



Revista Colombiana de Biotecnología

ISSN: 0123-3475

ISSN: 1909-8758

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia

Vásquez, Y; Escobar, M.C  
Reactores Bioquímicos Pasivos: Una alternativa  
biotecnológica para la remediación de drenajes ácidos de mina  
Revista Colombiana de Biotecnología, vol. XXII, núm. 2, 2020, Julio-Diciembre, pp. 53-69  
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia

DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v22n2.74090>

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77666754006>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

UAEH redalyc.org

Sistema de Información Científica Redalyc  
Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal  
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso  
abierto

# Reactores Bioquímicos Pasivos: Una alternativa biotecnológica para la remediación de drenajes ácidos de mina

## Biochemical passive reactors: a biotechnological alternative to remediation of acid mine drainage

Vásquez Y\*, Escobar M.C\*\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v22n2.74090

### RESUMEN

El Drenaje ácido de mina (DAM) es actualmente el principal contaminante de las regiones mineras. Los reactores bioquímicos pasivos son una tecnología sostenible fácil de instalar que utiliza desechos agroindustriales de la región y puede operar en áreas remotas con poco mantenimiento. Además, son una tecnología limpia que involucra bioprocesos, reacciones químicas y precipitación de metales, minimizando el impacto de los vertimientos ácidos sobre suelos y cuerpos de aguas. Los reactores bioquímicos pasivos son columnas empacadas con una "mezcla reactiva" conformada por materiales orgánicos, inorgánicos y un inóculo microbiano. En esta mezcla se remedia el DAM por medio de procesos fisicoquímicos como la adsorción, precipitación, coprecipitación de los metales y de la reducción del sulfato a sulfuro, mientras se incrementa el pH y la alcalinidad. Con el fin de brindar información reciente, así como las necesidades de investigación en el tema, este documento presenta una revisión de literatura sobre la generación química y biológica de los DAM, así como su remediación utilizando reactores bioquímicos pasivos. El conocimiento de los conceptos básicos de estos procesos es extremadamente útil para evaluar las posibles aplicaciones, beneficios y limitaciones de estos sistemas de tratamiento utilizados por la biotecnología durante la biorremediación de efluentes mineros.

**Palabras clave:** mezcla reactiva, comunidades microbianas, sulfato reducción, precipitación de metales.

### ABSTRACT

Acid Mine Drainage (AMD) is currently the main pollutant in mining areas. Passive biochemical reactors are a sustainable technology easy to install using agro-industry waste from the mining region and operating in remote locations. Besides, bioreactors are clean technology that involves bioprocesses, chemical reactions, and metal precipitation, minimizing the impact of AMD on soils and fresh water sources. The passive biochemical reactors are columns packed with a "reactive mixture" consisting of organic, inorganic materials and a microbial inoculum. In this reactive mixture, AMD is remediated through physicochemical processes such as metals adsorption, precipitation, and co-precipitation, as well as, the reduction of sulfate to sulfur, while pH and alkalinity are increased. To provide recent information and research needs in the subject, this document presents a review of the literature about the chemical and biological generation of AMD and its remediation using passive biochemical reactors. The knowledge of the basic concepts of these processes is extremely useful to evaluate the possible applications, benefits and limitations of these treatment systems used by biotechnology during the bioremediation of mining effluents.

**Key words:** reactive mixture, microbial communities, sulfate reduction, metal precipitation.

**Recibido:** marzo 15 de 2019 **Aprobado:** noviembre 5 de 2020

\* Profesora asociada, Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de ingeniería y Ciencias Básicas, Universidad Central, Carrera 5 No 21-38, Bogotá, Colombia, email: ovasquezo@ucentral.edu.co, ORCID ID: 0000-0002-3595-8177.

\*\* Semillero de Bioingeniería y Nanotecnología, Facultad de Ingeniería y Ciencias Básicas, Universidad Central, Bogotá, D.C., Colombia. ORCID ID: 0000-0002-6794-559.

## INTRODUCCIÓN

Ligado al proceso de extracción y beneficio de la minería se encuentra la generación de grandes volúmenes de drenajes que pueden ser ácidos, neutros o fuertemente básicos, incluso pueden ser radiactivos, corrosivos y/o tóxicos (Nordstrom, 2011). Los drenajes ácidos de mina (DAM) se caracterizan por tener bajo pH ( $< 4,5$ ), alto contenido de iones metálicos y metaloides disueltos ( $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ , As (III/V), Se (VI), Sb (III/V)) así como sulfatos (Adams *et al.*, 2014). Cuando los DAM son vertidos en la superficie destruyen la capa vegetal, erosionan el suelo y contaminan los cauces de los ríos eliminando los organismos bentónicos e interrumpiendo la cadena trófica (Nordstrom, 2015). Además, los DAM pueden impactar la naturaleza por cientos de años, incluso a perpetuidad, mientras que la contaminación por metales puede extenderse cientos de kilómetros río abajo de la zona minera (Macías *et al.*, 2017).

Estudios sobre toxicidad del DAM presentan letalidad sobre *Daphnia magna* y *Danio rerio* (Chamorro *et al.*, 2018). Además, se ha encontrado que afectan los perfiles genéticos de las comunidades microbianas del suelo, alterando los genes de resistencia a metales (Zhang *et al.*, 2019), y reduciendo la actividad de las enzimas  $\beta$ -glucosidasa, ureasa y fosfatasa ácida y alcalina afectando

la degradación de nutrientes (Quiceno-Vallejo *et al.*, 2020). La toxicidad del DAM está relacionada con la concentración de metales como Fe, Zn y Cu los cuales pueden interferir con la división celular, generando estrés oxidativo e inhibiendo el transporte de nutrientes esenciales (Carabassa *et al.*, 2019).

La red internacional para la prevención de drenajes ácidos estimó que cerca de 100.000 sitios mineros en varios países (USA, Australia, Reino Unido, Alemania, Perú y Chile) generan drenajes ácidos que afectan a más de 80.000 km de riberas de ríos y lagos con metales como  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ag^{1+}$ ,  $Zn^{2+}$  y As (III/V) (INAP, 2020). Además, a nivel mundial se producen más de 7.300 millones de toneladas de carbón mineral con presencia de DAM en todos los escenarios (WCA, 2020). En Colombia, se han detectado drenajes ácidos en la mayoría de los distritos mineros y en los últimos años se han intentado caracterizar en regiones de explotación de oro y carbón. Distritos mineros como Zipa-Samacá (Cundinamarca y Boyacá), El Tambo-Dovio (Yumbo-Valle del cauca) y Paz del Río (Boyacá) presentan drenajes con bajo pH ( $< 3,0$ ), altos contenidos de sulfatos ( $> 1.500 \text{ mg L}^{-1}$ ) y presencia de metales disueltos como  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  y  $Ni^{2+}$  (Figura 1). En los estudios realizados por MINMINAS, UPME y la Universidad de Córdoba, (2015) sobre la calidad de los drenajes en regiones mineras del país, se



**Figura 1.** Drenajes ácidos de mina en varias regiones de Colombia: a y b. Distrito Minero Zipa-Samacá (a. Samacá (Boyacá)  $5^{\circ}27'59'' \text{ N}$ ;  $73^{\circ}33'23'' \text{ O}$ ; b. Guachetá (Cundinamarca)  $5^{\circ}23'40'' \text{ N}$ ;  $73^{\circ}39'50'' \text{ O}$ ), c. Distrito Minero Paz del Río (Páramo de Pisba en Tasco;  $5^{\circ}56'22'' \text{ N}$ ;  $72^{\circ}35'50'' \text{ O}$ ), d. Distrito minero El Tambo-Dovio (corregimiento Pedregal-Yumbo;  $3^{\circ}31'16'' \text{ N}$ ;  $76^{\circ}32'56'' \text{ O}$ ) (Fotografías Vásquez Y).

encontró que la mayoría de las minas generan DAM y las concentraciones de metales son superiores a las establecidas por la legislación colombiana (Resolución 631 de 2015).

Diferentes tecnologías para el tratamiento de DAM están disponibles y son conocidas como sistemas activos y pasivos. Los sistemas activos son altamente eficientes y son instalados en minas en operación, pero requieren la continua adición de sustancias químicas neutralizantes (p.e., cal, carbonato de calcio, carbonato de sodio, hidróxido de sodio) generando lodos con metales que requieren un manejo adecuado implicando altos costos para la empresa (Rakotonimaro *et al.*, 2017). Por otra parte, los sistemas pasivos, se recomiendan en la etapa de cierre de mina o en minas abandonadas y reciben su nombre porque utilizan procesos químicos, físicos y biológicos simulando procedimientos naturales y no requieren supervisión ni mantenimiento continuo (Ali *et al.*, 2019).

Los sistemas pasivos pueden ser clasificados como bioquímicos o biológicos con presencia de organismos vivos (plantas, bacterias, hongos, algas) y fisicoquímicos o geoquímicos con materiales inorgánicos neutralizantes (dolomita, carbonatos, silicatos y boratos). Los sistemas biológicos incluyen humedales artificiales (aerobios o anaerobios), reactores bioquímicos pasivos o reactores sulfato reductores, biofiltros de turba o compost y barreras reactivas permeables. Los sistemas fisicoquímicos incluyen drenajes anóxicos calizos (DAC), canales abiertos de piedra caliza (CAC), substratos dispersores de alcalinidad (SDA) y sistemas sucesivos productores de alcalinidad (SSPA; Skousen *et al.*, 2016).

En algunos casos dada la compleja composición de los DAM se requiere de la combinación de sistemas activos y pasivos o de varios sistemas pasivos conformando los sistemas de tratamiento multietapas. Algunos de estos pueden estar compuestos por substratos dispersores de alcalinidad con cascadas de aireación (Rötting *et al.*, 2008) o con puntos de decantación (Macías *et al.*, 2012). Otros combinan reactores bioquímicos con canales de piedra caliza (Genty *et al.*, 2016) o con biofiltros de turba (Clyde *et al.*, 2016) o un sistema dispersor de alcalinidad entre dos reactores bioquímicos (Genty *et al.*, 2018; Rakotonimaro *et al.*, 2018).

Los sistemas pasivos tienen su origen en el grupo pionero de Huntsman *et al.* (1978), perteneciente a la Universidad Estatal de Wright (Ohio, Estados Unidos). Ellos identificaron que cuando el DAM ingresaba en un pantano natural, se reducía la concentración de metales y sulfato, mientras incrementaba el pH y la alcalinidad. Estas observaciones de campo per-

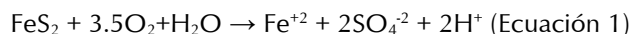
mitieron desarrollar la idea de construir humedales artificiales para el tratamiento del DAM y el consecuente desarrollo de los sistemas de tratamiento pasivo. Posteriormente, con base en las investigaciones desarrolladas por Tuttle *et al.*, (1969) sobre el metabolismo de las bacterias sulfato reductoras (BSR) y su potencial uso en el tratamiento DAM, investigadores como Hedin (1994), Dvorak (1992) y Cheong (1998), desarrollaron los protocolos de implementación de los tratamientos pasivos. La propuesta realizada por estos investigadores es aún vigente y está basada en la química del DAM donde se tiene en cuenta la concentración de metales, metales, sulfatos, pH, acidez, sólidos solubles y condiciones redox, el caudal de generación de DAM y la topografía del lugar donde se pretende instalar. Skousen *et al.* (2017), presenta un diagrama de selección del tratamiento pasivo donde resumen los principales aspectos encontrados por estos investigadores.

Uno de los sistemas pasivos biológicos más investigados en los últimos años para la remediación del DAM son los reactores bioquímicos pasivos (RBP), también conocidos como reactores sulfato-reductores, los cuales son fáciles de instalar y operar en áreas montañosas y generalmente remotas. Los RBP son una tecnología limpia que involucra bioprocesos, reacciones químicas y precipitación de metales, minimizando el impacto de los vertimientos ácidos sobre suelos y aguas en las áreas mineras (Skousen *et al.*, 2017; Haakensen *et al.*, 2015).

En este contexto, el objetivo de esta revisión es brindar información reciente acerca de RBP, así como dar a conocer las necesidades de investigación en el tema. Este documento presenta una revisión de literatura sobre la generación química y biológica de los DAM, así como su biorremediación utilizando RBP. También se describen los estudios recientes sobre las comunidades microbianas presentes en los RBP y como estas influyen en su eficiencia. El conocimiento de los conceptos básicos de estos procesos es extremadamente útil para evaluar las posibles aplicaciones, beneficios y limitaciones de estos sistemas de tratamiento utilizados por la biotecnología durante la biorremediación de efluentes mineros.

### Generación del DAM

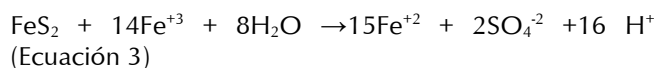
La generación de DAM es un proceso que combina la química y la biología, la primera fase del proceso es química, y ocurre cuando los minerales sulfurados (p.e., Calcopirita, Esfalerita, Galena, Arsenopirita, Molibdenita, Pirita, entre otros) presentes en el suelo son expuestos al agua y al oxígeno. Tomando como ejemplo la pirita, a pH neutro se oxida produciendo iones ferrosos ( $\text{Fe}^{+2}$ ), sulfatos ( $\text{SO}_4^{-2}$ ) y protones ( $\text{H}^+$ ) ocasionando una disminución del pH (Ecuación 1) y provocando un incremento en los sólidos totales disueltos (Nordstrom, 2011).



Cuando el pH desciende (< 4,0), se inicia el mecanismo biológico y la anterior reacción puede ser catalizada por microorganismos que incrementan la cinética de reacción en seis o siete órdenes de magnitud, descendiendo aún más el pH (Sánchez-Andrea, *et al.*, 2014). Durante esta etapa la bacteria ataca al sulfuro mediante su adherencia al mineral y la posterior acción enzimática que involucra transferencia de electrones desde la parte reducida del mineral al oxígeno disuelto (Kefeni *et al.*, 2017). Si el ambiente es muy ácido, con un pH cercano a 3,0 el ion ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ) se oxidan a ion férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ; Ecuación 2).



El ion férrico es un fuerte agente oxidante de los minerales sulfurados, incluso más activo que el oxígeno. Cuando el pH decrece este permanece en solución y es reducido por la pirita generando más iones ferrosos ( $\text{Fe}^{+2}$ ) y mayor acidez (Ñancucheo y Barrie Johnson, 2014; Ecuación 3).



Si el ambiente próximo es muy oxidante y el pH es cercano a 3,0 muchos iones ferrosos se oxidan a iones férricos que reaccionan con el agua, precipitando como hidróxido y generando más acidez (Ecuación 4).



Inicialmente la oxidación de la pirita es un proceso lento, pero a medida que la capacidad de neutralizar del medio se pierde y el pH desciende, la capacidad del  $\text{Fe}^{+3}$  para oxidar la pirita incrementa siendo la causa de la rápida formación del DAM. Además, la tasa de formación del DAM se ve afectado por factores como: oxígeno, agua, microorganismos, textura (tamaño de grano y superficie), solubilidad del mineral y concentración de elementos traza (Nordstrom *et al.*, 2015).

La segunda fase del proceso de generación del DAM es biológica, donde las propiedades fisicoquímicas del DAM (pH, fuerza iónica, temperatura) restringen el habitat para unos pocos microorganismos debido al limitado número de reacciones capaces de suministrar energía (Xu *et al.*, 2018). Los microorganismos detectados en el DAM con múltiples mecanismos de resistencia a ambientes extremos pertenecen a los phyla *Proteobacteria*, *Nitrospirae*, *Firmicutes* *Acidobacteria* *Proteobacteria*, *Aquificae*, el phylum candidato TM7 en el dominio Bac-

teria, y *Euryarchaeota* y *Crenarchaeota* en Archaea (Chen *et al.*, 2016; Teng *et al.*, 2017). *Leptospirillum*, *Ferroplasma*, *Ferrovum*, *Gallionella*, *Acidiphilium*, *Acidithrix*, *Sideroxydans*, *Acidithiobacillus* y *Nitrospira* son los géneros más comunes con abundancia relativa alta (> 63, 31, 6 y 2%, respectivamente), presentes en *biofilms*, aguas, suelos/sedimentos y biorreactores con DAM (Villegas-Plazas *et al.*, 2019).

El uso de las técnicas moleculares en el estudio en la microbiología del DAM ha incrementado el conocimiento de la diversidad de microorganismos acidófilos (Chen *et al.*, 2015; García-Moyano *et al.*, 2015; Méndez-García *et al.*, 2015). Estos incluyen bacterias moderadamente termófilas (20°C - 35°C) como *Leptospirillum ferrooxidans*, moderadamente acidófilas como *Thiomonas* o *Halothiobacillus spp* y oxidadoras de hierro como la especie propuesta *Ferrovum myxofaciens*. Las arqueas involucradas en la generación del DAM, han sido poco estudiadas y sólo se conocen algunas. La más relevante es *Ferroplasma acidiphilum* aislada de la mina Richmond (California, EE. UU), capaz de realizar la oxido-reducción del hierro (Hallberg, 2010). Otras arqueas pertenecientes los grupos *Euryarchaeota* y *Thermoplasmatales* también han sido identificadas en ambientes impactados por DAM (García-Moyano *et al.*, 2015).

Además de los análisis de diversidad a través de tecnologías de secuenciación, en la última década estudios metagenómicos y metatranscriptómicos han permitido no solo el ensamblaje de genomas completos, sino también la identificación del potencial metabólico y funcional de los microorganismos que viven el DAM (Lukhele *et al.*, 2019). Adicional a las rutas metabólicas centrales como la fosforilación oxidativa, biosíntesis de aminoácidos, metabolismo del nitrógeno y el carbono, entre los transcritos presentes en el DAM se encuentran los relacionados a mecanismos de resistencia al estrés inherentes a un ambiente de condiciones extremas. Por ejemplo, estrategias para sobrevivir a pHs bajos como la expresión de enzimas implicadas en la impermeabilización y generación de potencial de membrana positivo, expulsión y secuestro intracelular de protones. También la expresión de genes relacionados a resistencia a metales (Zn, Fe, Pb, Cd, Co, Cu), y en la reparación de daños al ADN y proteínas (Hua *et al.*, 2015).

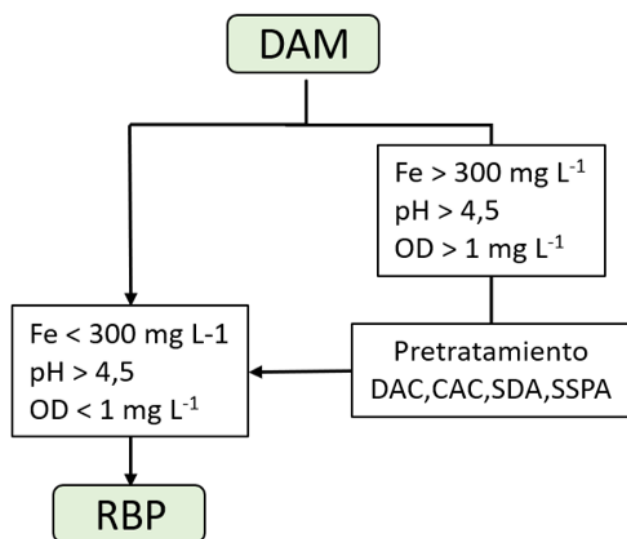
Aunque el DAM es considerado un residuo minero, en los últimos años se han realizado estudios en recuperación de elementos y metales de tierras raras (Itrio), ambos con intereses comerciales. El DAM puede albergar Itrio hasta dos órdenes de magnitud más altas que las aguas y océanos continentales. Estos minerales son materias primas esenciales para aplicaciones tecnológicas



modernas. En el 2016 la demanda global de este material y sus óxidos llegó a 160.000 toneladas, por lo cual se iniciaron estudios para identificarlos y recuperarlos de los drenajes de mina por métodos biotecnológicos (Ayora *et al.*, 2016).

### Reactores bioquímicos pasivos

Los RBPs son columnas o cavidades poco profundas ( $\geq 1$  m) con revestimiento plástico como aislante y empaçadas con una mezcla reactiva conformada por substratos orgánicos, inorgánicos y un inóculo microbiano (Adams *et al.*, 2014). Durante el funcionamiento, el DAM pasa a través de la mezcla reactiva en un tiempo de retención hidráulico (TRH) con el fin de incrementar el pH, mientras se reducen los sulfatos y metales (Gusek, 2015). Los RBPs pueden ser utilizados como sistema de tratamiento primario o secundario, pero eso depende de la química del DAM (Figura 2).



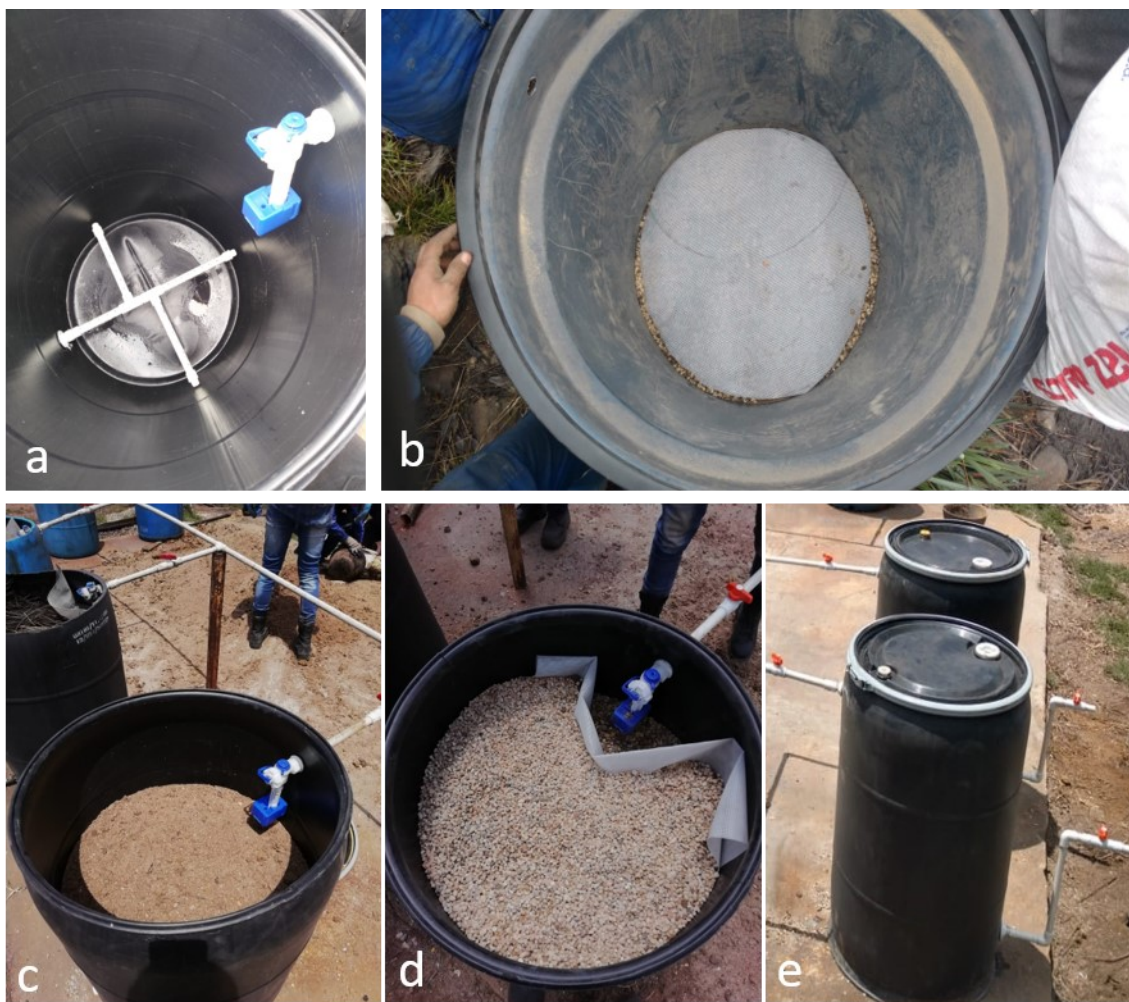
**Figura 2.** Selección de un RBP como tratamiento primario o secundario durante la biorremediación del DAM. (Drenajes anóxicos calizos (DAC), canales abiertos de piedra caliza (CAC), substratos dispersores de alcalinidad (SDA), sistemas sucesivos productores de alcalinidad (SSPA)).

La eficiencia de los RBP durante la remediación del DAM ha sido estudiada y descrita en varios estudios por cerca de 20 años (Tabla 1). Los RBP se pueden diseñar de flujo ascendente, descendente u horizontal, siendo los descendente los más utilizados debido a que se aprovecha la gravedad reduciendo costos, no obstante, se debe tener cuidado en que no se formen caminos de DAM en la mezcla reactiva. Para su instalación en el fondo de cada tanque o columna se coloca un sistema de tubería en forma de cruz, construido con tubos en

rejilla o flauta, que permiten colectar el DAM tratado de manera homogénea y conducirlo al puerto de descarga donde se controla el caudal de salida (Figura 3a). Los reactores son ensamblados colocando una capa de gravilla ( $\varnothing=1,0$  mm) de aproximadamente 15 cm de alto sobre la tubería en forma de cruz y sobre esta una geomembrana (malla 25) para evitar la pérdida de materia orgánica y el taponamiento del sistema de salida del DAM tratado (Figura 3b). Luego sobre la geomembrana se coloca la mezcla reactiva o substrato en capas de 15 cm que se compactan suavemente hasta alcanzar una altura máxima de 80 cm (Figura 3c), siguiendo las recomendaciones de Yim *et al.*, (2015). Después, se coloca otra geomembrana, otra capa de gravilla y un disco poroso o plato plástico con pequeñas perforaciones para asegurar la distribución homogénea del DAM en el reactor y finalmente la tapa con el puerto de ingreso del DAM y una pequeña válvula para la salida de los gases (figura 3d) que se pueden llegar a generar durante la actividad microbiana. Aunque se han realizado estudios utilizando reactores sin tapa (Lefticariu *et al.*, 2014) no se ha logrado la eficiencia esperada ( $> 70\%$ ) para la remoción de metales debido a que no se logran las condiciones anaerobias necesarias para la actividad de las BSR.

Posterior al montaje de los reactores, estos se llenan lentamente con un medio líquido que facilite la adaptación de las BSR para que resistan el cambio brusco una vez ingrese el DAM e inicie la fase de operación. La fase de incubación es de 2 a 4 semanas y se considera terminada cuando se han establecido las condiciones sulfato reductoras ( $\text{pH} > 7,0$  y potencial de óxido reducción (ORP)  $< -300$  mV; Postgate, 1984). Algunos autores recomiendan que la saturación del reactor se realice con medio Postgate (Genty *et al.*, 2020; Rakotonimaro *et al.*, 2018) y otros directamente con DAM (Vásquez *et al.*, 2016b; Yim *et al.*, 2015).

En la primera etapa de funcionamiento de un biorreactor, los procesos más importantes de remoción son la adsorción y la precipitación en forma de hidróxidos y de carbonatos. Sin embargo, una vez las condiciones de sulfato reducción están establecidas, la precipitación de sulfuros metálicos ( $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ), hidróxidos ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ , y  $\text{Al}^{3+}$ ) y carbonatos ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) se convierte en el mecanismo predominante, debido a la facilidad de reacción de los metales y los sulfuros disueltos en el medio (Haakensen *et al.*, 2015). La principal ventaja que da la formación de los sulfuros metálicos es que son muy insolubles, y por lo tanto menos biodisponibles en comparación con otros minerales metálicos (Sánchez-Andrea *et al.*, 2014).



**Figura 3.** Montaje y puesta en marcha de un RBP piloto con flujo descendente: a. Tubería de descarga del DAM tratado, b. capa de gravilla y geomembrana, c. mezcla reactiva, d. capa de gravilla de la parte superior, e. reactor completo. (Fotografías Vásquez Y).

Los reactores pasivos son una promisoriosa tecnología para la biorremediación de DAM, sin embargo, su éxito en campo requiere de un escalonado proceso de ensayo usando reactores por lotes (Figura 4a), en continuo a escala banco (Figura 4b y 4c) y piloto en campo (Figura 3e) que permiten hacer validaciones de diseño antes de la instalación a escala planta (Adams *et al.*, 2014). Un apropiado diseño piloto en campo es el mejor lugar para ajustar el rango de flujo que debe ser tratado en el reactor de acuerdo con la concentración de metales y sulfatos presentes en el DAM durante la temporada seca y de lluvia. También, se recomienda que la evaluación del sistema piloto se realice durante varios meses, incluso años dependiendo de las fluctuaciones climáticas (ITRC, 2013).

Previos estudios han determinado que el agotamiento de los substratos orgánicos, la reducción del área reactiva

de la mezcla y la pérdida de la permeabilidad son los factores que afectan la eficiencia y longevidad de los reactores en campo (Genty *et al.*, 2020). Estimar correctamente estos parámetros en un sistema piloto puede prevenir errores en el tratamiento a escala en planta. Si en un estudio piloto se presenta este tipo de problemas es posible reevaluar los parámetros hidráulicos, ajustar la composición de la mezcla reactiva o considerar la adición de un pre o postratamiento (Lefticariu *et al.*, 2015). En reactores pasivos los ensayos piloto también permiten determinar las características de la mezcla reactiva posttratamiento, así como su toxicidad para prever la disposición final de los residuos (Jouini *et al.*, 2019). Por último, el sistema piloto permite estimar los costos de la implementación del sistema final en campo, así como los costos de operación durante el tratamiento del DAM.

Tabla 1. Estudios sobre la eficiencia de los RBP durante la remediación del DAM.

Escala de reactor	Volumen total del reactor (m <sup>3</sup> )	DAM	substrato orgánico de la mezcla reactiva	TRH (días)	pH		Remoción de sulfato (%)	Remoción de metales (%)	Referencias
					Entrada	Salida			
Banco	0.011	Sintético	48% aserrín, 10% de compost de hojas, 30% de cenizas, 10% de arena y 2% de lodo municipal.	0.5 -1	2.8	6.4	12	Ni 99; Fe 75; Cu 80	Ali <i>et al.</i> , 2020
Banco	1.6	sintético	10% compost de champiñón, 20% ocre (arcilla y arena), 30% escoria de acero y 40% caliza	3	3.5	6.5		Fe 94,6; Mn 61,2; Zn 96,7; Al 96	Madzin <i>et al.</i> , 2020
Banco	0.2	Natural	Melaza	10	6.5	7.1	100	Zn 73,5; Ni 45	Nielsen <i>et al.</i> , 2018
Banco	0.06	Natural	12 % Salvado de arroz, 45% de carbonato, 0.5% de suelo y una capa en la parte superior de cascarilla de arroz	2	3.5	7.0	77.8	Zn 83,6; Cu 99; Cd 99	Sato <i>et al.</i> , 2018
Banco	0.07	sintético	15% de estiércol de vaca, 10% de compost de hongos, 25% de aserrín de sajo, 15% de grava, 20% de piedra caliza y 15% de sedimento de humedal como inóculo	2, 4	3.5	7.2	60	Fe 85; Zn 100	Vásquez <i>et al.</i> , 2016
piloto	2.65	Sintético	5% astillas de madera, 10% aserrín, 5% gallinaza, 10% compost, 8% sedimento de río, 10% arena, 2% urea, 50% carbonato de calcio	14.6	2.8	6.7	72	Fe 89,7	Genty <i>et al.</i> , 2018)
Piloto	50	Natural	12 % Salvado de arroz, 45% de carbonato, 0.5% de suelo y una capa en la parte superior de cascarilla de arroz	1.1	3.5	7.0		Zn 70,6; Cu 99; Cd 80	Aoyagi <i>et al.</i> , 2017
Piloto	0.21	Natural	36% compost de hojas, 18 % residuos cervenceros de cebada, 36% de pasto, 5% astillas de madera, 2 %suero de leche en polvo, 3% carbonato	3	4.0	6.7	32	Fe 83; Mn 6; Ni 81; Zn 95; Cu 85; Cd 92	Lefticariu <i>et al.</i> , 2015
Planta	158	Natural	50% astillas de madera, 10% arena, 20% gallinaza, 10 % compost, 20% calita	5	3.0	6.2	72.2	Fe 99,2	Rakotonimaro <i>et al.</i> , 2018
Planta	840	Natural	45% de astillas de madera, 45% de compost de residuos municipales y 10% de lodos de aguas residuales	3	6.0	7.5	100	Zn 98; Cd 94; Pb 94	Bailey <i>et al.</i> , 2016 <a href="https://www2.groundstability.com/force-crag-mine-water-treatment-scheme/">https://www2.groundstability.com/force-crag-mine-water-treatment-scheme/</a>

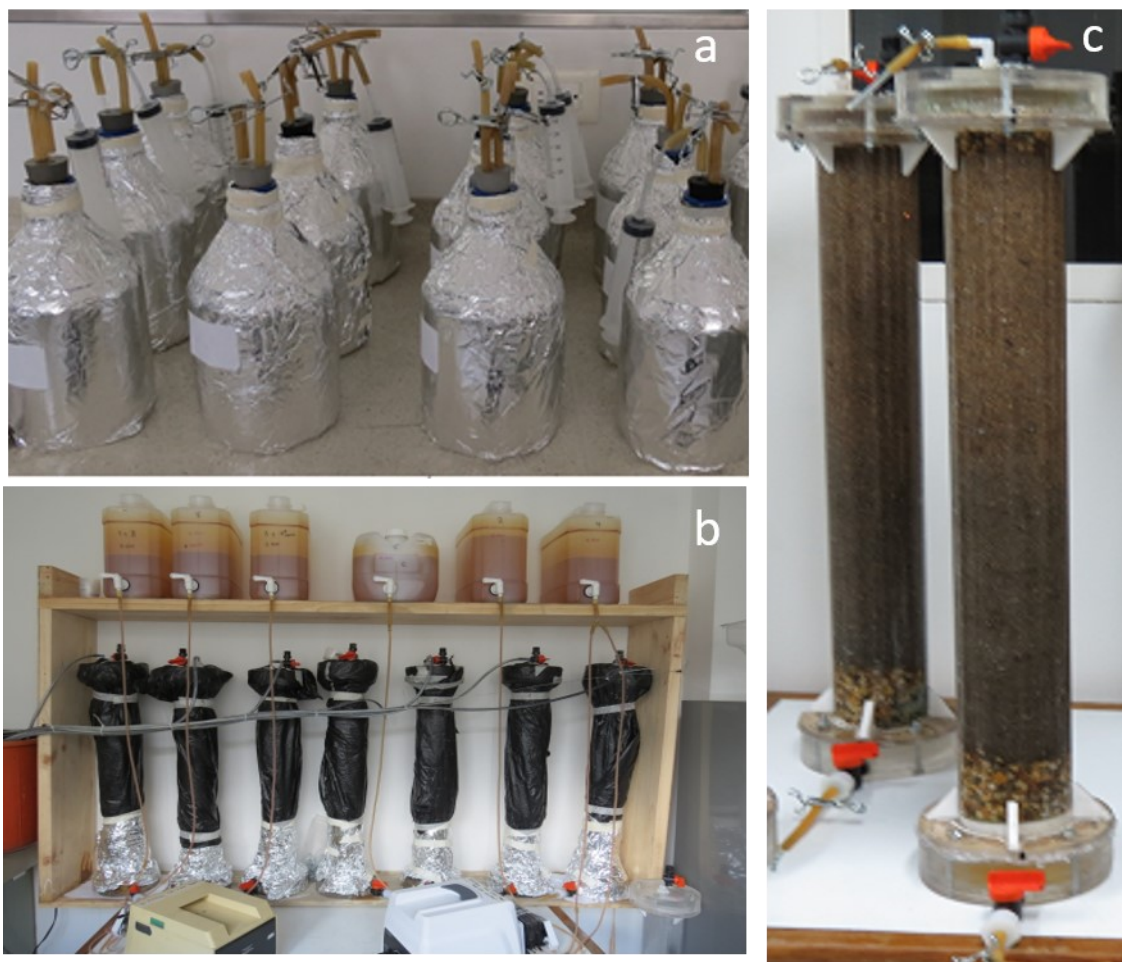
### Mezcla reactiva

La mezcla reactiva está conformada por substratos orgánicos como fuente de energía para los microorganismos, materiales inorgánicos para incrementar el pH y la permeabilidad y un inóculo microbiano con bacterias celulíticas, fermentadoras y sulfato reductoras (Ali *et al.*, 2019). Los substratos orgánicos pueden ser compuestos de bajo peso molecular o residuos orgánicos lignocelulósicos. Entre los de bajo peso molecular encontramos alcoholes (metanol y etanol), ácidos orgánicos (acetato, lactato, piruvato) y azúcares (glucosa), los cuales tienen la ventaja de ser directamente utilizados por las BSR, pero implican altos costos que los hacen inviables y algunos, como los alcoholes, involucran problemas de seguridad pública cuando son almacenados en grandes cantidades en minas abandonadas.

La cuidadosa selección de una mezcla reactiva capaz de suministrar carbono y nitrógeno orgánico a los microorganismos a corto y largo plazo asegura una mayor efi-

ciencia al biorreactor (Tabla 2). Entre los substratos orgánicos encontramos materiales como el compost (champiñón, pasto, acelgas, gallinaza, estiércol de vaca, caballo u ovejo), residuos lignocelulósicos (desechos de papel, aserrín, paja, astillas de madera), desechos de alimentos (papa, vino, melaza, suero de queso, mosto de cerveza) y aguas residuales domésticas con alta carga orgánica (Sánchez-Andrea *et al.*, 2014). Aunque estos substratos son abundantes y económicos, son de lenta degradación y deben ser reducidos a compuestos de bajo peso molecular por los microorganismos heterotróficos antes de ser utilizados por las BSR (Hao *et al.*, 2014). Si se utilizan substratos lignocelulósicos, éstos deben permitir el arranque, el establecimiento y la operatividad del biorreactor por largos períodos de tiempo, para esto deben contener sustancias fácilmente disponibles (azúcares solubles, aminoácidos, algunas proteínas, almidón, celulosa, hemicelulosa y lignina) (Vásquez *et al.*, 2016a). La celulosa es degradada lentamente hasta moléculas simples, por degradadores de celulosa, y su





**Figura 4.** Reactores bioquímicos pasivo en laboratorio: a. reactores por lotes, b. reactores en continuo de flujo ascendente. (Fotografías Escobar M.C).

tasa de descomposición determina a largo plazo la tasa de remoción de sulfato. Finalmente, la lignina que se considera no degradable por los microorganismos anaerobios se recomienda ser adicionada a la mezcla reactiva en baja concentración (Adams *et al.*, 2014).

La mezcla reactiva debe contener un inóculo de microorganismos que favorezcan la degradación de celulosa y el establecimiento de las condiciones sulfato reductoras. En estudios por lotes se ha determinado que cuando se utiliza un buen inóculo, la remoción de sulfato y la producción de sulfuros se realiza en períodos más cortos (Pereyra *et al.*, 2012). Como inóculo se puede utilizar sedimentos de lagos y de ríos contaminados con DAM en donde se encuentren microorganismos aerobios que favorezcan el rápido consumo de oxígeno y nitrato, así como organismos anaerobios que se establezcan en el reactor (Biermann *et al.*, 2014). Diferentes estudios indican que, en gran medida el rendimiento y longevidad de

los biorreactores depende de la actividad de las BSR (Rezadehbashi y Baldwin, 2018). Sin embargo, las BSR no pueden oxidar directamente fuentes complejas de carbono y dependen del metabolismo de otras bacterias como las fermentadoras y celulolíticas. Esto implica que el número de bacterias degradadoras de fuentes complejas de carbono presentes en el inóculo es otro factor crítico. La inoculación con bacterias de cultivos o con estiércol suple el sistema con BSR, pero estos microorganismos son obligados a readaptarse a los metales, lo que puede demorar el arranque del biorreactor, por tanto, se recomienda el uso de inóculos con BSR provenientes de suelos, sedimentos, desechos industriales y mineros (Hwang *et al.*, 2018).

En cuanto al material de soporte o componente inorgánico que se adiciona a la mezcla reactiva, se reporta que las mayores tasas de reducción de sulfatos en los RBP se logran cuando los microorganismos tienen acceso a una

**Tabla 2.** Función de los componentes de la mezcla reactiva.

Función	Material
Fuente de carbón y nitrógeno a <b>largo plazo</b>	Astillas de madera, aserrín, conchas de caracol, compost, gallinaza, cascarilla de arroz, heno, ensilaje, marlo de maíz
Fuente de carbón y nitrógeno a <b>corto plazo</b>	Estiércol, quitina, desechos de cervecería/lácteos, pulpa de remolacha, etanol, acetato, suero de leche, biosólidos
Inóculo microbiano	Estiércol de rumiante, residuos de RBPs, lodos de planta de tratamiento, sedimentos de ríos cercanos a zonas mineras
Neutralización	Calcita, dolomita, carbonato de calcio, ceniza de madera, quitina
Permeabilidad	Arena, gravilla, astillas de madera, roca picada, piedra pómez

superficie porosa, especialmente si el poro es grande con un buen volumen vacío porque permite que los microorganismos se puedan establecer y llevar a cabo los procesos metabólicos. El diámetro recomendado es > 0,6 mm, de lo contrario el sustrato tiende a compactarse y disminuye la conductividad hidráulica debida a la precipitación de sulfuros metálicos y del incremento de la biomasa microbiana (Haakensen *et al.*, 2015).

Al final del ciclo de vida de los RBP la mezcla reactiva debe ser remplazada en su totalidad y se recomienda que la mezcla postratamiento sea manejada apropiadamente evitando contacto con el agua y el oxígeno para prevenir la disolución de los minerales y la consecuente liberación de los metales al ambiente. Estudios previos han mostrado que estos residuos tienen poca estabilidad y su comportamiento ambiental es difícil de predecir (Jouini *et al.*, 2019). También, que dependiendo de la composición química del DAM los residuos se pueden clasificar como no peligrosos e inertes (Simonton *et al.*, 2000), inestables (Genty *et al.*, 2012), peligrosos o inapropiados para el relleno sanitario sin pretratamiento (Kousi *et al.*, 2018).

#### **Propiedades hidráulicas de los RBP**

La eficiencia y el funcionamiento a largo plazo de un RBP también dependen de sus propiedades hidráulicas, especialmente de la conductividad, la porosidad de la mezcla reactiva, el tiempo de retención hidráulica y el caudal (ITRC, 2013). La conductividad hidráulica ( $K_{sat}$ ) representa la mayor o menor facilidad con la que la mezcla reactiva deja pasar el DAM a través de ella y está gobernada por la ley de Darcy que puede expresarse de la siguiente manera:

$$Q = K_{sat} A \frac{\Delta h}{\Delta L}$$

Donde Q es el caudal ( $\text{cm}^3 \text{s}^{-1}$ ), A es el área transversal ( $\text{cm}^2$ ),  $\Delta h/\Delta L$  es el gradiente hidráulico ( $\text{cm/cm}$ ). Estimar correctamente  $K_{sat}$  previene problemas futuros de reducción de porosidad y permeabilidad causados por los sólidos suspendidos (oxi-hidróxidos, carbonatos, sulfuros metálicos y biomasa) en el reactor, que pueden afectar la eficiencia y finalmente causar fallas (Genty *et al.*, 2018). El  $K_{sat}$  de la mezcla reactiva debe ser cercano a  $10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$ , y ajustar la composición en busca de este valor favorece el dimensionamiento de sistema piloto. En los biorreactores pasivos que utilizan compost como único sustrato el  $K_{sat}$  tiene un valor cercano a  $10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ , y se han observado problemas de compactación y sedimentación en los primeros meses de operación. Por tanto, se recomienda una mezcla reactiva con diferentes sustratos orgánicos (cascaras de nuez, astillas de madera) y en especial con aserrín, debido a su alta conductividad hidráulica (desde  $10^{-3}$  hasta  $10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$ ) que previene el taponamiento (Haakensen *et al.*, 2015).

La porosidad de la mezcla reactiva es otro parámetro hidráulico importante y debe ser estimada antes de establecer el TRH (Adams *et al.*, 2014). Este parámetro aumenta con el porcentaje de aserrín o de astillas de madera presentes en la mezcla reactiva. Estos sustratos pueden ocupar los huecos entre la gravilla y separar los componentes incrementando los caminos de flujo (Genty *et al.*, 2018). La porosidad es un parámetro que debe tenerse en cuenta durante la selección de la mezcla reactiva y en el dimensionamiento de los biorreactores en campo.

Una vez seleccionada la mezcla reactiva el siguiente paso es la evaluación de la eficiencia del reactor en flujo continuo y para esto se debe establecer el TRH. Este parámetro hidráulico se define como el tiempo promedio que una gota de DAM se demora desde que ingresa hasta que sale del biorreactor. En estudios de campo se ha encontrado que el TRH de los biorreactores pasivos debe ser mínimo 1,5 días y máximo 4 días, su elección depende de la carga de los metales y el pH del DAM (Tabla 1). En reactores pasivos se ha encontrado que después de la elección de la apropiada mezcla reactiva, el TRH es el parámetro hidráulico más difícil de ajustar. Esto se debe a que un bajo TRH no permite que la actividad bacteriana neutralice la acidez y precipiten los metales, además puede llevar a un lavado de los nutrientes y microorganismos presentes en la mezcla reactiva, mientras que un alto TRH puede ocasionar el crecimiento excesivo de los microorganismos que consumen los sustratos orgánicos agotando la mezcla reactiva (Vásquez, *et al.*, 2016b).

El TRH tiene influencia directa sobre la eficiencia de los reactores pasivos y es dependiente del flujo o caudal que ingresa al reactor (Adams *et al.*, 2014) y puede calcularse de la siguiente forma:

$$Q = \frac{V_T \times \theta}{TRH}$$

Donde Q es el caudal ( $\text{cm}^3 \text{ s}^{-1}$ ),  $V_T$  es el volumen total de la mezcla reactiva ( $\text{cm}^3$ ) y  $\theta$  la porosidad de la mezcla reactiva. El volumen de DAM que ingresa al reactor y el tiempo de residencia tiene impacto directo sobre la eficiencia, si es muy alto puede colmatar el biorreactor, sobresaturando la mezcla reactiva e inhibiendo la actividad de los microorganismos. Por el contrario, si es muy bajo, el sustrato puede oxidarse y liberar los metales que ya habían sido precipitados y disminuir la actividad de la comunidad microbiana (Skousen *et al.*, 2017). Por otra parte, si el caudal incrementa significativamente por encima del caudal de diseño, la comunidad microbiana puede sufrir un efecto de lavado, reduciendo la eficiencia del reactor y requiriendo mantenimiento adicional (Vásquez *et al.*, 2016b).

#### **Degradación de materia orgánica en los RBP**

En ambientes anaerobios con presencia de sulfato, la degradación de la materia orgánica requiere de la interacción de diferentes grupos microbianos, en la cual el producto metabólico final de un grupo es el sustrato de otro, hasta que la oxidación completa se lleve a ca-

bo. Los microorganismos celulolíticos y fermentativos, son los primeros en hidrolizar polímeros de gran peso molecular (polisacáridos, lípidos, proteínas) en azúcares, ácidos grasos y aminoácidos, entre otros, y los microorganismos fermentadores generan a partir de ellos:  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$ , acetato, alcoholes y ácidos orgánicos (lactato, butirato y propionato). Las bacterias acetogénicas transforman estos ácidos orgánicos y alcoholes en acetato,  $\text{H}_2$  y  $\text{CO}_2$  (Schuchmann y Müller, 2016).

Por su parte los microorganismos sulfato reductores pueden llevar a cabo la degradación de los compuestos orgánicos hidrolizados o fermentados de forma incompleta hasta acetato o de forma completa hasta  $\text{CO}_2$  (Hao *et al.*, 2014). Las BSR utilizan gran variedad de donadores de electrones: compuestos orgánicos (lactato, piruvato, malato, succinato, formiato, etanol), carbohidratos pequeños (glucosa, sacarosa, fructosa), ácidos grasos de cadena corta (acetato), ácidos grasos de cadena larga y compuestos aromáticos (benzoato, fenol, tolueno) (Han *et al.*, 2016).

El lactato es el mejor sustrato para las BSR porque es buen donador de electrones, debido a que produce tres moles de bicarbonato por cada dos moles de sustrato consumido, ayudando a neutralizar el pH de los efluentes en los RBP (Xu *et al.*, 2018). Sin embargo, no todas las especies de BSR pueden oxidar el lactato ni el etanol a  $\text{CO}_2$ . Solo algunas pueden oxidar parcialmente moléculas orgánicas simples en acetato, y muy pocas pueden usar solo el acetato (Brahmacharimayum *et al.*, 2019).

En ambientes anaerobios con bajo ORP ( $< -300 \text{ mV}$ ) existe competencia por los sustratos disponibles. Los microorganismos metanogénicos utilizan los productos finales de todos los procesos anteriores ( $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$  y acetato) para generar metano ( $\text{CH}_4$ ), y compiten con las BSR debido a que ocupan ecosistemas análogos en los que ambos utilizan acetato e hidrógeno molecular como donador de electrones (Laiothanachareon *et al.*, 2014). Cuando la concentración de sulfato está en exceso, generalmente los microorganismos metanogénicos son pobres competidores, tanto en ambientes naturales como en sistemas artificiales. Se cree que el paradigma de la predominancia de BSR en ambientes con altas concentraciones de sulfato y de metanogénicos en ambientes con bajas concentraciones de sulfato, se debe a que las BSR tienen ventajas cinéticas y termodinámicas, como por ejemplo bajos valores de la constante de afinidad ( $K_m$ ) tanto para el  $\text{H}_2$  como para el acetato (Stams *et al.*, 2019). No obstante, aun con excesos de sulfato, se ha reportado la coexistencia de estos dos microorganismos (Pereyra *et al.*, 2008); esto ha sido atribuido principalmente a diferencias en la colonización y en las pro-

iedades de adhesión de las comunidades microbianas, o a la variabilidad en la toxicidad del sulfuro.

Las BSR son anaerobias estrictas, sin embargo, algunas especies pueden tolerar e incluso reducir el oxígeno por períodos de tiempo muy limitados. Algunos también pueden utilizar el sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ), tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) o azufre como aceptores de electrones alternativos, y reducirlos de igual manera, a sulfuro (Bell *et al.*, 2020). Existen otros compuestos que sirven de aceptores finales de electrones para las BSR, sin embargo, estos procesos de reducción no se encuentran acoplados al crecimiento de estos microorganismos. Entre estos se encuentran: el hierro, uranio, seleniato, cromato y arsenaio. Por último, también se ha observado que las BSR pueden usar compuestos orgánicos, como el fumarato o el dimetilsulfóxido, como aceptores finales de electrones, para su crecimiento (Hao *et al.*, 2014).

### **Comunidades microbianas encontradas en RBP**

Se ha observado que en los RBP alimentados con moléculas de bajo peso molecular (etanol, metanol, lactato) la población microbiana está conformada en su mayoría (95%) por BSR. Sin embargo, en biorreactores empacados con mezclas reactivas se ha evidenciado mayor diversidad de bacterias celulolíticas y fermentativas, capaces de degradar la materia orgánica con capacidad para donar electrones y afectar la cinética de formación de sulfuros metálicos, mientras que las BSR se encuentran en baja proporción (5 – 10 %) (Hiibel *et al.*, 2008; Reza-dehbashi y Baldwin, 2018). Se ha establecido que la comunidad microbiana en los reactores pasivos está relacionada con factores como el inóculo (Pereyra *et al.*, 2010), los sustratos orgánicos (Song *et al.*, 2012a; Song *et al.*, 2012b; Lefticariu *et al.*, 2015), el tiempo de operación (Aoyagi *et al.*, 2018), pH (Aoyagi *et al.*, 2017; Fan *et al.*, 2019) y el tiempo de retención hidráulica (Aoyagi *et al.*, 2017; Vásquez *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2018).

Los *phyla* dominantes en los reactores pasivos empacados con material ligno-celulósico corresponden a *Chloroflexi*, *Chlorobi*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Planctomycetes*, *Spirochaetes*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Gemmatimonadetes*, *Synergistetes*, *Caldiserica*, *Cyanobacteria*, *Spirochaete* y *OP11* (Drennan *et al.*, 2016; Mirjafari y Baldwin 2016; Baldwin *et al.*, 2016; Aoyagi *et al.*, 2018; Sato *et al.*, 2019). También, se han reportado más de 100 géneros siendo los microorganismos heterótrofos que degradan celulosa y otros polisacáridos los más abundantes, 25 al 30% del total de la comunidad. Los géneros celulolíticos de mayor abundancia reportados en estudios de biorreactores pasivos corresponden a *Bacteroides*, *Clostridium*, *Acetivibrio*, *Spirochaeta*, *Ruminococcus* y *Cellulomonas*. De

igual manera, los fermentativos más reportados son *Paludibacter*, *Clostridium*, *Devosia* y *Treponema* (Baldwin *et al.*, 2016).

El análisis comparativo de secuencias del 16SrRNA agrupa a los microorganismos reductores de sulfato en siete linajes filogenéticos: cinco de bacteria y dos de archaea. La mayoría de BSR pertenecen a la clase mesófilas Gram-negativas *Deltaproteobacteria* (~23 géneros). Las familias miembros de esta clase que cuentan con un mayor número de especies son *Desulfobacteraceae*, *Desulfobulbaceae* y *Desulfovibrionaceae*, cuyo género más numeroso es *Desulfovibrio spp.* El siguiente grupo más numeroso es la clase *Clostridia* conformada con 3 géneros de bacterias Gram-positivas: *Desulfotomaculum*, *Desulfosporosinus* y *Desulfosporomusa* (Liu *et al.*, 2018). Las tres últimas clases dentro del dominio Bacteria, están conformadas por BSR termófilas: *Nitrospirae*, *Thermodesulfobacteria* y *Thermodesulfobiaceae* (Brahmacharimayum *et al.*, 2019).

Con el desarrollo de las técnicas moleculares se han reconocido 40 géneros que han sido agrupados por su fisiología y rol ecológico en completas (22 géneros) e incompletas (16 géneros) oxidadoras de compuestos orgánicos y un remanente formado por *Desulfotomaculum* y *Desulfomonile*, que presentan las dos características (Hao *et al.*, 2014). Diversos géneros han sido encontrados en los biorreactores pasivos, pero los de mayor abundancia son *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus*, *Desulfomicrobium* que pertenecen al grupo de las incompletas oxidadoras y *Desulfobacter* que es el género dominante de las completas oxidadoras (Sánchez-Andrea *et al.*, 2014).

Los métodos tradicionales de cultivo no se consideran eficaces para cuantificar grupos microbianos reductores de sulfato, celulolíticos y fermentadores, involucrados en los procesos biogeoquímicos de los reactores, debido a que requieren mucho tiempo y subestiman el número de bacterias. Además, el conteo por la técnica del número más probable limita el conocimiento de las comunidades microbianas, mientras que técnicas moleculares modernas permiten cuantificar y entender la dinámica de las comunidades en diferentes ambientes. Los métodos moleculares, pueden proveer información precisa sobre el número y posible función, mediante la amplificación de genes funcionales (Lukhele *et al.*, 2019). La cuantificación de las BSR se ha llevado a cabo mediante el uso de gen *dsrA* que codifica para la subunidad  $\alpha$  de la enzima desasimilativa sulfato reductasa encargada de catalizar la reducción del (bi) sulfito a sulfuro (Liu *et al.*, 2018). Este gen ha sido ampliamente utilizado como marcador molecular durante la detección y enumeración de BSR en diferentes ambientes con gran eficiencia

debido a que está evolutivamente conservado y es un gen constitutivo (Zhang *et al.*, 2016). Para el caso de las bacterias celulolíticas, la hidrólisis de celulosa es catalizada por enzimas pertenecientes al grupo de las glucosidasas, las cuales están divididas según su estructura y función en familias de enzimas. La mayoría de las glucosidasas de microorganismos anaerobios pertenecen solo a tres familias: 5, 9 y 48 (Pereyra *et al.*, 2012). La familia 48 incluye en su mayoría exonucleasas, codificadas por el gen *cel48*, de única copia en los genomas de los microorganismos celulolíticos (Hua *et al.*, 2018). En casi todas las bacterias fermentativas (microorganismos anaerobios estrictos o facultativos), los electrones reducidos se canalizan a  $H_2$  través de la enzima hidrogenasa (Ding *et al.*, 2016). Por último, se conoce que el gen *hydA* codifica para una proteína de 350 aminoácidos que corresponde a la subunidad alfa del hierro hidrogenasa (Poudel *et al.*, 2016).

La degradación de celulosa, la fermentación y la sulfato reducción, son procesos enzimáticos que coexisten en los reactores para la remediación de DAM. La cuantificación de genes que codifican estas enzimas es ventajoso porque da información funcional directa, en comparación a las técnicas de secuenciación del gen 16S rRNA (como el ilumina). La cuantificación de los genes funcionales *dsrA*, *cel48* y *hydA* por qPCR ha permitido el estudio de su dinámica bajo la influencia de diferentes factores que determinan la eficiencia de los RBP. En previos estudios con estos genes se ha demostrado cómo la composición de los substratos orgánicos (Hiibel *et al.*, 2011), el efecto de la bioaugmentación y bioestimulación (Pereyra *et al.*, 2012), las condiciones medio ambientales y de operación (Vásquez *et al.*, 2018) de los biorreactores pueden incrementar las comunidades microbianas, y por lo tanto el éxito para la remoción de sulfatos y metales.

Aunque se han realizado importantes estudios sobre la diversidad microbiana asociada a la biorremediación del DAM, investigaciones recientes (Aoyagi *et al.*, 2018; Hessler *et al.*, 2018; Rezadehbash y Baldwin, 2018; Fan *et al.*, 2019) utilizando técnicas de secuenciación masiva han detectado nuevos grupos sin asignación taxonómica, y han logrado el ensamblaje de genomas completos de nuevos representantes de BSR a partir de metagenomas de biorreactores (Almstrand *et al.*, 2016). Sugiriendo que el potencial metabólico involucrado en la degradación de la materia orgánica y de la biotransformación de metales es más diverso de lo conocido hasta ahora. Recientemente, se ha establecido que el metabolismo bacteriano influye sobre la especiación de los metales y sulfuros, conduciendo a una rápida atenuación de la contaminación por DAM (Aguinaga *et al.*, 2019).

### **Factores que afectan la eficiencia de los RBP**

La eficiencia de un reactor pasivo para remediar el DAM se determina por el incremento del pH y la alcalinidad, así como por la remoción de sulfatos y metales. El pH del DAM debe incrementarse antes y durante el tratamiento hasta un valor cercano a la neutralidad. Un  $pH \geq 7,0$  asegura una óptima remoción de sulfatos y metales mientras que a valores  $\leq 5,0$  se inhibe la sulfato reducción y se incrementa la solubilidad de los sulfuros metálicos (Xu y Chen, 2020). Además, a bajo pH, la presencia de ácidos orgánicos producidos durante la fermentación puede inhibir el sulfato reducción. Los ácidos orgánicos a bajo pH pueden difundir a través de la membrana celular y una vez dentro, el pH intracelular (neutro) favorece la disociación del ácido, liberando protones que terminan afectando el pH celular (Hao *et al.*, 2014). La adición de carbonato de calcio a la mezcla reactiva durante el montaje del reactor favorece el incremento del pH durante los primeros meses, pero durante el tratamiento, la alcalinidad es generada por la actividad de las BSR.

Otro factor que reduce la eficiencia de los biorreactores pasivos es la concentración de sulfuros disueltos en el caudal, el cual inhibe los microorganismos cuando una de sus formas ( $H_2S$ ,  $HS^-$  o  $S^{2-}$ ), dependiendo del pH, ingresa a la célula y se combina con el hierro de la ferredoxina, los citocromos u otras enzimas con centros catalíticos metálicos, causando inhibición en la cadena transportadora de electrones (Sánchez-Andrea *et al.*, 2014). Sin embargo, los sulfuros metálicos también pueden generar toxicidad e inhibir los microorganismos por recubrimiento de las células causando dificultad para acceder a la materia orgánica (Shahsavari *et al.*, 2019). El efecto de los sulfuros sobre los microorganismos presentes en los reactores pasivos depende del pH, la temperatura, tipo de fuente de carbono y concentración de hierro y sulfato (Hao, 2014). En un biorreactor pasivo se espera que el ORP sea negativo ( $< -100$  mV) para proveer un ambiente sustentable para los microorganismos anaerobios. Sin embargo, cuando ingresa oxígeno disuelto al reactor a través del DAM, el ORP aumenta afectando los microorganismos y reduciendo la eficiencia. La concentración de oxígeno disuelto en el DAM para que la sulfato reducción no sea inhibida debe estar entre 0,1 y 1,0  $mg\ L^{-1}$ , pero cuando hay materia orgánica presente se pueden formar micronichos donde los microorganismos están protegidos (Hao *et al.*, 2014). Por otro lado, la eficiencia y el funcionamiento del biorreactor a largo plazo también dependen de la composición química del DAM, las variaciones del flujo, la conductividad hidráulica, la porosidad de la mezcla reactiva y el TRH.

### **Conclusiones y necesidades de investigación**



Aunque los reactores pasivos son una opción efectiva para la remediación de los DAM, y los efectos de los parámetros de diseño sobre la eficiencia de los reactores han sido descritos, todavía no se entiende bien la relación entre los parámetros de operación y la comunidad microbiana durante su funcionamiento (Tsai *et al.*, 2019). Este tipo de estudios son esenciales para asegurar el funcionamiento de los biorreactores y ayudar a mejorar su diseño y rendimiento a largo plazo. Hasta ahora la mayoría de las investigaciones se han enfocado en correlacionar la eficiencia de los biorreactores con el conteo de BSR dejando de lado las bacterias celulolíticas y fermentadoras, que son las encargadas de degradar fuentes de carbono complejas, haciéndolas disponibles a las BSR.

A pesar de los avances en el tratamiento de DAM a nivel mundial, todavía se necesitan mayores estudios sobre la optimización de estos sistemas en campo, empleando TRH más cortos y determinando correctamente la mezcla reactiva empleando residuos orgánicos de cada región. De igual manera, los microorganismos involucrados en la reducción de los sulfatos durante la remediación en campo y los factores que afectan su desempeño han sido poco estudiados. El conocimiento de la comunidad microbiana presente en estos sistemas ha sido lento y no se sabe cómo sus interacciones pueden ayudar a mejorar la eficiencia durante el tiempo de operación o en el futuro cuando el reactor esté terminando su vida útil.

En Colombia también es necesario evaluar a escala piloto en campo y con DAM natural las condiciones seleccionadas en reactores a escala de laboratorio. El conocimiento que se obtenga desde esta aproximación ingenieril y microbiológica permitirá comprender con más detalle las condiciones óptimas para el diseño de reactores pasivos para el tratamiento de DAM en campo. Además, se brindará una opción al gremio minero para incorporar procesos químicos y biológicos que contribuyan con el uso de tecnologías limpias durante la extracción del carbón y oro para la obtención de productos que minimicen los impactos ambientales, económicos y sociales.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, B., Anderson, R., Bless, D., Butler, B., Conway, B., Dailey, A., & Zownir A. (2014). Reference guide to Treatment Technologies for mining-influenced water. Washington, USA: US Environmental Protection Agency-OSRTI, p. 8-30.
- Aguinaga, O.E., Wakelin, J.F., White, K.N., Dean, A. P., & Pittman, J. K. (2019). The association of microbial activity with Fe, S and trace element distribution in sediment cores within a natural wetland polluted by acid mine drainage. *Chemosphere*, 231, 432-441.
- Ali, H.E.B., Neculita, C.M., Molson, J.W., Maqsoud, A., & Zagury, G.J. (2019). Performance of passive systems for mine drainage treatment at low temperature and high salinity: A review. *Minerals Engineering*, 134, 325-344.
- Ali, H.E.B., Neculita, C.M., Molson, J. W., Maqsoud, A., & Zagury, G.J. (2020). Salinity and low temperature effects on the performance of column biochemical reactors for the treatment of acidic and neutral mine drainage. *Chemosphere*, 243, 125303.
- Almstrand, R., Pinto, A.J., Figueroa, L.A., & Sharp, J.O. (2016). Draft genome sequence of a novel Desulfobacteraceae member from a sulfate-reducing bioreactor metagenome. *Genome announcements*, 4(1).
- Aoyagi, T., Hamai, T., Hori, T., Sato, Y., Kobayashi, M., Sato, Y., & Sakata, T. (2018). Microbial community analysis of sulfate-reducing passive bioreactor for treating acid mine drainage under failure conditions after long-term continuous operation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(5), 5795-5800.
- Aoyagi, T., Hamai, T., Hori, T., Sato, Y., Kobayashi, M., Sato, Y., & Sakata, T. (2017). Hydraulic retention time and pH affect the performance and microbial communities of passive bioreactors for treatment of acid mine drainage. *Amb Express*, 7(1), 142.
- Ayora C., Macías F., Torres E., Lozano A., Carrero S., Nieto J.M., Castillo-Michel H. (2016). Recovery of rare earth elements and yttrium from passive-remediation systems of acid mine drainage. *Environmental science y technology*. 50(15): 8255-8262.
- Bailey, M.T., Gandy, C.J., & Jarvis, A.P. (2016). Reducing life-cycle costs of passive mine water treatment by recovery of metals from treatment wastes. In *Mining Meets Water-Conflicts and Solutions. Proceedings of the International Mine Water Association Symposium* (pp. 1255-1262).
- Baldwin, S.A., Mattes, A., Rezadehbashi, M., & Taylor, J. (2016). Seasonal microbial population shifts in a bioremediation system treating metal and sulfate-rich seepage. *Minerals*, 6(2), 36.
- Bell, E., Lamminmäki, T., Alneberg, J., Andersson, A.F., Qian, C., Xiong, W., & Bernier-Latmani, R. (2020). Active sulfur cycling in the terrestrial deep subsurface. *The ISME Journal*, 14(5), 1260-1272.
- Biermann, V., Lillicrap, A.M., Magana, C., Price, B., Bell, R.W., & Oldham, C.E. (2014). Applicability of passive compost bioreactors for treatment of extremely acidic and saline waters in semi-arid climates. *Water Research*, 55, 83-94.
- Brahmacharimayum, B., Mohanty, M.P., & Ghosh, P.K. (2019). Theoretical and practical aspects of biolo-

- gical sulfate reduction: a review. *Global NEST Journal*, 21(2), 222-244.
- Carabassa, V., Domene, X., Ortiz, O., Marks, E.A., & Alcañiz, J.M. (2019). Determination of EC50 Values for Cu, Zn, and Cr on Microorganisms Activity in a Mediterranean Sandy Soil. *CLEAN–Soil, Air, Water*, 47(12), 1700617.
- Chamorro, S., Barata, C., Piña, B., Casado, M., Schwarz, A., Sáez, K., & Vidal, G. (2018). Toxicological analysis of acid mine drainage by water quality and land use bioassays. *Mine Water and the Environment*, 37(1), 88-97.
- Chen, L. X., Huang, L. N., Méndez-García, C., Kuang, J. L., Hua, Z. S., Liu, J., & Shu, W. S. (2016). Microbial communities, processes, and functions in acid mine drainage ecosystems. *Current Opinion in Biotechnology*, 38, 150-158.
- Chen, L. X., Hu, M., Huang, L. N., Hua, Z. S., Kuang, J. L., Li, S. J., & Shu, W. S. (2015). Comparative metagenomic and metatranscriptomic analyses of microbial communities in acid mine drainage. *The ISME Journal*, 9(7), 1579-1592.
- Cheong, Y.W., Min, J.S., & Kwon, K.S. (1998). Metal removal efficiencies of substrates for treating acid mine drainage of the Dalsung mine, South Korea. *Journal of Geochemical Exploration*, 64(1-3), 147-152.
- Ding, C., Yang, K. L., & He, J. (2016). Biological and fermentative production of hydrogen. In *Handbook of Biofuels Production* (pp. 303-333). Woodhead Publishing.
- Clyde, E. J., Champagne, P., Jamieson, H. E., Gorman, C., & Sourial, J. (2016). The use of a passive treatment system for the mitigation of acid mine drainage at the Williams Brothers Mine (California): pilot-scale study. *Journal of cleaner production*, 130, 116-125.
- Drennan, D. M., Almstrand, R., Lee, I., Landkamer, L., Figueroa, L., & Sharp, J. O. (2016). Organoheterotrophic bacterial abundance associates with zinc removal in lignocellulose-based sulfate-reducing systems. *Environmental Science & Technology*, 50(1), 378-387.
- Dvorak, D.H., Hedin, R.S., Edenborn, H.M., & McIntire, P. E. (1992). Treatment of metal-contaminated water using bacterial sulfate reduction: Results from pilot-scale reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 40(5), 609-616.
- Fan, J.H., Liu, X.Y., Gu, Q.Y., Zhang, M.J., & Hu, X.W. (2019). Effect of hydraulic retention time and pH on oxidation of ferrous iron in simulated ferruginous acid mine drainage treatment with inoculation of iron-oxidizing bacteria. *Water Science and Engineering*, 12(3), 213-220.
- García-Moyano, A., Austnes, A. E., Lanzén, A., González-Toril, E., Aguilera, Á., & Øvreås, L. (2015). Novel and unexpected microbial diversity in acid mine drainage in Svalbard (78 N), revealed by culture-independent approaches. *Microorganisms*, 3(4), 667-694.
- Genty, T., Bussière, B., Benzaazoua, M., Neculita, C. M., & Zagury, G. J. (2020). Treatment efficiency of iron-rich acid mine drainage in a tri-unit pilot system. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(8), 8418-8430.
- Genty, T., Bussière, B., Benzaazoua, M., Neculita, C. M., & Zagury, G. J. (2018). Changes in efficiency and hydraulic parameters during the passive treatment of ferriferous acid mine drainage in biochemical reactors. *Mine Water and the Environment*, 37(4), 686-695.
- Genty, T., Bussière, B., Paradie, M., & Neculita, C. M. (2016). Passive biochemical treatment of ferriferous mine drainage: Lorraine mine site, Northern Quebec, Canada. In *Proc. of the international mine water association (IMWA) conference*, July (pp. 11-15).
- Genty, T., Neculita, C.M., Bussière, B., Zagury, G.J., (2012). Environmental behaviour of sulphate-reducing passive bioreactor mixture. *Proc. of the 9th ICARD*, Ottawa, ON, Canada, May 20-26.
- Gusek, J.J. (2015). Passive Treatment of mining influenced Water: an overview of available Technologies and The Periodic Table. *Journal of Environmental Solutions for Oil, Gas, and Mining*, 1(1), 1-24.
- Haakensen, M., Pittet, V., Spacil, M.M., Castle, J.W., & Rodgers Jr, J.H. (2015). Key aspects for successful design and implementation of passive water treatment systems. *Journal of Environmental Solutions for Oil, Gas, and Mining*, 1(1), 59-81.
- Hallberg, K.B. (2010). New perspectives in acid mine drainage microbiology. *Hydrometallurgy*, 104(3-4), 448-453.
- Han, X., Schultz, L., Zhang, W., Zhu, J., Meng, F., & Geesey, G. G. (2016). Mineral formation during bacterial sulfate reduction in the presence of different electron donors and carbon sources. *Chemical Geology*, 435, 49-59.
- Hao, T.W., Xiang, P.Y., Mackey, H.R., Chi, K., Lu, H., Chui, H.K., & Chen, G. H. (2014). A review of biological sulfate conversions in wastewater treatment. *Water Research*, 65, 1-21.
- Hedin, R.S., Watzlaf, G.R., & Nairn, R.W. (1994). Passive treatment of acid mine drainage with limestone. *Journal of Environmental Quality*, 23(6), 1338-1345.
- Hessler, T., Harrison, S.T., & Huddy, R.J. (2018). Stratification of microbial communities throughout a biological sulphate reducing up-flow anaerobic packed

- bed reactor, revealed through 16S metagenomics. *Research in Microbiology*, 169(10), 543-551.
- Hiibel, S.R., Pereyra, L.P., Breazeal, M.V.R., Reisman, D.J., Reardon, K.F., & Pruden, A. (2011). Effect of organic substrate on the microbial community structure in pilot-scale sulfate-reducing biochemical reactors treating mine drainage. *Environmental Engineering Science*, 28(8), 563-572.
- Hiibel S.R., Pereyra L.P., Inman L.Y., Tischler A., Reisman D.J., Reardon K. F., Pruden A. (2008). Microbial community analysis of two field-scale sulfate-reducing bioreactors treating mine drainage. *Environmental Microbiology*. 10(8), 2087-97.
- Hua, M., Yu, S., Ma, Y., Chen, S., & Li, F. (2018). Genetic diversity detection and gene discovery of novel glycoside hydrolase family 48 from soil environmental genomic DNA. *Annals of Microbiology*, 68 (4), 163-174.
- Hua, Z.S., Han, Y.J., Chen, L.X., Liu, J., Hu, M., Li, S.J., & Shu, W.S. (2015). Ecological roles of dominant and rare prokaryotes in acid mine drainage revealed by metagenomics and metatranscriptomics. *The ISME journal*, 9(6), 1280-1294.
- Huntsman, B. E., Solch, J. G., & Porter, M. D. (1978). Utilization of Sphagnum species dominated bog for coal acid mine drainage abatement. *Geol. Soc. In Ann. 91st Annual Meeting Abstracts, Toronto, Ontario, Canada*.
- Hwang, S.K., & Jho, E.H. (2018). Heavy metal and sulfate removal from sulfate-rich synthetic mine drainages using sulfate reducing bacteria. *Science of the Total Environment*, 635, 1308-1316.
- INAP International Network for Acid Prevention. (2020). Australia <https://www.inap.com.au>
- ITRC. (2013). Biochemical Reactors for Mining-Influenced Water. Washington, USA: Interstate Technology and Regulatory Council.
- Jouini, M., Rakotonimaro, T.V., Neculita, C.M., Genty, T., & Benzaazoua, M. (2019). Stability of metal-rich residues from laboratory multi-step treatment system for ferriferous acid mine drainage. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(35), 35588-35601.
- Kefeni, K.K., Msagati, T. A., & Mamba, B. B. (2017). Acid mine drainage: prevention, treatment options, and resource recovery: a review. *Journal of Cleaner Production*, 151, 475-493.
- Kousi, P., Remoundaki, E., Hatzikioseyan, A., Korkovelou, V., & Tsezos, M. (2018). Fractionation and leachability of Fe, Zn, Cu and Ni in the sludge from a sulphate-reducing bioreactor treating metal-bearing wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(36), 35883-35894.
- Laathanachareon, T., Kanchanasuta, S., Mhuanthong, W., Phalakornkule, C., Pisutpaisal, N., & Champreda, V. (2014). Analysis of microbial community adaptation in mesophilic hydrogen fermentation from food waste by tagged 16S rRNA gene pyrosequencing. *Journal of Environmental Management*, 144, 143-151.
- Lefticariu, L., Walters, E.R., Pugh, C.W., & Bender, K.S. (2015). Sulfate reducing bioreactor dependence on organic substrates for remediation of coal-generated acid mine drainage: Field experiments. *Applied Geochemistry*, 63, 70-82.
- Lefticariu, L., Chugh, Y. P., & Behum, P. T. (2014). Field demonstration of alternative coal processing waste disposal technology. *Final report, Illinois Clean Coal Institute*, 28.
- Liu, Z.H., Yin, H., Lin, Z., & Dang, Z. (2018). Sulfate-reducing bacteria in anaerobic bioprocesses: basic properties of pure isolates, molecular quantification, and controlling strategies. *Environmental Technology Reviews*, 7(1), 46-72.
- Lukhele, T., Selvarajan, R., Nyoni, H., Mamba, B. B., & Msagati, T. A. (2019). Acid Mine Drainage as Habitats for Distinct Microbiomes: Current Knowledge in the Era of Molecular and Omic Technologies. *Current microbiology*, 1-18.
- Macías, F., Caraballo, M. A., Rötting, T. S., Pérez-López, R., Nieto, J. M., & Ayora, C. (2012). From highly polluted Zn-rich acid mine drainage to non-metallic waters: Implementation of a multi-step alkaline passive treatment system to remediate metal pollution. *Science of the Total Environment*, 433, 323-330.
- Macías, F., Pérez-López, R., Caraballo, M. A., Sarmiento, A. M., Cánovas, C. R., Nieto, J. M., & Ayora, C. (2017). A geochemical approach to the restoration plans for the Odiel River basin (SW Spain), a watershed deeply polluted by acid mine drainage. *Environmental Science and Pollution Research*, 24 (5), 4506-4516.
- Madzin, Z., Kusin, F.M., Molahid, V.L.M., & Hasan, S.N.M.S. (2020). Passive remediation of mine impacted water using selected treatment media containing-bioreactor. *MS&E*, 736(4), 042028.
- Méndez-García, C., Peláez, A. I., Mesa, V., Sánchez, J., Golyshina, O. V., & Ferrer, M. (2015). Microbial diversity and metabolic networks in acid mine drainage habitats. *Frontiers in Microbiology*, 6, 475.
- MINMINAS, UPME, & U. Córdoba. (2015). Incidencia real de la minería del carbón, del oro y del uso del mercurio en la calidad ambiental con énfasis especial en el recurso hídrico - diseño de herramientas para la planeación. Bogotá: <http://www1.upme.gov.co/simco/>

- Mirjafari, P., & Baldwin, S.A. (2016). Decline in performance of biochemical reactors for sulphate removal from mine-influenced water is accompanied by changes in organic matter characteristics and microbial population composition. *Water*, 8(4), 124.
- Ñancucheo, I., & Johnson, D. B. (2014). Removal of sulfate from extremely acidic mine waters using low pH sulfidogenic bioreactors. *Hydrometallurgy*, 150, 222-226.
- Nordstrom, D. K., Blowes, D. W., & Ptacek, C. J. (2015). Hydrogeochemistry and microbiology of mine drainage: an update. *Applied Geochemistry*, 57, 3-16.
- Nordstrom, D. K. (2011). Mine waters: Acidic to circum-neutral. *Elements*, 7, 393-398. URL: <http://elements.geoscienceworld.org/content/7/6/393.full.pdf+html>.
- Pereyra, L. P., Hiibel, S. R., Perrault, E. M., Reardon, K. F., & Pruden, A. (2012). Effect of bioaugmentation and biostimulation on sulfate-reducing column startup captured by functional gene profiling. *FEMS Microbiology Ecology*, 82(1), 135-147.
- Pereyra, L. P., Hiibel, S. R., Riquelme, M. P., Reardon, K. F., & Pruden, A. (2010). Detection and quantification of functional genes of cellulose-degrading, fermentative, and sulfate-reducing bacteria, and methanogenic archaea. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(7), 2192-2202.
- Pereyra L.P., Hiibel S.R., Pruden A., Reardon K. F. (2008). Comparison of microbial community composition and activity in sulfate-reducing batch systems remediating mine drainage. *Biotechnology and Bioengineering*. 101(4), 702-13.
- Postgate J. R., (1984). The sulphate-reducing bacteria. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Poudel, S., Tokmina-Lukaszewska, M., Colman, D. R., Refai, M., Schut, G. J., King, P. W., & Boyd, E. S. (2016). Unification of [FeFe]-hydrogenases into three structural and functional groups. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1860(9), 1910-1921.
- Quiceno-Vallejo, M. F., Escobar, M. C., & Vásquez, Y. (2020). Impacto de los drenajes de mina sobre los microorganismos del suelo. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 44(170), 241-256.
- Rakotonimaro, T. V., Neculita, C. M., Bussière, B., Genty, T., & Zagury, G. J. (2018). Performance assessment of laboratory and field-scale multi-step passive treatment of iron-rich acid mine drainage for design improvement. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(18), 17575-17589.
- Rakotonimaro, T. V., Neculita, C. M., Bussière, B., Zagury, G. J. (2017). Comparative column testing of three reactive mixtures for the bio-chemical treatment of iron-rich acid mine drainage. *Minerals Engineering*, 111, 79-89.
- Rezadehbashi, M., & Baldwin, S. A. (2018). Core sulphate-reducing microorganisms in metal-removing semi-passive biochemical reactors and the co-occurrence of methanogens. *Microorganisms*, 6(1), 16.
- Rötting, T.S., Caraballo, M.A., Serrano, J.A., Ayora, C., Carra, J., (2008). Field application of calcite Dispersed Alkaline Substrate (calcite-DAS) for passive treatment of acid mine drainage with high Al and metal concentrations. *Appl. Geochem.*, 23, 1660-1674.
- Sánchez-Andrea, I., Sanz, J. L., Bijmans, M. F., & Stams, A. J. (2014). Sulfate reduction at low pH to remediate acid mine drainage. *Journal of hazardous materials*, 269, 98-109.
- Sato, Y., Hamai, T., Hori, T., Aoyagi, T., Inaba, T., Kobayashi, M., & Sakata, T. (2019). Desulfosporosinus spp. were the most predominant sulfate-reducing bacteria in pilot-and laboratory-scale passive bioreactors for acid mine drainage treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(18), 7783-7793.
- Sato, Y., Hamai, T., Hori, T., Habe, H., Kobayashi, M., & Sakata, T. (2018). Year-round performance of a passive sulfate-reducing bioreactor that uses rice bran as an organic carbon source to treat acid mine drainage. *Mine Water and the Environment*, 37(3), 586-594.
- Schuchmann, K., & Müller, V. (2016). Energetics and application of heterotrophy in acetogenic bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 82(14), 4056-4069.
- Shahsavari, S., Seth, R., Chaganti, S. R., & Biswas, N. (2019). Inhibition of anaerobic biological sulfate reduction process by copper precipitates. *Chemosphere*, 236, 124246.
- Simonton, S., Dimsha, M., Thomson, B., Barton, L.L., Cathey, G., (2000). Long-term stability of metals immobilized by microbial reduction. *Proc. of the Conference on Hazardous Waste Research: Environmental Challenges and Solutions to Resource Development, Production and Use, Southeast Denver, CO, USA*, May 23-25.
- Skousen, J., Zipper C.E., Rose A., Ziemkiewicz P.F. (2016). Review of Passive Systems for Acid Mine Drainage Treatment. *Mine Water and the Environment*, 36(1), 133-153.
- Skousen, J., Zipper, C. E., Rose, A., Ziemkiewicz, P. F., Nairn, R., McDonald, L. M., & Kleinmann, R. L. (2017). Review of passive systems for acid mine

- drainage treatment. *Mine Water and the Environment*, 36(1), 133-153.
- Song H., Yim G.J., Ji S.W., Neculita C. M., Hwang T. (2012a). Pilot-scale passive bioreactors for the treatment of acid mine drainage: efficiency of mushroom compost vs. mixed substrates for metal removal. *Journal of Environmental Management*, 111, 150-8.
- Song, H., Yim, G.J., Ji, S.W., Nam, I.H., Neculita, C. M., & Lee, G. (2012b). Performance of mixed organic substrates during treatment of acidic and moderate mine drainage in column bioreactors. *Journal of Environmental Engineering*, 138(10), 1077-1084.
- Stams A.J.M., Teusink B., Sousa D.Z. (2019). Ecophysiology of Acetoclastic Methanogens. In *Biogenesis of Hydrocarbons. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Cham, Switzerland: Springer, p. 1-14.
- Teng, W., Kuang, J., Luo, Z., & Shu, W. (2017). Microbial diversity and community assembly across environmental gradients in acid mine drainage. *Minerals*, 7(6), 106.
- Tsai, Y., Baldwin, S. A., Siang, L. C., & Gopaluni, B. (2019). A Comparison of Clustering and Prediction Methods for Identifying Key Chemical-Biological Features Affecting Bioreactor Performance. *Processes*, 7(9), 614.
- Tuttle, J. H., Dugan, P. R., & Randles, C. I. (1969). Microbial sulfate reduction and its potential utility as an acid mine water pollution abatement procedure. *Applied Microbiology*, 17(2), 297-302.
- Vásquez, Y., Escobar, M. C., Saenz, J. S., Quiceno-Vallejo, M. F., Neculita, C. M., Arbeli, Z., & Roldan, F. (2018). Effect of hydraulic retention time on microbial community in biochemical passive reactors during treatment of acid mine drainage. *Bioresource Technology*, 247, 624-632.
- Vásquez, Y., Escobar, M. C., Neculita, C. M., Arbeli, Z., & Roldan, F. (2016a). Selection of reactive mixture for biochemical passive treatment of acid mine drainage. *Environmental Earth Sciences*, 75(7), 576.
- Vásquez, Y., Escobar, M. C., Neculita, C. M., Arbeli, Z., & Roldan, F. (2016b). Biochemical passive reactors for treatment of acid mine drainage: effect of hydraulic retention time on changes in efficiency, composition of reactive mixture, and microbial activity. *Chemosphere*, 153, 244-253.
- Villegas-Plazas, M., Sanabria, J., & Junca, H. (2019). A composite taxonomical and functional framework of microbiomes under acid mine drainage bioremediation systems. *Journal of Environmental Management*, 251, 109581.
- WCA World Coal Association. (2020). Australia: <https://www.worldcoal.org/coal/coalmining>.
- Xu, Y. N., & Chen, Y. (2020). Advances in heavy metal removal by sulfate-reducing bacteria. *Water Science and Technology*.
- Xu, R., Yang, Z. H., Zheng, Y., Liu, J. B., Xiong, W. P., Zhang, Y. R., & Fan, C. Z. (2018). Organic loading rate and hydraulic retention time shape distinct ecological networks of anaerobic digestion related microbiome. *Bioresource Technology*, 262, 184-193.
- Yim, G., Ji, S., Cheong, Y., Neculita, C. M., & Song, H. (2015). The influences of the amount of organic substrate on the performance of pilot-scale passive bioreactors for acid mine drainage treatment. *Environmental Earth Sciences*, 73(8), 4717-4727.
- Zhang, X., Tang, S., Wang, M., Sun, W., Xie, Y., Peng, H., & Giesy, J.P. (2019). Acid mine drainage affects the diversity and metal resistance gene profile of sediment bacterial community along a river. *Chemosphere*, 217, 790-799.
- Zhang, Y., Zhen, Y., Mi, T., He, H., & Yu, Z. (2016). Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria community in surface sediments from the adjacent area of Changjiang Estuary. *Journal of Ocean University of China*, 15(1), 107-116.