd, and 75% for Ni (minor elements). After reaction, gypsum and poorly crystalline Fe-Al oxy-hydroxides and oxy-hydroxysulfates were the main precipitates identified by X-ray diffraction and scanning electron microscopy. Trace metal uptake is mainly attributed to co-precipitation and/or adsorption onto the newly formed Fe-Al precipitates. Geochemical modeling of solutions using the PHREEQC code predicted supersaturation of the observed phases. The experimental results were optimized with the PHREEQC code and combined with the annual production of each waste to quantify the extent of a possible treatment at field-scale. According to our estimations, the system proposed is able to treat effectively an annual total volume of 11.6 hm<sup>3</sup>, which is equivalent to a mean discharge of 368 L/s. Green liquor dregs alone would be able to treat 86% of the total volume. This result demonstrates the possibility of using alkaline paper mill wastes for treatment and restoration of worldwide natural resources extremely contaminated by AMD such as the IPB.

**Keywords:** Acid mine drainage, treatment, paper mill wastes, Iberian Pyrite Belt

### INTRODUCTION

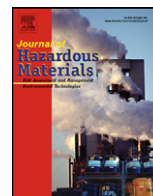
The generation of acid mine drainage (AMD) from oxidation of sulfide-bearing wastes is a worldwide problem due to the release of free acidity and dissolved metal(loid)s to environmental receptors (Younger 1997; Olías et al. 2006). The Iberian Pyrite Belt (IPB; SW Iberian Peninsula, Spain and Portugal) is one of the most outstanding massive sulfide provinces in the world since it contains more than 80 deposits and about 1700 Mt of reserves (Sáez et al. 1999). Long-term mining in the region has generated a large volume of AMD, which is drained by the Tinto and Odiel river basins in the Province of Huelva, impacting on the quality of stream sediments, water, and soils (e.g., Morillo et al. 2002; Olías et al. 2006; Fernández-Caliani et al. 2009). Recent studies have shown that the Tinto and Odiel rivers discharge an enormous amount of metals such as Fe (7900 t/yr), Al (5800 t/yr), Zn (3500 t/yr), Cu (1700 t/yr), and Mn (1600 t/yr) into the Estuary of Huelva, and hence into the Atlantic Ocean (Nieto et al. 2007).

Acid mine drainage treatment systems can be categorized as: active or passive technologies (Johnson and Hallberg 2005).

Passive treatment systems rely on natural water flow and biogeochemical reactions without the use of energy and continuous addition of chemical reagents, and hence, these technologies are receiving much more attention recently (PIRAMID Consortium 2003). Some examples of passive traditional systems are: anoxic limestone drains (ALD; Watten et al. 2005) or reducing and alkalinity producing systems (RAPS; Jage et al. 2001). However, the traditional treatments in the IPB have short lifetimes due to clogging of the porosity as a consequence of the very high metal concentrations of the AMD in this region (Nieto et al. 2007). Albeit, a novel reactive material, so-called dispersed alkaline substrate (DAS), consisting of inert pine wood shavings to increase porosity and reduce clogging and a fine-grained reagent (e.g., limestone or caustic magnesia), is showing very promising results at present (Rötting et al. 2008a; Caraballo et al. 2009a).

The use of other alkaline reagents such as wollastonite from the Aracena skarn deposit in Huelva (Fernández-Caliani et al. 2008), calcium or lime mud from cellulose pulp production in Huelva (Pérez-López et al. 2010) or fly ash from coal combustion in Los Barrios power plant (Pérez-López et al. 2007; Quispe et al. 2010) is being investigated as alternatives to limestone or magnesia to treat acidic waters and sulfide-rich wastes from the

\* E-mail: rafael.perez@dgeo.uhu.es



# Neutralization of acid mine drainage using the final product from CO<sub>2</sub> emissions capture with alkaline paper mill waste

Rafael Pérez-López<sup>a,b,\*</sup>, Julio Castillo<sup>b</sup>, Dino Quispe<sup>b</sup>, José Miguel Nieto<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Institute of Environmental Assessment and Water Research, IDÆA – CSIC, Jordi Girona 18, 08034 Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Department of Geology, University of Huelva, Campus 'El Carmen', 21071, Huelva, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 3 November 2009

Received in revised form

21 December 2009

Accepted 22 December 2009

Available online 4 January 2010

### Keywords:

Paper waste

CO<sub>2</sub> sequestration

Acid mine drainage

Neutralization

Trace elements

## ABSTRACT

In this study, experiments were conducted to investigate the applicability of low-cost alkaline paper mill wastes as acidity neutralizing agents for treatment of acid mine drainage (AMD). Paper wastes include a calcium mud by-product from kraft pulping, and a calcite powder from a previous study focused on sequestering CO<sub>2</sub> by carbonation of calcium mud. The neutralization process consisted of increase of pH by alkaline additive dissolution, decrease of metals solubility and precipitation of gypsum and poorly crystallized Fe–Al oxy-hydroxides/oxy-hydroxysulphates, which acted as a sink for trace elements to that extent that solutions reached the pre-potability requirements of water for human consumption. This improvement was supported by geochemical modelling of solutions using PHREEQC software, and observations by scanning electron microscope and X-ray diffraction of reaction products. According to PHREEQC simulations, the annual amount of alkaline additive is able to treat AMD (pH 3.63, sulphate 3800 mg L<sup>-1</sup>, iron 348 mg L<sup>-1</sup>) with an average discharge of about 114 and 40 L s<sup>-1</sup> for calcium mud and calcite powder, respectively. Likewise, given the high potential of calcium mud to sequester CO<sub>2</sub> and of resulting calcite powder to neutralize AMD, paper wastes could be a promising solution for facing this double environmental problem.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Acid mine drainage (AMD) is an inevitable wastewater of the mining industry characterized by its strongly acidic nature and significant levels of metal ions, especially iron, and sulphate. AMD results from the percolation of water through sulphide minerals from waste disposal sites in sulphide-mining districts, generally pyrite, which oxidizes and dissolves when in contact with air and water. These discharges are typically the first cause of environmental deterioration of fluvial courses, groundwater and soils. Treatment of AMD can take two basic ways: active and passive techniques [1]; albeit, passive technologies have received much more attention recently since the improvement of water quality occurs using only naturally available energy sources and, once built, require sporadic maintenance [2]. The most common passive systems to treat AMD are anoxic limestone drains (ALD; [3]), reducing and alkalinity producing systems (RAPS; [4]) and the dispersed alkaline substrate (DAS; [5]).

Most of AMD treatment systems use limestone as an acidity neutralizing agent in order to increase pH and enhance metal pre-

cipitation (e.g. [6]). However, the use of limestone implies a high economic and environmental cost because limestone is usually a “resource” and not a “residue”. The objective of integrated waste management is the search for sustainable development, i.e. to balance the fulfilment of human needs with the protection of the natural environment in the present and indefinite future. With this in mind, the current work is focused on recycling a waste as an alkaline additive in passive treatment systems in a geological setting that represents a clear example of an AMD-affected region, in addition to suffering other huge environmental problems. Ideally, the perfect additive for the AMD treatment must fulfil the following requirements: high acid neutralizing potential, low-cost and production close to the environmental problem.

## 2. Objectives and environmental setting

This research was carried out in the Province of Huelva (SW, Spain), which is characterized from an environmental point of view by two continuous pollution sources: abandoned mining activity from the Iberian Pyrite Belt (IPB) and the present industrial activity from the Huelva Industrial State. IPB, located at approx. 50 km from the city of Huelva, is one of the most important metallogenetic provinces of polymetallic massive sulphides in the world [7]. The zone waked up the economic and commercial interest of numerous civilizations from immemorial times [8]. The result of the intense

\* Corresponding author at: Department of Geology, University of Huelva, Campus 'El Carmen', 21071 Huelva, Spain. Tel.: +34 95 921 9826; fax: +34 95 921 9810.

E-mail address: [rafael.perez@dgeo.uhu.es](mailto:rafael.perez@dgeo.uhu.es) (R. Pérez-López).