

Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Memoria para optar al título profesional de Bioquímico

**“IMPORTANCIA DE LA ACTIVIDAD MICROBIOLÓGICA EN LA PREDICCIÓN
DEL DRENAJE ÁCIDO DE MINAS”**

Carolina Isabel Bahamóndez Honores

Agosto, 2012

Patrocinante de Tesis : Davor Cotoras

Director de Tesis : Jacques Wiertz

RESUMEN

En el presente trabajo se analizaron seis muestras de residuos mineros provenientes de tranques de relave de la minera Los Pelambres, con el objeto de estudiar el efecto de los microorganismos en los test de predicción de drenaje ácido de minas.

El drenaje ácido que afecta una proporción importante de residuos mineros es uno de los principales problemas ambientales que debe enfrentar la actividad minera. Las bacterias ferro y thiooxidantes juegan un rol importante en la generación del drenaje ácido, por su efecto catalítico en la oxidación de los sulfuros. Este efecto es ampliamente reconocido en una etapa avanzada del proceso, a pH ácido, pero no existe consenso sobre su importancia en la etapa inicial cuando el pH todavía se mantiene por sobre 4,0.

Los programas de predicción de drenaje ácido involucran generalmente pruebas estáticas y pruebas cinéticas que buscan simular las condiciones de meteorización de los materiales, pero que generalmente se realizan sin la participación efectiva de los microorganismos. El test confirmativo, con inoculación de microorganismos, busca determinar su efecto en la generación de drenaje ácido; sin embargo, esta prueba confirmativa considera un pH muy ácido (pH 2,8), que se aleja de las condiciones de una etapa de transición entre la oxidación química y biológica de los sulfuros. En el presente estudio se estudió el efecto de la inoculación de un cultivo de microorganismos a pH superior a 4,0.

Los tests estáticos realizados permitieron una primera clasificación de las muestras de acuerdo a su potencial de generar ácido. Distintas clasificaciones fueron obtenidas a partir de los resultados de cada test, resultando en la clasificación dispar de las muestras.

En cuanto al test confirmativo, de tres muestras descritas como potencialmente generadoras de drenaje ácido por el test realizado a pH 2,8, se llegó a sólo una muestra con este potencial al utilizar un pH inicial 4,5.

Con el objeto de estimar las especies microbianas que se encontraban presentes en una muestra de relave (M2), se realizó un análisis mediante CARD-FISH a una mezcla de las soluciones provenientes del test confirmativo 3. Los resultados indicaron la presencia de *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans* en alta proporción, seguida de las otras especies; *Leptospirillum* y *Sulfobacillus*, lo que está de acuerdo con la literatura.

Las diferencias entre las clasificaciones obtenidas a través de los test estáticos y confirmativos, corroboran que la actividad bacteriana a pH superior a 4,0, debiese ser considerada como complemento para una apropiada predicción del potencial de generación de drenaje ácido de minas.

SUMMARY

In the present work, six samples of mining waste from Los Pelambres mining's tailings were analysed with the purpose of studying the effect of microbial inoculation in the acid mine drainage prediction test.

Acid drainage, which affects a significant proportion of mining waste, is one of the major environmental problems that the mining activity has to face. The ferrous and sulphur oxidizing bacteria play an important role in the acid drainage because of its catalytic effect on the oxidation of the sulphides. This process is widely recognized in its advanced stage, acid pH; however there is no consensus on its importance in the initial stage of the process, whenever the pH still remains over 4.0.

Acid mine drainage prediction programs, generally involve static and kinetic tests, which seek to simulate weathering conditions of the materials but they are usually carried out without the effective participation of microorganisms. The confirmative test with inoculation of microorganisms, seeks to determine its effect on the generation of acid drainage. Nevertheless, the confirmative test takes into account a very acidic pH level (pH 2,8) which moves away from the conditions in a transitional stage, between the chemical and biological oxidation of sulphides. In the present work, we observed the inoculation effect at a pH above 4.0.

Static tests that were previously performed, allowed a first classification of samples in relation to their acid generation potential. Moreover, different classifications were obtained from the results of each test, with dissimilar conclusions.

In relation to the confirmative test, of three samples initially described as potentially acid forming by the test at pH 2.8, only one sample had the potential to generate acid when the test was carried out at a higher pH 4.5.

With the purpose of estimation of the microbial species that were present in a tailing sample (M2), a CARD-FISH analysis was performed to a mix of solutions coming from the confirmative test. The results showed the presence of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans* at a similar proportion, followed by *Sulfobacillus sp*, which is according to the consulted literature.

The classification differences obtained through the static and confirmative tests, corroborates the idea that bacterial activity at pH higher than 4.0, should be considered as a

complement to an appropriate classification of the samples regarding to acid rock drainage generation.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. ASPECTOS GENERALES

El drenaje ácido de rocas es el drenaje resultante del proceso natural de meteorización de los minerales sulfurados. La oxidación de estos minerales ocurre cuando las rocas se encuentran expuestas a condiciones atmosféricas, ya sea a través de procesos geológicos o actividades antropogénicas que involucren remoción de material.

La acidez generada a través de las reacciones de oxidación de los sulfuros puede llevar a la disolución de distintos metales, y que en ciertas condiciones estos puedan ser descargados en corrientes de agua.

Dependiendo del pH que se registre en la solución efluente, se establecen tres etapas en la formación del drenaje ácido. En las primeras dos etapas, caracterizadas por valores de pH moderados ($\text{pH} > 3,5$), el material mantiene la capacidad de neutralizar parcial o totalmente el ácido generado, y la oxidación de los sulfuros se produce principalmente por el oxígeno. Al término de las etapas I y II el pH de la solución ha disminuído y la actividad bacteriana aumentado, observándose la transición desde la oxidación química a biológica de los minerales sulfurados. En la tercera etapa y final, el material expuesto a meteorización ya agotó gran parte de la capacidad neutralizadora de los minerales alcalinos presentes, y se observa una mayor solubilidad de los iones metálicos, en particular del ión férrico. En esta etapa la oxidación biológica es predominante, y la velocidad de oxidación de los sulfuros y consecuente generación de ácido es mayor.

Para prevenir o mitigar los nocivos efectos del drenaje ácido es fundamental una correcta predicción. De acuerdo con AMIRA, 2002, los test estáticos constituyen el primer acercamiento. Éstos otorgan información cualitativa, basándose en el balance entre el potencial de generación de ácido y la capacidad de neutralizar éste por parte del mineral. Por otro lado, los test cinéticos permiten seguir la dinámica de acidificación de la muestra en el

tiempo. El denominado test confirmativo se realiza posterior a los test estáticos, cuando no existe claridad respecto a la clasificación de las muestras. Éste busca determinar si las bacterias hierro y azufreoxidantes pueden generar más ácido del que pueda ser consumido por los componentes neutralizadores. El test confirmativo utilizado a la fecha considera la actividad microbiana al inocular las muestras con bacterias, en un medio de cultivo a pH 2,8, considerando la actividad de los microorganismos sólo en una etapa ya avanzada del proceso de meteorización. Se ha observado, sin embargo, que las etapas iniciales de formación del drenaje ácido pueden durar años e incluso décadas, por lo que en la mayor parte de los casos los tests de predicción son realizados cuando aún las muestras exhiben condiciones cercanas a la neutralidad.

Los microorganismos de mayor implicancia en la generación de drenaje ácido a pH inferiores a 3, debido a que pueden ser rápidamente cultivables en estos ambientes, son las bacterias acidófilas hierro y azufreoxidantes, tales como, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* y, en algunos casos, la especie autotrófica facultativa *Sulfobacillus* (Schrenk et al., 1998; Mykytezuk et al., 2010).

El drenaje ácido minero es considerado por la Agencia de Protección del Ambiente (EPA) como una de las tres principales amenazas al ecosistema, razón por la cual, en los últimos años ha aumentado el desarrollo y optimización de los programas de predicción de drenaje, con el objetivo superior de adoptar las medidas necesarias para su prevención.

1.2. ANTECEDENTES

El cobre se encuentra de manera natural en la corteza terrestre en una concentración promedio de 50 mg/Kg (DHHS, 2006), siendo la comercialización mundial de cobre fino, durante el año 2010, de 16,20 millones de toneladas métricas.

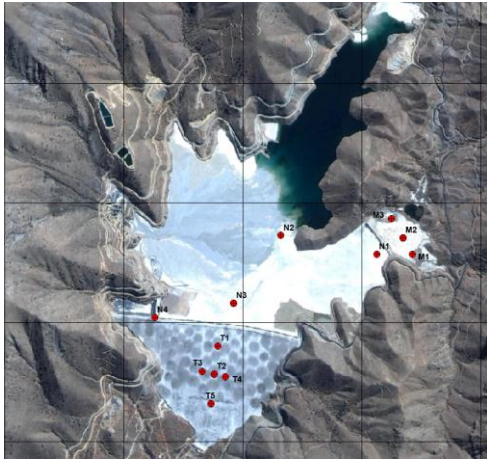
La extracción del cobre depende de la forma en que se encuentre en el mineral, ya sea como sulfuros u óxidos. Cerca del 80% del cobre mundial se encuentra en forma de mineral sulfurado (Davenport et al. 2002). Este mineral no se disuelve fácilmente en soluciones acuosas, por lo que la mayoría de su extracción es a través de pirometalurgia, proceso que produce cátodos a través de concentración por flotación, fundición y electro-refinación. Del 20% restante, correspondiente a mineral oxidado, se generan cátodos por hidrometalurgia, técnica que consiste en lixiviación en pilas, extracción por solventes y electro-obtención.

Chile es el principal país productor de cobre, con más de un tercio de la producción mundial. COCHILCO informó que, durante el año 2009, la producción chilena de cátodos de cobre obtenidos por electro-refinación y electro-obtención alcanzó 3.184 miles de toneladas métricas (www.cochilco.cl).

La producción de los cátodos de cobre resulta en la generación de residuos como material estéril, ripio y relaves. En la producción de una tonelada de cátodos de cobre provenientes de mineral sulfurado ($\approx 1\%$ de cobre), se generan aproximadamente 200-300 toneladas de material estéril y 97 toneladas de relaves. Si la tonelada de cátodos proviene de mineral oxidado ($\approx 1,5\%$ de cobre), se produce una cantidad aproximada de 100 a 200 toneladas de material estéril y 80 toneladas de ripio.

Los relaves son uno de los principales residuos mineros masivos generados en la producción de cátodos provenientes de minerales sulfurados, debido a la cantidad, al contenido y a la forma de almacenaje (Davenport et al. 2002, www.tailings.info/tailings.htm). Los procesos de concentración por flotación permiten, a partir de un mineral que contienen en promedio 1% de cobre, obtener un concentrado sulfurado donde se recupera la mayor parte de los sulfuros cobre, llegando a concentraciones de cobre del orden del 30%. El resto del mineral (ganga), junto con los sulfuros de cobre no recuperados, otros sulfuros metálicos y parte del agua utilizada en el proceso, se descarta como relave. Los relaves son generalmente almacenados en grandes áreas denominadas tranques o embalses (Figura 1), que se conforman por un muro de contención conformado por la fracción más gruesa del relave (arenas), y una cubeta donde se deposita la fracción fina o lamas. En los tranques, grandes volúmenes de materiales, con contenidos significativos de minerales sulfurados, se encuentran expuestos a la meteorización.

A)



B)

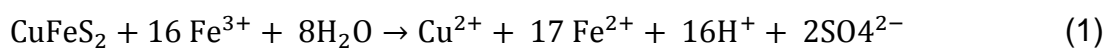


Figura 1: Tranques de Relave de la minera Los Pelambres. A) Imagen aerea de los tranques de relave Quillay y Chinche, donde los puntos rojos corresponden a los sitios en que se realizó la extracción de las muestras utilizadas en el estudio de la predicción de drenaje ácido. B) Fotografía lateral de los Tranques de relave Quillay y Chinche.

Las características de los relaves pueden variar de acuerdo a la mineralogía, de los procesos físicos y químicos usados para extraer el mineral y, además, de la razón agua/ sólido resultante. Por tanto, es importante determinar las características del relave, para así tener un mayor conocimiento acerca de su comportamiento a corto y largo plazo y su potencial impacto en el medio ambiente.

No todos los sulfuros generan drenaje ácido al entrar en contacto con oxígeno y agua. La calcopirita (CuFeS_2), por ejemplo, requiere de ión férrico para que el cobre contenido sea disuelto.

En la oxidación total de la calcopirita, se considera:



En la Tabla 1 se presentan minerales sulfurados que generan ácido al ser oxidados con oxígeno (A), y minerales que requieren ión férrico como oxidante (B).

Tabla 1: Minerales sulfurados. A) Minerales con contenido de sulfuro que generan ácido al ser oxidados con oxígeno. B) Minerales que requieren hierro férrico como oxidante.

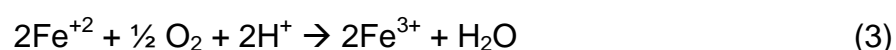
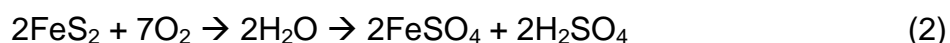
A)	Mineral	Fórmula	B)	Mineral	Fórmula
	Pirita	FeS ₂		Esfalerita	ZnS
	Pirrotita	Fe _{1-x} S		Galena	PbS
	Bornita	Cu ₅ FeS ₄		Calcopirita	CuFeS ₂
	Arsenopirita	FeAsS		Covelita	CuS
	Enargita/famatinita	Cu ₃ AsS ₄ /Cu ₃ SbS ₄		Cinabrio	HgS
	Realgar	AsS		Millerita	NiS
	Oropimente	As ₂ S ₃		Pentlandita	(Fe,Ni) ₉ S ₈
	Estibnita	Sb ₂ S ₃		Greenockita	CdS

Dentro de los minerales mencionados en la Tabla 1, la pirita (FeS₂) es el mineral de mayor relevancia, desde la perspectiva de la generación de ácido, debido a su concentración, tamaño y distribución. La pirita es el mineral sulfurado más abundante en la corteza terrestre (Schrenk et al., 1998).

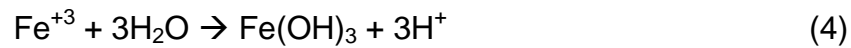
1.2.1. Drenaje Ácido de Minas

El drenaje ácido de rocas (DAR) es el resultado del proceso natural de meteorización de minerales sulfurados, causado predominantemente por la oxidación de la pirita. La meteorización ocurre de manera natural cuando ésta se encuentra expuesta a condiciones atmosféricas, ya sea a través de procesos geológicos o actividades antropogénicas que involucran remoción de material. A consecuencia de que el drenaje ácido puede ser resultado de distintos procesos, se denomina Drenaje Acido de Minas (DAM) cuando su generación tiene relación con esta última actividad.

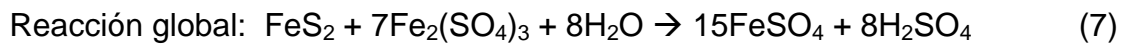
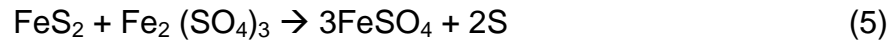
Las ecuaciones que dan cuenta de las reacciones iniciales de la generación del drenaje ácido son:



En un medio con alto pH (pH > 4,5) el hidróxido férrico precipita, desplazando el equilibrio de la reacción:



A pH más ácido ($\text{pH} < 4,5$), el Fe(III) oxidará la pirita de acuerdo a:



La minería acelera la meteorización de sulfuros reactivos al crear condiciones que facilitan el movimiento de aire y agua, y al exponer grandes volúmenes de material que, de otra forma, se encontrarían depositados en capas de roca por debajo de la superficie donde hay poco o no hay oxígeno (Jenkins et al., 2000). Al incrementar la exposición aumentan también las áreas superficiales del mineral reactivo, y con ello la posibilidad de colonización bacteriana. Las operaciones mineras que más drenaje ácido producen son de: cobre, zinc y plomo, uranio, oro, carbón, níquel y cobalto.

1.2.2. Principales Fuentes de DAM

Las principales fuentes de drenaje ácido en minería, de acuerdo a Natarajan et al. (2008), son: los botaderos de roca estéril, los botaderos de las pilas de lixiviación, las pilas de almacenamiento y los relaves.

1.2.3. Requerimientos y Condiciones de Generación

Existen tres requerimientos básicos para la generación de DAM: la disponibilidad de agua, de oxígeno y la presencia de minerales sulfurados.

Características físicas del material, temperatura, pH, equilibrio Fe^{3+}/Fe^{2+} , y la actividad microbiana, determinarán la cinética en que el DAM será producido.

El drenaje ácido se caracteriza por el desbalance entre la generación y la neutralización de ácido en el tiempo, registrando pH inferiores a 3. (Jenkins et al., 2000). Además, se caracteriza por concentraciones moderadas a elevadas de metales y la alta concentración de sulfatos.

1.2.4. Etapas de Generación

Ferguson y Erickson indicaron en 1987 que, dependiendo del pH de la solución efluente, se pueden definir tres etapas en la formación del drenaje ácido (Figura 2). A medida que el pH disminuye por las reacciones de oxidación, se desarrollan distintas reacciones de neutralización por parte de los minerales consumidores de ácido. En los gráficos de la evolución de pH en el tiempo (Ferguson et al., 1987; Broughton et al., 1992), es posible observar estas reacciones de neutralización como platós.

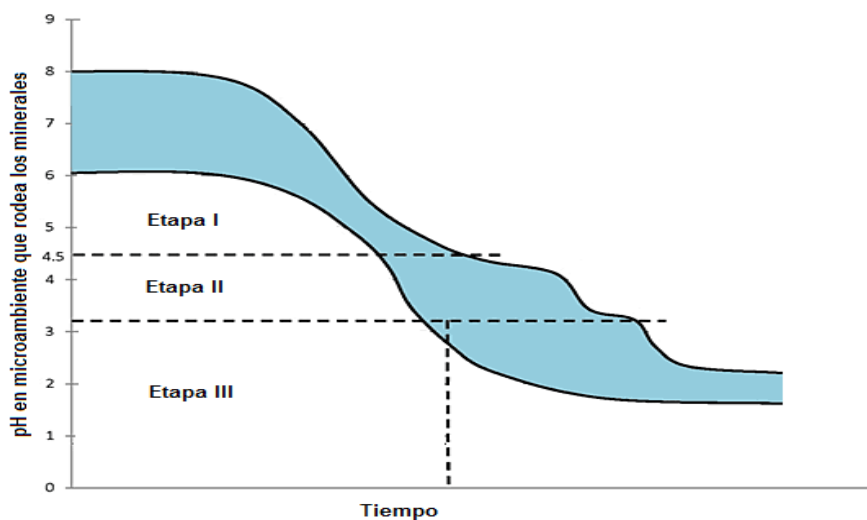


Figura 2: Etapas de generación de drenaje ácido. De acuerdo al pH registrado en el microambiente que rodea a los minerales, se definen 3 etapas en la generación del drenaje. El pH del microambiente disminuye en el tiempo como consecuencia de la oxidación de los minerales sulfurados expuestos a oxígeno o hierro férrico (Ferguson et al, 1987).

La Etapa I puede durar años. Ésta se desarrolla a un pH cercano a la neutralidad, y la oxidación en esta etapa es en su mayoría química, a causa del oxígeno atmosférico. La oxidación del mineral causa la generación de sulfatos y de ácido, el cual es rápidamente neutralizado por los minerales consumidores de ácido presentes en la roca. Cuando carbonatos, silicatos y otros minerales alcalinos dejan de estar disponibles, el pH de la solución comienza a disminuir gradualmente. Si la generación de acidez en el tiempo continúa mayor a la capacidad del mineral para neutralizar, el pH continuará acidificándose hasta alcanzar las etapas II y III, de la generación del drenaje ácido.

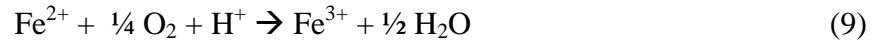
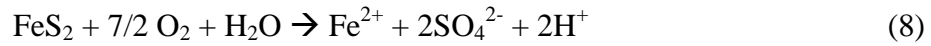
Durante la Etapa II el pH ya es inferior a 4,5, permitiéndose, además de oxidación química de los minerales sulfurados, la oxidación mediada por distintos microorganismos acidófilos, aumentando la velocidad de generación de ácido (Chotpantarat 2010). En esta etapa el pH de la solución es menor, y se observa una mayor concentración de sulfato y metales disueltos.

En la Etapa III el pH que rodea a los minerales es aún menor, y la oxidación biológica de los minerales sulfurados es predominante. En esta etapa la velocidad de oxidación es la mayor del proceso de generación de drenaje ácido. Cuando una bacteria hierro oxidante está presente en condiciones ácidas, la oxidación de un amplio rango de minerales sulfurados puede llegar a ser 10^6 veces más rápida que la oxidación química (Singer 1970). El principal oxidante de esta etapa es el hierro férrico.

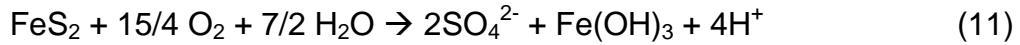
1.2.5. Reacciones Involucradas

Reacciones de generación

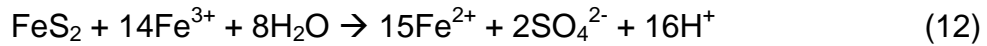
En las Etapas I y II de la generación del DAM se observan las reacciones 8-10 (Singh et al. 1985, Ferguson et al., 1987). La reacción 8 da cuenta de la generación de ácido sulfúrico a partir de pirita, donde un mol de pirita generará dos moles de ácido junto a un mol de Fe(II). En caso de que el potencial redox se mantenga alto, el Fe(II) puede ser rápidamente oxidado a Fe(III) (Ecuación 9), consumiendo parte de la acidez. La velocidad en que ocurre la reacción 9 puede verse acelerada en presencia de microorganismos. La reacción 10, mientras tanto, da cuenta de que en condiciones de mayor pH, parte del Fe(III) hidrolizará, formando hidróxido férrico, que es un precipitado rojo característico del drenaje ácido, y generando a su vez acidez.



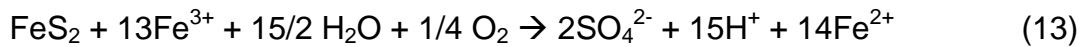
Siendo la reacción global de las etapas I y II:



En la Etapa III se consideran las reacciones 9 y 12. Debido al menor pH de esta etapa, el Fe(III) no se hidroliza completamente y se mantiene disuelto, pudiendo así oxidar pirita (Ecuación 4). El Fe(II), de acuerdo a la ecuación 9, podrá ser nuevamente oxidado a Fe(III) y continuar oxidando pirita.



Reacción global de la etapa III:



Reacciones de Neutralización

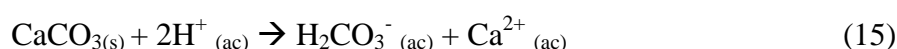
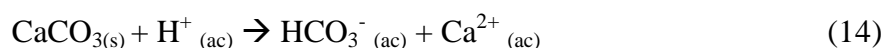
Junto a los minerales generadores de acidez, pueden coexistir minerales consumidores de ácido (Tabla 2). Una vez expuestos los minerales a la meteorización, los minerales sulfurados se oxidarán generando condiciones ácidas, mientras los minerales alcalinos reaccionarán neutralizando el ambiente.

Tabla 2: Minerales alcalinos y el rango de pH en que reaccionan. Durante la generación del drenaje ácido el pH desciende produciendo la reacción de los minerales consumidores de ácido presentes en el medio, amortiguando los cambios de pH.

Mineral	Rango de amortiguación (pH)
Carbonatos	5,1-6,9
Óxidos	1,7-4,3

Los minerales consumidores de ácido corresponden principalmente a carbonatos, óxidos y silicatos. De acuerdo a la acidez del medio, distintos minerales alcalinos reaccionan amortiguando el pH a través del consumo de protones.

Los minerales que neutralizan de manera más efectiva son aquellos que contienen carbonato de calcio (Lapakko et al.,1995):



1.2.6. Aspectos biológicos

La posibilidad de que las bacterias estuviesen involucradas en la formación del DAM fue reportado por primera vez en 1919 por Powel y Parr, quienes descubrieron que el carbón inoculado con una solución de sulfato sin esterilizar, producía un drenaje con mayores concentraciones de sulfato que los controles estériles (Singh et al. 1985).

No todos los tipos de mineral están sujetos a lixiviación biológica (Rawlings et al., 2005). En general, esta sucede si el mineral contiene hierro o sulfuro en forma reducida. Existe también la posibilidad de que un mineral sin hierro o sulfuro sea lixiviado si ocurre en manera conjunta con uno que sí los posea.

Los parámetros físicos, geoquímicos y mineralógicos de los relaves, como la temperatura, pH, difusión de oxígeno o la reactividad del mineral, determinan la composición de las comunidades microbianas (Kock et al., 2008).

Los microorganismos de mayor implicancia en la generación de DAM, debido a que pueden ser rápidamente cultivables en estos ambientes, son las bacterias acidófilas hierro y azufre oxidantes tal como *A. ferrooxidans*, *L. ferrooxidans* y, en algunos casos, la especie autotrófica facultativa *Sulfobacillus* (Schrenk et al., 1998; Druschel et al. 2004; Kock et al., 2008).

En biolixiviación por contacto, la bacteria unida al mineral libera hierro ferroso (Rodríguez et al., 2003), el que es usado como donador de electrones por las bacterias que se encuentran en la solución.

Existen distintos factores que intervienen en el desarrollo bacteriano y que, por tanto, afectarán la velocidad de oxidación de los minerales sulfurados. Las bacterias que intervienen en la generación de drenaje ácido requieren de un medio ácido para vivir (acidófilas). Además, en el caso de las bacterias aeróbicas, éstas necesitan de un ambiente con aire, puesto que el O₂ es utilizado como oxidante en la lixiviación, y el CO₂ como fuente de carbono.

Las bacterias requieren distintos elementos para su metabolismo: amonio, azufre e iones metálicos. Como fuente de energía primaria utilizan ión ferroso y azufre inorgánico.

La reacción de oxidación de elementos reducidos depende de la transferencia de electrones, lo que permite considerar el potencial redox como una medida de la actividad microbiana, donde a mayor potencial, mayor actividad.

Los microorganismos se clasifican de acuerdo al rango de temperatura en el cual pueden sobrevivir. Las bacterias mesófilas viven en un rango óptimo de 30-40 °C, las termófilas, sobre los 65 °C. La posibilidad de controlar la temperatura en un proceso de lixiviación artificial depende del método ocupado, ya que la oxidación de los minerales sulfurados es exotérmica.

A. ferrooxidans, es una bacteria gram-negativa, mesófila y acidófila, siendo tolerante a pH entre 1,0 y 6,0, con un pH óptimo cercano a 2,0, donde las variaciones en pH se deben a la cepa y a las condiciones específicas de crecimiento (Valdés et al. 2003, Ohmura et al., 2002). Este organismo puede obtener sus requerimientos de energía y electrones de la oxidación, de varias formas de azufre reducido y hierro ferroso, siendo capaz, además, de reducir anaeróbicamente azufre usando electrones derivados del hidrógeno y de fijar nitrógeno y dióxido de carbono.

El aumento en la oxidación de hierro y el número celular es más rápido a pH entre 2,3 y 3,5 que a pH cercanos a 1,0. Sobre pH 3,5, la velocidad de oxidación de hierro ferroso disminuirá pero las células aún podrán crecer. El descenso en la velocidad pareciera estar

ligado a la formación de precipitados de hierro férrico a pH menos ácido, ya que estos podrían obstaculizar los procesos de transporte de protones en la superficie celular (Meruane y Vargas, 2003; Lu et al., 2010).

Usualmente se asume la bacteria *A. ferrooxidans* como el microorganismo más importante en la generación de drenaje ácido, a pesar de esto investigaciones realizadas por Schrenk et al. (1998), Edwards et al. (1999), y Leveille et al. (2001) muestran que en ciertas condiciones la bacteria hierro oxidante *Leptospirillum ferrooxidans* (*L. ferrooxidans*) puede competir con la *A. ferrooxidans*.

Se ha demostrado que en ambientes cuyos pH son inferiores a 2,0, *L. ferrooxidans* es dominante frente a *A. ferrooxidans* (Kock et al., 2008). Mientras que en que relaves con pH entre \approx 2,0- 4,0, la especie dominante es *A. ferrooxidans* (Leveille et al., 2001).

Cuando el potencial redox es bajo, y más hierro ferroso se encuentra en solución, la *A. ferrooxidans* predominará, y cuando exista una mayor razón férrico/ ferroso, *L. ferrooxidans* predominará. La *A. ferrooxidans* es, además, más sensible a la inhibición por altas concentraciones de ion férrico (Bakhtiari et al., 2011).

En cultivos se ha observado que el pH óptimo de la especie *Leptospirillum* (1,3 -3,0) es inferior al de las especies *Acidithiobacillus* (2,0 – 4,0) (Kock et al., 2008; Xie et al., 2009).

Mientras las especies *Leptospirillum* son oxidantes aeróbicos obligados de ferroso, *A. ferrooxidans* y especies *Sulfobacillus* son más versátiles y capaces también de oxidar hierro reducido y minerales sulfurados aeróbicamente, así como de reducir hierro férrico de manera anaeróbica (Kock et al., 2008).

Mecanismo de oxidación

Oxidación por contacto:

Los microorganismos se unen a la superficie del mineral para solubilizarlo, facilitándose una oxidación enzimática canalizando los electrones desde el mineral hasta un aceptor de electrones apropiado (Malki et al., 2006). Los microorganismos forman una capa de exopolisacaridos (EPS) al unirse a la superficie del mineral (Rawlings et al. 2005).

Oxidación Indirecta:

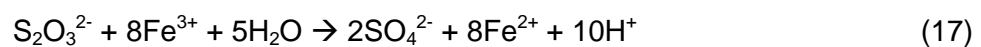
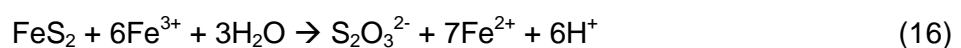
El ataque indirecto de los sulfuros no es producido directamente por reacciones enzimáticas, sino a consecuencia del hierro férrico en solución (Rodríguez et al., 2003; Malki et al., 2006). En este caso los microorganismos se ocupan de la regeneración del hierro férrico, responsable de la oxidación de minerales sulfurados expuestos y de otros compuestos reducidos.

En 1996 Schippers et al. propusieron un mecanismo cíclico de lixiviación de minerales sulfurados solubles en ácido, que actuaba de manera indirecta: Mecanismo del tiosulfato. Luego, en 1999, expandieron este mecanismo considerando los minerales sulfurados como un todo. Este mecanismo se conoce como del polisulfato.

Mecanismo del tiosulfato:

Mecanismo dependiente del ataque oxidativo de hierro férrico, exclusivo de metales sulfurados insolubles en ácido, tal como la pirita (Rawlings et al., 2005). La solubilización de éste ocurre a través del ataque de hierro férrico, siendo el tiosulfato el principal intermediario y el sulfato el mayor producto.

Sólo las bacterias hierro oxidantes son capaces de lixiviar minerales sulfurados no solubles en ácido, ya que estas pueden regenerar el Fe^{3+} consumido en los procesos de oxidación iniciales (Rohwerder et al., 2003). Este mecanismo, usando pirita como ejemplo, puede ser simplificado con las siguientes ecuaciones:



En presencia de hierro férrico el sulfuro de la pirita es oxidado a tiosulfato, liberándose a la solución tiosulfato y hierro ferroso (Rohwerder et al., 2003). Luego, la mayoría de tiosulfato es oxidado por hierro férrico a sulfato vía tetrionato y otros politionatos. En la ausencia de bacterias thiooxidantes también se produce un porcentaje de azufre (10 - 20%).

Mecanismo del polisulfato:

Mecanismo de biolixiviación de metales sulfurados solubles en ácido como la calcopirita (Rohwerder et al., 2003). Estos minerales son disueltos por la acción de hierro férrico y protones, siendo el azufre elemental el principal intermediario.

Más del 90% del sulfuro es transformada a azufre elemental, siendo este relativamente estable (Rawlings et al., 2005). Este puede ser oxidado a sulfato por bacterias tiooxidantes como *A. thiooxidans* y *A. caldus*.

En la ausencia de hierro férrico, las bacterias tiooxidantes oxidan el sulfuro de hidrógeno libre -vía azufre con ácido sulfúrico-, regenerando los protones consumidos previamente en la disolución del mineral.

La disolución del mineral sulfurado es iniciada por el ataque de protones en la estructura cristalina, pudiendo lixiviar en ausencia de hierro férrico. En este último caso, el oxígeno puede actuar como aceptor de electrones. En ambientes ácidos los polisulfuros son convertidos a azufre elemental (S₈).

Oxidación Cooperativa:

Como su nombre lo indica, corresponde a la cooperación entre la bacteria unida a la superficie del mineral y las bacterias que se encuentran en la solución.

1.2.7. Consecuencias Ambientales

Las reacciones generadoras de drenaje ácido no sólo ocurren durante las faenas mineras activas, sino también durante las décadas posteriores. Los bajos pH producidos pueden disolver muchos de los minerales presentes en la mena, causando que el hierro y elementos potencialmente tóxicos como cobre, cadmio y zinc, sean solubilizados y que luego estos puedan ser filtrados o descargados en las corrientes de agua.

El alcance y el grado de contaminación por metales pesados varía de un lugar a otro, dependiendo de las características geoquímicas del relave. (Changul et al., 2010).

El cobre y zinc son elementos traza en la vida de animales y plantas, pero en altas dosis son tóxicos (Savinov et al, 2003). En metales como el cadmio, se conoce que es altamente tóxico para plantas, animales y humanos, y que cuando está presente en formas biodisponibles, existe la bioacumulación tanto en organismos terrestres y acuáticos.

Metales como arsénico, manganeso y mercurio, típicos productos del D.A.M., son conocidos por ser carcinógenos, por causar dermatitis y desórdenes neurológicos (Akabzaa et al., 2007).

La Agencia de Protección del Ambiente clasifica el drenaje ácido de minas como uno de los mayores problemas ambientales de la actividad minera debe enfrentar.

1.2.8. Tests de Predicción

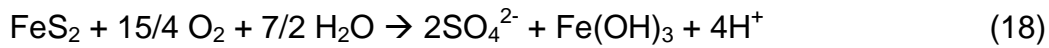
Los test de predicción del drenaje ácido son la mejor herramienta para prevenir los impactos negativos en el medio ambiente. Además, la inversión en prevención resulta menor que el de una posterior remediación.

Análisis Mineralógico

Los análisis mineralógicos pueden indicar las especies presentes en las muestras, tanto productoras como consumidoras de ácido. Permiten además identificar la existencia de aleaciones (asociaciones entre los minerales) que inhibirán la oxidación de los sulfuros (AMIRA, 2002).

Test Estáticos

Constituyen el primer acercamiento para una acertada predicción del DAM, éstos comparan el potencial de producción de ácido máxima de la muestra (PA) con el máximo potencial de neutralización (PN). El PA es determinado multiplicando por un factor de conversión que proviene del balance de la ecuación global:



Por cada mol de pirita (equivalente a $2 \times 32 = 64$ g de azufre) se generan 4 protones (equivalentes a 2 moles de ácido sulfúrico). Luego, considerando que para neutralizar 2 moles de H_2SO_4 se requieren 2 moles de CaCO_3 (equivalentes a 200 g), el valor de PA (expresado en kg equivalente de CaCO_3 por tonelada de material) será:

$$\text{PA} = 31,25 * \%S \quad (19)$$

El PN es una medida de la capacidad del mineral para neutralizar ácido, y está determinado por la adición de ácido a una muestra y la titulación con ácido, siendo el punto final pH 3,5.

El potencial de neutralización neto (PNN) es la diferencia entre el potencial de neutralización y el potencial de generar acidez.

$$\text{PNN} = \text{PN} - \text{PA} \quad (20)$$

Los parámetros mencionados, PA, PN y PNN, se expresan como kilogramos de CaCO_3 por tonelada de material.

Dependiendo del PNN obtenido por medio de los test estáticos, las muestras podrán ser clasificadas en: No generadoras de ácido ($\text{PNN} > +20$ kg equivalente de CaCO_3/t), potenciales generadoras de ácido ($\text{PNN} < -20$ kg equivalente de CaCO_3/t) y muestras cuya clasificación se mantiene incierta ($-20 < \text{PNN} < +20$).

La razón entre PN y PA también permite clasificar las muestras. Si $\text{PN}/\text{PA} > 2$, se considera las muestras como no generadoras de ácido. Si $1 < \text{PN}/\text{PA} < 2$, existe posibilidad de generación de ácido, por lo que esas muestras son clasificadas como inciertas y, finalmente, si $\text{PN}/\text{PA} < 1$, se considera que las muestras presentan potencial de generar ácido.

Los test estáticos se caracterizan por ser relativamente rápidos de realizar y de bajo costo, lo que permite su realización en un gran número de muestras.

Algunos test estáticos son: el análisis de humedad, pH en pasta, test de generación de ácido neta y el método B.C. Research.

pH en pasta

La medición de pH en pasta se realiza en el sobrenadante de la solución de agua desionizada y muestra en proporción 1:1 (p/p) (Chopantarat et al., 2010). Este test indica el número de iones hidrógeno libres en la solución preparada. Como la oxidación de la pirita es dependiente del tiempo, el pH da poca información acerca de si la muestra podrá o no producir drenaje ácido. El pH de una muestra sin meteorizar, con alto contenido de sulfuro, podrá ser similar al del agua desionizada, mientras que el de una muestra meteorizada con un bajo contenido de sulfuro, puede tener un pH menor.

Un pH en pasta inferior a 5,0 dará indicios de una posible generación de ácidos por parte de la muestra, mientras un pH superior a 8,0, la posible presencia de carbonatos (MEND, 1991).

El pH en pasta es un test económico, rápido y simple de realizar. Entre sus desventajas podemos mencionar que es cualitativo, que no nos permite conocer la velocidad en la generación de ácido, que es un indicador de la condición actual de la muestra, y que debe ser combinado con otros test para poder estimar el potencial de generar ácido.

Test NAG

El test NAG, de generación de ácido neta, puede ser usado solo o en conjunto con otros métodos estáticos para confirmar la clasificación de potencial generador de ácido (Changul et al. 2010). Este se basa en el principio de que el peróxido de hidrógeno, H_2O_2 , acelerará la oxidación de los minerales sulfurados presentes en la muestra. Durante este test la generación de ácido y una neutralización puede ser simultánea, por lo que el resultado final representa una medición directa de la cantidad neta de ácido generado por la muestra.

El test NAG no requiere determinaciones de sulfuro y por lo tanto es más usado que otros test estáticos. Debe tenerse en consideración que muestras con un alto contenido de pirita podrían no ser totalmente oxidadas en una sola adición de H_2O_2 , siendo necesario el empleo del test NAG secuencial, con consecutivas adiciones de peróxido (AMIRA, 2002). Esta situación puede llevar a una subestimar el potencial de generación de ácido en muestras con alto contenido de azufre.

British Columbia Research

Existen distintos métodos que permiten determinar el potencial de neutralización de una muestra. Métodos representativos son el British Columbia research inicial (B.C. research) y el Sobek (EPA, 1994; MEND Project, 1996). La titulación BC research determina el potencial de neutralización de una muestra al titular con H_2SO_4 1N hasta alcanzar un pH 3,5. La ventaja de este test sobre otros métodos, es que al no adicionar exceso de ácido a la muestra da un mejor entendimiento del potencial de neutralización del mineral en terreno. De determinar que la muestra es potencialmente generadora de ácido, se realizará un test cinético para confirmar.

Test Confirmativo

El test confirmativo se desarrolla posterior a los test estáticos en los casos dónde la clasificación aún es incierta. Este busca determinar en qué grado el contenido de azufre de la muestra podría ser oxidado, la producción de ácido a partir de sulfuros y actividad bacteriana. Mediante la incorporación de la oxidación biológica en este test, es posible observar si las bacterias ferro y thiooxidantes pueden generar más ácido de lo que puede ser neutralizado. El test confirmativo es, por ende, un test cualitativo que informa de un pH inicial, un pH posterior a la oxidación biológica y una confirmación de producción potencial de ácido (Si/No)

Test Cinéticos

Los test cinéticos son diseñados para acelerar la meteorización natural de los minerales sulfurados, con el propósito de conocer la velocidad en que se producirá el drenaje ácido

(Natarajan 2008). Estos tests se llevan a cabo sólo en aquellas muestras que han sido clasificadas previamente por los test estáticos como potencialmente generadoras de acidez. Los test cinéticos son más costosos e implican una mayor inversión de tiempo que los test estáticos.

1.3. HIPÓTESIS

Los microorganismos juegan un rol importante desde las primeras etapas de formación de drenaje ácido de minas, en que el pH aún se mantiene por sobre 3,5, y su actividad debe ser considerada en la predicción del drenaje ácido.

1.4. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la importancia de la actividad microbiana en las etapas iniciales de la meteorización de minerales sulfurados mediante la aplicación de un test confirmativo

modificado que permita predecir la generación de drenaje ácido en presencia de microorganismos ferro y thiooxidantes.

Objetivos específicos

1. Analizar el potencial de generación de drenaje ácido presente en muestras de relave, mediante la realización de distintos test estáticos.
2. Reconocer el efecto de la oxidación biológica en muestras de relave por medio del desarrollo del test confirmativo, utilizando distintos pH iniciales.
3. Comparar las clasificaciones obtenidas mediante tests estáticos y confirmativos, y observar el efecto de los microorganismos en las primeras etapas de la generación del drenaje ácido de minas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales y reactivos

- Balanza analítica
- Estufa
- Desecador
- pH metro SCOTT
- Titulador automático
- Agitador
- Centrifuga
- Calefactor
- Espectrofotómetro UV marca Agilen
- Agitador orbital termoregulado a 30 °C
- Solución buffer 7,0
- Solución buffer 4,0
- H₂SO₄ 0,2N
- Agua desionizada
- H₂O₂ 15%
- NaOH 0,05 y 0,1M
- Hidroxilamina
- o-fenantrolina

2.2 Métodos

2.2.1. Recolección de muestras

Se realizó el estudio de seis muestras provenientes de los tranques de relave Chinche y Quillay, de la minera Los Pelambres. Estas fueron extraídas a distintas profundidades (Tabla 3).

Tabla 3: Sector del tranque de relave, propiedad de la minera Los Pelambres, y la profundidad (cm) en que se realizó la extracción de las muestras M1-M6.

Muestra	Lugar Extracción	Profundidad Extracción (cm)
M ₁	Area reciente del tranque	10 – 30
M ₂	Area reciente del tranque	40 – 60
M ₃	Area antigua del tranque	0 – 30
M ₄	Area antigua del tranque	60 – 65
M ₅	Pared del tranque	30 – 50
M ₆	Pared del tranque	30 – 50

Es esperable que las muestras tomadas a una mayor profundidad, al estar menos expuestas, se encuentren con un menor grado de oxidación.

2.2.2. Análisis de Humedad

El análisis de humedad se desarrolló acorde a lo publicado por ASTM internacional. Luego de calentar el crisol en la estufa se dejó enfriar en el desecador, para posteriormente registrar el peso. Se adicionó al crisol tres gramos de muestra de relave y se dejó secar la muestra a 30°C por dos horas. Pasado este tiempo se dejó enfriar la muestra contenida en el crisol, se pesó y luego se determinó el porcentaje de humedad. Nuevamente se calentó por dos horas y determinó el porcentaje de humedad, esto fue repetido hasta registrar un valor constante.

El porcentaje de humedad fue determinado de acuerdo a:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Peso de muestra húmeda} - \text{Peso de muestra seca}}{\text{Peso de muestra húmeda}} \times 100 \quad (21)$$

2.2.3 Determinación de pH en pasta

A 20 gramos de muestra se adicionó agua destilada en proporción 1:1, siendo agitada por 5 segundos y dejada reposar por 10 minutos. Luego se introdujo el electrodo de un pH-metro, previamente calibrado, en el sobrenadante y se revolvió suavemente. El pH fue registrado una vez que las lecturas se mantuvieron constante.

2.2.4 BC Research

El consumo de ácido fue determinado a través de la titulación por el método B.C. Research (Duncan et al. 1979). Luego de agregar 100 mL de agua desionizada a 10 gramos de muestra, se agitó mecánicamente a 200 r.p.m. durante 15 minutos. La solución fue filtrada y posteriormente titulada. Tradicionalmente se titula utilizando H_2SO_4 1N hasta pH 3,5, pero debido al bajo gasto de ácido registrado en las primeras mediciones se hizo necesario utilizar una normalidad menor (0,02N).

A partir del volumen de ácido adicionado se estima el potencial de neutralización de la muestra.

El porcentaje de neutralización, mediante la titulación por el método BC research, fue determinado según:

$$\frac{\text{Kg de ácido}}{\text{Tonelada de muestra}} = \frac{(C_i - C_f) \times V}{\text{gramos de muestra}} \quad (22)$$

Dónde:

C_i : Concentración inicial de ácido [gr/Lt]

C_f : Concentración final de ácido [gr/Lt]

V : Volumen de ácido agregado [ml]

2.2.5 Test de generación de ácido neta

Se agregó 250 mL de H₂O₂ 15% (a temperatura ambiente) a 2,5 g de muestra pulverizada en un erlenmeyer de 500 mL y se dejó que la muestra reaccionara. Acabada la efervecencia inicial, se calentó la muestra por un mínimo de 2 horas. Se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente y se registró el pH final (NAG pH).

Se adicionó agua desionizada hasta completar un volumen final de 250 mL, y luego tituló la solución a pH 4,5 con NaOH.

La concentración del NaOH utilizada debe basarse en el NAG pH final de la solución. Si el NAG pH registrado es mayor a 2,0, se usa NaOH 0,10 M para titular, si el NAG pH es menor a 2,0, se debe usar NaOH 0,50 M.

2.2.6 Determinación de hierro en solución

La determinación de Fe (II) y Fe total en solución, se realizó mediante el método colorimétrico de o-fenantrolina estandarizado por Muir et al. en el año 1977.

Determinación de hierro ferroso

Se tomó 0,1 mL de la muestra diluida hasta una concentración de 100 ppm de ión ferroso, seguido a esto se adicionó 0,4 mL de solución de fenantrolina y se agitó. Se agregaron 2 mL de agua destilada y se agitó nuevamente. Finalmente, la absorbancia fue leída a 510 nm.

Determinación de hierro total:

Se tomaron 0,1 mL de muestra diluída hasta una concentración de 100 ppm de ferroso y se adicionó 0,1 mL de hidroxilamina. Se agitó, agregó 0,4 mL de solución de fenantrolina y agitó nuevamente. Posterior a esto, se agregó 1,9 mL de agua destilada y se agitó la solución. La absorbancia fue leída a 510 nm.

Determinación de hierro férrico:

La determinación de hierro férrico disuelto proviene de la diferencia entre el hierro total y el hierro ferroso ya estimados por colorimetría.

$$\text{Fe}^{3+} = \text{Hierro total} - \text{Fe}^{2+} \quad (23)$$

2.2.7 Test Confirmativo

El test confirmativo, como lo indica su nombre, tiene por finalidad comprobar la generación de ácido por parte de la muestra luego de haber realizado los test estáticos.

A diferencia de los test anteriores, el test confirmativo realiza la oxidación de la muestra en presencia de microorganismos, y no por la incorporación de ácido, donde puede generarse una oxidación forzada de las muestras.

En un matraz de 250 mL se agregaron 15 gramos de muestra, 98 mL de medio basal pH 2,8 y 2 mL de inóculo concentrado de un cultivo mixto de microorganismos. Este cultivo fue enriquecido a partir de una muestra de relave proveniente del tranque de relave de la minera Los Pelambres con medio basal (0,4 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,056 g/L de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y 0,4 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y Fe(II) 3 g/L, ajustado a pH 1,6 con H_2SO_4 . Finalmente, los matraces deben mantenerse en agitación continua a 30°C. Se debe monitorear el pH y Eh de 2 a 3 veces por semana.

La clasificación de las muestras se realizó de acuerdo a la evolución de pH en el tiempo. En los casos donde los valores de pH inicialmente disminuyeron para luego estabilizarse se realizó una segunda adición de muestra (15 g). Las muestras cuyos pH resultaron >3,5 se consideraron como no generadores de ácido, mientras pH inferiores a 3,5 fueron consideradas

potenciales generadoras de ácido. El promedio de los pH se obtuvo por el promedio de las concentraciones de hidrógeno de los duplicados en el tiempo.

De acuerdo a esta metodología se realizarán tres test confirmativos distintos, que se diferenciarán en el pH inicial a utilizar.

En el primer test confirmativo se analizarán todas las muestras, iniciando la prueba a un pH 2,8. Los test 2 y 3 se realizarán sólo a las muestras que muestren un mayor potencial de generación de drenaje ácido. El segundo test utilizará un medio basal inicial de 4,5; el último test estudiará el comportamiento bacteriano a pH 2,8 y 4,5, y un pH inicial intermedio: 3,5.

2.2.8 Identificación de bacterias por técnica de CARD-FISH

La identificación de microorganismos presentes en las muestras analizadas para el test confirmativo se realizó mediante la técnica de CARD-FISH, descrita por Pernthaler et al (2002). Este método se basa en la detección de determinadas especies mediante el uso de sondas específicas para ellas, su hibridación y posterior detección mediante la observación al microscopio de epifluorescencia.

La técnica consiste en el traspaso de células desde una suspensión a un soporte, seguido de la permeabilización de células e inactivación de peroxidasas, la hibridación y amplificación de la señal, para una posterior evaluación al microscopio de fluorescencia. Con este objetivo se utilizaron sondas para *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* y *Sulfobacillus sp* (Tabla 4).

Tabla 4: Sondas utilizadas en el método de CARD-FISH para la identificación de las bacterias *A.ferrooxidans*, *A. thiooxidans*, *L. ferrooxidans* y *Sulfobacillus sp* presentes en la solución luego del desarrollo del test confirmativo en un rango de pH 2,8-4,5.

	Secuencia	Referencia
<i>A. ferrooxidans</i>	GGA CTT AAC CCA ACA TCT CA	Bustos, P., 2005
<i>A. thiooxidans</i>	AAG AGG AGC CTA CGT CTG A	Holker, K., 2007

L. ferrooxidans GGG TGA GTA ATA CAT GGG TG Bustos, P., 2005
Sulfobacillus GTG CGT AAT ACA TGA TGC AAG TCG Holzer, K., 2007
sp

III. RESULTADOS

3.1. TEST ESTÁTICOS

3.1.1. Análisis Químico

Conocer el contenido de azufre presente en las muestras puede indicar la capacidad del mineral a ser oxidado. La Tabla 5 indica los porcentajes de azufre total, sulfato lixiviable y sulfuro de las muestras M1-M6. El azufre sulfurado se calcula por la diferencia entre el azufre total y el azufre asociado a sulfato. Todas las muestras analizadas contienen bajo porcentaje de azufre sulfuro.

Tabla 5: Contenido de azufre total (%), sulfuro (%) y sulfato lixiviable en HCl (%) presente en las muestras M1-M6 determinado mediante análisis químico. El potencial de generar ácido (Kg CaCO₃/ton) está dado por el producto entre el contenido de sulfuro de cada muestra y el factor 31,25.

Muestra	Azufre total (%)	Azufre Sulfuro (%)	Sulfato lixiviable en HCl (%)	Potencial de ácido (kg equivalente de CaCO ₃ /t)
M1	0,93	0,06	2,6	1,9
M2	1,24	0,1	3,0	3,1
M3	0,04	0,02	0,07	0,6
M4	0,03	0,01	0,07	0,3
M5	0,45	0,15	0,9	4,7
M6	0,45	0,08	1,11	2,5

El análisis de metales presentes en las muestras de relave M₁, M₃ y M₅ fue realizado por la empresa ALS. En la Tabla 6 se muestran los contenidos de algunos de los metales analizados.

Tabla 6: Contenido de arsénico (ppm), cobre total (ppm) y hierro (%) presente en las muestras de relave M1, M3 y M6.

Elemento	M1	M3	M5
Arsénico Total (ppm)	6	46	13
Cobre total (ppm)	427	521	874
Manganeso total (ppm)	133	162	149
Hierro total (%)	1,38	1,31	1,75

3.1.2. Porcentaje de Humedad

Tabla 7: Contenido de humedad (%) de las muestras de relave M1-M6 determinado de acuerdo al protocolo de ASTM internacional (1998).

Muestra	% Humedad
M1	20,43
M2	27,43
M3	13,05
M4	28,44
M5	5,98
M6	5,69

3.1.3. pH en pasta

El pH en pasta da una medida instantánea de la acidez o alcalinidad. En la Tabla 8 se indican los valores de pH en pasta obtenidos para las muestras M1-M6.

Tabla 8: Valores de pH en pasta de las muestras M1-M6. Los valores de $\text{pH} < 5,0$ indican el potencial de generación de ácido, mientras que $\text{pH} > 8,0$ el posible contenido de carbonatos en la muestra (MEND, 1991).

Muestra	pH en pasta
M1	6,89
M2	5,92
M3	7,77

M4	7,42
M5	7,04
M6	6,45

Los pH en pasta registrados, con excepción de M₂(5.92), son cercanos a la neutralidad, por ende, las muestras analizadas podrían:

- No contener una cantidad significativa de minerales sulfurados.
- Contener minerales sulfurados pero encontrarse en una fase previa a las etapas de formación de drenaje ácido. (De acuerdo al pH de pasta, sólo M₂ habría comenzado la generación condiciones ácidas, encontrándose al inicio de la etapa I)
- Que los minerales sulfurados iniciales hayan sido oxidados y neutralizados antes de la realización del test.

En el caso de que la concentración de sulfuro sea significativa, sería posible determinar si la muestra ya ha sido oxidada mediante la determinación de la concentración de sulfato. A mayor oxidación de minerales sulfurados, mayor será la concentración de sulfato.

3.1.4. Consumo de ácido

El consumo de ácido da cuenta de la capacidad del mineral de neutralizar ácido, por tanto, en M1 (2,28), M5 (2,20) y 6 (1,26) existe una menor cantidad de minerales consumidores de ácido (Tabla 9).

Tabla 9: Consumo de ácido de las muestras M1-M6 (Kg CaCO₃/ton) registrado mediante el test British Columbia Research. A mayor consumo de ácido, mayor es la capacidad de la muestra de neutralizar la acidez del medio.

Muestra	Consumo de ácido (Kg CaCO ₃ /ton)
M1	2,28

M2	4,2
M3	6,63
M4	5,54
M5	2,2
M6	1,26

Se registró la variación de pH según volumen de ácido agregado, con lo que se realizó curvas de pH que muestran cómo se desarrolla el drenaje ácido, así como la existencia de minerales consumidores de ácido.

Para entender las reacciones de neutralización que transcurren a lo largo de la curva de pH, la Tabla 10 presenta los rangos de pH de reacción de algunos minerales alcalinos.

Tabla 10: Rango de pH en que algunos minerales consumidores de ácido reaccionan estabilizando el pH.

	Fórmula	pH de amortiguación
Carbonatos		
Calcita, aragonita	CaCO ₃	5,5 – 6,9
Siderita	FeCO ₃	5,1 – 6,0
Malaquita	Cu ₂ CO ₃ (OH) ₂	5,1 – 6,0
Óxidos		
Gibsita	Al(OH) ₃	3,7 – 4,3
Limonita/goethita	FeOOH	3,0 – 3,7
Ferrihidrita	Fe(OH) ₃	2,8 – 3,0
Jarosita	KFe ₃ (SO ₄) ₂ (OH) ₆	1,7 – 2,0
Aluminosilicatos		0,5 – 1,5

En la Figura 3 se observa la evolución de pH generada por la adición de H₂SO₄ 0,02N en las muestras M1-M6. El número de platós distinguibles en cada muestra depende de los minerales sulfurados que generan condiciones ácidas al ser oxidados, y de los minerales alcalinos que en ciertos rangos de pH reaccionan consumiendo protones. En M₁, por ejemplo, se observan al menos 4 platós, que pudiesen corresponder a Calcita (carbonato) que tiene un pH buffer de 5,5-6,9, Siderita (carbonato) de 5,1-6,0 y Gibsita (óxido) de 3,7-4,7. Si los minerales alcalinos son consumidos y la generación de ácido aún está presente, se observará un nuevo descenso de pH.

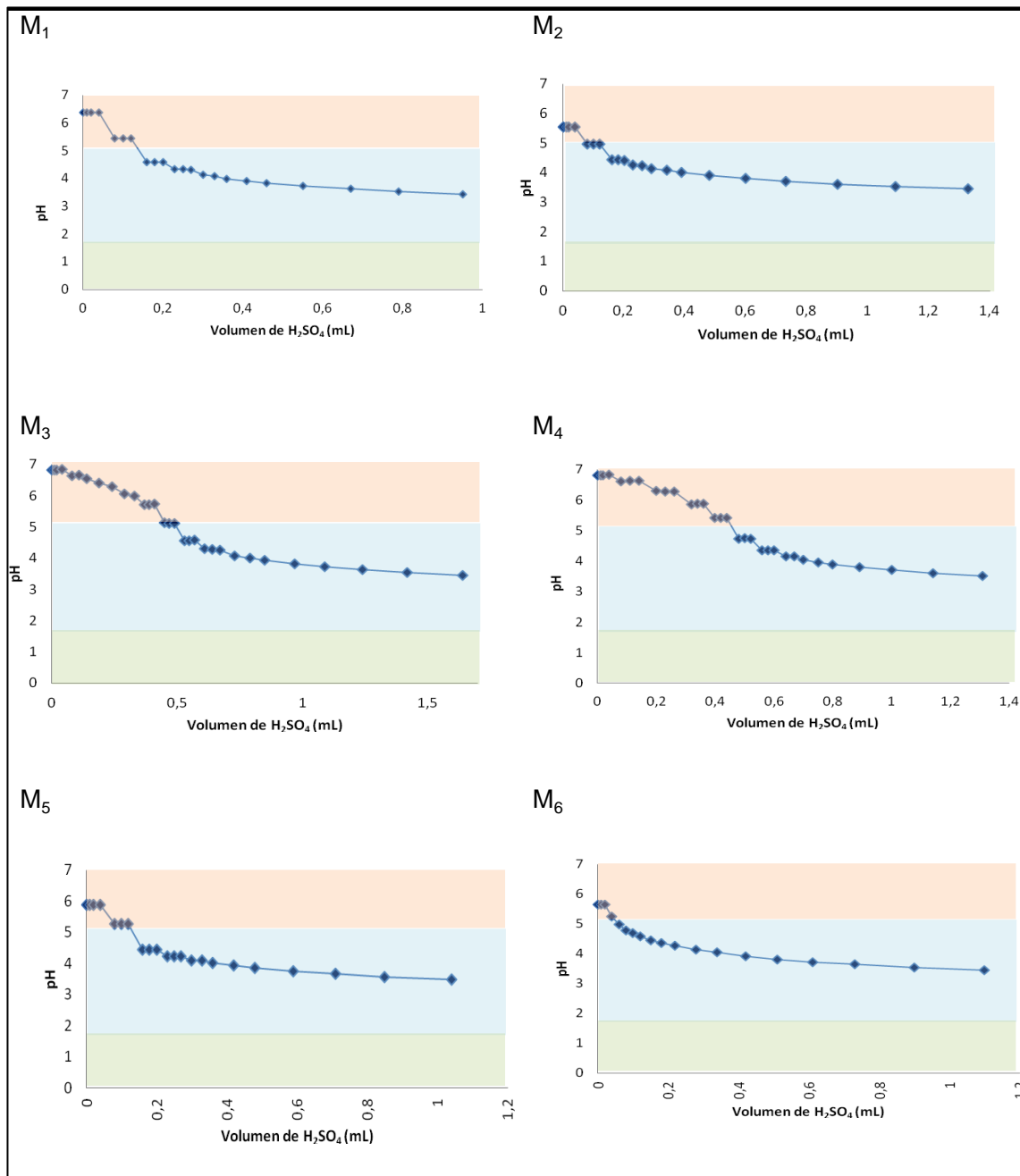


Figura 3: Evolución de pH dada por la adición de H₂SO₄ 0,02N. A medida que el pH disminuye por la adición de ácido, los minerales alcalinos presente en las muestras reaccionan manteniendo el pH constante; una vez agotados los minerales consumidores de ácido, el pH continúa su descenso hasta el fin de la experiencia a 3,5. Las zonas anaranjadas representan zonas de reacción de carbonatos, celestes, de óxidos y verde a la zona en que los silicatos neutralizan acidez.

3.1.5. Test NAG

Tres muestras fueron analizadas por la empresa ALS: M1, M3 y M5. La muestra M1 registró un NAGpH de 4,43, M3 de 4,97 y M5 un pH de 3,43.

La Tabla 11, presenta un resumen de las clasificaciones obtenidas mediante la realización de test estáticos.

Tabla 11: Resumen de los resultados obtenidos mediante los análisis químicos iniciales y los tests estáticos de predicción de drenaje ácido de las muestras M1-M6. NPR corresponde a la relación entre el potencial de neutralización (NP) y el potencial de generar acidez (AP); Si $NPR > 4:1$, las muestras no son potencialmente generadoras de drenaje ácido; entre $1:1-2:1$ requieren de mayores análisis y $NPR < 1:1$ indica que las muestras tienen potencial de generar acidez en el tiempo (Price et al., 1997).

Muestra	Azufre Sulfuro (%)	Sulfato lixiviable con HCl (%)	pH en pasta	Potencial de acidez (AP) (Kg CaCO ₃ /ton)	Potencial de neutralización (PN) (Kg CaCO ₃ / Ton)	Potencial neto de neutralización (PNN) (Kg CaCO ₃ /ton)	NP/AP (NPR)
M1	0,06	2,6	6,89	1,9	2,28	0,38	1,2
M2	0,10	3,0	5,92	3,1	4,20	1,10	1,4
M3	0,02	0,07	7,77	0,6	6,63	6,03	11,1
M4	0,01	0,07	7,42	0,3	5,54	5,24	18,5
M5	0,15	0,9	7,04	4,7	2,20	-2,50	0,5
M6	0,08	1,11	6,45	2,5	1,26	-1,24	0,5

3.2. TEST CONFIRMATIVO

3.2.1. Test Confirmativo 1

El test confirmativo 1 se realizó a las muestras M1-M6 siguiendo el protocolo convencional. Se observó la evolución de pH en el tiempo luego de adicionar a la muestra, inóculo y medio basal a un pH inicial 2,8. Adicionalmente se estudió el comportamiento del potencial redox durante el experimento.

En la Figura 4, se observa las mediciones de pH registradas en el análisis de cada muestra. Una vez iniciado el test de la muestra M1 se produce el aumento de pH con peak registrado a las 96 horas. Esta alza es generada por la reacción del mineral alcalino presente. El pH se mantiene en un rango constante, hasta que una segunda adición de muestra es realizada y existe un nuevo consumo de protones.

No se observaron valores de pH inferiores a 3,5 durante el desarrollo del experimento, por ende, el test confirmativo descarta que la muestra M1 sea generadora de ácido.

En la observación de M2 se aprecia un menor consumo de ácido inicial y, a partir de las 24 horas, el pH casi no registra variaciones, manteniéndose en un rango de pH 2,5-2,9. A las 384 horas se adicionó por segunda vez muestra, el mineral alcalino contenido en esta, generó un nuevo aumento de pH. La última medición registrada indica que una vez más el potencial de acidez es mayor al de consumo de ácido, y el pH disminuye. Las mediciones realizadas indican a M2 como una muestra potencialmente generadora de ácido.

Las muestras M3 y M4 presentan una evolución de pH comparable en el tiempo. La metodología indica que ambas fueron extraídas desde un mismo punto y, por tanto, la semejanza en la medición podría ser explicada por una mineralogía similar. En estas, luego del consumo inicial de protones, se observa pH constante, aún a pesar de una segunda adición de muestra. De acuerdo al test confirmativo, M3 y M4 no son potenciales generadoras de drenaje ácido.

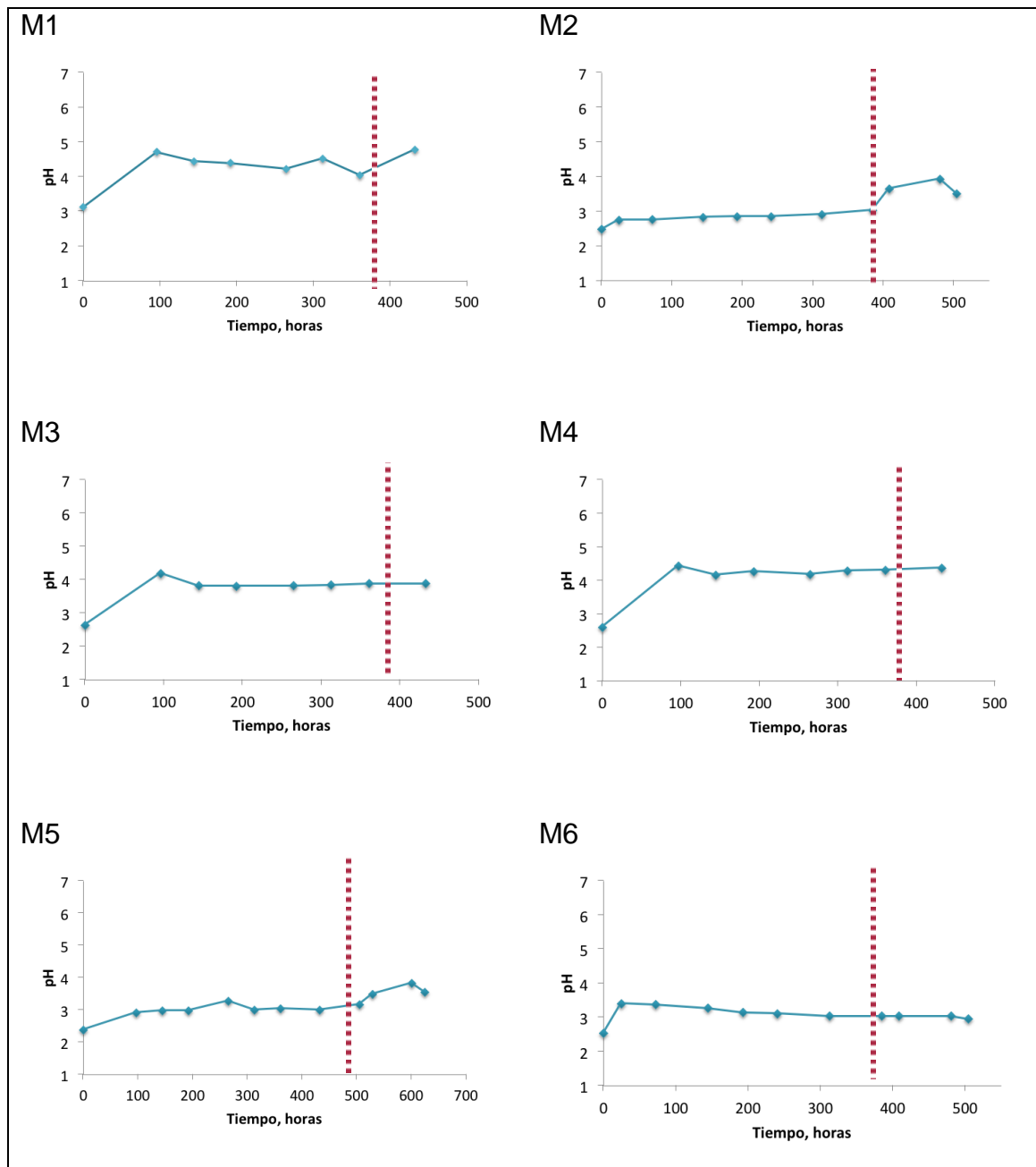


Figura 4: Test confirmativo 1 iniciado a pH 2,8. Se observa la evolución del pH en el tiempo experimentado en las muestras M1 - M6 durante la realización del test confirmativo 1. La línea punteada representa el momento en que la segunda adición de muestra (15 g) fue realizada. Las muestras que registran pH <3,5 son considerados potencialmente generadoras de drenaje ácido.

En M5 se registra un pH constante desde el inicio del test hasta la adición de 15 gramos adicionales de muestra. Pevio a la adición de nueva muestra, M5 mantenía pH en el rango de 2,4 a 3,0. Similar a lo ocurrido con M2, posterior a la adición se registra una nueva

alza de pH y luego se observa la disminución de pH por el agotamiento de minerales alcalinos. La evidencia indica que M5 es potencial generadora de ácido.

En la evolución de pH en el tiempo de M6, la mayor alza de pH se registra a las 24 horas (pH 3,4). A lo largo de toda la experiencia el pH se registra inferior a 3,5, por lo cual debiese ser considerada la muestra M6 como potencial generadora de ácido.

3.2.2. Test Confirmativo 2

El primer test realizado de acuerdo al protocolo utilizó un pH inicial 2,8. Con el propósito de establecer lo que sucede a menor acidez, se modificó el pH inicial del medio basal, empleando un medio basal a pH 4,5.

Este test permite observar si la actividad de las bacterias acidófilas en una etapa previa de la generación del drenaje ácido, etapa II, deriva en una clasificación equivalente a la obtenida utilizando un pH menor.

Se analizaron las tres muestras que, de acuerdo al primer test confirmativo, presentan potencial de generar drenaje ácido.

En la Figura 5 se distingue el comportamiento del pH en el tiempo de las muestras M2, M5 y M6. Al comparar los valores de pH registrados en el estudio de la muestra M2 por los tests confirmativos 1 y 2, se observa que, en este último caso, un mayor número de platós es registrado. Esto se debe a que un mayor número de minerales alcalinos pueden encontrarse reactivos. Se observa además un comportamiento similar entre la muestra inoculada y el control.

A partir de las 912 horas las mediciones de pH realizadas registran pH inferiores a 3,5. Por tanto, la muestra M2 es una vez más clasificada como potencialmente generadora de ácido.

Las muestras M5 y M6, mantienen pH sobre 3,5 a lo largo del experimento. De acuerdo a este test las muestras no debiesen desarrollar condiciones ácidas en el tiempo.

La clasificación de las muestras, por medio de un segundo test confirmativo, difirió en dos de las tres muestras analizadas la primera vez.

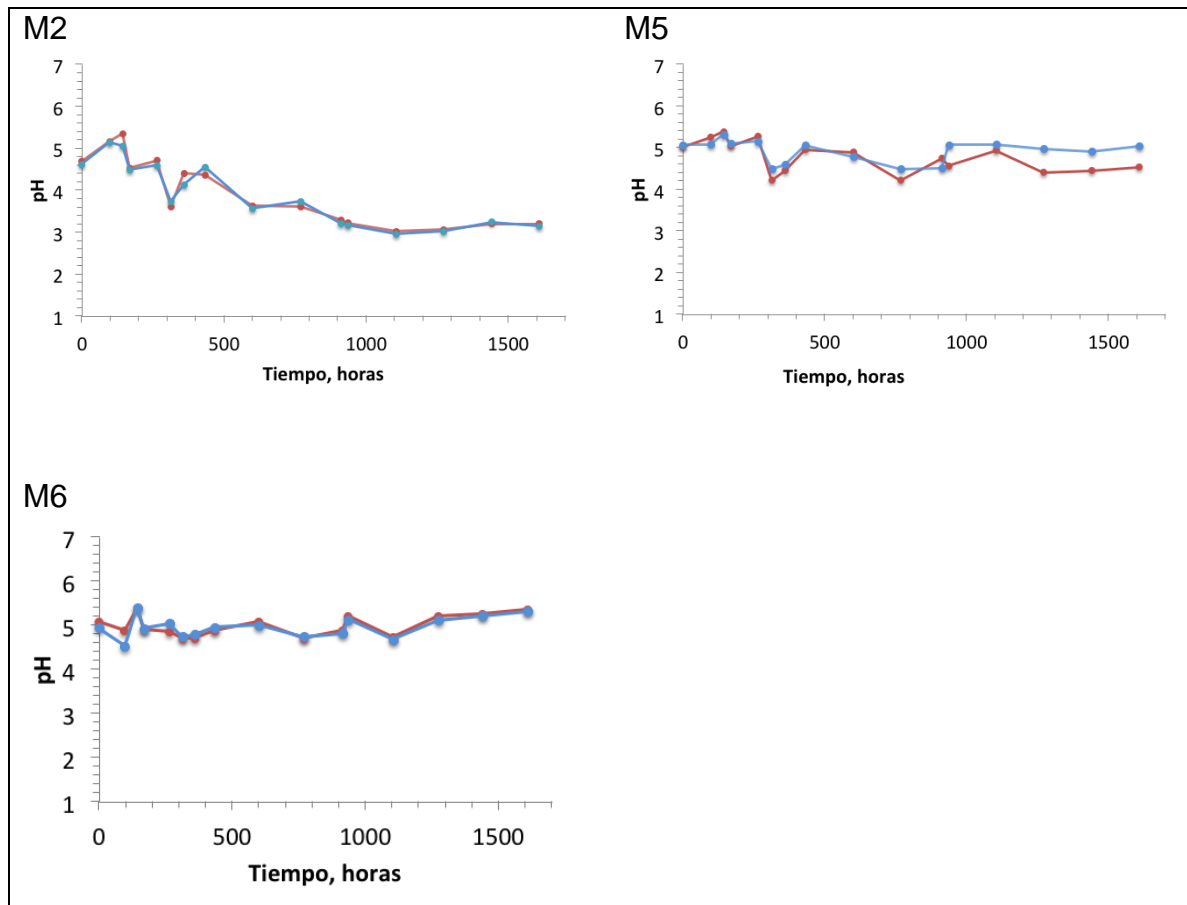


Figura 5: Test confirmativo 2 realizado a pH inicial 4,5. Se presenta las curvas de pH de las muestras (—●—) M1, M5 y M6 y de sus respectivos controles sin inculo (—●—) en el tiempo. Muestras que registran valores de $\text{pH} < 3,5$ en el tiempo son consideradas como potenciales generadoras de drenaje ácido.

3.2.3. Test Confirmativo 3

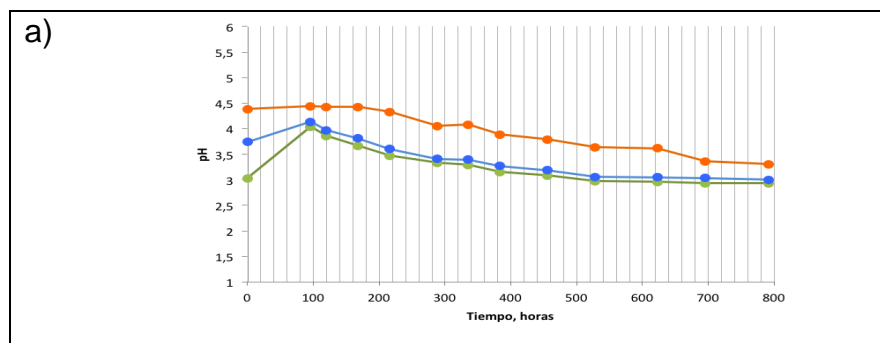
Con el fin de observar más detenidamente el efecto del pH en la predicción del drenaje ácido, se realizó un nuevo test confirmativo analizando las muestras de relave a tres distintos pH de manera simultánea. Se utilizó los dos pH ya estudiados (2,8-4,5) y un tercer pH intermedio: 3,5.

El test confirmativo 3 se aplicó sólo a M2, puesto que es la única muestra en ser clasificada de manera equivalente en los dos tests confirmativos ya realizados.

En los test confirmativos anteriores se realizó el monitoreo pH y Eh en el tiempo (Figura 6). En este se determinará además el hierro ferroso y férrico en solución por el método de colorimetría con o-fenantrolina. La determinación de hierro férrico es realizada por la diferencia entre hierro total y hierro ferroso.

Utilizando un pH inicial de medio basal de 2,8 se registró la evolución de pH, Eh y hierro en solución de M2 en el tiempo. La muestra M2 tuvo un pH inicial de 3,02 y a las 92 horas presentó el peak de la experiencia con pH 4,02. Luego se observó el descenso continuo de pH, registrándose un pH final de 2,93. La ascendente evolución del potencial redox en el tiempo refleja el comportamiento del pH. El análisis de hierro realizado por colorimetría muestra el aumento de hierro en solución en el tiempo. Se determinó que todo el hierro disuelto se encontraría como hierro férrico, puesto que los análisis de hierro ferroso no presentan coloración detectable por este método. No se observó diferencias estadísticas significativas entre las mediciones realizadas de pH, Eh y férrico de las muestras en duplicado y sus respectivos controles sin inocular (datos no mostrados), indicando que las muestras inoculadas y aquellas directamente utilizadas presentan actividad microbiológica similar.

Iniciado el test a pH 3,5, se aprecia que a pesar de la diferencia de pH en que se inició este test con respecto al anterior, se observó un comportamiento de pH y Eh similar entre M2 a pH 2,8 y M2 a pH 3,5. Apreciándose máximos y mínimos de pH y Eh en los mismos intervalos de tiempo. Los pH registrados en M2, pH 3,5 se observan aunque de igual comportamiento, levemente mayor al observado en M2, pH 2,8. Es posible que esta diferencia se deba sólo a la inoculación con un menor número de bacterias al inicio del test. El análisis de hierro realizado se mantiene similar hasta el registro de las 264 horas y, a partir de ese punto, es ya apreciable que aunque el hierro férrico aumenta en el tiempo en ambos casos, en esta muestra la disolución es menor.



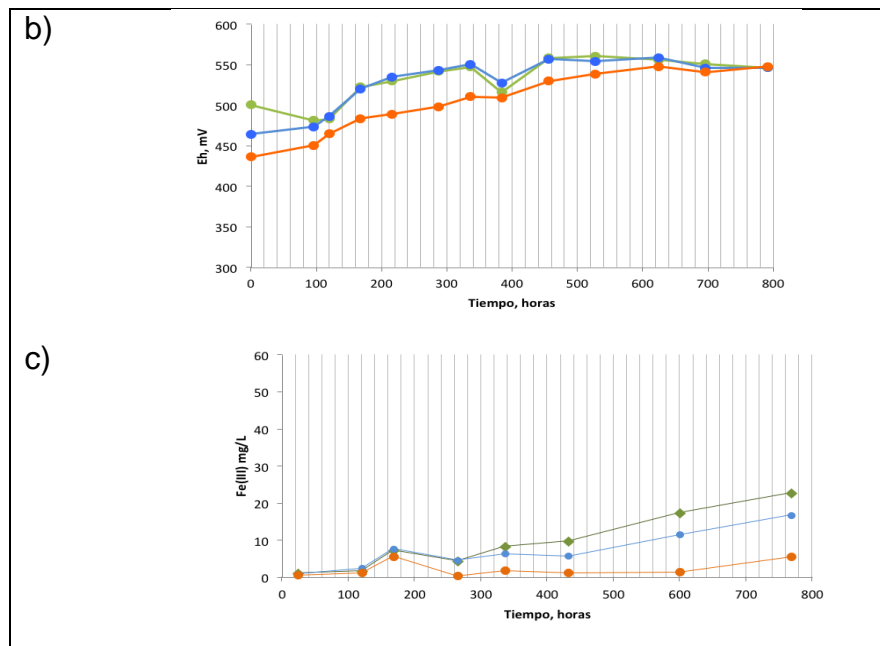


Figura 6: Test confirmativo 3. En la figura se observa la evolución de pH (a), Eh (b) y hierro férrico (c) de la muestra M2. Este test, fue realizado iniciando a tres pH de medio basal diferentes; pH 2,8 (◆), pH 3,5 (●) y pH 4,5 (▲).

En la muestra que utilizó medio inicial a pH 4,5, se presentan máximos y mínimos de pH en los mismos intervalos de tiempo que a pH 2,8 y 3,5, pero en un rango de pH superior. El Eh, por su parte, pareciera tener crecimiento constante en el tiempo. Al término del análisis el potencial de M2 a pH 4,5 ya registraba valores cercanos al de las otras muestras. Como era esperable, la concentración de hierro soluble detectado por colorimetría corresponde a hierro férrico. Esta es menor a los casos anteriores, ya que el mayor pH al que se inició esta experiencia demora la solubilización de la pirita presente en la muestra.

En la Figura 6 se presentan los valores registrados en las mediciones de pH, Eh e ión férrico en solución para la muestra M2.

3.3. Análisis biológico de la población bacteriana

Durante la realización del test confirmativo 3 se monitoreó la actividad de las bacterias en la muestra M2 por medio de mediciones de pH, Eh e ión férrico en solución. Se realizó además la técnica de CARD-FISH a una mezcla de cultivos que se habían desarrollado a distintos pH, pero que tenían un origen común.

Fue posible identificar, mediante la realización de CARD-FISH, la presencia de *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans*, *L. ferrooxidans* y *Sulfobacillus sp.*, estimando que las tres primeras se encontraban en una concentración similar, y que *Sulfobacillus sp* se encontraba en una concentración menor.

Lo observado por medio de CARD-FISH concuerda con lo indicado en la literatura, en que se indica a estas bacterias como de fácil crecimiento en condiciones que simulan la generación de DAM. El porcentaje en que estas bacterias se encuentran presentes debiese variar en los distintos sitios del relave de acuerdo el tipo de minerales presentes y al estado de avance de generación de drenaje ácido.

IV. DISCUSION

Los test estáticos realizados son de naturaleza química al corresponder a la oxidación de las muestras por H_2SO_4 , H_2O_2 u otro compuesto que genere la oxidación de los sulfuros presentes. Por tanto, logran simular las condiciones iniciales de la formación de drenaje ácido. Estos test pueden arrojar distintas conclusiones de acuerdo al tamaño de las partículas, temperatura, pH, y la duración del test en que se realizan las estimaciones (Maest et al., 2005). La mineralogía de la muestra y materia orgánica también pueden afectar las estimaciones de los potenciales de acidez y neutralización en muestras con un bajo contenido de azufre (Usher et al., 2003). Además, el resultado varía de acuerdo a la interpretación de los resultados de cada test estático.

La presencia de sulfatos o azufre en materia orgánica podría sobre estimar el potencial de generar acidez cuando se utiliza el azufre total (Maest et al, 2005), razón por la cual, en este estudio, se utiliza el porcentaje de azufre sulfurado para la determinación del potencial de acidez. El análisis químico de las muestras indica que M2 (0,10), M5 (0,15), y M6 (0,08) contienen los mayores porcentajes de minerales sulfurados. De acuerdo a Usher et al. (2003), este contenido de azufre sulfuro sería insuficiente para que su oxidación genere acidez ($\%S < 0,3$). A esto se agrega que no todos los minerales sulfurados se encuentran reactivos, y que no todos los minerales sulfurados generan ácido al ser oxidados (Maest et al., 2005). Las muestras M1 (2,6), M2 (3,0) y M6 (1,11) poseen el mayor contenido de sulfato lixiviable.

El test de pH en pasta permite determinar la concentración actual de protones en la muestra sin predecir el potencial de generar acidez (Usher et al., 2003). De acuerdo a este pH, MEND (1991) señala que ninguna de las muestras contendrían, al momento de ser analizadas, acidez por oxidación, puesto registraron $pH > 5,0$.

Los valores registrados de NAG pH, para M1 (4,43) y M3 (4,97), indican que estas presentan un bajo riesgo de generar ácido ($3,5 < pH < 5,5$). Por otro lado, la muestra M5 (NAG pH= 3,4) presenta un alto riesgo al alcanzar un $pH < 3,5$ (AMIRA, 2002; Usher et al., 2003). El

peróxido de hidrógeno utilizado en la determinación del NAG pH oxida rápidamente los sulfuros reactivos presentes en la muestra, por lo tanto solo estos sulfuros son determinados, evitando así la confusión producida por el contenido de azufre total y sulfatos (Usher et al., 2003). Hay que tener presente que el H_2O_2 presenta una menor reactividad frente a carbonatos, silicatos y algunos minerales sulfurados, y que esta menor reactividad podría llevar a que el test convencional de una adición no fuese suficiente frente a ciertas mineralogías, derivando en una errada clasificación (AMIRA, 2002).

De acuerdo al potencial neto de neutralización, las muestras M1-M6 se mantienen en una zona de incertidumbre al encontrarse en un rango $20 > PNN > -20$ Kg $CaCO_3/t$ (Villeneuve et al., 2003; Usher et al., 2003).

De acuerdo a la guía de generación de drenaje ácido, desarrollada por Price et al (1997), en relación al potencial de neutralización y acidez (NPR), las muestras M3 y M4 no presentan potencial de generar ácido, y no se requiere de análisis posteriores ($NPR > 4:1$). Por otro lado, M1 y M2 (NPR entre $1:1-2:1$) pueden llegar a generar DAM si el potencial de neutralización no es lo suficientemente reactivo. Finalmente, M5 y M6 ($< 1:1$) sí resultan potenciales generadoras de drenaje ácido (Figura 7).

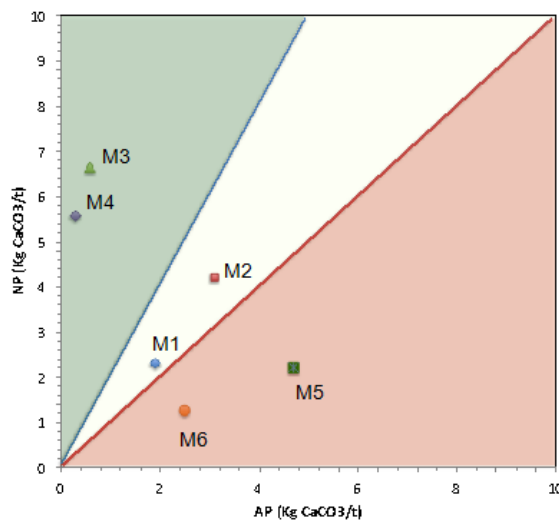


Figura 7: Potencial de generar ácido basado en relación NP/AP. Clasificación de las muestras M1-M6, de acuerdo al equilibrio entre los potenciales de acidez y neutralización (NPR).

El test B.C. Research, estima el potencial de neutralización, mediante la titulación de las muestras hasta un punto final a pH 3,5 (Duncan et al., 1979). El utilizar un punto final inferior a $\text{pH} < 6$, para determinar el potencial de neutralización, podría sobre estimar el potencial de neutralizar de las muestras, puesto considera la reacción de minerales alcalinos, como silicatos, a pH ya muy ácidos (Maest et al, 2005).

La clasificación basada en la razón del potencial de neutralización (NP/AP) y el NAGpH (Figura 8), define las muestras como no generadoras de ácido cuando se encuentran en el cuadrante superior derecho ($\text{pH NAG} > 4,5$; $\text{NP/AP} > 1$) y como potencialmente generadoras en el cuadrante inferior izquierdo ($\text{NAGpH} < 4,5$; $\text{NP/AP} < 1$). Conforme a lo anterior, de las tres muestras analizadas para NAGpH, M5 sería potencialmente generadora, M1 mantendría una clasificación incierta, y M3 podría ser descartada como potencial generadora de drenaje ácido (Villeneuve et al., 2003).

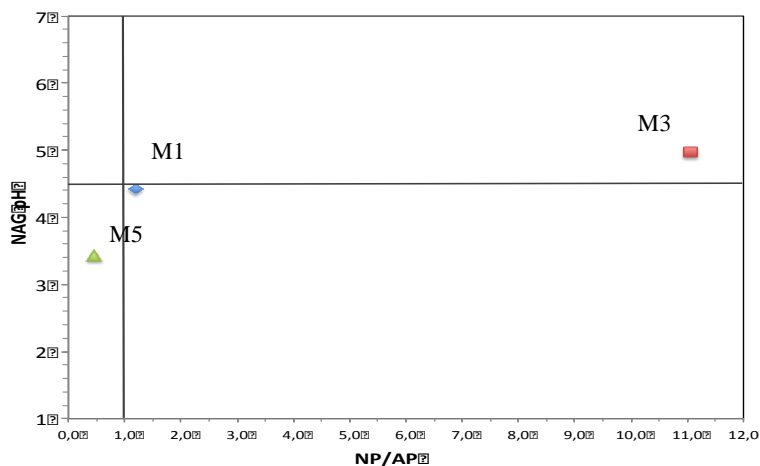


Figura 8: Potencial de generar acidez de M1, M3 y M5 de acuerdo al NAG pH y a la razón entre el potencial de neutralización y de acidificación (NPR). Las muestras que presentan $\text{NAG pH} > 4,5$ y $\text{NPR} > 1$ son consideradas no generadoras de ácido; mientras que $\text{NAG pH} < 4,5$ y $\text{NPR} < 1$ como potenciales generadoras de acidez.

El uso del test confirmativo en la predicción del drenaje ácido cobra importancia al incorporar la actividad de los microorganismos en las pruebas de predicción. Hecho que no ocurre en los test estáticos, cuyo resultados se basan en la oxidación química y no biológica de las muestras (Peralta, 1997).

El primer test confirmativo fue realizado a las muestras M1-M6. Este siguió la metodología convencional (EPA, 1994), empleando un medio basal pH inicial 2,8. Por el pH utilizado, el test confirmativo convencional permite estudiar la actividad oxidativa de los microorganismos en la etapa III (pH<3,5) de generación de drenaje ácido definida por Ferguson en 1987. La observación del pH y potencial redox durante la realización del test indica que M2, M5 y M6 presentan potencial de generar drenaje ácido, puesto que mantienen un pH inferior a 3,5 durante la experiencia. Estas muestras contenían además los mayores porcentajes de azufre sulfurado. Finalmente, la razón entre el potencial de neutralización y acidez, determinada mediante los tests estáticos realizados previamente, ya había descrito a M5 y M6 como potenciales generadores de ácido, mientras M2 fue identificado por primera vez como un posible generador de condiciones ácidas.

Meruane (2002) demostró que a pH<4,8, la oxidación de ión ferroso se relaciona principalmente con la actividad bacteriana. Esto llevó al desarrollo de un segundo test confirmativo, ahora iniciando a un pH de medio basal mayor (4,5). De esta forma fue posible estudiar lo que sucede en una etapa previa de la generación de drenaje ácido (3,0< Etapa II <4,5), donde se mantiene una transición entre la oxidación química y biológica de los minerales. La evolución de pH y potencial redox de las muestras analizadas, M1, M5 y M6, muestran sólo a M2 como potencialmente generadora de acidez al mantener pH < 3,5.

La Tabla 12 presenta la comparación de las muestras M1-M6 de acuerdo a los resultados obtenidos en los test estáticos y test confirmativo 1 y 2.

Tabla 12: Comparación de las muestras M1-M6 de acuerdo a los test estáticos y test confirmativo (T.C.) 1 y 2. Se describen las muestras como no potenciales generadoras de drenaje ácido (■), de clasificación incierta (■) y muestras potencialmente generadoras de acidez (■). S/I= Sin información.

Muestra	pH pasta	PNN	NAGpH	NPR	NAGpH vs NPR	T.C. 1	T.C. 2
M1	6,89	0,38	4,43	1,2		> 3,5	S/I
M2	5,92	1,10	S/I	1,4	S/I	< 3,5	< 3,5
M3	7,77	6,03	4,97	11,1		> 3,5	S/I
M4	7,42	5,24	S/I	18,5	S/I	> 3,5	S/I
M5	7,04	-2,50	3,45	0,5		< 3,5	> 3,5
M6	6,45	-1,24	S/I	0,5	S/I	< 3,5	> 3,5

A partir de la Tabla 12 es posible observar las clasificaciones de las muestras M1-M6 obtenidas por los distintos test estáticos y por los test confirmativo 1 y 2. Los test confirmativos permitieron describir a M2 como la única muestra potencialmente generadora de drenaje ácido, resultado que no fue previsto con el uso de los test estáticos. La realización del test confirmativo a un pH mayor, test a pH 4,5, permitió descartar la clasificación previa de M5 y M6 como potenciales generadoras de ácido.

Adicional a los pH ya analizados, 2,8 y 4,5, se realizó un tercer test a pH intermedio: 3,5. Se analizó una única muestra, puesto las clasificaciones ya habían sido definidas a pH 2,8 y 3,5 de manera equivalente (potencialmente generadora de ácido). Este test permitió observar la actividad de los microorganismos por medio de pH, Eh y hierro férrico a un pH intermedio. En todos los casos se observó la disminución de pH y el aumento de Eh y ión férrico en el tiempo y, a pesar de las diferencias en el pH inicial del medio basal utilizado, en las tres situaciones estudiadas M2 fue descrita como posible generadora de drenaje ácido.

Finalmente, mediante el empleo del test student, se determinó que no hay diferencia entre el test iniciado a pH 2,8 y el test a pH inicial 3,5, pero que sí existe diferencia al comparar los test confirmativos a los pH 2,8-4,5 y 3,5-4,5 (Tabla 13).

Tabla 13: Comparación de los resultados del test confirmativo 3. Se presenta la comparación de los tests confirmativos realizados a pH iniciales 2,8-3,5; 2,8-4,5 y 3,5-4,5 de acuerdo al test student (t), $p < 0,05$.

	2,8-3,5	2,8-4,5	3,5-4,5
t calculado	-1,475	-6,412	-4,923
t crítico	2,064	2,064	2,064

El uso de CARD-FISH permitió identificar la presencia de cuatro especies de microorganismos en un rango de pH entre 2,8-4,5 en la muestra de relave M2. Como era esperable, la bacteria es la forma de vida predominante en las condiciones de estudio utilizadas (Schrenk et al., 1998; Kock et al., 2008).

Concordando con estudios realizados en muestras de relaves a pH menos ácidos ($2,7 < \text{pH} < 4$), se identificó las bacterias *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans*, y *Leptospirillum ferrooxidans* en una proporción similar. Es esperable que, con el aumento del potencial redox en el tiempo, el porcentaje de *Leptospirillum* vaya en aumento, puesto existen estudios que indican que *Leptospirillum* es menos sensible a la inhibición por Fe^{3+} que *A. ferrooxidans* (Rawling et al., 1999; Kock et al., 2008). Se esperaría además que, a medida que aumente la oxidación de los minerales sulfurados, el pH disminuya y aumente la concentración de *Leptospirillum*, ya que, el pH óptimo de *Leptospirillum* es menor que el registrado por *A. ferrooxidans* (Kock et al., 2008). En cuanto a la concentración de *Sulfobacillus sp.*, es probable que la temperatura utilizada en el test confirmativo (30°C) haya incidido en su

menor observación. Tanto la temperatura, pH, difusión de oxígeno y reactividad del mineral, determinan la composición de la comunidad microbiana (Kock et al., 2008).

V. CONCLUSIONES

La aplicación de tests estáticos a seis muestras de relave provenientes de los tranques de relave Quillay y Chinche de la minera Los Pelambres, generaron resultados dispares. Por tanto, las muestras no pudieron ser clasificadas o descartadas como potenciales generadoras de drenaje ácido mediante la sólo aplicación de los test estáticos.

La realización del test confirmativo a pH inicial 2,8, permitió clasificar tres de las seis muestras como posibles generadoras de drenaje ácido. Sin embargo, la aplicación del test confirmativo a un pH inicial superior, 4,5, llevó a la clasificación de una única muestra (M2).

La aplicación del test confirmativo a un pH mayor permitió simular una etapa en que el drenaje aún no se ha desarrollado por completo, y donde existe una transición entre la oxidación química y biológica de los minerales sulfurados.

La realización de CARD-FISH corroboró la presencia de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* y *Sulfobacillus* sp en las soluciones que se encontraban en un rango de pH 2,8-4,5.

En virtud de las conclusiones ya esgrimidas se recomienda, en estudios de predicción de drenaje ácido de minas, complementar el uso de los test estáticos con la aplicación del test confirmativo a pH 2,8 y 4,5.

VI. REFERENCIAS

- Akabzaa, T., Armah, T., Baneong-Yakubo, B. (2007). Prediction of acid mine drainage generation potential in selected mines in the Ashanti Metallogenic Belt using static geochemical methods. *Env. Geol.* 52:957-964.
- AMIRA. (2002). ARD Test Handbook. Project P387A Prediction & Kinetic Control of Acid Mine Drainage.
- ASTM International, Document Summary “D2216-98 Standard Test Method for Laboratory Determination of Water (Moisture) Content of Soil and Rock by Mass”
- Bakhtiari, F., Atashi, H., Zivdar, M., Syedbagheri, S., Hassan, M. (2011), Bioleaching kinetics of copper from copper smelters dust. *J. Ind. Eng. Chem.* 17: 29-35.
- Broughton, L., Robertson, A. (1992), Acid Rock Drainage from Mines - Where We Are Now. IMM Minerals, Metals and Environment Conference, Manchester, UK.
- Bustos, P. (2005), “Identificación de bacterias hierrooxidantes en procesos de biolixiviación mediante técnicas moleculares”. Tesis. (Ingeniería Civil en Biotecnología). Santiago, Chile, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas.

- Changul, C., Sutthirat, C., Padmanahban, G., Tongcumpou, C. (2010). Chemical characteristics and acid drainage assessment of mine tailings from Akara Gold mine in Thailand. *Environ Earth Sci.* 60:1583-1595.
- Chotpantarat, S. (2011) A Review of Static Test and Recent Studies. *Am. J. Applied Sci.* 8: 400-406.
- COCHILCO [en línea] <www.cochilco.cl> [Consulta: 24 febrero 2012].
- Davenport, W., King, M., Schlesinger, M., Biswas, A. (2002), Extractive Metallurgy of copper, Elsevier Science, Cuarta edición, Oxford, UK.
- DHHS (Department of Health and Human Services) (2004) Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) toxicological profile for copper. Atlanta, USA.
- Druschel, G., Baker., Gihring, T., Banfield, J. (2004), Acid mine drainage biogeochemistry at Iron Mountain, California. *Geochem. Trans.*, v.5(2).

- Duncan, D., Bruynesteyn, A. (1979), Determination of Acid Production Potential of Waste Materials, Met. Soc. AIME, A79-29, 10p
- Edwards, K., Gihring, T., Banfield, J. (1999), Seasonal Variations in Microbial Populations and Environmental Conditions in an Extreme Acid Mine Drainage Environment. Environ. Microbiol. 65: 3627-3632.
- EPA, (1994), Technical Document: Acid Mine Drainage Prediction, Washington, USA.
- Ferguson , K., Erickson, M. (1987), Will it generate AMD?. Proceedings of 11th Annual British Columbia Mine Reclamation Symposium in Campbell River, Canada.
- Holker, K. (2007), “Cuantificación de bacterias en procesos de biolixiviación mediante NMP-PCR”. Tesis (Ingeniería Civil en Biotecnología), Santiago, Chile, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas.
- Jenkins, D., Johnson, D., Freeman, C. (2000). Mynydd Parys Cu-Pb-Zn mines: mineralogy, microbiology and acid mine drainage. Mineralogy Society 9:161-179.
- Kock, D., Schippers, A. (2008), Quantitative Microbial Community Analysis of Three Different Sulfidic Mine Tailing Dumps Generating Acid Mine Drainage. Appl. Environ. Microbiol. 74(16): 5211-5219.
- Lapakko, K., Wessels, J., Antonson. D. (1995). Long term dissolution testing of mine wastes. Reporte a la Agencia de Protección Ambiental, USA.
- Léveillé, S., Leduc, L., Ferroni, G., Telang, A., Voordouw, G. (2001), Monitoring of bacteria in acid mine environments by reverse sample genome probing. Can. J. Microbiol. 47: 431-442.
- Lu, S., Gschkat, S., Reiche, M., Akob, D., Hallberg, K., Kusel, K. (2010), Ecophysiology of Fe-Cycling Bacteria in Acidic Sediments. Appl. Environ. Microbiol. 76: 8174-8183.
- Maest, A., Kuipers, J. (2005), Predicting Water Quality at Hardrock Mines: Methods and Models, Uncertainties, and State of the art, Boca Environmental, USA.
- Malki, M., González-Toril, E., Sanz, J., Gómez, F., Rodriguez, N., Amils, R. (2006), Importance of iron cycle in biohydrometallurgy, Hydrometallurgy 83: 223-228.
- MEND Project 1.16.1b (1991), Acid Rock Drainage Prediction Manual, Department of Energy, Mines and Resources, Canada.
- MEND Project 1.16.3 (1996), Determination of Neutralization Potential for Acid Rock Drainage Prediction, Mining and mineral process engineering, University of British Columbia, Canada.

- Meruane, G. (2002). Oxidación Bacteriana de Sulfato Ferroso con *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Tesis (Doctorado en Ciencias de la Ingeniería, Mención Química), Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, 73-89.
- Meruane, G., Vargas, T. (2003), Bacterial oxidation of ferrous iron by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in the pH range 2,5-7,0. *Hydrometallurgy*, 71 (1-2): 149-158.

- Muir, M., Anderson, T. (1977), Determination of Ferrous Iron in Copper Process Metallurgical Solutions by o-phenantroline Colorimetric Methods. *Metall Trans.* Vol 8B: 517-518.
- Natarajan, K. (2008), Microbial aspects of acid mine drainage and its bioremediation. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China.* 18: 1352-1360.
- Ohmura, N., Sasaki, K., Matsumoto, N., Saiki, H.. (2002), Anaerobic Respiration Using Fe³⁺, S₀ y H₂ in the Chemolithoautotrophic Bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* 184: 2081-2087.
- Peralta, G. (1997). Characterization, Leachability and Acid Mine Drainage Potential of Geothermal Solid Residues, Tesis (Doctorado en química aplicada), Toronto, Canadá. Universidad de Toronto, Departamento de Ingeniería Química e Ingeniería Aplicada.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J., Amann, R. (2002), Fluorescence In Situ Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3094-3101.
- Rawlings, D., Tributsch, H., Hansford, G. (1999). 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.
- Rawlings, D. (2005), Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microbial Cell Factories*, 13(4): 1–15.
- Rodríguez, Y., Ballester, A., Blázquez, M.L., González, F., Muñoz, J. (2003), New information on the pyrite bioleaching mechanism at low and high temperature. *Hydrometallurgy*, 71:37–46.
- Rohwerder, T., Gehrke, T., Kinzler, K., Sand, W. (2003), Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63:239-248.
- Savinov, V., Gabrielsen, W., Savinova, T. (2003). Cadmium, zinc, copper, arsenic, selenium and mercury in seabirds from the Barents Sea: levels, inter-specific and geographical

differences. *Science of the Total Environment*, 306: 133-158.

- Schrenk, M., Edwards, K., Goodman, R., Hamers, R., Bandfield, J. (1998), Distribution of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*: Implications for Generation of Acid Mine Drainage. *Science*, 279: 1519-1522.
- Schipper, A., Sand, W. (1999), Bacterial Leaching of Metal Sulfides Proceeds by two indirect Mechanisms Via Thiosulfate or Via Polysulfides and Sulfur. *Appl. Env. Microbiol.* 65(1): 319-321.
- Singer, P., Stumm, W. (1970), Acidic mine drainage: the rate-determining step. *Science* 167: 1121-1123.
- Singh, G., Mridula, B. (1985), Bacterial formation of acid mine drainage: Causes and control, *J. Scient. Ind. Res.*, 44:478-485.
- Southam, G., Beveridge, J. (1992), Enumeration on Thiobacilli within pH-neutral and acid mine tailings and their role in the development of secondary mineral soil, *Appl. Environ. Microbiol.* 58(6): 1904-1912.
- Stewart, W., Miller, S., Smart, R. (2006). *Advances in Acid Rock Drainage (ARD) Characterisation of Mine Wastes*, 7th International Conference on Acid Rock Drainage (ICARD), MO, USA.
- Tailings.info [en línea], Página relacionada a las tecnologías de manejo y almacenamiento de relaves <www.tailings.info/tailings.htm> [Consulta: 05 Junio2011].
- Usher, B., Cruywagen, L., Necker, E., Hodgson F. (2003), *Acid-Base Accounting, Techniques and Evaluation: Recommended Methods for Conducting and Interpreting Analytical Geochemical Assessments at Opencast Collieries in South Africa*. Water Research Commission. Sudáfrica.
- Villeneuve, M., Bussiere, B., Benzaazona, M. Aubertin, M., Monroy, M. (2003) The Influence of Kinetic test type on the geochemical response of low acid generating potential tailings. *Tailings and Mine Waste*, 269-279.
- Xie, X., Xiao, S., Liu, J. (2009), Microbial Communities in Acid Mine Drainage and Their Interaction with Pyrite Surface. *Curr. Microbiol.* 59: 71-77.