

# Metodologías y técnicas instrumentales para el estudio de sistemas de aguas ácidas

P. Acero Salazar<sup>(1)</sup>, M.<sup>a</sup> P. Asta Andrés<sup>(1)</sup>, C. Torrentó Aguerri<sup>(2)</sup>, M.<sup>a</sup> J. Gimeno Serrano<sup>(1)</sup>, L. F. Auqué Sanz<sup>(1)</sup>  
y J. B. Gómez Jiménez<sup>(1)</sup>

(1) Grupo de Modelización Geoquímica, Área de Petrología y Geoquímica del Departamento de Ciencias de la Tierra, Universidad de Zaragoza, Campus San Francisco, c/Pedro Cerbuna 12, 50010 Zaragoza (España).  
patriace@unizar.es, masta@ucmerced.edu, lauque@unizar.es, jgomez@unizar.es

(2) Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua (IDAEA), CSIC, C/Jordi Girona, 18-26, 08034 Barcelona, España  
clara.torrento@idaea.csic.es

## RESUMEN

Los sistemas de aguas ácidas presentan una gran complejidad geoquímica, ya que involucran una gran variedad de procesos de interacción entre aguas superficiales o subterráneas, gases (sobre todo el oxígeno atmosférico), minerales responsables de la generación de acidez y aquellos que intervienen en la atenuación natural de los contenidos de elementos disueltos y distintos tipos de actividad biológica. Por ello la calidad y fiabilidad de un estudio geoquímico en este tipo de sistemas dependen en gran medida de que las técnicas de muestreo, preservación y análisis de aguas, minerales, gases y muestras biológicas sean las más adecuadas para el tipo de interpretaciones que se desea realizar. En este trabajo se detallan las principales características de los métodos y técnicas más habituales empleados en los estudios geoquímicos desarrollados en sistemas de aguas ácidas en entornos ricos en sulfuros, teniendo en cuenta no sólo los distintos tipos de muestras habituales sino también las peculiaridades de los distintos tipos de sistemas (cortas mineras, balsas de lodos, arroyos ácidos, etc). Además, se indican las posibles aplicaciones y dificultades de cada metodología y técnica descrita y se proporcionan referencias a otros estudios científico-técnicos que permiten profundizar en los fundamentos de su uso.

Palabras clave: geoquímica, metodología, minería, sulfuros, toma de muestras

## ***Methods and instrumental techniques for the study of acidic water systems***

### ABSTRACT

*From a geochemical point of view acidic waters are very complex systems in which many interaction processes take place between surface and ground waters, gases (particularly atmospheric oxygen), acid-generating minerals, solid phases responsible for the natural attenuation of elements in solution and also many types of biological activity. Owing to this high complexity, the quality and reliability of any geochemical study focusing on this type of system will depend largely upon the use of appropriate methods of sampling, preservation and analysis of waters, minerals, gases and biological samples. We describe here the main methods and techniques used in geochemical studies of acid waters associated with sulphide mineral environments, taking into account not only the various sample types but also the features of the main types of system (open pits, tailings ponds, acid streams etc.). We also explain the main applications and limitations of each method or technique and provide references to earlier technical and scientific studies in which further information can be obtained.*

*Key words: geochemistry, methodology, mining, sampling, sulphide minerals*

## **Introducción**

La primera etapa a desarrollar para caracterizar geoquímicamente un sistema de aguas ácidas o de residuos mineros ricos en sulfuros consiste, al igual que en otros estudios, en la identificación del problema a resolver y en el diseño de un plan de muestreo y análisis que permita contribuir a su resolución. En esta etapa se debe considerar qué tipo de información se necesita obtener sobre el sistema de interés y cuándo y dónde se debe obtener dicha información. Además

conviene considerar otros factores prácticos, como el tipo de muestras a estudiar (aguas, sólidos, gases, muestras microbiológicas, etc.) o la disponibilidad de personal y equipamiento apropiado para el muestreo, la conservación, el transporte, el procesado y el análisis de dichas muestras.

En este trabajo no se tratarán con detalle estos aspectos, que requerirían una extensión mucho mayor y, además, ya han sido objeto de numerosos artículos científicos, libros y monografías. Sin embargo, todos los detalles relacionados con el diseño y

ejecución de planes de muestreo y análisis y con el control de calidad son de extrema importancia, por lo que ningún estudio geoquímico debería ser acometido sin considerarlos. Pueden encontrarse introducciones de variado nivel de detalle a estos aspectos en los textos de Appelo y Postma (2005), Zhang (2007), EPA (2007), USGS (2008) o Price (2009) y en la mayor parte de los artículos científicos experimentales o de campo.

En favor de la brevedad, tampoco se tratarán en este trabajo el conjunto de medidas de monitorización no geoquímica (geotécnica, hidrogeológica, climática, etc.) que necesariamente deben acompañar y complementar a todo estudio geoquímico en ambientes ricos en sulfuros, aunque deben ser tenidos en cuenta durante la planificación y desarrollo de cualquier trabajo. Una revisión sencilla sobre dichas medidas complementarias de monitorización puede encontrarse en el capítulo 3 del texto de Lottermoser (2003) y sus referencias. Por lo tanto, este trabajo se ha centrado únicamente en mostrar las principales metodologías y técnicas geoquímicas y mineralógicas empleadas habitualmente en estudios geoquímicos sobre ambientes ricos en sulfuros, describiendo brevemente la utilidad de cada una de ellas e indicando las principales dificultades y precauciones involucradas en su aplicación. Además, en cada apartado se proporcionan referencias a artículos científicos, libros, monografías o documentos técnicos que permiten ampliar y profundizar en los fundamentos de uso de las distintas metodologías y técnicas.

La información sobre metodologías y técnicas en estudios geoquímicos se ha agrupado en tres grandes bloques que tratan el muestreo y estudio de (1) sólidos asociados a ambientes mineros ricos en sulfuros, (2) aguas y gases y (3) muestras microbiológicas.

## **Metodologías para el estudio de sólidos en ambientes mineros ricos en sulfuros**

### ***Recogida y conservación de muestras de sólidos y precipitados***

La recogida de sólidos en ambientes ricos en sulfuros se realiza empleando generalmente técnicas muy similares a las utilizadas para la toma de otros tipos de muestras de rocas, suelos o sedimentos. Entre los numerosos textos sobre el muestreo, conservación, estudio e instrumentación para la toma de muestras sólidas se puede ampliar información en EPA (2009) y en el texto de Price (2009).

El principal problema en el transporte y almacena-

miento de muestras de precipitados de drenajes ácidos, lodos mineros u otros sólidos de ambientes ricos en sulfuros, al igual que en la mayoría de muestras geológicas, es la posibilidad de que se produzcan transformaciones de las fases minerales recogidas, de forma que dejen de ser representativas de los materiales presentes en el sistema estudiado. Las precauciones más habituales para evitar las reacciones de oxidación de los sulfuros o la alteración del resto de fases incluyen el congelado de las muestras en el plazo más breve posible (Al *et al.*, 1997; Blowes *et al.*, 1991; Bigham *et al.*, 1996; Regenspurg *et al.*, 2004; Gagliano *et al.*, 2004, Acero *et al.*, 2007a), su almacenamiento sin humedad y la minimización del tiempo transcurrido entre la toma de muestra y las determinaciones analíticas (EPA, 2007, Price, 2009). En ocasiones se puede incluso almacenar las muestras en atmósfera de nitrógeno o bajo agua (Salmon y Malmström, 2006) para preservar las condiciones anaerobias y limitar las reacciones microbianas o de oxidación.

Las muestras sólidas recogidas en estos ambientes deben ser frecuentemente secadas, disgregadas o molidas antes de realizar las determinaciones mineralógicas, físicas o geoquímicas. El secado se realiza normalmente al aire (ej. Blowes y Jambor, 1990; Dold y Fontboté, 2002; Acero *et al.*, 2006, 2007a; Asta *et al.*, 2010a), en horno a menos de 40°C (para evitar transformaciones minerales, ej.: Dold y Fontboté, 2001; Dold y Spagenberg, 2005) o bien por liofilización (el denominado *freeze drying* en la literatura en inglés: Bigham *et al.*, 1996; Gagliano *et al.*, 2004; Regenspurg *et al.*, 2004). En todos los casos hay que tener en cuenta, para la interpretación posterior de los resultados, que el proceso de secado puede inducir la precipitación de sales solubles a partir del agua de poros, excepto que las muestras húmedas sean sometidas a un lavado con agua, etanol (ej. Acero *et al.*, 2006) o metanol (ej. Al *et al.*, 1997), entre otros procedimientos. Además de estas precauciones, es muy recomendable mantener las muestras refrigeradas antes y después del secado. Un caso especialmente delicado en cuanto a la preservación de muestras sólidas lo constituyen los precipitados solubles, normalmente sulfatados, que suelen formarse en ambientes ricos en sulfuros por evaporación de aguas ácidas (ej. melanterita,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , rozenita,  $\text{FeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , szomnokita,  $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , epsomita,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , hexahidrita,  $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , etc.). Muchas de estas fases minerales se diferencian entre sí únicamente por el número de moléculas de agua que presentan, por lo que su recogida, preservación y estudio debe realizarse teniendo en cuenta la posibilidad de que el grado de hidratación de los precipitados recogidos

varíe en función de las condiciones ambientales y del procesado recibido (Hammarstrom *et al.*, 2005). La mayor parte de estudios indican que el almacenamiento de este tipo de muestras se realiza en bolsas de plástico selladas, en recipientes herméticos a la misma temperatura que el lugar de recogida (Jamieson *et al.*, 2005; Hammarstrom *et al.*, 2005) o bien manteniendo los precipitados inmersos en aceite mineral (Nordstrom *et al.*, 2000) o en la propia agua de precipitación (Frau, 2000). Más recomendaciones sobre la preservación de muestras se pueden encontrar en Waller (1992).

### **Técnicas y métodos de estudio habituales usados en muestras de precipitados mineros y otros sólidos**

Las pruebas más habituales destinadas a caracterizar los sólidos y precipitados mineros se muestran a modo de resumen en la Tabla 1 y se detallan a continuación.

La distribución de tamaños de partículas es una de las propiedades que más determina el comportamiento físico y químico de los minerales presentes en entornos ricos en sulfuros, condicionando los tamaños de poros y su distribución, las propiedades hidráulicas, la reactividad química y la superficie expuesta. Por ese motivo, es necesario tener especial cuidado en asegurar que la muestra sobre la que se realizan las distintas pruebas de laboratorio presenta la misma distribución granulométrica que el material de campo, para lo que suelen realizarse granulometrías por tamizado, dispersión láser u otras técnicas (Tabla 1). Debido a la frecuente presencia, en muchos de los sólidos presentes en estos ambientes, de fases solubles en agua, es conveniente evitar el uso de ésta en los tratamientos de disgregación de las muestras sustituyéndola, por ejemplo, por etanol u otros disolventes no polares. Otras de las pruebas más habituales y útiles en la caracterización de los sólidos y precipitados son aquellas destinadas a identificar y cuantificar las fases minerales que los componen. Como se muestra en la Tabla 1, dicho estudio mineralógico suele realizarse mediante la identificación por microscopía petrográfica usando probetas pulidas o láminas delgadas preparadas a partir del sólido estudiado (ej. Blowes y Jambor, 1990; Gunsinger *et al.*, 2006) o bien mediante Difracción de Rayos X (DRX o XRD, en sus siglas inglesas) usando muestras en polvo (ej. Bigham *et al.*, 1996; Acero *et al.*, 2006, 2007a; Asta *et al.*, 2010a). Es importante tener en cuenta que la preparación de las muestras para su identificación mineral por estas técnicas (molido, secado, tamizado) puede inducir cambios en las mis-

mas debido, fundamentalmente, a variaciones en el grado de hidratación de algunas fases minerales (ej. muchos sulfatos solubles) o a la exposición de nuevas superficies a la acción oxidante del oxígeno.

En ocasiones, especialmente cuando para el tipo de estudio realizado resultan de interés fases minerales difíciles de detectar por estos métodos debido a su baja cristalinidad (ej. schwertmannita,  $\text{Fe}_3\text{O}_3\text{SO}_4(\text{OH})_6$ , ferrihidrita,  $\text{Fe}_5\text{OH}_8 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , etc) o a su escasez en la muestra, se pueden utilizar métodos más complejos, como la denominada Difracción de Rayos X Diferencial (DXRD; Differential X-ray Diffraction, en nomenclatura inglesa). La DXRD consiste en la identificación de dichas fases de difícil detección mediante la comparación entre los diagramas de difracción de rayos X realizados a partir de una misma muestra antes y después de un ataque químico especialmente destinado a eliminarlos, como por ejemplo: una extracción selectiva (ver los trabajos de Dold, 2003a,b y de Caraballo *et al.*, 2009).

En algunos casos, especialmente en los estudios centrados en la formación de precipitados asociados a aguas ácidas, puede ser de interés caracterizar de forma precisa el color de éstos mediante la carta de color de Munsell (ej. Gagliano *et al.*, 2004), o mediante medidas de reflectancia difusa obtenidas usando un espectrofotómetro UV-VIS equipado con esfera integradora. El color es una propiedad muy condicionada por las variaciones de estructura, tamaño de partícula, y composición de los óxidos, oxihidróxidos y oxihidróxisulfatos férricos presentes en estos ambientes (Cornell y Schwertmann, 2006).

La determinación de la superficie específica de los sólidos asociados a aguas ácidas es otra de las pruebas realizadas con mayor frecuencia, ya que esta propiedad es de gran relevancia para la velocidad de oxidación y disolución y para las reacciones de adsorción, entre otros procesos. Además, en el caso de muchos óxidos, oxihidróxidos y oxihidróxisulfatos de baja cristalinidad formados en estos ambientes, la superficie específica es una propiedad que puede ayudar a la identificación de dichas fases minerales (Bigham *et al.*, 1996). Existen diversas técnicas para medir la superficie específica (Tabla 1), cada una con sus ventajas e inconvenientes (White y Peterson, 1990; Tester *et al.*, 1994; Lüttge *et al.*, 1999; White y Brantley, 2003), entre las que destacan la medida por isoterma de adsorción de gases basada en el método BET (Brunauer *et al.*, 1938) y la medida del área geométrica calculada a partir del tamaño de partícula (Tester *et al.*, 1994).

Aparte de la medida de la superficie específica y de las determinaciones mineralógicas, existe un amplio abanico de técnicas destinadas a caracterizar

Tipo de test	Utilidad	Técnica preparación	Técnicas de análisis	Referencias uso
Granulometría	Conocer la distribución de las proporciones de tamaños de grano de una muestra	Disgregación mecánica o química	Tamizado en seco o en húmedo, separación por gravedad (líquidos densos)	Evans y Banwart (2006), Gunsinger <i>et al.</i> (2006)
Superficie específica	Conocer la cantidad de superficie potencialmente reactiva de la muestra	Disgregación húmeda	Dispersión láser	Capítulo 16 de Price (2009)
Identificación mineral	Identificar los distintos minerales que aparecen en la muestra y evaluar semicuantitativamente su abundancia relativa (a veces)	Disgregación mecánica o química	Método BET (Brunauer <i>et al.</i> , 1939), Estimación geométrica	Evans y Banwart (2006) y capítulo 16 de Price (2009)
Análisis elemental total	Conocer la composición elemental de una muestra o de una submuestra (ej. fracciones de diferente granulometría)	Tamizado y/o molienda	Difracción de rayos X	Bigham <i>et al.</i> (1996), Dold y Fontboté (2001), Dold (2003a y b), Acero <i>et al.</i> (2006, 2007a), Asta <i>et al.</i> (2010a)
Análisis de elementos traza	Cuantificar las proporciones de elementos traza (As, Ba, Cu, Ni, Zn, etc) en la muestra o submuestra	Láminas delgadas o probetas pulidas	Microscopía petrográfica	Blowes y Jambor (1990), Blowes <i>et al.</i> (1991), Dold y Fontboté (2001), Jamieson <i>et al.</i> (2005), Gunsinger <i>et al.</i> (2006)
Análisis elemental puntual	Cuantificar la composición elemental de un punto de la muestra (ej. un grano mineral, un punto en el interior del mismo, etc)	Digestión total ácida (agua regia, HCl+HF+HNO <sub>3</sub> +HClO <sub>4</sub> )	ICP-AES/ MS, HPLC, AAS, etc.	Dold y Fontboté (2002), Price (2009)
Análisis elemental en distintas fracciones mineralógicas	Conocer la distribución de elementos asociados a las diferentes fracciones mineralógicas de la muestra	Pellet por presión	Fluorescencia de rayos X	Evans y Banwart (2006), Perez-Lopez <i>et al.</i> (2007, 2009)
Estudio de la microtopografía y morfología de la superficie mineral	Conocer la morfología, topografía y estructura atómica de los distintos granos minerales y de su capa externa, incluyendo superficies de alteración e incluso estimar la composición puntual	Probeta pulida	Microsonda electrónica	Chon <i>et al.</i> (1999)
Análisis de especiación y composición química superficial	Identificar el mineral y variaciones en su estructura y composición en los granos de la muestra	Extracciones selectivas/secuenciales	ICP-AES/ MS, HPLC, AAS, etc.	Dold (2003a,b), Perez-Lopez (2008), Caraballo <i>et al.</i> (2009)
Obtención de información química y estructural	Determinar la composición elemental y la distribución de especies en la región superficial de una muestra o grano	Generalmente, recubrimiento de la muestra con Au o C	Microscopía electrónica de barrido, espectroscopía de energía dispersiva de rayos X	Acero <i>et al.</i> (2006), Asta <i>et al.</i> (2010a)
Descripción color	Proporcionar una referencia inequívoca del color muestral en la escala Munsell	Ninguna en especial	Microscopía de fuerza atómica	Cama <i>et al.</i> (2005)
Potencial de neutralización (Neutralisation Potential, NP)	Medir la cantidad de acidez (H <sup>+</sup> ) que la muestra es capaz de neutralizar	Muestra cortada en capas muy finas (<2000 Å), habitualmente recubierta con Au o C.	Microscopía electrónica de transmisión	Hochella <i>et al.</i> (2005)
Contaje Ácido-Base (Acid Base Accounting, ABA)	Medir el potencial de un material para generar drenaje ácido al ser expuesto a reacciones de alteración y meteorización	Ninguna en especial, puede ser en polvo, pastilla, etc.	Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X	Acero <i>et al.</i> (2007b), Asta <i>et al.</i> (2010b)
		Ninguna en especial	Espectroscopía Raman	Sobron <i>et al.</i> (2009)
		Corte en capas finas	Espectroscopía de infrarrojos	Kumpulainen <i>et al.</i> (2007)
		Carta Munsell		Carlson <i>et al.</i> (2002), Murad y Rojik (2003), Kumpulainen <i>et al.</i> (2007)
		Adición controlada de ácido a una cantidad conocida de muestra pulverizada en un corto espacio de tiempo		Price (2009)
		Resultado combinado de pruebas para medir el potencial de neutralización, el pH, el pH en pasta saturada, etc		Price (2009), Dold y Fontboté (2001, 2002), Stromberg y Banwart (1999), White <i>et al.</i> (1999)

Tabla 1. Metodologías y técnicas más habituales en el estudio de sólidos de ambientes mineros ricos en sulfuros  
 Table 1. The most common methods and techniques used to study solid residues in sulphide-rich mining environments

las propiedades de estos sólidos (Tabla 1). Dentro de estas técnicas, los métodos de microscopía son comúnmente empleados y tienen por finalidad la determinación de la micro-topografía de la superficie de la muestra. Entre estas técnicas están la microscopía electrónica de barrido y la de transmisión, la microscopía de efecto túnel y la de fuerza atómica (denominadas respectivamente SEM, TEM, STM y AFM, en sus siglas inglesas). De todas ellas, probablemente la técnica más ampliamente utilizada sea la microscopía electrónica de barrido, ya que requiere muy poca manipulación previa de las muestras, es rápida y de coste económico relativamente reducido. Como ventaja adicional, la SEM es fácilmente configurable con diversos detectores tales como los de electrones retrodispersados (BSE, en siglas inglesas) o los espectrómetros de energías dispersivas de rayos X (EDS, en siglas inglesas), entre otras, que pueden aportar información sobre la composición de la zona superficial de las muestras sólidas estudiadas.

Otro grupo de técnicas frecuentemente empleadas en el estudio de sólidos asociados a aguas ácidas y residuos mineros con sulfuros son aquellas que permiten la determinación de la estructura atómica y molecular superficial, como la espectroscopía de estructura fina por absorción de rayos-X (X-ray Absorption Fine-Structure, XAFS), o las ya mencionadas AFM, STM y TEM. La composición química superficial de los sólidos puede ser determinada a partir del uso de espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (X-ray Photoelectron Spectroscopy, XPS), espectroscopía de electrones Auger (Auger Electron Spectroscopy, AES), microsonda electrónica de barrido (Electron Micro Probe Analysis, EPMA) y la espectrometría por fluorescencia de rayos X (X-ray Fluorescence, XRF). Otra técnica comúnmente empleada en estudios asociados a ambientes mineros es la espectroscopía Raman, que proporciona información química y estructural del material a estudiar. En general, a excepción de la espectroscopía Raman, que se basa en el examen de la luz dispersada por un material al incidir sobre él un haz monocromático, estas técnicas se fundamentan en la interpretación del comportamiento de la muestra estudiada al ser bombardeada por un haz de rayos-X. Así por ejemplo, algunas técnicas analizan las energías de los electrones emitidos por la muestra (como XPS o AES), la energía de los rayos-X emitidos por la muestra (espectrometría por fluorescencia de rayos X) o bien el espectro de energías absorbidas por la muestra (técnicas XAFS). Una descripción de los fundamentos físicos de muchas de estas técnicas, entre otras, y de su uso aplicado a los residuos mineros puede encontrarse en Weisener (2003) y en Subías y Bauluz (2008).

Aunque no está centrado en los residuos mineros, se recomienda consultar el trabajo de Hochella (1990). Entre los métodos más novedosos para el estudio de la estructura atómica y molecular de este y otros muchos tipos de muestras, se encuentra el uso de los aceleradores de partículas (radiación sincrotrón). El empleo de la radiación sincrotrón es una importante herramienta microanalítica que permite la determinación de elementos que se encuentran en muy bajas concentraciones (traza) y/o se tiene poca cantidad de muestra o se quiere realizar el estudio en regiones muy localizadas. Por tanto, ha sido ampliamente empleada para el análisis de  $\mu$ XRD,  $\mu$ XRF y XAFS/ $\mu$ XAFS de sólidos asociados a aguas y residuos mineros (Foster *et al.*, 1998; Paktunc *et al.*; 2003, Asta *et al.*, 2010a).

Además de las metodologías citadas anteriormente, como la EPMA o XRF, en los estudios geoquímicos de este tipo de sistemas es muy frecuente la determinación de la composición química de los precipitados mediante el empleo de los métodos de ataque o digestión total. Estos métodos consisten en poner los elementos composicionales de la muestra en solución líquida o en forma de perla vítrea de forma que puedan ser analizados. Los métodos de digestión en fase húmeda más utilizados (Price, 2009) son el ataque con agua regia ( $\text{HF}+\text{HNO}_3$ ) y el ataque con  $\text{HF}$ ,  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HCl}$  y  $\text{HClO}_4$  combinados (ej. Dold y Fontboté, 2002). Todos ellos disuelven por completo sulfuros, sulfatos, óxidos y carbonatos y el uso de uno u otro dependerá de las características de la muestra y de criterios analíticos (posibles interferencias, límites de detección deseados, etc.). En muestras con proporciones apreciables de silicatos, puede ser necesario emplear técnicas complementarias de digestión ya que el uso de  $\text{HF}$  puede conducir a la volatilización del Si solubilizado en la muestra y, por tanto, a la subestimación de sus concentraciones. Por ello, si el estudio requiere del conocimiento de las concentraciones de Si conviene contrastar estos resultados con los obtenidos mediante otra técnica, por ejemplo, con los de análisis de fluorescencia de rayos X. Además de los métodos de ataque total en fase húmeda, es muy habitual el uso de la digestión en fase sólida mediante fusión con borato de litio a alta temperatura (en torno a  $1000^\circ\text{C}$ , Price, 2009), que permite crear una perla vítrea fácilmente analizable por fluorescencia de rayos X o mediante su puesta en solución por ataque ácido (ej. Courtin-Nomade *et al.*, 2005). Las desventajas de la fusión con borato de litio residen en su inadecuación para muestras con contenidos altos de sulfuros ( $> 5\%$ , aprox.), la obtención de peores límites de detección que los obtenidos con los métodos de digestión por vía húmeda y la posible pérdida de sus-

tancias volatilizables a alta temperatura (ej. CO<sub>2</sub>, sustancias orgánicas, agua asociada a los minerales, etc) que, a veces, son de interés en el estudio a realizar.

En algunos casos, resulta de interés cuantificar la proporción de cada componente químico que se asocia a una fase mineral o un precipitado, para lo que se suelen realizar extracciones selectivas. Éstas consisten en someter a las muestras sólidas a ataques químicos destinados únicamente a solubilizar un determinado tipo de minerales y analizar el extracto procedente del ataque. Frecuentemente, las muestras son sometidas a extracciones selectivas de agresividad creciente (extracciones secuenciales) de forma que, en cada etapa de ataque químico, se van extrayendo fases minerales progresivamente más resistentes. En general, para los sólidos asociados a minas de sulfuros, se suelen realizar ataques selectivos secuenciales en el siguiente orden de aplicación: (1) fases solubles en agua, (2) fases adsorbidas e intercambiables, (3) fases carbonatadas, (4) óxidos, oxihidróxidos y oxihidroxisulfatos de baja cristalinidad, sobre todo de Fe y Mn, (5) óxidos, oxihidróxidos y oxihidroxisulfatos cristalinos, sobre todo de Fe y Mn, (6) fases orgánicas y sulfuros y (7) fase residual, en la que se incluyen los minerales no atacados en las etapas previas (ej. silicatos). Algunos ejemplos de protocolos de extracciones secuenciales específicamente aplicados al estudio de precipitados y otros sólidos de estos ambientes ricos en sulfuros pueden encontrarse en Dold (2003 a y b), Acero *et al.* (2007a), Pérez-López *et al.* (2008), y en sus referencias. Aunque las extracciones secuenciales proporcionan información muy valiosa y son ampliamente empleadas, debe tenerse en cuenta sus limitaciones como la posible falta de selectividad de los reactivos empleados y la potencial re-adsorción y redistribución de los metales durante el tratamiento de la muestra (Bermond y Yousfi, 1997; Gómez-Ariza *et al.*, 2000). Algunas de estas limitaciones se solucionan con el empleo, cuando es posible, de técnicas espectroscópicas, tales como la espectroscopía de absorción de rayos X (X-ray Absorption Spectroscopy, XAS) (Asta *et al.*, 2010a).

Otra medida común en el estudio de balsas de lodos mineros o suelos contaminados por minería es la determinación del pH en pasta saturada (Dold y Fontboté, 2001, 2002; Dold y Spagenberg, 2005) con la que se intenta reproducir las condiciones esperables en el agua de poro durante la infiltración de agua de escorrentía (Price, 2009). Para realizar esta determinación, se introduce el electrodo combinado en una pasta homogénea preparada con una proporción aproximada de 2:1 de agua destilada y de la fracción de muestra sólida con tamaños de grano < 250

micras, respectivamente, aunque la proporción exacta de agua depende de cada muestra (Page *et al.*, 1982).

Existen también algunas pruebas destinadas específicamente a valorar el comportamiento de un residuo minero u otro material en relación con su capacidad para generar o neutralizar acidez en diversas condiciones, entre los que destacan la determinación del potencial de neutralización (NP, *Neutralisation Potential*) y la contabilidad Ácido/Base (ABA, *Acid Base Accounting*). Para obtener más detalles sobre el uso de estas pruebas, se puede consultar el texto de White *et al.* (1999), así como la Tabla 1 y las referencias proporcionadas en la misma.

Como ya se explicó previamente, todas estas técnicas y metodologías y otras no tratadas en este trabajo, se combinan para caracterizar la evolución espacial y temporal de sistemas de aguas ácidas y residuos mineros con sulfuros, en los denominados test cinéticos.

### **Recogida, procesado y conservación de muestras de agua y gases**

En el caso de muestras de agua de ambientes ricos en sulfuros, las técnicas analíticas no difieren sustancialmente de las empleadas en otros tipos de estudios hidrogeoquímicos, por lo que este apartado se centrará únicamente en los detalles relacionados con las medidas, la recogida de muestras, su procesado en campo y su preservación hasta el análisis, que son los aspectos en los que existen más dificultades y particularidades. Entre los numerosos textos disponibles sobre técnicas de análisis, se recomiendan el texto ya clásico de Skoog *et al.* (2001) y el manual del USGS (2008).

Al igual que para la toma de otros tipos de muestras de agua, es aconsejable utilizar procedimientos estándar para asegurar la representatividad y el control de calidad de las muestras. Se recomienda realizar *in situ* en el sistema estudiado el mayor número de medidas y determinaciones analíticas posibles. Así se evita parte de la manipulación de la muestra y se previenen posibles alteraciones debidas a la exposición a condiciones diferentes de las de su ambiente natural.

El tipo de muestreo de aguas más sencillo consiste en la simple recogida de un volumen dado en un curso de agua superficial (un río, arroyo, manantial, etc.), un lago minero u otro tipo de reservorio. Para cualquiera de estos tipos de muestreo existe una amplia gama de procedimientos que van desde el muestreo a mano en un recipiente abierto por un solo

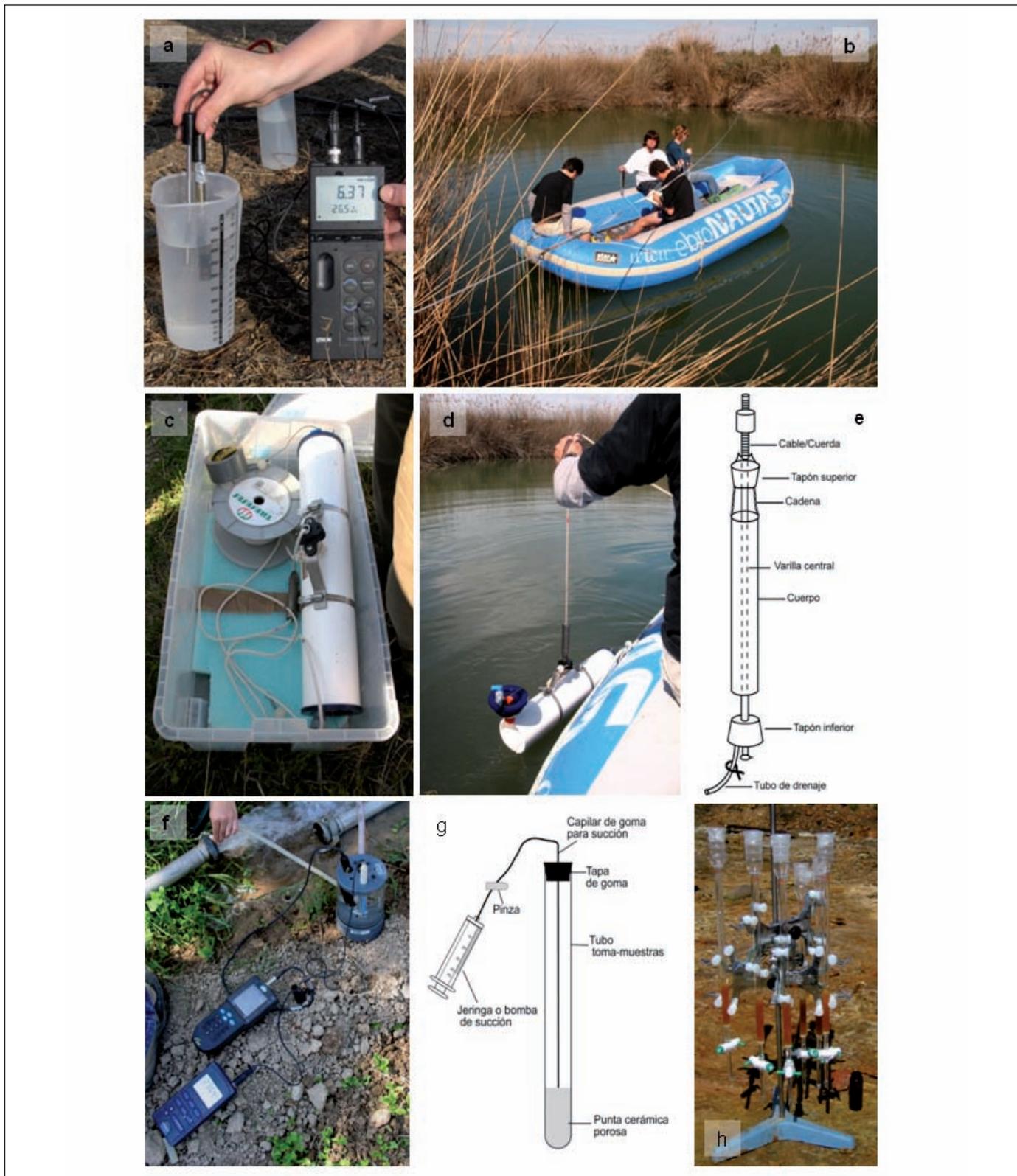


Figura 1. Medida de pH *in situ* (a), recogida de muestras en lagos (b), muestreador tipo Van Dom (c y d) y muestreador tipo Kemmerer (e), celda de flujo (f), lisímetro de succión (g), muestreo empleando resina de intercambio iónico (h)  
 Figure 1. a) *in situ* pH measurement; b) sampling from lakes; c and d) Van Dom sampler and Kemmerer sampler; e) flow cell; f) suction lysimetre; g) sampling using ion-exchange resin

punto hasta los muestreos integrados, en los que normalmente la muestra final está constituida por la suma de varios volúmenes tomados a lo largo de una transversal al cauce o de una línea vertical, frecuentemente ponderados en función del caudal en cada punto de muestreo. En el caso concreto de lagos mineros u otros reservorios similares, puede ser necesario tomar muestras a distintas profundidades y desde distintos puntos de la superficie de los mismos, para lo cual en ocasiones se usan barcas o lanchas (Figura 1b) y muestreadores con sistema de cerrado hermético automático (tipo Van Dom o Kemmerer, ver Figura 1 c, d, e) o incluso sistemas de bombeo. Además, las medidas de parámetros hidrogeoquímicos deberían realizarse siempre que sea posible sin alterar las condiciones originales de la muestra para lo que pueden usarse sondas multiparamétricas sumergibles (ej. Regenspurg *et al.*, 2004). Una excelente guía de uso, calibración y mantenimiento general de este tipo de sondas puede encontrarse en el capítulo 6 del manual del USGS (2008).

Para la toma de muestras en pozos u otros conductos subterráneos afectando a la zona saturada, puede ser necesario utilizar equipos de bombeo y conducción del agua desde la profundidad a la que ésta se encuentra hasta la superficie. Idealmente, la muestra de agua debería ser tomada tras una medida del nivel del agua en el pozo o conducto y una purga, a caudal controlado, del agua que pudiera estar estancada en el pozo y no ser representativa de las condiciones en el acuífero estudiado. Para ello, antes de tomar las muestras para análisis se deberían monitorizar, siempre que sea posible, las variaciones en los parámetros hidrogeoquímicos del agua bombeada (pH, Eh, oxígeno disuelto, turbidez, conductividad eléctrica y temperatura) hasta su completa estabilización mediante una celda de flujo (Figura 1f) u otro equipo similar que evite el contacto con la atmósfera (ej. Dold *et al.*, 2005; Gunsinger *et al.*, 2006). Además, la medida de estos y otros parámetros que pudieran ser de interés se debería realizar antes, durante y después de la toma de muestras para poder evaluar la variabilidad y representatividad de las mismas.

En ocasiones, para muestrear las aguas de poro de la zona saturada de balsas de residuos mineros se suelen utilizar lisímetros que, en esencia, son recipientes enterrados entre los lodos mineros que recogen el agua que se infiltra por gravedad a la profundidad a la que están instalados. Cuando se desea tomar muestras de las aguas de poro de la zona no saturada, se suelen emplear los lisímetros de succión (Figura 1g), que consisten en un recipiente cerrado con un extremo poroso que se entierra en el material

de la balsa y se llena del agua de poro de la misma mediante la aplicación de vacío. Otra opción, en el caso de lodos mineros extremadamente secos en los que el agua de poro no se puede extraer por succión, son los sistemas de presión en muestras de lodo extraídas de la profundidad deseada mediante sondeos (Patterson *et al.*, 1978; Acero *et al.*, 2007a), en ocasiones con la ayuda de líquidos inmiscibles que, al ser forzados a introducirse a presión en los poros del material, desplazan el agua de poros y permiten su recogida (ej. Blowes y Jambor, 1990; Blowes *et al.*, 1991; Dold *et al.*, 2005; Gunsinger *et al.*, 2006). A veces se pueden extraer pequeñas cantidades de agua de poro de lodos mineros u otros precipitados por centrifugación (ej. Jamieson *et al.*, 2005; Gagliano *et al.*, 2004).

Es importante considerar qué tipo de recipiente es el más adecuado para la muestra que se pretende recoger. Los recipientes metálicos pueden contaminar la muestra y algunos tipos de plásticos pueden retirar elementos de la solución al quedar adsorbidos o precipitados en sus paredes. En general para aguas de mina, se utilizan recipientes de polietileno (Nordstrom *et al.*, 2000; Frau, 2000), de PTFE (Courtin-Nomade *et al.*, 2005) u otros plásticos, frecuentemente prelavados con ácido (Bigham *et al.*, 1996), para muestras destinadas a análisis de los elementos disueltos mayores, menores y traza. Las muestras destinadas a otros tipos de análisis pueden requerir el uso de otros recipientes (botellas de vidrio, viales al vacío, recipientes metálicos, etc.). Para obtener más información sobre la selección del recipiente más adecuado y otros aspectos relacionados, puede consultarse además el manual de EPA (2007).

Además de realizar la recogida de las determinaciones analíticas de laboratorio de las muestras, existen una serie de medidas paramétricas que deberían realizarse siempre en condiciones de campo. En sistemas de aguas de mina se recomienda realizar medidas *in situ* del pH (Figura 1a), la temperatura, el potencial de oxidación-reducción, la conductividad eléctrica, el oxígeno disuelto y la turbidez (Lottmoser, 2003 y referencias en este texto, USGS, 2008). En aquellos casos en que el pH medido sea superior a 4,5, es también necesario determinar la alcalinidad y, en algunos casos, también la acidez. El significado de todos estos parámetros se detalla de forma resumida en la Tabla 2 y las precauciones a tener en cuenta durante su medida e interpretación se encuentran exhaustivamente tratadas en el capítulo 6 del texto del manual del USGS (2008).

Como recomendación general para todos los equipos de medida, pero en especial para las sondas de medida de pH, oxígeno disuelto y conductividad, es

Parámetro	Significado
Eh	Potencial de oxidación-reducción de una solución. Se obtiene determinando la concentración de especies redox ( $\text{Fe}^{2+}$ y $\text{Fe}^{3+}$ en el caso de las aguas de mina). Se expresa en voltios (V).
pH	Logaritmo negativo de la actividad de hidrogeniones ( $-\log a\text{H}^+$ ).
Conductividad eléctrica	Habilidad para conducir corriente eléctrica, depende de la cantidad de iones cargados en solución. Se expresa en $\mu\text{S}/\text{cm}$ .
Dureza	Suma de los iones que pueden precipitar como "partículas duras" a partir de un agua. Se expresa como mg de $\text{CaCO}_3/\text{L}$ .
Alcalinidad	Capacidad de una solución para neutralizar la acidez. Se determina por titración ácida a un determinado pH, por ejemplo a pH 4.5. En la mayoría de las aguas naturales es igual a las concentraciones de los iones carbonato y bicarbonato. Aunque otros iones como borato, silícico o hidróxido pueden combinarse con el hidrogeno y contribuir a la alcalinidad. Se expresa como mg de $\text{CaCO}_3$ o de $\text{HCO}_3^-$ por litro.
Acidez	Capacidad de una solución para donar protones. Se determina por titración básica subiendo el pH hasta un valor de por ejemplo 8.3. Algunos iones disueltos ( $\text{H}^+$ , $\text{Fe}^{2+}$ , $\text{HSO}_4^-$ ), gases o ácidos orgánicos pueden contribuir a la acidez. Se expresa como mg de $\text{CaCO}_3$ o de $\text{HCO}_3^-$ por litro.
Total de sólidos disueltos (TDS)	Cantidad de sólidos disueltos. Se determina por evaporación y pesado del residuo seco. Se expresa en mg/L.
Oxígeno disuelto (DO)	Cantidad de oxígeno disuelto en el agua.
Turbidez	Evidencia visual de la presencia de materia en suspensión en un agua. Se expresa empleando una escala numérica empírica.
Temperatura	$^{\circ}\text{C}$
Salinidad	Cantidad del total de sólidos disueltos. Agua dulce < 1000 o 1500 mg/L de TDS; aguas salobres de 1000 a 10000 mg/L de TDS; aguas salinas de 10000 a 100000 mg/L de TDS; TDS superiores a los de las aguas salinas corresponden a salmueras.

Tabla 2. Principales parámetros geoquímicos a controlar en la mayor parte de estudios de aguas ácidas de mina (Lottermoser, 2003)  
 Table 2. Principal geochemical parameters to be monitored in studies into acidic waters associated with mining (Lottermoser, 2003)

de gran importancia realizar una calibración de los mismos previamente a su uso, siguiendo las instrucciones proporcionadas por los fabricantes de cada equipo y utilizando soluciones tampón o patrón lo más similares posible a las muestras a estudiar. A veces, la elevadísima salinidad y acidez de algunas aguas de mina obliga a adaptar los procedimientos de medida (ej. del pH), diseñados para otros rangos de condiciones hidrogeoquímicas (Nordstrom *et al.*, 2000). En aquellos casos en los que la exactitud y precisión deseada para las medidas a realizar no sea muy elevada, algunos parámetros de las aguas pueden determinarse mediante tiras indicadoras (ej. pH) o mediante kits colorimétricos (ej. oxígeno disuelto, alcalinidad, etc.).

Una vez tomadas las muestras de aguas de ambientes ricos en sulfuros, gran parte de los problemas asociados a la preservación y análisis derivan de

sus altas concentraciones de hierro. La oxidación del hierro disuelto, especialmente en presencia de actividad microbiana, puede tener un gran impacto sobre las características hidrogeoquímicas de las muestras de aguas ácidas de mina, ya que el Fe(III) puede oxidar otras especies disueltas como el As (McCleskey *et al.*, 2003; Bednar *et al.*, 2002, 2005). Además, el Fe(III) puede precipitar con facilidad, alterando el pH de la solución y la concentración de Fe, sulfato y otros elementos disueltos, que tienden a coprecipitar o adsorberse en los óxihidróxidos y oxihidroxisulfatos férricos (Bigham *et al.*, 1994; Nordstrom, 2003; Lottermoser, 2003). Para evitar la presencia de microorganismos en las muestras acuosas es extremadamente importante filtrarlas inmediatamente tras su recogida a través de luz de malla de 0,45 micras o, preferiblemente, de 0,1 micras (Nordstrom, 2003) y, evidentemente, el filtro empleado debe ser desecha-

do en cada punto de muestreo. Además de evitar la presencia de microorganismos, el uso de un filtro de 0.1 micras permite eliminar la mayor parte de las partículas en suspensión y coloidales (Kennedy *et al.*, 1974; Gimeno, 1999), que podrían sufrir procesos de disolución, precipitación y adsorción, alterando también las características de la muestra acuosa original. En ocasiones, puede ser interesante conservar los filtros empleados en cada punto para hacer precisamente un estudio del material particulado (empleando, por ejemplo, cualquiera de los métodos expuestos en este mismo trabajo en el apartado sobre el estudio de muestras sólidas) o, incluso, hacer un estudio comparado de los contenidos de determinados elementos en muestras filtradas y sin filtrar para caracterizar el papel desempeñado por este material en el transporte de elementos en el sistema acuoso de interés. Otra particularidad de muchas aguas de mina, pero en especial de las aguas de poro de lodos mineros y sobre todo de las que se encuentran en la zona no saturada o han sufrido evaporación, es la elevada salinidad de las mismas. En este tipo de aguas muy concentradas es conveniente en muchos casos realizar diluciones en el campo tras el filtrado para favorecer su estabilidad y evitar la aparición de precipitados que podrían comprometer su representatividad (ej. Nordstrom *et al.*, 2000).

Una vez obtenida una alícuota filtrada de cada muestra de agua, es también muy importante asegurar su estabilidad, para lo cual se suele añadir a la misma una cierta cantidad de ácido (ej. ácido nítrico, HNO<sub>3</sub>, clorhídrico, HCl, sulfúrico, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ascórbico, C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>, etc) u otras sustancias (ej. HgCl<sub>2</sub> para inhibir el desarrollo bacteriano o EDTA para minimizar la oxidación y precipitación del Fe). En la elección del estabilizante a emplear, hay que tener en cuenta no sólo el efecto deseado sino también los posibles problemas analíticos que éste pueda producir, ya sea porque altere la distribución de especies de interés en solución o porque de lugar a interferencias u otros problemas en la técnica de análisis escogida (ej. el Cl añadido con el HCl puede interferir la señal del As en determinación de éste último por ICP). En cualquier caso, la acidificación o estabilización de la muestra debe ser realizada inmediatamente tras el filtrado. Es común, para la estabilización de la muestra, el empleo de resinas de intercambio iónico para la eliminación de especies que puedan provocar interferencias en los análisis, o bien, alterar el estado original de la muestra (por ej. provocar la oxidación de As(III); McCleskey *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2006; Figura 1h).

Además del filtrado de la muestra y su estabilización, en general es muy importante evitar en lo posi-

ble la entrada de aire o la desgasificación de la muestra (por ejemplo, en muestras ricas en CO<sub>2</sub>) con el uso de recipientes adecuados que deben ser rellenados por completo intentando minimizar en lo posible la presencia de burbujas de aire. También es importante realizar el análisis de la muestra en el tiempo más corto posible desde su recogida e incluso, si es posible, realizar las determinaciones analíticas en el campo en el momento de la toma de muestras. Para las determinaciones analíticas que obliguen a trasladar las muestras al laboratorio, éstas deben mantenerse refrigeradas a temperaturas inferiores a 4°C desde la recogida hasta el análisis e incluso en la oscuridad (McCleskey *et al.*, 2004; Sarmiento *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2006).

Una de las determinaciones habituales es el análisis de la especiación del Fe, para lo cual se toma una submuestra filtrada de agua a la que se añade ácido clorhídrico (HCl) hasta conseguir un pH < 2, lo que ralentiza al máximo la velocidad de oxidación del Fe(II) a Fe(III) (Singer y Stumm, 1970). La muestra así tratada puede ser almacenada en la oscuridad y refrigerada (por debajo de 4°C) hasta 6 meses sin que la distribución de especies de hierro se altere significativamente (To *et al.*, 1999). El análisis de Fe(II)/Fe(III) suele realizarse a partir de dicha muestra por colorimetría y posiblemente el método más empleado es el de la ferroceína, detallado originalmente en los trabajos de Stookey (1970) y To *et al.* (1999) y modificado en ocasiones para adaptarlo a distintos tipos de muestras concretas. Por ejemplo, se emplea la modificación propuesta por Herrera *et al.* (1989) en muestras cuya proporción de Fe(II)/Fe(III) es muy pequeña, como en los estudios de oxidación de Fe(II) de sistemas bacterianos donde el contenido de Fe(II) puede llegar a ser sólo el 1%.

El muestreo de gases es frecuente en los estudios centrados en caracterizar la evolución de las balsas de lodos mineros, ya que la evolución de estos sistemas está muy determinada por la disponibilidad de oxígeno. Además, la detección de concentraciones anormalmente altas de otros gases, como el CO<sub>2</sub> o el H<sub>2</sub>S, son muy indicativas de la existencia de determinados procesos (ej. actividad bacteriana generadora de CO<sub>2</sub>, disolución no oxidativa de sulfuros y generadora de H<sub>2</sub>S, etc), por lo que es frecuente su monitorización. Habitualmente las medidas de concentraciones de gases se realizan directamente en campo con equipos portátiles para evitar las dificultades asociadas al transporte y conservación de las muestras. Dichas medidas se suelen realizar acoplado los equipos de análisis a una bomba que extrae el gas a través de un cilindro de material inerte (acero inoxidable, por ejemplo) que se introduce en el residuo

minero hasta la profundidad deseada (Blowes *et al.*, 1991, Elberling *et al.*, 2000, Gunsinger *et al.*, 2006) o extrayendo las muestras de gas de la profundidad deseada mediante una jeringa u otro instrumento similar a botellas selladas de vidrio que posteriormente son trasladadas al laboratorio para su análisis por cromatografía de gases u otra técnica equivalente (Blowes y Jambor, 1990, Elberling *et al.*, 2000, Dold *et al.*, 2005, Alakangas *et al.*, 2010).

## **Muestreo y estudio de muestras microbiológicas.**

### ***Recogida de muestras y conservación***

En la recogida de muestras para análisis microbiológicos se siguen los procedimientos generales para muestreo (agua y sólidos), pero teniendo especial cuidado en evitar la contaminación con bacterias alóctonas al sistema. Todo el material que va a estar en contacto con la muestra debe esterilizarse previamente mediante autoclave y deben seguirse procedimientos asépticos para la toma y manipulación de las muestras. Los envases ideales para la recogida de muestras son recipientes de vidrio con tapón de rosca que cierren herméticamente y que hayan sido previamente esterilizados en autoclave. Asimismo, pueden usarse recipientes esterilizados de polipropileno o teflón o botes de plástico de un solo uso para recogida de orina. También existen en el mercado bolsas de polietileno preesterilizadas (ej. bolsas Whirl-Pak®).

Las muestras deben ser procesadas lo más rápidamente posible y preservadas hasta su uso en condiciones idóneas para que no se produzcan cambios en las poblaciones microbiológicas. El volumen/tamaño de muestra y la forma de almacenamiento dependen del propósito del estudio y de los métodos de estudio que se vayan a aplicar. En general, las muestras deben ser guardadas en frío. En ocasiones las muestras se guardan en atmósfera anóxica (N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) para preservar los microorganismos anaeróbicos. En tal caso, pueden usarse sobres generadores de atmósfera anóxica (ej. sobres GasPak) o cámaras de anaerobiosis. En el caso de determinaciones de biodiversidad mediante técnicas moleculares independientes de cultivo, las muestras deben guardarse congeladas a -20°C para la posterior extracción de ADN. El número de bacterias en suspensión en muestras de agua subterránea o de aguas ácidas normalmente es muy bajo y, por tanto, la muestra debe filtrarse para concentrar la biomasa. Excelentes guías sobre muestreo y manipulación de muestras microbiológicas pueden encontrarse en el texto de Atlas y Bartha (2002), en el de Pepper *et al.* (2008) o en el manual publicado por el USGS (1989).

### ***Técnicas y métodos de estudio***

Existen numerosos textos sobre metodologías microbiológicas aplicadas a muestras ambientales, como por ejemplo Grigorova y Norris (1990), Atlas y Bartha (2002) o Hurst *et al.* (2002).

Para el recuento de bacterias totales se usa comúnmente la observación mediante el microscopio de fluorescencia de muestras teñidas con diferentes colorantes fluorocromos como el DAPI y el naranja de acridina (Kepner y Pratt, 1994). A veces también se emplean sondas génicas fluorescentes para la identificación y recuento de poblaciones microbianas específicas. Para la determinación del número de células fisiológicamente activas (con membranas celulares intactas) y de células muertas (con membranas dañadas) se suele utilizar la pareja de colorantes diacetato de fluoresceína y yoduro de propidio. Existen kits comerciales para hacer determinaciones de viabilidad (ej. kit LIVE/DEAD® BacLight™).

Los estudios clásicos de diversidad microbiana se basan en el aislamiento de microorganismos mediante técnicas dependientes de cultivo, como el cultivo en placa o la técnica del número más probable (MPN, *most probable number*) (Cochran, 1950) y consisten en el cultivo de la muestra en un medio específico adecuado para que determinadas bacterias proliferen (por ejemplo: Kirby *et al.*, 1999; Dold y Fontboté, 2001; Johnson *et al.*, 2005) para enumerar bacterias sulfo- o ferro-oxidantes acidófilas en aguas ácidas de mina. El principal inconveniente de estas metodologías es que sólo se aísla una pequeña proporción de los componentes existentes en la comunidad microbiana, (entre 0.001 y 1%, Torsvik *et al.*, 2002). La caracterización de la diversidad de una comunidad bacteriana también puede realizarse mediante metodologías independientes de cultivo que se basan en el estudio directo de la muestra a diferentes niveles (Amann *et al.*, 1995). Entre las técnicas moleculares más usadas se encuentra el análisis de ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana (PLFA), la PCR acoplada a electroforesis en geles con gradiente desnaturizante químico o térmico (DGGE o TGGE, respectivamente) o a polimorfismos de la longitud del fragmento terminal de restricción (T-RFLP), y las técnicas de hibridación *in situ* (FISH). Para ampliar más información sobre protocolos de muestreo, manipulación y tratamiento de las muestras se puede consultar el trabajo de González-Toril *et al.* (2006). Para conocer casos del uso de técnicas de hibridación fluorescente *in situ* para la determinación de la diversidad microbiana en ambientes de drenaje ácido de minas se pueden ver los trabajos de Schrenk *et al.* (1998), Edwards *et al.* (1999a,b), Bond *et al.* (2000) y Bond y Banfield (2001).

En cuanto a los métodos microscópicos, además de las técnicas mencionadas en las secciones anteriores, también se utilizan la microscopía de epifluorescencia (EPM) y la microscopía láser confocal de barrido (CLSM). Las muestras pueden fijarse para preservar las estructuras celulares, normalmente mediante el uso de diferentes agentes químicos, como etanol, formaldehído, glutaraldehído o ácido acético. También es habitual realizar pruebas metabólicas para determinar el nivel de actividad metabólica de la comunidad microbiana del sistema de estudio, como por ejemplo, medidas de la oxidación de Fe(II) en muestras ambientales procedentes de ambientes ácidos con sulfuros (ej. Suzuki et al., 1990; Dold y Fontboté, 2001)

## Referencias

- Acero, P., Ayora, C., Torrentó, C. and Nieto, J. 2006. The behavior of trace elements during schwertmannite precipitation and subsequent transformation into goethite and jarosite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70, 4130-4139.
- Acero, P., Ayora, C. and Carrera, J. 2007a. Coupled thermal, hydraulic and geochemical evolution of pyritic tailings in unsaturated column experiments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71, 5325-5338.
- Acero, P., Cama, J. and Ayora, C. 2007b. Rate law for galena dissolution in acidic environment *Chemical Geology*, 245, 219-229.
- Al, T., Blowes, D., Martin, C., Cabri, L. and Jambor, J. 1997. Aqueous geochemistry and analysis of pyrite surfaces in sulfide-rich mine tailings. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 61, 2353-2366.
- Alakangas, L., Öhlander, B. and Lundberg, A. 2010. Estimation of temporal changes in oxidation rates of sulphides in copper mine tailings at Laver, Northern Sweden. *Science of The Total Environment*, 408, 1386-1392.
- Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59, 143-169.
- Appelo C.A.J. and Postma D. 2005. *Geochemistry, groundwaters and pollution*. Balkema, Rotterdam, 649 pp.
- Asta, M.P., Ayora, C., Roman-Ross, G., Cama, J., Acero, P., Gault, A., Charnock, J. and Bardelli, F. 2010a. Natural attenuation of arsenic in the Tinto Santa Rosa acid stream (Iberian Pyritic Belt, SW Spain): The role of iron precipitates. *Chemical Geology*, 271, 1-12.
- Asta, M.P., Cama, J., Ayora, C., Acero, P. and De Giudici, G. 2010b. Arsenopyrite dissolution rates in O<sub>2</sub>-bearing solutions. *Chemical Geology*, 273, 272-285.
- Atlas, R. y Bartha, R. 2002. Ecología cuantitativa: número, biomasa y actividad. En *Ecología microbiana y microbiología ambiental*, 4ª Ed. Madrid, Addison Wesley, pp. 217-277.
- Bermond A.P. and Yousfi I. 1997. Reliability of comparisons based on sequential extraction procedures applied to soil samples: The thermodynamic point of view. *Environmental Technology*, 18, 219-224.
- Bednar A.J., Garbarino J.R., Ranville J.F. and Wildeman T.R. 2002. Preserving the distribution of inorganic arsenic species in groundwater and acid mine drainage samples. *Environmental Science and Technology*, 36, 2213-2218.
- Bednar A.J., Garbarino J.R., Ranville J.F. and Wildeman T.R. 2005. Effects of iron on arsenic speciation and redox chemistry in acid mine water. *Journal of Geochemical Exploration*, 85, 55-62.
- Bigham J.M., Carlson L. and Murad E. 1994. Schwertmannite, a new iron oxyhydroxysulphate from Pyhasalmi, Finland, and others localities. *Mineralogical Magazine*, 58, 641-648.
- Bigham, J.M., Schwertmann, U., Traina, S.J., Winland, R.L. and Wolf, M. 1996. Schwertmannite and the chemical modeling of iron in acid sulfate waters. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 60, 2111-2121.
- Blowes, D.W. and Jambor, J.L. 1990. The pore-water geochemistry and the mineralogy of the vadose zone of sulfide tailings, Waite-Amulet, Quebec, Canada. *Applied Geochemistry*, 5, 327-346.
- Blowes, D.W., Reardon, E.J., Jambor, J.L. and Cherry, J.A. 1991. The formation and potential importance of cemented layers in inactive sulfide mine tailings. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 55, 965-978.
- Bond, P.L., and Banfield, J.F. 2001. Design and performance of rRNA targeted oligonucleotide probes for in situ detection and phylogenetic identification of microorganisms inhabiting acid mine drainage environments. *Microbial Ecology*, 41, 149-161.
- Bond, P.L., Druschel, G.K. and Banfield, J.F. 2000. Comparison of acid mine drainage microbial communities in physically and geochemically distinct ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4962-4971.
- Brunauer S., Emmett P.H. and Teller E. 1938. Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society*, 60, 309-319.
- Cama, J., Acero, P., Ayora, C. and Lobo, A. 2005. Galena surface reactivity at acidic pH and 25 °C based on flow-through and in situ AFM experiments. *Chemical Geology*, 214, 309-330.
- Caraballo, M.A., Rotting, T.S., Nieto, J.M. and Ayora, C. 2009. Sequential extraction and DXRD applicability to poorly crystalline Fe- and Al-phase characterization from an acid mine water passive remediation system. *American Mineralogist*, 94, 1029-1038.
- Carlson, L, Bigham, J. M., Schwertmann, U., Kyek, A. and Wagner, F. 2002. Scavenging of As from acid mine drainage by schwertmannite and ferrihydrite: A comparison with synthetic analogues. *Environmental Science and Technology*, 36, 1712-1719.
- Chon, H-T., Kim, J-Y, and Choi, S-Y 1999. Hydrogeochemical Characteristics of Acid Mine Drainage around the Abandoned Youngdong Coal Mine in Korea. *Resource Geology*, 49, 113-120.

- Cochran, W.G. 1950. Estimation of bacterial densities by means of the most probable number. *Biometrics*, 6, 105-116.
- Cornell, R.M. and Schwertmann, U. 2006. The Iron Oxides. Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses. Wiley-Vch. 664 pp.
- Courtin-Nomade, A. Grosbois, C. Bril, H. and Roussel, C. 2005. Spatial variability of arsenic in some iron-rich deposits generated by acid mine drainage. *Applied Geochemistry*, 20, 383-396.
- Dold, B. and Fontboté, L. 2001. Element cycling and secondary mineralogy in porphyry copper tailings as a function of climate, primary mineralogy, and mineral processing. *Journal of Geochemical Exploration*, 74, 3-55.
- Dold, B. and Fontboté, L. 2002. A mineralogical and geochemical study of element mobility in sulfide mine tailings of Fe oxide Cu-Au deposits from the Punta del Cobre belt, northern Chile *Chemical Geology*, 189, 135-163.
- Dold, B. 2003a. Speciation of the most soluble phases in a sequential extraction procedure adapted for geochemical studies of copper sulfide mine waste. *Journal of Geochemical Exploration*, 80, 55-68.
- Dold, B. 2003b. Dissolution kinetics of schwertmannite and ferrihydrite in oxidized mine samples and their detection by differential X-ray diffraction (DXRD). *Applied Geochemistry*, 18, 1531-1540.
- Dold, B. and Spangenberg, J. 2005. Sulfur speciation and stable isotope trends of water-soluble sulfates in mine tailings profiles. *Environmental Science and Technology*, 39, 5650-5656.
- Dold, B., Blowes, D., Dickhout, R., Spangenberg, J. and Pfeifer, H. 2005. Low molecular weight carboxylic acids in oxidizing porphyry copper tailings. *Environmental Science and Technology*, 39, 2515-2521.
- Edwards, K.J., Gihring, T.M. and Banfield, J.F. 1999a. Seasonal variations in microbial populations and environmental conditions in an extreme acid mine drainage environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 3627-3632.
- Edwards, K.J., Goebel, B.M., Rodgers, T.M., Schrenk, M.O., Gihring, T.M., Cardona, M.M., Hu, B., McGuire, M.M., Hamers, R.J., Pace, R.N. and Banfield, J.F. 1999b. Geomicrobiology of pyrite (FeS<sub>2</sub>) dissolution: Case study at Iron Mountain, California. *Geomicrobiology Journal*, 16, 155-179.
- Elberling, B., A. Schippers and Sand, W. 2000. Bacterial and chemical oxidation of pyritic mine tailings at low temperatures. *Journal of Contaminant Hydrology*, 41, 225-238.
- EPA 2007. Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods (SW-846). 15/11/19. <http://www.epa.gov/epawaste/hazard/testmethods/sw846/online/index.htm>.
- EPA 2009. Historic Mine Sites. Inventory and Risk Classification. Appendix 2: Geochemical Sampling Protocols, 170 pp. 15/11/10. [http://www.epa.ie/downloads/pubs/land/mines/Appendix2\\_Sampling\\_Protocols.pdf](http://www.epa.ie/downloads/pubs/land/mines/Appendix2_Sampling_Protocols.pdf)
- Evans, K.A. and Banwart, S.A., 2006. Rate controls on the chemical weathering of natural polymineralic material. I. Dissolution behaviour of polymineralic assemblages determined using batch and unsaturated column experiments. *Applied Geochemistry*, 21, 352-376.
- Foster A.L., Brown G.E.J., Tingle T.N. and Parks G.A. 1998. Quantitative arsenic speciation in mine tailings using X-ray absorption spectroscopy. *American Mineralogist*, 83, 553-568.
- Frau, F. 2000. The formation-dissolution-precipitation cycle of melanterite at the abandoned pyrite mine of Genna Luas in Sardinia, Italy: environmental implications. *Mineralogical Magazine*, 64, 995-1006.
- Gagliano, W.B., Brill, M.R., Bigham, J.M., Jones, F.S. and Traina, S.J. 2004. Chemistry and mineralogy of ochreous sediments in a constructed mine drainage wetland *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 68, 2119-2128.
- Gimeno, M.J. 1999. Estudio del comportamiento geoquímico de las tierras raras en un sistema natural de aguas ácidas (Arroyo del Val-Bádenas). Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza, 503 p.
- Gomez Ariza J.L., Giraldez I., Sanchez-Rodas D. and Morales E. 2000. Selectivity assessment of a sequential extraction procedure for metal mobility characterization using model phases. *Talanta* 52, 545-554.
- González-Toril, E., Gómez, F., Malki, M. and Amils, R. 2006. The isolation and study of acidophilic microorganisms. *Methods in Microbiology*, 35, 471-510.
- Grigorova, R. and Norris, J.R. 1990. *Methods in microbiology* Vol. 22, San Diego, Academic Press Limited.
- Gunsinger, M., Ptacek, C., Blowes, D. and Jambor, J. 2006. Evaluation of long-term sulfide oxidation processes within pyrrhotite-rich tailings, Lynn Lake, Manitoba. *Journal of Contaminant Hydrology*, 83, 149-170.
- Hammarstrom, J.M., Seal, R.R., Meier, A.L. and Kornfeld, J.M. 2005. Secondary sulfate minerals associated with acid drainage in the eastern US: recycling of metals and acidity in surficial environments. *Chemical Geology*, 215, 407-431.
- Herrera L., Ruiz P., Aguillon J.C. and Fehrmann A. 1989. A New Spectrophotometric Method for the Determination of Ferrous Iron in the Presence of Ferric Iron. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 44, 171-181.
- Hochella, M.F., Jr. 1990. Atomic structure, microtopography, composition and reactivity of mineral surfaces. In: Hochella, M.F. and White, A.F. *Mineral-water interface geochemistry, Reviews in Mineralogy*, 23, 86-132.
- Hochella, M.F., Jr., Moore, J.N., Putnis, C.V., Putnis, A., Kasama, T., and Eberl, D.D. 2005. Direct observation of heavy metal-mineral association from the Clark Fork River Superfund Complex: Implications for metal transport and bioavailability. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 69, 1651-1663.
- Hurst, C.J., Crawford R.L., Garland, J.L., Lipson, D.A., Mills, A.L. and Stetzenbach, L.D. 2002. *Manual of Environmental Microbiology* 3<sup>rd</sup> Ed. Washington, ASM Press, 1138 p.
- Jamieson, H., Robinson, C., Alpers, C., McCleskey, R., Nordstrom, D. and Peterson, R. 2005. Major and trace element composition of copiapite-group minerals and coexisting water from the Richmond mine, Iron Mountain, California. *Chemical Geology*, 215, 387-405.

- Johnson, D.B., Okibe, N. and Hallberg, K.B. 2005. Differentiation and identification of iron-oxidizing acidophilic bacteria using cultivation techniques and amplified ribosomal DNA restriction enzyme analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 60, 299-313.
- Jurjovec, J., Ptacek, C. and Blowes, D.W. 2002. Acid neutralization mechanisms and metal release in mine tailings: A laboratory column experiment. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 66, 1511-1523.
- Kennedy, V., G. Zellweger and B. Jones 1974. Filter Pore Size Effects on the Analysis of Al, Fe, Mn, and Ti in Water. *Water Resources Research*, 10, 785-790.
- Kepner, R.L. and Pratt, J.R. 1994. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: Past and present. *Microbiological Reviews*, 58, 603-615.
- Kirby, C.S., Thomas, H.M., Southam, G. and Donald, R. 1999. Relative contributions of abiotic and biological factors in Fe(II) oxidation in mine drainage. *Applied Geochemistry*, 14, 511-530.
- Kumpulainen, S., Carlson, L., and Räsänen, M-L. 2007. Seasonal variations of ochreous precipitates in mine effluents. *Applied Geochemistry* 22, 760-777.
- Lottermoser, B.G. 2003. *Mine wastes. Characterization, treatment and environmental impacts*. 2<sup>nd</sup> Edition. Springer, Berlin, 304 pp.
- Lüttge, A., Bolton, E.W. and Lasaga, A.C. 1999. An interferometric study of the dissolution kinetics of anorthite: The role of reactive surface area. *American Journal of Science*, 299, 652-678.
- McCleskey, R.B., Ball, J.W. and Nordstrom, D.K. 2003. Metal interferences and their removal prior to the determination of As(V) and As(III) in acid mine waters by hydride generation atomic absorption spectrometry: U.S. Geological Survey Water-Resources Investigations Report 03-4117, 14 p.
- McCleskey, R.B., Nordstrom, D.K. and Maest, A.S. 2004. Preservation of water samples for arsenic(III/V) determinations: an evaluation of the literature and new analytical results *Applied Geochemistry*, 19, 995-1009.
- Murad, E. and Rojik, P. 2003. Iron-rich precipitates in a mine drainage environment: Influence of pH on mineralogy. *American Mineralogist*, 88, 1915-1918.
- Nordstrom, D.K., Alpers, C.N., Ptacek, C.J. and Blowes, D.W. 2000. Negative pH and extremely acidic mine waters from Iron Mountain, California. *Environmental Science and Technology*, 34, 254-258.
- Nordstrom, D.K. 2003. Effects of Microbiological and Geochemical Interactions in Mine Drainage. In: Jambor, J.L., Blowes, D.W. and Ritchie, A.I.M. (Eds.), *Environmental Aspects of Mine Wastes*, Short Course Series Vol. 31, Mineralogical Association of Canada, 227-238.
- Oliveira V., Sarmiento A.M., Gómez-Ariza J.L., Nieto J.M. and Sánchez-Rodas D. 2006. New preservation method for inorganic arsenic speciation in acid mine drainage samples. *Talanta*, 69, 1182-1189.
- Page, A.L., Miller, R.H. and Keeney, D.R. 1982. *Methods of Soil Analysis. Part 2 – Chemical and Microbiological Properties*. American Society of Agronomy Inc., Soil Science Society of America Inc. Second Edition, 199-209.
- Paktunc D., Foster A. and Laflamme G. 2003. Speciation and characterization of arsenic in Ketz River mine tailings using x-ray absorption spectroscopy. *Environmental Science and Technology*, 37, 2067-2074.
- Patterson, R.J., Frape, S.K., Dykes, L.S., and McLeod, R.A. 1978. A coring and squeezing technique for detailed study of subsurface water chemistry. *Canadian Journal of Earth Science*, 15, 162-169.
- Perez-Lopez, R., Nieto, J.M. and de Almodovar, G.R. 2007. Utilization of fly ash to improve the quality of the acid mine drainage generated by oxidation of a sulphide-rich mining waste: Column experiments. *Chemosphere*, 67, 1637-1646.
- Perez-Lopez, R., Alvarez-Valero, A.M., Nieto, J.M., Saez, R. and Matos, J.X. 2008. Use of sequential extraction procedure for assessing the environmental impact at regional scale of the Sao Domingos Mine (Iberian Pyrite Belt). *Applied Geochemistry*, 23, 3452-3463.
- Pérez-López, R., Sáez, R., Álvarez-Valero, A.M., Nieto, J.M., and Pace, G., 2009. Combination of sequential chemical extraction and modelling of dam-break wave propagation to aid assessment of risk related to the possible collapse of a roasted sulphide tailings dam. *Science of the Total Environment*, 407, 5761-5771.
- Pepper, I.L., Gerba, C.P. and Maier, R.M. 2008. Environmental sample collection and processing. In: Maier, R.M. and Pepper, I.L. (Eds.) *Environmental Microbiology*. 2<sup>nd</sup> Ed. Elsevier Science, San Diego, CA, 137-155.
- Price, W., 2009. *Prediction Manual for Drainage Chemistry from Sulphidic Geologic Materials*. MEND Report 1.20.1. CANMET Mining and Mineral Sciences Laboratory.
- Regenspurg, S., Brand, A. and Peiffer, S. 2004. Formation and stability of schwertmannite in acidic mining lakes. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 68, 1185-1197.
- Salmon, S.U. and Malmström, M.E. 2006. Quantification of mineral dissolution rates and applicability of rate laws: Laboratory studies of mill tailings. *Applied Geochemistry*, 21, 269-288.
- Sarmiento, A.M., Sánchez-Rodas, D., Oliveira, V., Nieto, J.M., and Gómez-Ariza, J.L. 2005. Field methodology for the stabilization of arsenic species in AMD. In: 9th International Mine Water Congress, 569-573.
- Schrenk, M.O., Edwards, K.J., Goodman, R.M., Hamers, R.J. and Banfield, J.F. 1998. Distribution of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*: Implications for generation of acid mine drainage. *Science*, 279, 1519-1522.
- Skoog, D.A., Holler, F.J. y Nieman, T.A. 2001. *Principios de análisis instrumental*. Ed. Mac Graw-Hill, 1028 pp.
- Singer, P.C. and Stumm, W. 1970. Acidic mine drainage. Rate-determining step. *Science*, 167, 1121-1123.
- Sobron, P, Sanz, A, Acosta, T. and Rull, F. 2009. A Raman spectral study of stream waters and efflorescent salts in Rio Tinto, Spain. *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular*, 71, 1678-1682.
- Stookey, L.L. 1970. Ferrozine - A new spectrophotometric reagent for iron. *Analytical Chemistry*, 42, 779-781.

- Stromberg, B. and Banwart, S. 1999. Weathering kinetics of waste rock from the Aitik copper mine, Sweden: scale dependent rate factors and pH controls in large column experiments. *Journal of Contaminant Hydrology*, 39, 59-89.
- Subías I. and Bauluz, B. 2008. *Instrumental techniques applied to Mineralogy and Geochemistry*. Seminarios de la Sociedad Española de Mineralogía, 5, 154 pp.
- Suzuki, I., Takeuchi, T.L., Yuthasastrakosol, T.D. and Oh, J.K. 1990. Ferrous iron and sulfur oxidation and ferric iron reduction activities of *Thiobacillus ferrooxidans* are affected by growth on ferrous iron, sulfur, or a sulfide ore. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1620-1626.
- Tester, J.W., Worley, G., Robinson, B.A., Grigsby, C. O. and Feerer, J.L. 1994. Correlating quartz dissolution kinetics in pure water from 25 to 625 °C. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 58, 2407-2420.
- To, T., Nordstrom, D., Cunningham, K., Ball, J. and McCleskey, R. 1999. New method for the direct determination of dissolved Fe(III) concentration in acid mine waters. *Environmental Science and Technology*, 33, 807-813.
- Torsvik, V., Ovreas, L. and Tron Frede, T. 2002. Prokaryotic diversity: magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science*, 296, 1064-1066.
- USGS, 1989. *Methods for collection and analysis of aquatic biological and microbiological samples*: U.S. Geological Survey Techniques of Water-Resources Investigations, Book 5, Chapter A4. 9/11/10. <http://pubs.usgs.gov/twri/>.
- USGS 2008. *National field manual for the collection of water-quality data*: U.S. Geological Survey Techniques of Water-Resources Investigations, Book 9. 18/11/10. <http://pubs.usgs.gov/twri/>.
- Waller, R. 1992. Temperature and humidity sensitive mineralogical and petrological specimens. In: Howie, F.M. (Ed.), *The Care and Conservation of Geological Material: Minerals, Rocks, Meteorites, and Lunar Finds*. Butterworth-Heinemann, Oxford, United Kingdom, pp. 29-50.
- Weisener, C.G. 2003. Novel spectroscopy techniques to characterize mine waste. In: Jambor, J.L., Blowes, D. and Ritchie, I. (Eds.) *Environmental Aspects of Mine Wastes*, Vol 31, , Mineralogical Association of Canada, Vancouver, BC.
- White, A. and Brantley, S. 2003. The effect of time on the weathering of silicate minerals: why do weathering rates differ in the laboratory and field? *Chemical Geology*, 202, 479-506.
- White, A.F. and Peterson, M L. 1990. Role of reactive-surface-area characterization in geochemical kinetic models. In: Melchior, D.C. and Bassett, R.L. (Eds.) *ACS Symposium Series 416, Chemical Modeling of Aqueous Systems II*. American Chemical Society, Los Angeles, California.
- White, W.W., Lapakko, K.A., and Cox, R.L. 1999. Static-test methods most commonly used to predict acid-mine drainage: Practical guidelines for use and interpretation. In: Plumlee, G.S. and Logsdon, M.J. (Eds.), *Reviews in Economic Geology, The environmental geochemistry of ore deposits. Part A: Processes, techniques, and health issues*, v. 6A, p. 289-323.
- Zhang, C. 2007. *Fundamentals on environmental sampling and analysis*. Wiley-Vch, 456 pp.

Recibido: noviembre 2010

Revisado: enero 2011

Aceptado: enero 2011

Publicado: abril 2011

