

# Tratamiento microbiano de aguas ácidas resultantes de la actividad minera: una revisión

• José Santiago Pozo-Antonio\* •  
Universidade de Vigo, España

\*Autor para correspondencia

• Iván Puente •  
Escuela Naval Militar, España

• Susana Lagüela •  
Universidad de Salamanca, España

• María Veiga •  
Universidade de Vigo, España

## Resumen

Pozo-Antonio, J. S., Puente, I., Lagüela, S., & Veiga, M. (mayo-junio, 2017). Tratamiento microbiano de aguas ácidas resultantes de la actividad minera: una revisión. *Tecnología y Ciencias del Agua*, 8(3), 75-91.

La oxidación de minerales sulfurados presentes en los residuos de actividad minera de yacimientos polimetálicos con sulfuros, especialmente piritita u otros, como calcopiritita o pirrotina, genera drenajes ácidos de mina (AMD, por sus siglas en inglés, *acid mine drainage*) ricos en elementos potencialmente tóxicos, que pueden contaminar a los cuerpos de agua vulnerables, ya sean superficiales o profundos. La oxidación de la piritita y, en menor grado, la de otros sulfuros, por la acción del aire y agua tiene lugar a través de dos tipos de mecanismos: uno de naturaleza inorgánica, debido al oxígeno molecular o al ion férrico; y otro con intervención biótica, fundamentalmente de bacterias oxidantes del azufre y del hierro. La necesidad de mitigar y prevenir la formación de AMD ha promovido el desarrollo de numerosas investigaciones sobre los mecanismos de oxidación y su prevención. Los resultados de las investigaciones han sido la base del desarrollo de tecnologías de prevención o control basadas en procedimientos físicos, químicos y biológicos; el uso de medidas microbiológicas es la menos dañina para el medio ambiente, dado que se trata de seres presentes en el mismo y que no conlleva la adición de agentes artificiales. El objetivo de esta revisión es examinar la documentación centrada en técnicas que actúan sobre los microorganismos oxidantes de Fe inhibiendo su actividad (técnicas preventivas) y en el empleo de microbios que reducen la acidez de los AMD ya generados (técnicas de remediación).

**Palabras clave:** AMD, *Thiobacillus ferrooxidans*, microorganismos, piritita, remediación, minería.

## Abstract

Pozo-Antonio, J. S., Puente, I., Lagüela, S., & Veiga, M. (May-June, 2017). Microbial treatment of acid mine drainage (AMD): A review. *Water Technology and Sciences (in Spanish)*, 8(3), 75-91.

The oxidation of sulfide minerals, present in many current and historical abandoned mining activities of polymetallic deposits with sulphide, especially pyrite or others as pyrrhotite or chalcopyrite, generates acid mine drainage rich in potentially toxic elements that can contaminate sensitive water bodies, either superficial or deep. Pyrite oxidation and to a lesser extent, that of other sulfides, upon exposure of air and water, is conducted via two mechanisms: one of inorganic nature, due to the molecular oxygen or the ferric ion; and another mechanism with biotic intervention, mainly sulphur or iron-oxidizing bacteria. The need to mitigate and prevent AMD formation, has promoted the development of numerous studies on the oxidation mechanisms and AMD prevention. The research findings have been the basis for the development of prevention or control technologies based on physical, chemical and biological processes, the latter being much less harmful to the environment, given that they are already present there and it does not entail the addition of artificial agents. The aim of this review is to examine documentation focused on techniques that inhibit the action of the iron-oxidizing bacteria (prevention techniques) and the use of microbial communities to reduce the acidity of existing AMD (remediation techniques).

**Keywords:** AMD, *Thiobacillus ferrooxidans*, microorganisms, pyrite, remediation, mining.

---

Recibido: 15/09/2014  
Aceptado: 09/01/2017

---

## Introducción

Un gran número de ríos en el mundo presenta contaminación metálica derivada de los procesos de oxidación de sulfuros resultantes de actividades mineras (Battaglia-Brunet *et al.*, 2012; García-Moyano, González-Toril, Aguilera, & Amils, 2012; Klein, Tischler, Muhling, & Schlomann, 2013), como es el caso del río Spree en Alemania, en el cual se calculó que durante 2015 se descargaron 130 000 toneladas de sulfato (Sonntag, 2007). Los drenajes ácidos de mina (AMD del inglés, *acid mine drainage*) contienen concentraciones de sulfato desde gramos hasta cientos de gramos por litro (Nordstrom, Alpers, Ptacek, & Blowes, 2000; Blowes, Ptacek, Jambor, & Weisener, 2003). Los minerales responsables de la generación de los AMD son los sulfuros de hierro (pirita,  $\text{FeS}_2$  y la pirrotita,  $\text{Fe}_{1-x}\text{S}$ ) y, en menor medida, calcopirita, marcasita, esfalerita, etcétera, los cuales son estables e insolubles en ausencia de agua y oxígeno atmosférico (González-Toril, Llobet-Brossa, Casamayor, Amann, & Amils, 2003; Johnson, 2003; Árcega-Cabrera, Castillo-Blum, & Armienta, 2010). La gestión eficaz de los AMD y la corrección de los impactos que producen sólo es posible si se conocen los procesos que influyen en la liberación y transporte de los elementos potencialmente tóxicos, en particular de los denominados metales pesados (Armienta, Talavera, Morton, & Barrera, 2003; Árcega-Cabrera *et al.*, 2010; Inocencio-Flores, Velázquez-Machuca, Pimentel-Equihua, Montañez-Soto, & Venegas-González, 2013).

Dada la posibilidad de acceso de los AMD a sistemas hidrológicos superficiales o a sistemas acuíferos subterráneos que sean utilizados para el consumo humano o industrial, en los últimos años se ha invertido tiempo y dinero en la investigación centrada en técnicas correctoras y preventivas de los AMD (Gallert & Winter, 2002). Su formación ha sido ampliamente reconocida como uno de los grandes problemas ambientales en muchas regiones mineras (Cohen-Ronald, 2006; Johnson, 2003; Hallberg, 2010; García-Moyano *et al.*, 2012). Por lo tanto, existen normativas europeas (European Union's

Water Framework Directive) que regulan la cantidad de sulfato en las aguas.

La necesidad de prevenir la formación de AMD ha provocado el desarrollo de investigaciones sobre los mecanismos de oxidación y su prevención (Nordstrom *et al.*, 2000; Johnson & Hallberg, 2003, 2005; Hallberg, 2010). La información generada sobre el tema es poca debido a que la oxidación de los sulfuros es compleja y sus efectos pueden variar de manera enorme entre distintos lugares y condiciones (Klein *et al.*, 2013).

En el ámbito internacional, entre las entidades preocupadas por el control de los AMD se tiene a las siguientes:

- International Network for Acid Prevention (INAP): agrupación de empresas de minería comprometida con el control de los AMD.
- Mine Environment Neutral Drainage Program (MEND): organismo fundado por el gobierno canadiense, con el objetivo de desarrollar tecnologías para reducir los efectos de los AMD.
- Acid Drainage Technology Initiative (ADTI): grupo de EUA que incluye representantes de empresas, estado, gobiernos federales y universidades.
- Partnership for Acid Drainage Remediation (PADRE): comisión europea de la International Mine Water Association (IMWA), destinada al estudio de mejores prácticas en la remediación de los AMD de minas en activo y abandonadas en Europa.

### *Mecanismo de oxidación y disolución de iones potencialmente tóxicos*

Una aproximación al mecanismo de degradación de la calidad del agua por introducción de metales pesados disueltos procedentes de actividades mineras sigue los pasos del esquema de la figura 1.

Los sulfatos formados en la cuarta etapa se vuelven a disolver cuando el drenaje ácido deja de funcionar o se producen otros aportes de aguas más puras, que quedan contaminadas

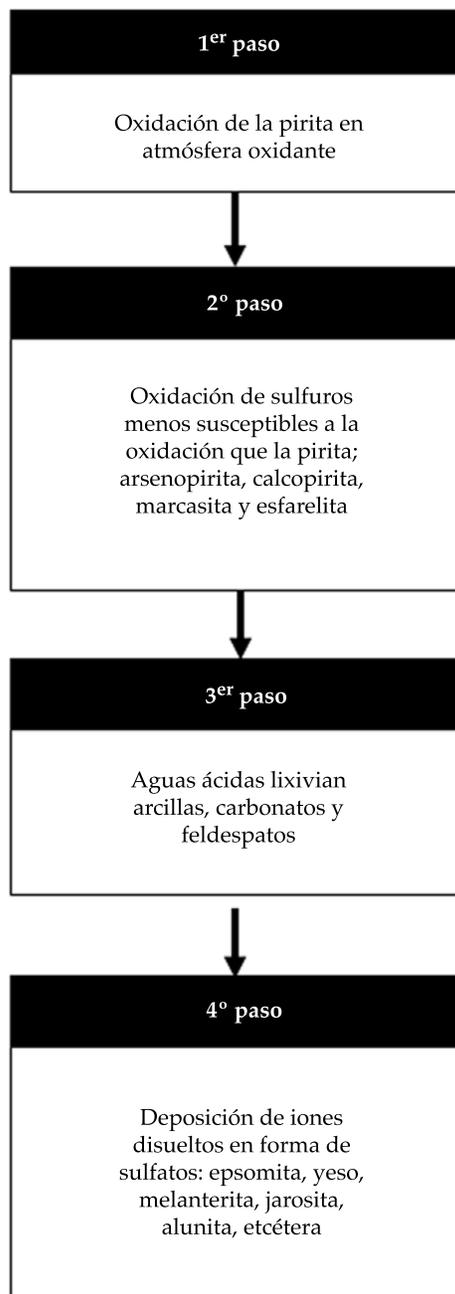


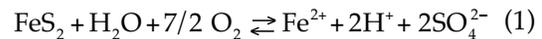
Figura 1. Pasos o etapas de formación de AMD. Fuentes: Baker y Banfield, 2003; Hallberg, 2010.

en poco tiempo. El resultado final es que los cuerpos de agua se acidifican y presentan altas concentraciones de sulfatos, cationes alcalinos y elementos potencialmente tóxicos, como los denominados metales pesados.

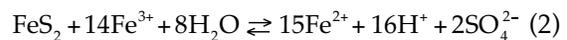
La pirita se oxida a sulfatos, siendo esta reacción catalizada por actividad bacteriana, generando acidez y liberando hierro en forma iónica (Hallberg, 2010). Una vez que este fenómeno se ha iniciado es muy difícil controlarlo sin un coste elevado (Cruz & Monroy, 2006), por lo que se requiere de técnicas predictivas eficientes para poder proponer medidas de prevención y control.

Existen dos mecanismos de oxidación (Nancucheo & Barrie-Johnson, 2011):

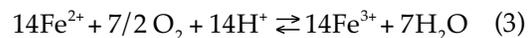
1. Reacción directa del oxígeno con la pirita para dar lugar a iones sulfato y acidez. Se trata de un mecanismo inorgánico, donde el agente oxidante es el oxígeno. Este mecanismo se corresponde con la reacción (1):



2. Sustitución del oxígeno por el ion férrico, actuando como oxidante (2). Se trata de otro mecanismo inorgánico:



Para que esta reacción tenga lugar es necesaria una reacción previa (3), donde el ion ferroso se oxida *in situ* (Singer & Stumm, 1970):



Otros minerales sulfuros son oxidados de forma similar a la pirita, dando lugar a metales y sulfatos en disolución; los AMD contienen diversos metales, por ejemplo Cu, Fe, Zn, Al, Pb, As, Cd, etcétera, en concentraciones tóxicas. En el AMD (pH = 3.0) de mina de cobre se pueden registrar las siguientes concentraciones: Co (9.00 mg/l); Cu (45.50 mg/l); Fe (435.00 mg/l); Mn (7.21 mg/l); Ni (3.80 mg/l); Pb (7.50 mg/l); Zn (7.00 mg/l), y sulfato (3 360.00 mg/l) (Sahinkaya & Yucesoy, 2010; Sahinkaya, Dursun, Ozkaya, & Kaksonen, 2013).

### Factores abióticos y bióticos involucrados en la oxidación

La producción de acidez se ve muy favorecida por la finura de grano de la pirita y se ve influenciada, entre otros factores, por la temperatura, velocidad de penetración del oxígeno, humedad o las características hidrogeológicas del lugar (Stumm & Morgan, 1981).

La oxidación del Fe es un mecanismo dependiente del pH y Eh. La actividad microbiana aumenta la velocidad de formación de AMD y puede ser responsable de la mayor parte del AMD generado, principalmente por poblaciones de bacterias quimiolitotróficas acidófilas o neutrofilas, cuyos mecanismos de actuación son diferentes (Bonney & Holmes, 2012; Dopson & Johnson, 2012; Klein et al., 2013; Ilbert & Bonney, 2013). Las principales bacterias oxidantes de Fe en la formación de los AMD son las acidófilas del género *Thiobacillus* y las neutrófilas *Gallionella ferrugineala* y *Leptothrix* sp. (Hedrich et al., 2011; Klein et al., 2013), aunque pueden contribuir también otros grupos, como el *Leptospirillum* sp., que llevan el pH a valores menores de cuatro, donde ya puede intervenir *Thiobacillus* (Baker & Banfield, 2003; Johnson & Hallberg, 2003; Schippers et al., 2010; Korehi, Bloethe, & Schippers, 2014; Joshi 2014; Jones et al., 2015). El principal nutriente de estas bacterias autótrofas es el CO<sub>2</sub> (Stumm & Morgan, 1981). También es un importante nutriente el fósforo que se encuentra en trazas en los AMD (Banks, Younger, Amesen, Iversen, & Banks, 1997). El fosfato precipita como fosfatos de Fe o es adsorbido a minerales férricos (Stumm & Morgan, 1981). Otro nutriente importante es el nitrógeno presente en los nitratos que habitualmente se encuentran en los AMD como consecuencia del uso de explosivos de N en las actividades mineras (Banks et al., 1997). Otra fuente importante de N es el amonio, cuya falta puede provocar la reducción de la actividad bacteriana (Tuovinen, Panda, & Tsuchiya, 1979).

Mientras que la oxidación del ion ferroso es termodinámicamente favorable, su cinética es muy lenta cuando los valores de pH son

menores que cuatro. Sin embargo, las bacterias oxidantes *Thiobacillus ferrooxidans* utilizan la energía y pueden aumentar de forma significativa su tasa de oxidación (IPAT-UNESCO, 2000). Las bacterias que actúan como catalizadores aceleran esta reacción de 4 a 50 veces, con el consiguiente aumento de la acidez de las aguas (Johnson & Hallberg, 2003).

Por tanto, existen diversos procedimientos de naturaleza física, química y biológica para inhibir o reducir la acidez de los AMD. Esta revisión está centrada en las técnicas que actúan sobre los microorganismos oxidantes del Fe inhibiendo su actividad (técnicas preventivas), a través del empleo de bacterias, detergentes aniónicos, conservantes biológicos o vegetación, y en aquellas estrategias centradas en el empleo de microorganismos que reducen la acidez de los AMD (técnicas de remediación), en particular a través del uso de microbios transformadores de azufre y de metales, y la creación de humedales.

### Prevención: inhibición microbiana de los AMD

Tal y como afirmaron Johnson y Hallberg en su revisión bibliográfica, es considerablemente más rentable tratar el residuo y prevenir las condiciones que causan el deterioro que tratar las aguas ya degradadas (Johnson & Hallberg, 2005). La naturaleza del problema de acidez depende del origen del residuo minero y su grado de meteorización, y esto debe tenerse en cuenta para determinar el método adecuado para el postratamiento. El uso final deseado del área que ocupan los residuos mineros potencialmente generadores de AMD es también un factor crucial para la elección de las acciones de prevención. Los microorganismos influyen en la movilidad de los metales en el residuo de mina de muchas maneras. Algunos microorganismos causan una movilización del metal, mientras que otros contribuyen a que la disponibilidad del metal sea limitada (Solano, 2005; Hallberg, 2010). La influencia de los microorganismos en la movilidad del metal depende de cuál de estos procesos domina.

Los métodos centrados en la adición de sustancias para inhibir la formación de AMD pueden influir directamente sobre los microorganismos oxidantes o intervenir sobre toda la comunidad microbiana. En este último caso se encuentran ventajas, porque estas sustancias pueden mejorar la calidad de las aguas drenadas. Sin embargo, en la mayoría de los casos, para que los efectos sean permanentes, la aplicación de las sustancias inhibidoras tiene que ser repetida. Los experimentos realizados no han sido suficientemente prolongados como para determinar si los efectos del tratamiento sobre los microorganismos son permanentes. Sin embargo, algunos estudios indican que los efectos permanecen tras la degradación del inhibidor (Bernardes de Souza & Mansur, 2011). Se debe prestar especial atención a que los productos químicos antibacterianos utilizados sean compuestos que respeten el medio ambiente y no generen otros daños ambientales.

Los mecanismos de control de los mecanismos de liberación de iones de metales tóxicos pueden deberse a:

- Bacterias libres que constituyen partículas suspendidas móviles que pueden tener una capacidad de absorción del metal más elevada que las del ambiente circundante.
- Crecimiento de las bacterias, que se lleva a cabo en biopelículas formadas en las superficies de los minerales, lo cual los protege de la solubilización y, en consecuencia, reduce el transporte de los metales.

Además de estos mecanismos, Nancuqueo y Barrie-Johnson indicaron que los microorganismos producen agentes complejantes y otros metabolitos que pueden transformar los metales tóxicos en formas más o menos solubles, afectando el grado de solubilidad y movilidad (Nancuqueo & Barrie Johnson, 2011, 2014).

Desde el punto de vista microbiano, las posibles influencias de los microorganismos en el estado químico (especiación) y, en consecuencia, en la movilidad del metal, son numerosas y

complejas, abarcando desde procesos directos, como la transformación del metal y la fijación intracelular, a influencias más indirectas a través de la producción de sustancias que hacen que el metal sea más o menos móvil a través de la complejación. Tales procesos pueden ocurrir en el ambiente que prevalece en los residuos mineros con alta concentración de metales y pueden ser determinantes para la magnitud del impacto ambiental de los residuos de mina (Bernardes de Souza & Mansur, 2011). Estas interacciones entre metales y microorganismos pueden perturbarse por la presencia de otros compuestos, como minerales arcillosos, aniones inorgánicos, cationes competentes, materia orgánica complejante, etcétera. Los metales pueden llegar a estar hidratados, quelados o adsorbidos por estos compuestos, lo cual puede hacer que el metal esté menos disponible para la interacción microbiana.

Los microorganismos participan en el ciclo del carbono y por lo tanto influyen en la cantidad y carácter de la materia orgánica, y en la cantidad y tipo de agentes quelantes orgánicos capaces de unirse a los metales. En general, el tamaño del compuesto de coordinación entre el metal y el ligante orgánico determina si el complejo es móvil o inmóvil en el ambiente. La degradación microbiana puede de este modo cambiar los compuestos metal-orgánicos inmóviles a móviles y/o a formas de metal solubles en agua o viceversa. Sin embargo, la coordinación de los iones metálicos con la materia orgánica disminuye su grado de degradación (Renella, Landi, & Nannipieri, 2004).

Estas técnicas bactericidas son efectivas para el control de la contaminación del agua durante las fases de laboreo y de preparación de las escombreras, considerándose tecnologías más económicas al minimizar el tratamiento posterior del agua y sus costes asociados (Ohimain, Andriesse, & Van Mensvoort, 2004). Ohimain *et al.* señalan la persistencia del cambio que producen estas técnicas en la microbiología de las escombreras una vez desaparecido el bactericida, permitiendo así la estabilidad de la escombrera restaurada (Ohimain *et al.*, 2004).

Dentro de estas técnicas microbianas existen hoy en día cuatro líneas de investigación fundamentales: la inhibición bacteriana biológica (Johnson, Rolfe, Hallberg, & Iversen, 2001; Yang et al., 2008); el empleo de detergentes aniónicos (Li, Qi, & Liu, 2009; Urbanová et al., 2011); el uso de sustancias orgánicas conservantes (Bhatnagar & Singh, 1991), y la aplicación de vegetación (Johnson & Hallberg, 2005), siendo el empleo de medidas microbiológicas mucho menos dañina para el medio ambiente, siempre que no implique la adición de agentes artificiales.

#### a) Inhibición bacteriana biológica

En la mina de Richmond, en el norte de California, se han realizado estudios con 16 especies distintas de microorganismos, identificando a los taxones procarióticos como los mejores inhibidores de la humificación en condiciones de pH 1, y temperaturas oscilantes entre 30 y 50 °C (Johnson et al., 2001).

Asimismo, se ha observado una marcada inhibición en la degradación del citrato por la *Klebsiella oxytoca* cuando metales como Al, Cd, Co, Cu y Zn se enlazan con un anión orgánico (Renella et al., 2004).

Por otro lado, existen bacterias del género *Caulobacter* que inhiben la formación de ácido en desechos piríticos. Análisis de laboratorio han permitido calcular la reducción en costes de neutralización y almacenamiento de lodos ácidos gracias a ellas (Yang et al., 2008).

#### b) Inhibición bacteriana por medio del uso de detergentes aniónicos

La inhibición de las bacterias oxidantes del Fe (*Thiobacillus ferrooxidans*) se puede conseguir con diversas sustancias, como los surfactantes aniónicos, que han demostrado lograr la inhibición de modo económico y ambientalmente seguro (Li et al., 2009).

El lauril sulfato sódico (SLS, por sus siglas en inglés *sodium laureth sulfate*) es bastante efectivo en la limitación de la población bacteriana (Li et al., 2009). Muestras que contienen SLS en

concentraciones ascendentes de 5 a 25 ppm muestran un descenso proporcional del cultivo bacteriano hasta detenerlo para 30 ppm. De esta forma, el SLS en concentraciones de 30 ppm y superiores provocará que la acidez y la concentración de hierro sean fuertemente reducidas (Li et al., 2009). En concentraciones bajas, el SLS actúa alterando las propiedades semipermeables de la membrana citoplasmática de la bacteria, permitiendo así la entrada de hidrogeniones en la celda, lo que da lugar a disfunciones en el metabolismo y a una reducción en la velocidad de oxidación del hierro. Las concentraciones elevadas de SLS dañarán de tal modo la membrana que matarán a las bacterias (Urbanová et al., 2011). El SLS se administra con riego por aspersión en soluciones diluidas sobre las escombreras de forma que queden saturados los 30 cm superficiales, donde se produce fundamentalmente la oxidación. Con el paso del tiempo y las precipitaciones, el producto irá profundizando. El SLS se ha mostrado ineficaz en algunas ocasiones, por lo general en zonas con elevadas precipitaciones y baja capacidad de adsorción de los materiales piríticos (Li et al., 2009).

La adición de pequeñas cantidades de surfactantes aniónicos desde el inicio de formación de las escombreras impide la proliferación de bacterias ferroxidantes. De esta manera, las raíces de la vegetación, que requieren oxígeno, comenzarán a desarrollarse de manera adecuada, formándose un ambiente reductor que impedirá ya desde el inicio la degradación ácida de los materiales presentes en la escombrera (Ohimain et al., 2004).

#### c) Inhibición bacteriana por medio del uso de conservantes biológicos

Se trata de una técnica que utiliza sustancias orgánicas conservantes tóxicas para *Thiobacillus ferrooxidans*. No producen otro tipo de impacto ambiental y se mantienen perfectamente fijadas a los materiales de la escombrera.

Unas de las sustancias más investigadas y ensayadas por su eficiencia son el benzoato

sódico (SBZ por su nombre en inglés, *sodium benzoate*) y el sorbato potásico (PSB del inglés, *potassium sorbate*) (Bhatnagar & Singh, 1991). Cuando las muestras contienen unas concentraciones de inhibidor de hasta 30 ppm, se produce un descenso en la población bacteriana debido a la inhibición parcial, mientras que para concentraciones de 40 ppm y mayores, el SBZ y PSB reducen altamente los parámetros a controlar (Singh, Bhatnagar, & Sinha, 1990). Estas sustancias pueden reaccionar con aguas ácidas, precipitando sales orgánicas (sorbatos y benzoatos), que de ser redisueltas liberarán ácido benzoico y sórbico, también identificados como eficaces inhibidores de *T. ferrooxidans* (Bhatnagar & Singh, 1991). El PSB se ha mostrado como el inhibidor más eficaz, pero es también el más caro, mientras que el SBZ y el SLS presentan efectividad análoga, siendo el SBZ más barato.

#### d) Inhibición bacteriana por medio de la aplicación de vegetación

Los suelos de áreas descubiertas afectadas por la minería de arranque de carbón exhiben por lo general bajos pH y altas concentraciones de metales (Johnson & Hallberg, 2005). Las áreas con vegetación presentan pH elevados y tendrán mayores niveles de macronutrientes. Johnson y Hallberg detectaron que la diversidad de las familias de hongos en suelos con actividad minera es inferior, en comparación con áreas no explotadas (Johnson & Hallberg, 2005). La aplicación de vegetación sobre escombreras disminuye la producción de ácido a través de los siguientes fenómenos (Johnson & Hallberg, 2005):

1. La raíz compite por el oxígeno y la humedad con bacterias productoras de ácido.
2. El establecimiento de poblaciones de bacterias y hongos conlleva al consumo adicional de oxígeno y a la formación de ácidos orgánicos, que pueden inhibir las *T. ferrooxidans*.

3. Los niveles de dióxido de carbono en la escombrera aumentarán debido a la respiración de la raíz y la población bacteriana heterótrofa, creándose así un microambiente desfavorable para el desarrollo de las *T. ferrooxidans*.
4. La vegetación estabiliza la cubierta, protegiéndola del viento, la erosión e infiltración de agua.

Se usan dos enfoques generales en la revegetación de escombreras con niveles tóxicos de metales pesados (Johnson & Hallberg, 2005):

1. Un enfoque incluye la siembra de genotipos más o menos tolerantes al metal en el residuo.
2. El segundo enfoque es la adición de lodos de aguas residuales, composta o residuos similares a la superficie de las escombreras para facilitar la vegetación.

El establecimiento de la cubierta vegetal puede facilitarse usando plantas tolerantes al metal, empleando una capa de cubierta especial donde las plantas se siembran, adicionando fertilizantes, inoculando micorrizas y/o aplicando plantas en simbiosis con bacterias fijadoras del nitrógeno. De este modo se posibilita el crecimiento de plantas en los residuos, a pesar de su bajo contenido en materia orgánica y nutrientes, como nitrógeno y fósforo.

La elección de la vegetación es de particular importancia y se realiza considerando el lugar, las condiciones climáticas y los genotipos tolerantes a altas concentraciones del metal (Trumm, 2010). El éxito de la recuperación vendrá indicado por el aumento de la producción del suelo, a través de la acumulación continua de materia orgánica medida sobre la base de la acumulación de detritos, los contenidos en carbono y nitrógeno orgánico, y la proliferación de raíces. Todas estas características están fuertemente influenciadas por la actividad microbiana (Trumm, 2010).

La microflora del suelo es de gran importancia para el establecimiento de vegetación

saludable. Los vertederos de minas presentan a menudo bajos contenidos en nutrientes clave, como nitrógeno y fósforo, por lo que es esencial determinar el protagonismo de los microorganismos simbióticos (hongos micorrizas y bacterias fijadoras del nitrógeno) para mejorar el nivel de nutrientes de las plantas usadas para colonizar los residuos de mina (Visser, Straker, & Turchenek, 2010). La inoculación de micorrizas, combinada con arcilla expansiva y fertilizantes de nitrógeno y fósforo, obtuvo un óptimo desarrollo de plantas en una escombrera de una antigua mina de zinc (Pierzynski, Lambert, Hetrick, Sweeney, & Erickson, 2002).

Hay indicios de que las bacterias simbióticas fijadoras del nitrógeno pueden jugar un papel importante en la formación del suelo en los vertederos de minas (Chabbi & Rumpel, 2004). Las escombreras de una mina de uranio en Colorado fueron cubiertas de 15 a 20 cm de arena arcillosa, fertilizada principalmente con *Indian ricegrass* (*Oryzopsis hymenoides*), que se desarrolla en lugares donde ocurre la fijación del nitrógeno (Wullstein, 1980). La fijación del nitrógeno observada en este estudio evitó la necesidad de aplicar nitrógeno. La estabilización de las cubiertas arenosas es otra ventaja conseguida por la aplicación de pastos.

El correcto desarrollo del ciclo del nitrógeno en los ecosistemas de los ambientes de mina es necesario para la revegetación y la estabilidad a largo plazo (Reuben, Worwood, Carrigan, & Sorensen, 2011). Considérese que los residuos de mina no están siempre asociados con la falta de nitrógeno. Sorensen y Fresquez encontraron en áreas de vertederos de carbón en Nuevo México que el nitrógeno orgánico fósil asociado con el lodo y el carbón puede conducir a altos valores de nitrógeno total, amonio, nitrato y nitrito (Sorensen & Fresquez, 1991). Otro aspecto importante del ciclo del nitrógeno es la generación de acidez a través de la nitrificación, que puede dificultar la recuperación. Sin embargo, la desnitrificación consume protones y aumenta el pH.

Se ha demostrado que la adición de fangos residuales en lugar de fertilizantes inorgánicos tiene mejores resultados en el establecimiento y mantenimiento de la vegetación. Además, la

vegetación en los residuos de mina contaminados por metales pesados puede servir en ocasiones de pasto para animales, lo que generaría un problema mayor debido a la asimilación de los metales por parte del ganado y su correspondiente dispersión a otros grupos de la biosfera, provocando efectos tóxicos, incluso para el ser humano (Malik, 2004; Ahluwalia & Goyal, 2007).

El establecimiento de vegetación en áreas minadas puede influir de modo negativo en la movilidad del metal, pues los ácidos orgánicos producidos por la actividad microbiana o por las emanaciones orgánicas de plantas en la rizosfera cambian ampliamente la movilidad de los metales pesados (Schwab, Splichal, & Banks, 2006). En un estudio de campo en Kansas, centrado en la influencia de cuatro ácidos orgánicos principales muy comunes en ese suelo, como ácido fórmico, succínico, acético y láctico, se analizó la movilidad de metales pesados en residuos de mina y suelo no contaminado en condiciones de saturación. Los resultados no fueron concluyentes debido a la dificultad que conllevó su interpretación, porque todos los ácidos estaban presentes en todos los experimentos, incluso si no habían sido añadidos, y se encontraron dificultades para separar los efectos provocados por los ácidos orgánicos y los del pH. De todos modos, la adición de ácidos orgánicos indujo un aumento en la actividad microbiana y una mejora de la inmovilización microbiana del zinc, lo cual fue diferente a lo esperado (Schwab et al., 2006).

Aunque el objetivo inmediato de la recuperación es establecer una cubierta vegetal para prevenir la erosión del suelo, como objetivo a largo plazo están la estabilidad y el desarrollo del ecosistema del suelo. Por lo tanto, es crucial que la recuperación asegure una sucesión en el ecosistema para presentar condiciones tan estables como las del ambiente no perturbado.

### **Biorremediación: reducción de la acidez de los AMD**

Como la prevención no siempre es posible, los AMD ya generados deben ser tratados. Existen numerosas revisiones bibliográficas sobre este

tema (Klein et al., 2013; Sánchez-Andrea, Sanz, Bijmans, & Stams, 2014). Entre las técnicas microbianas encaminadas a reducir la acidez generada por las actividades mineras se encuentra el uso de microbios transformadores de azufre (Johnson & Hallberg 2005; Koschorreck, 2008; Muyzer & Stams, 2008; Barton & Fauque, 2009; Sheoran, Sheoran, & Choudhary, 2010; Klein et al., 2013); microbios transformadores de metales (Ehrlich, 2001; Wall & Krumholz, 2006), y uso de humedales (Younger, 2000; Batty & Younger, 2002; Weber, Werker, Gehder, Senger, & Legge, 2010; Guo & Cutrigh, 2015; Guo, Cutrigh, & Duirk, 2015).

a) Biorremediación por medio del uso de microbios transformadores de azufre

Los microorganismos procariotas capaces de reducir la concentración de azufre son fundamentalmente bacteria y *archaea*, y constituyen un grupo de más de 40 géneros (Klein et al., 2013), cuya actividad depende de su capacidad para oxidar sustancias orgánicas y transformarlas por completo en CO<sub>2</sub> (Sánchez-Andrea et al., 2014). Una selección de los microorganismos más empleados en la remediación de los AMD (Klein et al., 2013; Sánchez-Andrea et al., 2014) se encuentra en el cuadro 1.

Cuadro 1. Géneros empleados para reducir el azufre en los AMD. Fuentes: Klein et al., 2013; Sánchez-Andrea et al., 2014.

Filia	Clase	Género
<b>Bacterias</b>		
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Devosia/Pedomicrobium/Hyphomicrobium</i>
		<i>Nitrobacter</i>
		<i>Rhizobium</i>
		<i>Sphingomonas</i>
	Betaproteobacteria	<i>Thiobacillus</i>
		<i>Albidiferax</i>
	Gammaproteobacteria	<i>Enterobacter</i>
	Deltaproteobacteria	<i>Desulfobacterium</i>
		<i>Desulfobulbus</i>
		<i>Desulfomicrobium</i>
		<i>Desulfovibrio</i>
		<i>Geobacter</i>
	Firmicutes	Clostridia
<i>Anaerofustis</i>		
<i>Desulfosporosinus</i>		
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Cellulomonas</i>
Bacteroidetes	Bacteroidia	<i>Bacteroides</i>
		<i>Paludibacter</i>
<i>Chloroflexi</i>	<i>Anaerolineae</i>	<i>Longilinea</i>
<i>Spirochaetes</i>	<i>Spirochaetes</i>	<i>Spirochaeta</i>
<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacterium</i>
<b>Archaea</b>		
Euryarchaeota	<i>Methanobacteria</i>	<i>Methanobacterium</i>
	<i>Methanomicrobia</i>	<i>Methanobrevibacter</i>
		<i>Methanospirillum</i>
		<i>Methanosaeta</i>
		<i>Methanosarcina</i>
Crenarchaeota	<i>Thermoprotei</i>	<i>Thermocodium</i>
		<i>Caldivirga</i>

El proceso de reducción bacteriana de sulfatos ha sido utilizado principalmente en reactores biológicos a escala piloto (Tabak, Scharp, Burckle, Kawahara, & Govind, 2003; Newcombe & Brennan, 2010; Bekmezci, Ucar, Kaksonen, & Sahinkaya, 2011; Kumar, McCullough, & Lund, 2011; Sánchez-Andrea *et al.*, 2014). En una de estas investigaciones se desarrolló un sistema para tratar agua contaminada por metales de una mina de carbón y un vertedero de residuos fundidos en Pensilvania, usando composta de champiñón como una fuente de carbono orgánico para la reducción bacteriana de sulfato (Newcombe & Brennan, 2010). La composta de champiñón contenía caliza, que añadía alcalinidad al sistema. Las concentraciones de Fe, Zn, Mn, Ni y Cd se vieron disminuidas en más del 95% debido a la precipitación de los metales dentro de los reactores. El pH en uno de los sistemas aumentó desde 3.7 en el afluente hasta 6.9 en el vertido. Los efectos beneficiosos del tratamiento pueden ser por una precipitación del metal, dependiendo del pH en el reactor (Newcombe & Brennan, 2010).

En el campo, el sulfuro de hidrógeno (gas tóxico) se pierde en la atmósfera como resultado de la reducción de sulfato que se produce cuando la acumulación de materia orgánica (hojas, césped y otros compuestos orgánicos) se acumula en los lagos ácidos de mina. La sucesión natural microbiana es acelerada por la adición de materia orgánica, de preferencia con un contenido bajo de nitrógeno y fósforo (Kumar *et al.*, 2011). El sulfuro de hidrógeno se emite a la atmósfera a pH próximos a 6 y 7, y por lo tanto se elimina acidez del sistema.

Kumar *et al.* concluyeron que la ventaja de este método como medida de recuperación de lagos de minas ácidas radica en que el pH se eleva, y la acidez y el azufre se pierden sin crear un problema de lodos químicos (Kumar *et al.*, 2011). Otra ventaja es que los residuos orgánicos pueden servir como material crudo para el proceso, eliminando por lo tanto otro problema de residuos. Sin embargo, estas investigaciones fueron hechas en laboratorio, sin comprobarse su efectividad en el campo.

Debe mencionarse que para algunos tipos de residuos de mina, la reducción de sulfato con la adición de compuestos orgánicos debe evitarse, ya que puede causar un problema de contaminación mayor. Por ejemplo, en algunas minas de uranio, el radio soluble es eliminado como un coprecipitado con bario mediante la adición de cloruro de bario y colas de efluentes ricas en sulfato. Estudios de laboratorio probaron que la adición de un sustrato de carbono exógeno provoca que la reducción de sulfato disuelva el sulfato de radio y bario (Fedorak *et al.*, 1986).

No se conoce ninguna bacteria que forme azufre elemental directamente mediante la reducción del sulfato, así que para esto se necesita un cultivo mixto, que conste de bacterias reductoras de sulfato que conviertan el sulfato en sulfuro y unas bacterias oxidantes del sulfuro que transformen el sulfuro en azufre elemental. Sin embargo, Tabak *et al.* desarrollaron un proceso biológico para la eliminación de sulfato del efluente de una mina abandonada usando melaza como fuente de carbono orgánico en un reactor de lecho fijo anaeróbico con flujo ascendente (Tabak *et al.*, 2003). Las bacterias reductoras de sulfato que viven simbióticamente con bacterias de azufre fotosintéticas cooperaron para convertir el sulfato vía sulfuro en azufre elemental.

#### b) Biorremediación por medio del uso de microbios transformadores de metales

Algunos procesos de oxidación, como la oxidación del hierro ferroso y manganeso manganeso, pueden llevar a la precipitación de los mismos. Los productos de la oxidación pueden estar acumulados en la superficie de la célula microbiana o estar precipitados sin relación con las células (Ehrlich, 2001). Los procesos de reducción darían lugar también a la precipitación, como la reducción del selénico o selenioso a selenio metálico. Sin embargo, la precipitación estará restringida a la tolerancia al metal del organismo activo involucrado en el proceso (Ehrlich, 2001). En un estudio previo, bacterias pertenecientes al género *Clostridium*, actuando

junto con la *Desulfovibrio*, proporcionaron una disminución de las concentraciones de selenio, uranio, molibdeno y sulfato, mediante la conversión de sulfato a hidrógeno sulfuro, que después reaccionó con iones de uranio y molibdato para formar precipitados insolubles. El selenio fue rebajado de 1.6 mg.l<sup>-1</sup> a menos de 0.5 mg.l<sup>-1</sup>, probablemente por la reducción microbiana del selénico y selenioso solubles a selenio metálico insoluble (Wall & Krumholz, 2006).

c) Biorremediación por medio de la creación de humedales

Los humedales, tanto los naturales como los creados artificialmente, podrían ser adecuados para el tratamiento de los AMD. Este método ha recibido mucha atención, pues es relativamente barato. La consideración primordial al diseñar un humedal es la de proporcionar un sistema biológico que sea autogenerador y que también tenga la habilidad de amortiguar amplias fluctuaciones de la calidad del agua, condiciones climáticas y flujo (Johnson & Hallberg, 2005). Los humedales son por lo general sistemas de tratamiento de agua residual de bajo mantenimiento, incluyendo en éste la eliminación periódica y adición de caliza y biomasa, dragado, aumento del sedimento y control de plagas, como insectos.

Los sistemas de tratamiento por humedales artificiales, que se basan en los mismos procesos físicos, químicos y biológicos que tienen lugar en los humedales naturales, se clasifican en los siguientes dos tipos principales y se ilustran en la figura 2 (Johnson & Hallberg, 2005):

- Sistemas de flujo libre (FWS, por sus siglas en inglés *free water surface*): el nivel de agua está sobre la superficie del terreno (la superficie de agua está expuesta a la atmósfera) y el agua fluye a una baja velocidad a través de la vegetación del pantano en cuencas superficiales o canales.
- Sistemas de flujo subsuperficial (SFS, por sus siglas en inglés *sub-surface flow sytem*): similares a los FWS, pero el agua fluye a través del sustrato, estando el nivel de agua por debajo de la superficie del terreno. Aunque requieren menos área son más difíciles de mantener. Tienen la ventaja de no producir olores ni mosquitos, pero los procesos en su interior son anaerobios.

Se llevan a cabo diversos procesos biológicos para mejorar la calidad del agua en los humedales: oxidación bacteriana; fijación del metal por parte de plantas y microorganismos; precipitación del metal, como sulfuros; adsorción por fases sólidas (Pulford, 1991). No está claro

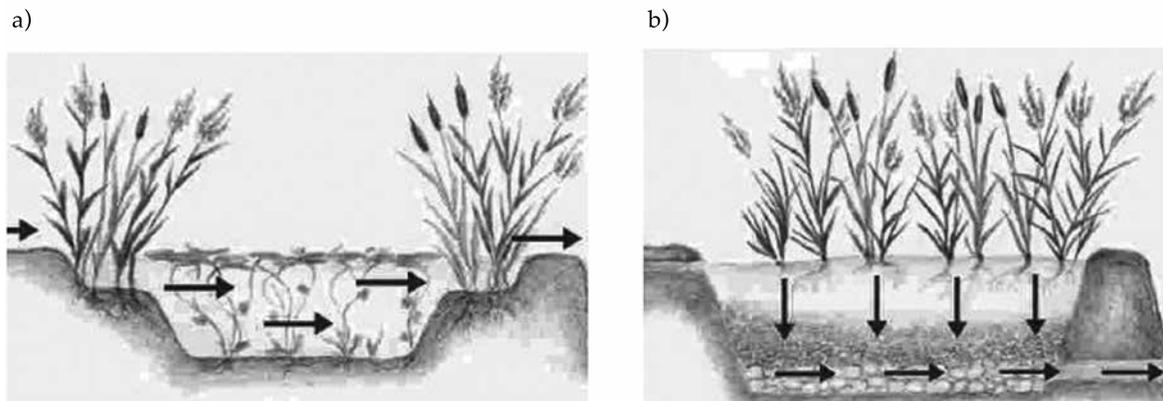


Figura 2. a) Sistema de flujo libre; b) sistema de flujo subsuperficial. Fuente: <http://www.ideassonline.org/>.

cuál de estos procesos es el más importante para tratar los AMD y puede diferir entre ubicaciones. Algunos enfoques en los humedales buscan dirigir los procesos microbianos, por ejemplo, promoviendo la reducción del sulfato. Dicha reducción de sulfato es favorecida por los bajos Eh y pH, condiciones anaerobias que predominan de forma típica en los humedales, excepto dentro de una capa de poca profundidad, donde el ambiente es aerobio. La bacteria que reduce sulfato usa la energía creada por la reducción de sulfato en tales ambientes, y por lo general es resistente y capaz de adaptarse a amplias variaciones del pH y temperatura; sin embargo, no tolera periodos largos de condiciones aerobias. Si las condiciones vuelven a ser aerobias (debido a fluctuaciones de nivel de agua u otros factores), las reacciones se revertirán y los humedales se convertirán en una fuente de sulfatos y metales. Aunque la actividad bacteriana está significativamente reducida en los casos donde el pH es menor de cinco, la bacteria puede controlar su microambiente regulando el pH a través de la reducción del sulfato (Pulford, 1991).

Para promover la reducción del sulfato en los humedales, a menudo se añade un sustrato orgánico para proporcionar una fuente de carbono para las bacterias reductoras de sulfato. Como ya se indicó, la composta de champiñón ha sido utilizado con este propósito; por una parte, por ser una fuente de carbono, pero por otra, por contener caliza que neutraliza la acidez (Newcombe & Brennan, 2010).

Cuando se diseña un humedal para hacer estas funciones, el área de tratamiento, la profundidad del agua, el número de celdas, la forma de la celda, la velocidad del flujo y el sustrato tienen que ser considerados y optimados para evitar la infiltración de agua al subsuelo (Johnson & Hallberg, 2005). En cuanto a los sistemas FWS, varios aspectos físicos son importantes cuando se diseña un humedal, como las concentraciones de metales pesados en este caso, tanto de entrada como de salida, pues determinan el tiempo de retención necesario y, en consecuencia, la superficie requerida para el humedal; de especial relevancia es la relación entre

anchura y largura. Asimismo, hay que tener en cuenta la carga hidráulica, el área específica, y la profundidad y pendiente del fondo.

Recientemente se han obtenido resultados satisfactorios en fitoextracción con el empleo de cañas en pantanos (Guo *et al.*, 2015; Guo & Cutright, 2015). Ambos trabajos consisten en la comparación del efecto de diferentes variables en la generación de placas de Fe y su fitoextracción. Guo y Cutright determinaron que el ácido cítrico es un buen elemento quelante para incrementar la absorción de metales por parte de las plantas, al contrario que las bacterias oxidizantes de Fe y los heterótrofos acidófilos (Guo & Cutright, 2015). Guo *et al.* confirmaron la idoneidad del ácido cítrico para la aplicación, determinando una mayor absorción de metales con la mayor edad de la planta (Guo *et al.*, 2015).

Dentro de la creación de humedales, se podría incorporar una de las nuevas líneas que se está desarrollando profundamente en los últimos años: el uso de microalgas (Gupta, Shrivastava, & Neeraj, 2001; Mehta & Gaur, 2005; Aguilera, Manrubia, Gomez, Rodriguez, & Amils, 2006; Aguilera, Souza-Egipsy, Gomez, & Amils, 2007; Aguilera *et al.*, 2010; Munoz & Guieysse, 2006; Das *et al.*, 2009; Souza-Egipsy, Altamirano, Amils, & Aguilera, 2011; Orandi, Lewis, & Moheimani, 2012; Orandi & Lewis, 2013). Las microalgas desarrolladas en AMD se caracterizan por sobrevivir en aguas con alto contenido de metales, baja concentración de nutrientes y bajo pH, y algunas de estas especies resistentes tienen la capacidad de extraer ciertos metales pesados de los AMD (Aguilera, Souza-Egipsy, Martin-Uriz, & Amils, 2008; Natarajan, 2008). Sin embargo, se requieren más investigaciones en este campo, pues la influencia de las condiciones ambientales influye en el desarrollo de tales algas (Orandi *et al.*, 2012; Orandi & Lewis, 2013).

### Conclusiones y líneas futuras de investigación

El tratamiento o prevención de los AMD es un proceso crucial a tener en cuenta en los planes

de diseño, operación y cierre de las minas, pues su generación puede tener graves consecuencias medioambientales, en especial si llegan a sistemas fluviales o a acuíferos subterráneos por los que tienen acceso directo a seres vivos.

La generación de AMD se ve favorecida por la presencia de bacterias ferrooxidantes *Thiobacillus ferrooxidans*, que catalizan la oxidación de minerales sulfurados, como la pirita. Pero del mismo modo que hay bacterias que aceleran el proceso, también se puede recurrir a bacterias para anularlo por completo o ralentizarlo, siendo esto la base de las técnicas preventivas y de remediación, respectivamente.

En los últimos años se han desarrollado tratamientos biotecnológicos amigables con el medio ambiente; pero muchos de ellos sólo se han llevado a cabo a pequeña escala en laboratorio debido a que su implementación resulta cara en exceso, si se le compara con otras técnicas que se están empleando en la actualidad, basadas sobre todo en métodos físicos (Pozo, Puente, Lagüela, & Veiga, 2014).

Se requiere una mayor investigación en las bacterias presentes en las comunidades microbianas de los AMD que muestran un ratio de oxidación mayor que los *Thiobacillus ferrooxidans*, pues podrían ser interesantes para alcanzar la remediación. Como ya lo indicaron Klein et al., estas bacterias deberían ser aisladas y estudiadas de manera que fuera posible identificar las condiciones óptimas de desarrollo de las mismas (Klein et al. 2013). Además, es necesario considerar las combinaciones de diferentes estrategias microbiológicas y estudiarlas en futuras investigaciones, así como la combinación con diferentes técnicas físicas, con el objetivo de aumentar la inhibición y remediación de los AMD.

El estudio de la influencia de los diversos parámetros que caracterizan el agua, como pH y Eh, deben ser estudiados a profundidad, así como la influencia que generan los procesos microbianos para la oxidación del Fe en la disponibilidad de los elementos traza necesarios para el desarrollo celular.

## Agradecimientos

Iván Puente y Susana Lagüela agradecen a los Ministerios de Ciencia e Innovación, y de Educación, Cultura y Deporte del gobierno español, sus contratos predoctorales BIA2009-08012 y FPU AP2009-1144, respectivamente, que les permitieron realizar la investigación presentada. José Santiago Pozo Antonio agradece a la Xunta de Galicia por su contrato con la Universidad de Vigo, en el marco de las ayudas de apoyo a la etapa de formación posdoctoral del Plan Gallego de investigación, innovación y crecimiento 2011-2015 (Plan I2C), para el año 2014.

## Referencias

- Aguilera, A., Manrubia, S. C., Gomez, F., Rodriguez, N., & Amils, R. (2006). Eukaryotic community distribution and their relationship with the water physicochemical parameters in an extreme acidic environment, Río Tinto (SW, Spain). *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 5325-5330.
- Aguilera, A., Souza-Egipsy, V., Gomez, F., & Amils, R. (2007). Development and structure of eukaryotic biofilms in an extreme acidic environment Río Tinto (SW, Spain). *Microb. Ecol.* 53, 294-305.
- Aguilera, A., Souza-Egipsy, V., Martin-Uriz, P. S., & Amils, R. (2008). Extracellular matrix assembly in extreme acidic eukaryotic biofilms and their possible implications in heavy metal adsorption. *Aquat Toxicol.*, 88, 257-266.
- Aguilera, A., Gonzalez-Toril, E., Souza-Egipsy, V., Amaral-Zettler, L., Zettler, E., & Amils, R. (2010). Phototrophic biofilms from Río Tinto, an extreme acidic environment, the prokaryotic component. *Microb. Mats.*, 14, 469-481.
- Ahluwalia, S. S., & Goyal, D. (2007). Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresour. Technol.*, 98, 2243-2257.
- Árcega-Cabrera, F., Castillo-Blum, E., & Armienta, M. A. (2010). Tetraethyl lead release from sediments in a mine-impacted tropical river. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 26, 119-127.
- Armienta, M. A., Talavera, O., Morton, O., & Barrera, M. (2003). Geochemistry of metals from mine tailings in Taxco, México. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 71, 387-393.
- Baker, B. J., & Banfield, J. F. (2003). MiniReview: Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 44, 139-152.
- Banks, D., Younger, P., Amesen, R., Iversen, E., & Banks, S. B. (1997). Mine-water chemistry: The good, the bad and the ugly. *Environ. Geol.*, 32, 157-174.
- Barton, L. L., & Fauque, G. D. (2009). Biochemistry, physiology and biotechnology of sulfatereducing bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.* 68, 41-98.

- Battaglia-Brunet, F., Crouzet, C., Burnol, A., Coulon, S., Morin, D., & Joulian, C. (2012). Precipitation of arsenic sulphide from acidic water in a fixed-film bioreactor. *Water Res.*, 46, 3923-3933.
- Batty, L. C., & Younger, P. L. (2002). Critical role of macrophytes in achieving low iron concentrations in mine water treatment wetlands. *Environ. Sci. Technol.*, 36, 3997-4002.
- Bekmezci, O. K., Ucar, D., Kaksonen, A. H., & Sahinkaya, E. (2011). Sulfidogenic biotreatment of synthetic acid mine drainage and sulfide oxidation in anaerobic baffled reactor. *Journal of Hazardous Materials*, 189(3), 670-676.
- Bhatnagar, M., & Singh, G. (1991). Growth inhibition and leakage of cellular material from *Thiobacillus ferrooxidans* by organic compounds. *J. Environ. Biol.*, 12, 385-399.
- Bernardes de Souza, C. M., & Mansur, M. B. (2011). Modelling of Acid Mine Drainage (AMD) in columns. *Braz. J. Chem. Eng.*, 28, 425-432.
- Blowes, D. W., Ptacek, C. J., Jambor, J. L., & Weisener, C. G. (2003). The geochemistry of acid mine drainage (pp. 149-204). En: *Environmental Geochemistry, Treatise on Geochemistry* 9. Lollar, B. S. (ed.). Amsterdam: Elsevier.
- Bonnefoy, V., & Holmes, D. S. (2012). Genomic insights into microbial iron oxidation and iron uptake strategies in extremely acidic environments. *Environ. Microbiol.*, 14, 1597-1611.
- Chabbi, A., & Rumpel, C. (2004). Decomposition of plant tissue submerged in an extremely acidic mining lake sediment: Phenolic CuO-oxidation products and solid-state <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *Soil Biol. Biochem.*, 36, 1161-1169.
- Cohen-Ronald, R. H. (2006). Use of microbes for cost reduction of metal removal from metals and mining industry waste streams. *Journal of Cleaner Production*, 14(12- 13), 1146-1157.
- Cruz, R., & Monroy, M. (2006). Evaluación de la reactividad de sulfuros de hierro y residuos mineros. Metodología basada en la aplicación de la voltamperometría cíclica. *Quím. Nova*, 29, 510-519.
- Das, B. K., Roy, A., Koschorreck, M., Mandal, S. M., Wendt-Potthoff, K., & Bhattacharya, J. (2009). Occurrence and role of algae and fungi in acid mine drainage environment with special reference to metals and sulfate immobilization. *Water Res.*, 43, 883-894.
- Dopson, M., & Johnson, D. B. (2012). Biodiversity, metabolism and applications of acidophilic sulfur-metabolizing microorganisms. *Environmental Microbiology*, 14(10), 2620-2631.
- Ehrlich, H. L. (2001). Past, present and future of biohydrometallurgy. *Hydrometallurgy*, 59, 127-134.
- Fedorak, P. M., Westlake, D. W. S., Anders, C., Kratochvil, B., Motkosky, N., Anderson, W. B., & Huck, P. M. (1986). Microbial release of <sup>226</sup>Ra<sup>2+</sup> from (Ba, Ra)<sub>4</sub>S<sub>4</sub> sludges from uranium mine wastes. *Appl. Environ. Microb.*, 52, 262-268.
- Gallert, C., & Winter, J. (2002). Bioremediation of soil contaminated with alkyllead compounds. *Wat. Res.* 36, 3130-3140.
- García-Moyano, A., González-Toril, E., Aguilera, A., & Amils, R. (2012). Comparative microbial ecology study of the sediments and the water column of the Río Tinto, an extreme acidic environment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 81, 303-314.
- González-Toril, E., Llobet-Brossa, E., Casamayor, E. O., Amann, R., & Amils, R. (2003). Microbial ecology of an extreme acidic environment. The Tinto River. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 4853-4865.
- Guo, L., & Cutright, T. J. (2015). Effect of citric acid and bacteria on metal uptake in reeds grown in a synthetic acid mine drainage solution. *Journal of Environmental Management*, 150, 235-242.
- Guo, L., Cutright, T. J., & Duirk, S. (2015). Effect of citric acid, rhizosphere bacteria, and plant age on metal uptake in reeds cultured in acid mine drainage. *Water Air Soil Pollut.* 226(2264), 1-11.
- Gupta, V. K., Shrivastava, A. K., & Neeraj, J. (2001). Biosorption of chromium (VI) from aqueous solutions by green algae *Spirogyra* species. *Water Res.*, 35(17), 4079-4085.
- Hallberg, K. B. (2010). New perspectives in acid mine drainage microbiology. *Hydrometallurgy*, 104, 448-453.
- Hedrich, S., Lünsdorf, H., Kleeberg, R., Heide, G., Seifert, J., & Schlömann, M. (2011). Schwertmannite formation adjacent to bacterial cells in a mine water treatment plant and in pure cultures of *Ferroplasma myxofaciens*. *Environ. Sci. Technol.*, 45, 7685-7692.
- Ilbert, M., & Bonnefoy, V. (2013). Insight into the evolution of the iron oxidation pathways. *Biochim Biophys Acta.* 1827(2), 161-175.
- Inocencio-Flores, D., Velázquez-Machuca, M. A., Pimentel-Equihua, J. L., Montañez-Soto, J. L., & Venegas-González, J. (2013). Hydrochemistry of groundwater in the Duero River basin and regulations for domestic use. *Water Technology and Sciences*, 4(5), 111-126.
- IPAT-UNESCO (2000). *Pesquisa e desenvolvimento de metodologias para o controle de drenagem ácida e tratamento de efluentes de indústria carbonífera* 184 pp.). Relatório técnico. Criciúma: Instituto de Pesquisas Ambientais e Tecnológicas, Universidade do Extremo Sul Catarinense.
- Johnson, D. B. (2003). Chemical and microbiological characteristics of mineral spoils and drainage waters at abandoned coal and metal mines. *Water Air Soil Pollut. Focus*, 3, 47-66.
- Johnson, D. B., & Hallberg, K. B. (2003). The microbiology of acidic mine waters. *Res. Microbiol.* 154, 466-473.
- Johnson, D. B., & Hallberg, K. B. (2005). Acid mine drainage remediation options: A review. *Sci. Total Environ.*, 338, 3-14.

- Johnson, D. B., Rolfe, S., Hallberg, K. B., & Iversen, E. (2001). Isolation and phylogenetic characterization of acidophilic microorganisms indigenous to acidic drainage waters at an abandoned Norwegian copper mine. *Environ. Microbiol.*, 3, 630-637.
- Jones, D. I. S., Kohl, C., Grettenberger, C., Larson, L. N., Burgos, W. D., & Macalady, J. L. (2015). Geochemical niches of iron-oxidizing acidophiles in acidic coal mine drainage. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(4), 1242-1250.
- Joshi, K. B. (2014). Microbes: Mini iron factories. *Indian J. Microbiol.*, 54(4), 483-485.
- Klein, R., Tischler, J. S., Muhling, M., & Schlomann, M. (2013). Bioremediation of mine water. *Advances in Biochemical Engineering-Biotechnology*, 141, 109-172.
- Korehi, H., Bloethe, M., & Schippers, A. (2014). Microbial diversity at the moderate acidic stage in three different sulfidic mine tailings dumps generating acid mine drainage. *Research in Microbiology*, 165(9), 713-718.
- Koschorreck, M. (2008) Microbial sulphate reduction at a low pH. *FEMS Microbiol. Ecol.* 64, 329-342.
- Kumar, R. N., McCullough, C. D., & Lund, M. A. (2011). How does storage affect the quality and quantity of organic carbon in sewage for use in the bioremediation of acidic mine waters? *Eco. Eng.* 37, 1205-1213.
- Li, C. Q., Qi, W. G., & Liu, X. B. (2009). The SLS system of caving mining simulation and its application. *Journal of Wuhan University of Technology*, 31, 132-134.
- Malik, A. (2004). Metal bioremediation through growing cells. *Environ. Int.*, 30, 261-278.
- Mehta, S. K., & Gaur, J. P. (2005). Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: Progress and prospects. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 25(3), 113-152.
- Munoz, R., & Guieysse, B. (2006). Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. *Water Res.*, 40, 2799-2815.
- Muyzer, G., & Stams, A. J. M. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Rev. Microbiol.*, 6, 441-454.
- Nancucho, I., & Barrie-Johnson, D. (2011). Significance of microbial communities and interactions in safeguarding reactive mine tailings by ecological engineering. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77, 8201-8208.
- Nancucho, I., & Barrie-Johnson, D. (2014). Removal of sulfate from extremely acidic mine waters using low Ph sulfidogenic bioreactors. *Hydrometallurgy*, 150, 222-226.
- Natarajan, K. A. (2008). Microbial aspects of acid mine drainage and its bioremediation. *Trans. Nonfer. Met. Soc. China*, 18(6), 1352-1360.
- Newcombe, C. E., & Brennan, R. A. (2010). Improved passive treatment of acid mine drainage in mushroom compost amended with crab-shell chitin. *J. Environ. Eng. ASCE*, 136, 616-626.
- Nordstrom, D. K., Alpers, C. N., Ptacek, C. J., & Blowes, D. W. (2000). Negative pH and extremely acidic mine waters from Iron Mountain, California. *Environ. Sci. Tec.*, 34, 254-258.
- Ohimain, E. I., Andriesse, W., & Van Mensvoort, M. E. F. (2004). Environmental impacts of abandoned dredged soils and sediments: Available options for their handling, restoration and rehabilitation. *J. Soil Sediment*, 4, 59-65.
- Orandi, S., Lewis, D. M., & Moheimani, N. R. (2012). Biofilm establishment and heavy metal removal capacity of an indigenous mining algal-microbial consortium in a photo-rotating biological contactor. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 39(9), 1321-1331.
- Orandi, S., & Lewis, D. M. (2013). Synthesising acid mine drainage to maintain and exploit indigenous mining microalgae and microbial assemblies for biotreatment investigations. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(2), 950-956.
- Pierzynski, G. M., Lambert, M., Hetrick, B. A. D., Sweeney, D. W., & Erickson, L. E. (2002). Phytostabilization of metal mine tailings using tall fescue. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management*, 6, 212-217.
- Pozo, S., Puente, I., Lagüela, S., & Veiga, M. (2014). Techniques to correct and prevent acidity generated by mining: A review. *DYNA Colombia*, 81(186), 73-80.
- Pulford, I. D. (1991). A review of methods to control acid generation of pyritic coal mine waste (pp. 269-278). In: *Land Reclamation*. Davies, M.C.R. (ed.). London: Elsevier.
- Renella, G., Landi, L., & Nannipieri, P. (2004). Degradation of low molecular weight organic acids complexed with heavy metals in soil. *Geoderma*, 122, 311-315.
- Reuben, T. N., Worwood, B. K., Carrigan, L. D., & Sorensen, D. L. (2011). Technical note: Pineview reservoir nutrient loading, unloading, and the role of groundwater in the estimates. *Transactions of the ASABE*, 54, 2219-2225.
- Sahinkaya, E., & Yucesoy, Z. (2010). Biotreatment of acidic zinc- and copper-containing wastewater using ethanol-fed sulfidogenic anaerobic baffled reactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33(8), 989-997.
- Sahinkaya, E., Dursun, N., Ozkaya, B., & Kaksonen, A. H. (2013). Use of landfill leachate as a carbon source in a sulfidogenic fluidized-bed reactor for the treatment of synthetic acid mine drainage. *Minerals Engineering*, 48, 56-60.
- Sánchez-Andrea, I., Sanz, J. L., Bijmans, M. F. M., & Stams, A. J. M. (2014). Sulfate reduction at low pH to remediate acid mine drainage. *Journal of Hazardous Materials*, 269, 98-109.
- Schippers, A., Breuker, A., Blazejak, A., Bosecker, K., Kock, D., & Wright, T. L. (2010). The biogeochemistry and microbiology of sulfidic mine waste and bioleaching dumps and heaps, and novel Fe(II)-oxidizing bacteria. *Hydrometallurgy*, 104, 342-350.

- Schwab, A. P., Splichal, P. A., & Banks, M. K. (2006). Persistence of atrazine and alachlor in ground water aquifers and soil. *Water Air Soil Poll.*, 171, 203-235.
- Singer, P. C., & Stumm, W. (1970). Acid mine drainage: The rate-determining step. *Science*, 167, 1121-1123.
- Singh, G., Bhatnagar, M., & Sinha, D. K. (1990). Environmental management of acid water problems in mining areas. *International Journal of Mine Water*, 9, 113-131.
- Sheoran, A. S., Sheoran, V., & Choudhary, R. P. (2010). Bioremediation of acid-rock drainage by sulphate-reducing prokaryotes: A review. *Miner. Eng.*, 23, 1073-1100.
- Solano, A. M. (2005). *Movilización de metales pesados en residuos y suelos industriales afectados por la hidrometalurgia del cinc* (287 pp.). Tesis de doctorado. Murcia: Departamento de Química Agrícola, Geología y Edafología, Universidad de Murcia.
- Sonntag, H. (2007). Problem sulfat in der spree - stand der diskussion und aktuelle trends (pp. 151-156). In: *Proceedings of the 58. Berg- und Hüttenmännischer Tag - Behandlungstechnologien für bergbaubeeinflusste Wässer / GIS- Geowissenschaftliche Anwendungen und Entwicklungen*. Universidad Técnica Bergakademie Freiberg, Freiberg, Alemania. 14-15 Junio 2017.
- Sorensen, D. L., & Fresquez, P. R. (1991). Land reclamation: Nitrification potential in reclaimed coal mine spoils and soils in the semiarid southwest. *J. Environ. Qual.*, 20, 279-285.
- Souza-Egipsy, V., Altamirano, M., Amils, R., & Aguilera, A. (2011). Photosynthetic performance of phototrophic biofilms in extreme acidic environments. *Environ. Microbiol.*, 13(8), 2351-2358.
- Stumm, W., & Morgan, J. (1981). *Aquatic chemistry: An introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters*, 2nd edition. New York: Wiley-Interscience.
- Tabak, H. H., Scharp, R., Burckle, J., Kawahara, F. K., & Govind, R. (2003). Advances in biotreatment of acid mine drainage and biorecovery of metals: 1. Metal precipitation for recovery and recycle. *Biodegradation*, 14, 423-436.
- Tuovinen, O. H., Panda, F., & Tsuchiya, H. (1979). Nitrogen requirement of iron-oxidizing Thiobacilli for acidic ferric sulfate regeneration. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 954-958.
- Trumm, D. (2010). Selection of active and passive treatment systems for AMD-Flow charts for New Zealand conditions. *New. Zeal. J. Geol. Geop.*, 53, 195-210.
- Urbanová, M., Kopecký, J., Valášková, V., Ságová-Marečková, M., Elhottová, D., Kyselková, M., Moënnelocoz, Y., & Baldrian, P. (2011). *FEMS Microbiol. Ecol.*, 78, 59-69.
- Visser, S., Straker, J., & Turchenek, L. (2010). The Wood Buffalo Environmental Association Jack Pine Forest Monitoring Program: Results from organic and mineral components of upland soils (pp. 1492-1503). *Memorias. Air and Waste Management Association's Annual Conference and Exhibition*. 22-25 Junio 2010, Calgary, Alberta, Canada.
- Wall, J. D., & Krumholz, L. R. (2006). Uranium reduction. *Annual Review of Microbiology* 60, 149-166.
- Weber, K. P., Werker, A., Gehder, M., Senger, T., & Legge, R. L. (2010). Influence of the microbial community in the treatment of acidic iron-rich water in aerobic wetland mesocosms. *Bioremediat. J.*, 14, 28-37.
- Wullstein, L. H. (1980). Nitrogen fixation acetylene reduction associated with rhizo sheaths of Indian rice grass used in stabilization of the slick-rock. Colorado tailings pile. *J. Range Manag.*, 33, 204-206.
- Yang, Y., Shi, W., Wan, M., Zhang, Y., Zou, L., Huang, J., Qiu, G., & Liu, X. (2008). Diversity of bacterial communities in acid mine drainage from the Shen-bu copper mine, Gansu province, China. *Electron. J. Biotechnol.*, 11, 1-12.
- Younger, P. (2000). The adoption and adaptation of passive treatment technologies for mine waters in the United Kingdom. *Mine Water Environ.*, 19, 84-97.

## Dirección institucional de los autores

Dr. José-Santiago Pozo-Antonio

Universidade de Vigo  
Escola de Enxeñaría de Minas e Enerxía  
Departamento de Enxeñaría de Recursos Naturais e Medioambiente  
Grupo de Explotación de Minas  
Campus Lagoas-Marcosende  
Rúa Maxwell, s/n  
36310 Vigo, ESPAÑA  
Teléfono: +34 (986) 811922  
ipozo@uvigo.es

Dr. Iván Puente-Luna

Escola Naval Militar  
Centro Universitario da Defensa  
Praza de España s/n, 36900 Marín, ESPAÑA  
Teléfono: +34 (986) 813 499  
ipuente@cud.uvigo.es

Dra. Susana Lagüela López

Universidad de Salamanca  
Escuela Politécnica Superior de Ávila  
Departamento de Ingeniería Cartográfica y del Terreno  
Calle de los Hornos Caleros 50  
05003, Ávila, ESPAÑA

Universidade de Vigo  
Grupo de Investigación de Xeotecnoloxías Aplicadas  
Rúa Maxwell, s/n  
36310 Vigo, ESPAÑA  
Teléfono: +34 (986) 813 499  
susi.minas@uvigo.es

*Dra. María Veiga Ríos*

Escola de Enxeñaría de Minas e Enerxía  
Departamento de Enxeñaría de Recursos Naturais e  
Medioambiente  
Campus Lagoas-Marcosende  
Rúa Maxwell, s/n  
36310 Vigo, ESPAÑA  
mveigarios@gmail.com