

# Reactores bioquímicos pasivos enmendados con nanopartículas de hierro cero valente para tratamiento de drenajes ácidos de mina

Passive biochemical reactors amended with zero valent iron nanoparticles for acid mine drainage treatment

Camila Andrea Vera Díaz\* y Yaneth Vásquez Ochoa\*\*

---

---

## Cómo citar:

Vera Díaz, C. A., & Vásquez Ochoa, Y. (2019). Reactores bioquímicos pasivos enmendados con nanopartículas de hierro cero valente para tratamiento de drenajes ácidos de mina. *Ingeciencia*, 4, 37-54.

- \* Ingeniera ambiental. Estudiante de la maestría en Bioingeniería y Nanotecnología. Joven investigadora y asistente graduada de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Básicas, Universidad Central. Correo: cverad1@ucentral.edu.co
- \*\* Licenciada en Química y Biología de la Universidad Libre de Colombia. Ms.C. en Ciencias Biológicas y Ph.D. en Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Javeriana. Profesora asociada de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Básicas, Universidad Central. Correo: ovasquezo@ucentral.edu.co

## Resumen

Los drenajes ácidos de mina (DAM) son vertimientos con bajo pH, alta concentración de metales y sulfato. El DAM puede contaminar el suelo y los cuerpos de agua por largos periodos incluso si cesaron las actividades mineras, por lo cual su tratamiento es un tema prioritario. En este estudio, se evaluó la eficiencia del tamaño (~100 y ~25 nm) y la concentración (5,0, 2,5 y 1,0% p/p) de nanopartículas de hierro cero valente (nZVI) como enmienda en la mezcla reactiva de reactores bioquímicos pasivos (RBP) con el fin de incrementar el pH y remover metales y sulfatos. Se construyeron catorce RBP por duplicado, seis de ellos contenían 125 g de mezcla reactiva, DAM y nZVI, mientras que los seis restantes contenían DAM y nZVI. Dos se usaron como controles: uno con solo mezcla reactiva y otro con solo DAM. Los reactores se mantuvieron en condiciones anaerobias y fueron evaluados semanalmente durante cinco semanas. Los resultados demuestran que en los reactores con mezcla reactiva aumentó el pH y la alcalinidad, mientras disminuía el potencial de óxido reducción (ORP), de manera que se lograron tasas de remoción de metales > 95% ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{+2}$ ) y de sulfato hasta 83%. En los reactores sin mezcla, el pH se mantuvo ácido y el ORP alto, lo cual dificultó la remoción de metales y sulfato, de modo que únicamente se logró la remoción de  $\text{Zn}^{2+}$ . Las nZVI mejoran significativamente la eficiencia del tratamiento con mezcla reactiva, sin embargo, es primordial realizar estudios más profundos sobre la toxicidad de las nanopartículas sobre la comunidad microbiana que participa en el proceso de biorremediación.

**Palabras clave:** actividad microbiana, eficiencia, inhibición microbiana, remoción de metales, sulfato reducción.

## Abstract

The Acid mine drainage (AMD) are discharges characterized by low pH and high concentrations of sulfate and metals. The DAM can pollute soil and water ecosystems for long periods of time even if mining activities have stopped, therefore their treatment is a priority issue. In this study the size (~100 y ~25 nm) and concentration (5.0, 2.5 y 1.0% p/p with respect to reactive mixture) of zero valent-iron nanoparticles (nZVI) were evaluated as amendment in the reactive mixture of biochemical passive reactors (BPR) to increase pH and alkalinity, promote sulfate reduction, and metal removal. Fourteen BPR was built in duplicate; six of them contained 125 g of reactive mixture, DAM and nZVI, the remaining six contained DAM and nZVI. Two were used as controls; one with only reactive mixture and another with only DAM. The reactors were remained in anaerobic conditions and were evaluated weekly for 5 weeks. The results show that in the reactors with reactive mixture the pH and alkalinity increased while decreasing the redox potential (ORP), achieving removal rates of metals >95% ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{+2}$ ) and sulfate up to 83%. In the reactor without reactive mixture, the pH was acid and ORP high while the removal of sulfate and metals was low, only is possible removal of  $\text{Zn}^{2+}$ . The nZVI significantly improve the efficiency of the treatment with reactive mixture. However, it is essential to carryout studies on the toxicity of nanoparticles on the microbial community that participates in the bioremediation process.

**Keywords:** efficiency, metal removal, microbial activity, microbial inhibition, sulfate reduction.

## 1. Introducción

El drenaje ácido de mina (DAM) es el principal contaminante de los distritos mineros, caracterizado por un bajo pH (<4,5) y alto contenido de iones metálicos disueltos ( $Zn^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Al^{+3}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ) y sulfatos (Adams *et al.*, 2014). El DAM contamina severamente los cuerpos de agua superficiales y subterráneos, los degrada y disminuye su calidad. Además, causa la pérdida de vegetación y de fauna, lo cual ocasiona la pérdida del ecosistema y afecta la oferta hídrica de la región, que a su vez impacta a las comunidades aledañas a los cuerpos de agua que dependen de estas para abastecerse (Grande, 2016).

En Colombia, se ha detectado la generación de DAM en todas las áreas mineras, especialmente en la región carbonífera Zipa-Samacá, donde hay 525 minas activas, 27 inactivas y 47 abandonadas (Prieto & Duitama, 2004). De acuerdo con el estudio realizado por la Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca (2010), el 55% de las minas realiza el tratamiento de DAM por adición de sustancias alcalinas, el 27% no realiza ningún tratamiento y el 18% no reporta información. Según estudios del Ministerio de Minas y Energía (2015), la explotación del carbón en la región ha afectado las cuencas hidrográficas en el Alto Meta y el río Sogamoso. Esta última, conformada por los ríos Chicamocha, Sogamoso y Suárez, es una gran fuente de agua para la región.

El DAM puede contaminar por largos periodos incluso si cesaron las actividades mineras, por lo cual su tratamiento se considera un tema prioritario. En la búsqueda de una posible solución se ha propuesto el uso de reactores bioquímicos pasivos (RBP), que son considerados una tecnología viable debido a su fácil operación y al uso de desechos agroindustriales para su montaje y funcionamiento. Los RBP son columnas o pozos empacados con una mezcla reactiva, conformada por sustratos orgánicos e inorgánicos que aportan nutrientes a los microorganismos responsables de la biorremediación (Vásquez, 2016). La eficiencia en remoción de metales y sulfatos de los RBP depende de la cuidadosa selección de los componentes de la mezcla reactiva, ya que estos determinan la disponibilidad de los nutrientes para la comunidad microbiana (Neculita *et al.*, 2011; Zagury *et al.*, 2006). Por lo general, los RBP operan con un tiempo de retención hidráulico (THR) de entre 2 y 4 días, un periodo muy extenso para el tratamiento de DAM donde las minas se encuentran en etapa extractiva.

En estudios previos se ha evaluado la eficiencia de mezclas reactivas que contienen partículas granulares de hierro cero valente (ZVI), las cuales han arrojado buenos resultados, pero evidencian poca longevidad debido al agotamiento de la superficie reactiva (Lindsay, 2008; Wilkin & McNeil, 2003). Sin embargo, este inconveniente podría superarse con el uso de nanopartículas de hierro cero valente (nZVI), debido a que su forma de cascarón con núcleo y su superficie específica con alto número de sitios activos favorecen el tratamiento de los contaminantes (Mukherjee *et al.*, 2016). Las propiedades físicas de las nZVI, tales como su comportamiento dual metal-óxido, las convierten en buenos candidatos en aplicaciones de biorremediación: su núcleo de hierro metálico es donador de electrones, así que le otorgan propiedades reductoras, mientras que el hidróxido de hierro de la superficie ofrece funciones coordinativas y electrostáticas que atraen los iones metálicos con carga positiva (Li *et al.*, 2016). Por tanto, las nZVI ofrecen dos nanocomponentes que permiten la eliminación simultánea de oxianiones (p. ej., As (V) y Cr (VI)) y de cationes (p. ej.,  $Zn^{+2}$ ,  $Al^{+3}$ ,  $Pb^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ). Además, los productos finales de las reacciones de nanopartículas son óxidos e hidróxidos de hierro, los cuales son ambientalmente amigables (Guo *et al.*, 2016).

Las nZVI han sido previamente utilizadas en varios estudios para tratar agua contaminada con metales pesados, sin embargo, hay poca información sobre su uso para tratar el DAM. Calderón y Fullana (2015) reportaron que el empleo de nZVI para tratar agua contaminada de manera artificial con una mezcla de cinco metales ( $Zn^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Cr^{+6}$  y  $Cu^{+2}$ ) produjo cambios en el pH y el potencial de óxido reducción (ORP), así como la reducción en la concentración de los metales. Por su parte, Klimkova *et al.* (2010) aplicaron por primera vez nZVI en el tratamiento de una muestra de agua subterránea contaminada con uranio en un área minera. Cuando agregaron las nZVI, el pH aumentó a valores cercanos a la neutralidad y el ORP disminuyó, lo cual se reflejó en la química del agua, pues la concentración de los metales disminuyó significativamente.

El principal inconveniente en el uso de nZVI es su potencial toxicidad para las comunidades microbianas (Kumar, 2013; Vangnai *et al.*, 2015). Se ha determinado que las nZVI pueden inhibir la actividad de las bacterias sulfato-reductoras (BSR), las cuales se encargan de reducir los sulfatos a sulfuros: en este proceso los metales se inmovilizan y se precipitan como sulfuros metálicos, que posteriormente pueden ser recuperados y aprovechados. No obstante, los estudios se han realizado en RBP que operan en fase líquida y que utilizan un solo donador de electrones (Kumar *et al.*, 2013; Saccá *et al.*, 2013; Saccá *et al.*, 2014). Específicamente, en este artículo se propone una mezcla reactiva compleja formada por residuos agroindustriales de la región que puede llegar a prevenir el daño que las nanopartículas provocan en los microorganismos.

En este sentido, los RBP enmendados con nZVI son una tecnología viable para mitigar los impactos de la minería, aunque no se cuenta con información acerca de su efecto sobre la eficiencia en el tratamiento ni sobre la comunidad microbiana participante. Si bien los RBP por sí solos permiten remediar el DAM y reducir sus impactos, esta investigación permite evaluar el efecto de las nZVI en la biorremediación del DAM del distrito minero Zipa-Samacá. Para cumplir este objetivo, se determina cómo el tamaño y la concentración de las nanopartículas afectan la eficiencia de los RBP para aumentar el pH y la alcalinidad, así como la remoción de sulfatos y metales del DAM. De esta manera, se ofrece una opción al gremio minero para incorporar procesos que contribuyan con el uso de tecnologías limpias durante la extracción del carbón que minimicen los impactos ambientales.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Materiales

En este estudio se utilizaron nZVI de dos clases: Nanofér y Nanousa con tamaños  $\sim 100$  nm y  $\sim 25$  nm, respectivamente. Las primeras nanopartículas fueron proporcionadas por la empresa Nanoiron, la cual indicó que su aplicación más común es la remediación de aguas subterráneas contaminadas por hidrocarburos clorados y metales pesados. Las segundas fueron compradas en US Research Nanomaterials, Inc.<sup>1</sup>, donde indican que son cero-valente, tienen una pureza de 99,5%, son esféricas, tienen una densidad aproximada de  $7,90$  g/cm<sup>3</sup> y son estables en la superficie.

<sup>1</sup> Encuentre mayor información sobre las empresas en los siguientes enlaces: <http://nanoiron.cz/en/> y <https://www.us-nano.com/inc/sdetail/165>

El DAM se recolectó en la mina Incarsa, de la empresa Milpa S. A., ubicada en la vereda Loma Redonda del municipio de Samacá (Boyacá), y fue caracterizado en un estudio previo por Garzón *et al.* (2019). El DAM tenía la siguiente composición en  $\text{mg L}^{-1}$ : 1107,6  $\text{Fe}^{2+}$ ; 185,0  $\text{Mn}^{2+}$ ; 48,2  $\text{Zn}^{2+}$ ; 209,6  $\text{Mg}^{2+}$ ; 174,5  $\text{Ca}^{2+}$  y 1833,9  $\text{SO}_4^{2-}$  a pH 2,8 y ORP (mV) 455,5. In situ se determinó el pH y el potencial de óxido-reducción (ORP) con una sonda multiparamétrica (HI 9828, Hanna Instruments; Woonsocket, RI). Posteriormente, se recolectaron seis muestras (100 mL) en botellas de polipropileno: dos fueron preservadas con  $\text{HNO}_3$  (pH 2,0) para cuantificación de metales, y cuatro sin preservantes. Todas las muestras fueron refrigeradas a 4° C hasta los análisis.

El inóculo microbiano fue extraído manualmente del embalse del Muña, ubicado en el municipio de Sibaté. Este inóculo proporcionó los microorganismos adaptados a ambientes contaminados con metales. El compost de champiñón se compró a la empresa Agrobachue Ltda., el estiércol bovino se obtuvo de una granja local y, finalmente, el aserrín de sajo, la gravilla y el carbonato de calcio se compraron en un almacén local.

## 2.2 Montaje de los RBP

La mezcla reactiva (MR) que se utilizó durante la puesta en marcha de los RBP estaba compuesta por 15% de estiércol bovino, 10% de compost de champiñón, 25% de aserrín, 15% de sedimento, 20% de gravilla y 15% de carbonato de calcio (Vásquez *et al.*, 2016a). La mezcla se preparó en peso húmedo y cada componente fue mezclado con los otros hasta obtener una pasta homogénea. Con el fin de corregir los porcentajes de cada componente, se determinó el porcentaje de humedad por diferencia de pesos antes y después de un calentamiento a 105° C durante 24 horas —método NCH 1515— (Instituto Nacional de Normalización [INN], 1979).

De esta forma, se construyeron catorce RBP en botellas de vidrio de 1L por duplicado. Cada uno contó con un sistema de extracción en la tapa conformado por dos puertos de muestreo (corchos, jeringas y tubos venturi): uno para suministrar  $\text{N}_2$  mientras por el otro se realizaba la extracción de la muestra de efluente. En siete de los reactores se colocó 125 g de mezcla reactiva, y los restantes siete se mantuvieron vacíos; posteriormente, se adicionó 600 mL de DAM en todos los RBP. Una vez realizado lo anterior, en cada RBP se adicionaron las nZVI en diferente concentración y preparadas en medio acuoso según las recomendaciones de la empresa que las manufactura. Por último, los reactores fueron sellados y saturados con  $\text{N}_2$ , se agitaron durante una hora para homogeneizar la mezcla reactiva, las nZVI con el DAM y se conservaron durante una semana a temperatura ambiente y en oscuridad en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Central hasta obtener condiciones favorables para la sulfato-reducción.

Con el fin de evaluar el efecto de la nZVI sobre la eficiencia de los reactores, se consideró el tamaño de las nanopartículas (P:25 y G:100 nm) y la concentración (5,0, 2,5 y 1,0% p/p con respecto a la mezcla reactiva) como variables. Además, se montaron dos RBP como controles: uno con mezcla reactiva y el otro solo con DAM, pero ambos sin nZVI.

## 2.3 Evaluación del tamaño y la concentración de las nZVI sobre la eficiencia de los RBP

La eficiencia de un RBP se determina por el incremento del pH y la alcalinidad, así como por la remoción de metales y sulfato. Por tanto, una vez alcanzadas las condiciones para la sulfato-reducción (pH >5,0 y ORP <-100 mV), se extrajeron 40 mL de cada reactor una vez a la semana durante cinco semanas para hacer los análisis fisicoquímicos. En cada muestra se determinó: (1) el pH y el ORP, con la sonda multiparamétrica; (2) la presencia de metales ( $Zn^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ ), mediante espectrofotometría de absorción atómica por el método 7000B (Usepa, 2007); (3) los sulfatos, por el método 4500-SO<sub>4</sub>, y los sulfuros, por el método 4500D —en el cual el azul de metileno es determinado por espectrofotometría UV-VIS (Genesys 10, Thermo Scientific; Waltham, MA)—, y (4) la alcalinidad, por el método 2320B (TitroLine alpha plus 20, Schott, Mainz, Alemania) (American Public Health Association [APHA], 2005). Por último, con el fin de determinar la distribución química de las especies presentes en el reactor, se realizó una modelación geoquímica por medio del software Minteq 3.0.

## 2.4 Efecto de las nZVI sobre la actividad microbiana

Después de cinco semanas, los RBP se desarmaron y se extrajo la mezcla reactiva, a la cual se le retiró manualmente la gravilla y se dejó secar al aire durante 24 horas. La actividad microbiana se determinó por medio de la enzima deshidrogenasa (DHS), siguiendo el método propuesto por Serra-Wittling *et al.* (1995).

## 2.5 Análisis estadístico

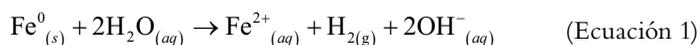
Inicialmente se determinó si los valores obtenidos para las variables cumplían los supuestos de homogeneidad de varianzas y de normalidad. Los valores que no cumplieron con los supuestos fueron transformados por medio de funciones matemáticas, como seno y coseno. Luego de esto se realizó un análisis Anova sobre las variables fisicoquímicas para encontrar diferencias significativas entre los factores y sus posibles combinaciones, seguido de una prueba post hoc (Tukey). El análisis estadístico se realizó con el software SPSS Statistics 19.

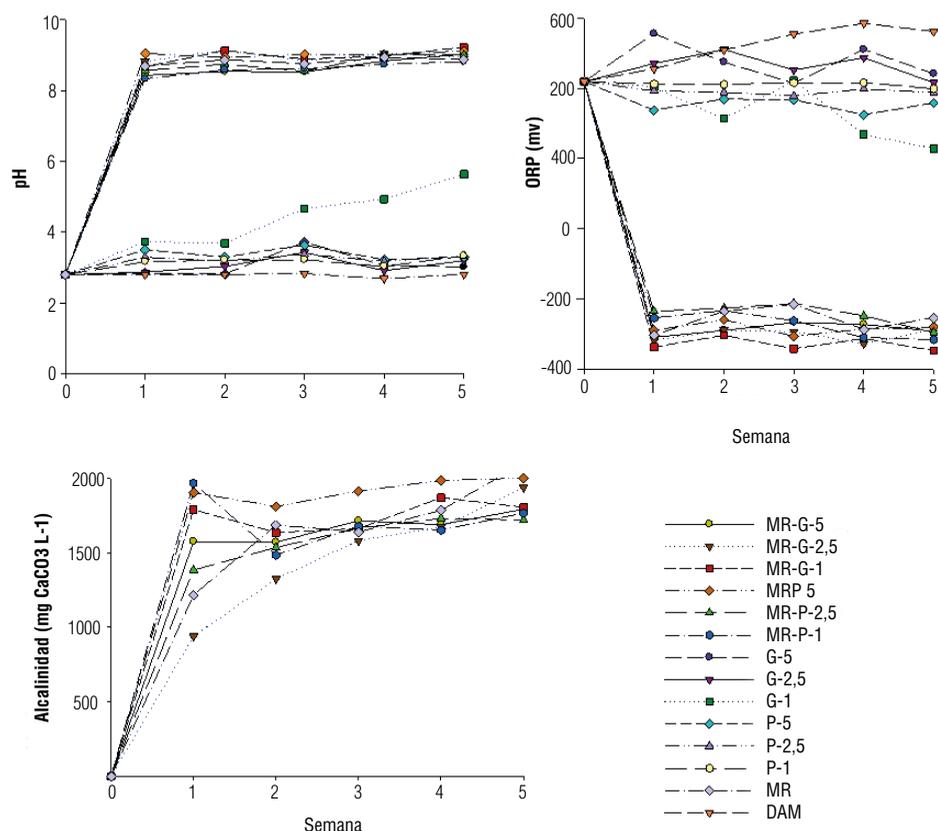
# 3. Resultados y discusión

## 3.1 Efecto de las nZVI en la eficiencia de los RBP

### 3.1.1 El pH, la alcalinidad y el ORP

Durante los ensayos, los reactores con mezcla reactiva alcanzaron valores de pH entre  $8,3 \pm 0,2$  y  $9,2 \pm 0,3$ . Este incremento se debe a la disolución del carbonato de calcio de la mezcla reactiva, a la oxidación de las nanopartículas por el contacto con el agua (ecuación 1) y a la actividad de las BSR, las cuales generan bicarbonato mientras reducen el sulfuro. El análisis (Anova;  $p < 0,05$ ) determina que ni el tamaño ni la concentración de las nZVI influyeron sobre el pH (figura 1).



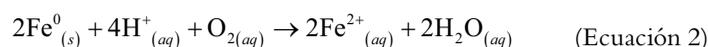


**Figura 1.** Cambios en el pH, la alcalinidad y el ORP durante la determinación del efecto de las nZVI sobre la eficiencia de los RBP.  
**Fuente:** elaboración propia.

Asimismo, en los reactores que contenían solo DAM y nZVI se obtuvieron valores de pH entre  $2,7 \pm 0,1$  y  $5,6 \pm 0,2$ . Las nZVI lograron un aumento de pH en los reactores: específicamente, el reactor con nZVI de  $\sim 100$  nm al 1% (G1) fue el que presentó mayores valores de pH ( $\sim 5,0$ ). Esto se debe a que la reacción del hierro (Fe) con el medio ácido provoca la oxidación anaeróbica de las nZVI y que es acompañada por la producción de  $\text{OH}^-$ , que aumentan el pH (ecuación 1) (Kumar *et al.*, 2013).

El pH es un parámetro determinante en el tratamiento del DAM en los RBP porque condiciona la comunidad microbiana, especialmente las BSR, que dependen de este factor para crecer. Estos microorganismos crecen mejor en condiciones alcalinas en rangos estrechos de pH entre 7,0-8,0, aunque toleran ambientes muy ácidos (pH  $\sim 4,0$ ) y de igual forma se desarrollan en ambientes muy alcalinos (pH  $\sim 9,5$ ) (Barton & Tomei, 1995); fuera de este intervalo de pH, las BSR pueden ser inhibidas en su totalidad. Vicente (2006) reporta que la mayor reducción de sulfato se produjo cuando el pH era cercano a la neutralidad (7,5), al disminuir el pH (6,0) la reducción del sulfato disminuía y al acidificar el medio (5,0) las concentraciones de sulfatos seguían estables sin ninguna variación, de lo cual se concluye que este comportamiento se puede atribuir a una inhibición del crecimiento bacteriano causado por la acidez del medio.

Además del pH, la comunidad microbiana y las BSR dependen de otros factores para desarrollarse, como el ORP. Las BSR son anaerobias estrictas y son sensibles a ambientes oxigenados: mueren fácilmente cuando son expuestas a este tipo de medios, por lo cual requieren de ausencia de oxígeno y un ORP bajo ( $-150$  mV) para crecer (Barton & Tomei, 1995). El ORP condiciona las funciones enzimáticas de los microorganismos debido a que algunos de ellos realizan su actividad solamente en medios reductores y otros en medios oxidantes, y los valores negativos de ORP en el medio favorecen reacciones de reducción y los valores positivos favorecen las reacciones de oxidación (Martínez, 2008). En el caso de los reactores con mezcla reactiva se encontró, por un lado, que el ORP alcanzó valores negativos entre  $-347,9 \pm 0,5$  y  $-213,1 \pm 18,8$  mV, y, por el otro, que la disminución del ORP se dio rápidamente en la primera semana de tratamiento, disminución que se asocia con el tamaño de la partícula y su velocidad de oxidación (ecuación 1). La rápida oxidación del Fe es paralela al rápido consumo del oxígeno disuelto en el agua (ecuación 2), lo cual produce un cambio a condiciones reductoras en estos reactores (Calderón & Fullana, 2015) y, por lo tanto, permite la supervivencia de las BSR.



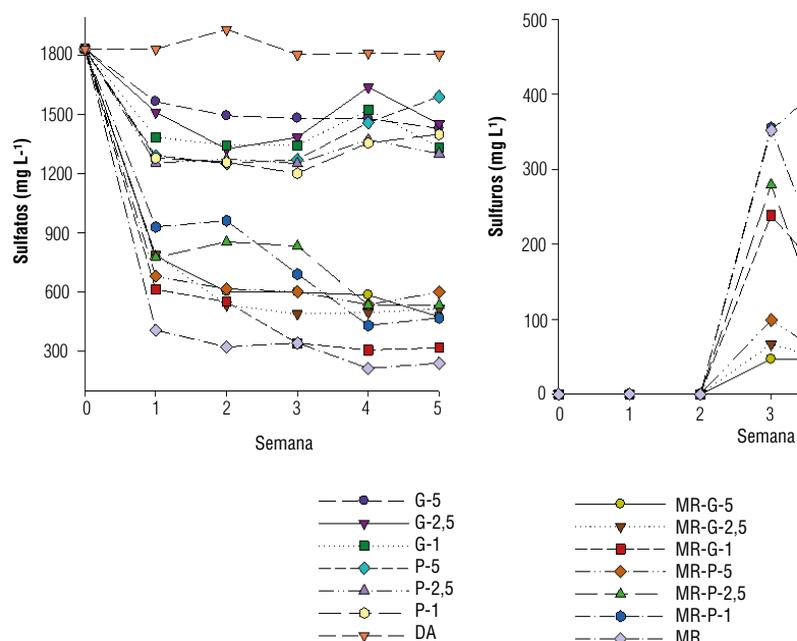
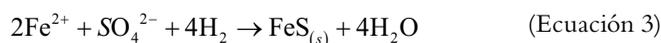
Por el contrario, en los reactores sin mezcla reactiva y en el control con DAM se registraron valores positivos de ORP entre  $228,9 \pm 19,5$  y  $545,4 \pm 0,1$  mV (figura 1). En los reactores con nZVI sin mezcla reactiva, los valores de ORP fueron menores que en el control de DAM, disminución que se produce por la rápida oxidación de la nanopartícula y la precipitación de hidróxidos (ecuación 2). En estos reactores no se contaba con la presencia de BSR, por lo cual la actividad microbiana no es el mecanismo de eliminación de contaminantes, sino que, en su lugar, la eliminación se realiza mediante una combinación de fenómenos como la adsorción de superficie, precipitación y coprecipitación con óxidos de hierro producto de la oxidación de la nZVI (Kumar *et al.*, 2013).

La alcalinidad incrementó en la primera semana de tratamiento en los RBP que contenían mezcla reactiva desde cero hasta  $1999,3 \pm 19,5$  mg  $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$  (figura 1). Los RBP que contenían nZVI de menor tamaño (25 nm) en concentración al 5% (P5) fueron los que mayor alcalinidad registraron. El incremento en la alcalinidad se debe a la disolución del material alcalino presente en los reactores, a la corrosión anaeróbica de la nZVI —lo cual genera el incremento de grupos  $\text{OH}^-$ — y a la reducción de sulfato, ya que ambos procesos implican el consumo de  $\text{H}^+$  (Ayala *et al.*, 2016). En estudios previos se plantea que el aumento de la alcalinidad se atribuye a la oxidación de sustratos orgánicos por la actividad de las BSR (Lindsay *et al.*, 2011). En los reactores sin mezcla reactiva no se determinó alcalinidad porque estos reactores presentaban valores de pH inferiores a 4,5, lo cual indica ausencia de iones carbonatos, bicarbonatos e hidróxidos (Quicasán *et al.*, 2017).

### 3.1.2 Sulfatos y sulfuros

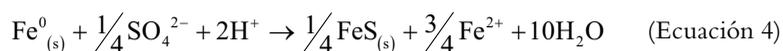
Los sulfatos presentaron una concentración inicial en el DAM de  $1833,9 \pm 0,1$  mg  $\text{L}^{-1}$  y su concentración se redujo en todos los reactores, especialmente en los que contenían mezcla reactiva (figura 2). En estos reactores, la tasa más alta de eliminación de sulfato se presentó en el de control, con un porcentaje de remoción del 83%, mientras que en

los reactores restantes el porcentaje de remoción fue de >61%. El análisis estadístico (Anova;  $p < 0,05$ ) evidencia que existe un efecto significativo tanto del tamaño como de la concentración de las nZVI, de lo cual se deduce que las nZVI pueden interferir en la sulfato-reducción. La reducción del sulfato en presencia de mezcla reactiva inicia cuando la partícula se oxida y produce  $H_2$ ,  $OH^-$  y  $Fe^{2+}$  (ecuación 1), posteriormente el sulfato es reducido a sulfuro mediante reacciones mediadas por BSR y forma precipitados de sulfuro de hierro (ecuación 3) (Miao *et al.*, 2012).



**Figura 2.** Cambios en la concentración de los sulfatos y los sulfuros durante la determinación del efecto de las nZVI sobre la eficiencia de los RBP. Fuente: elaboración propia.

En los reactores sin mezcla reactiva se encontró que las tasas de remoción de sulfato se encontraron entre 16% y 30%, y que las nZVI de menor tamaño presentaron las tasas más altas de remoción. Esto se debe a que su tamaño reducido ocasiona la rápida oxidación de la partícula (Kumar *et al.*, 2013) y por consiguiente la reducción del sulfato en proporciones levemente mayores. En estos reactores, el ZVI reacciona directamente con el sulfato y lo reduce a través de una reacción (redox) abiótica con las nanopartículas (ecuación 4). Sin embargo, las tasas de sulfato-reducción en presencia de nZVI son bastante bajas en contraste con los sistemas con BSR, que poseen tasas bastante altas, lo que indica que la reducción de sulfatos mediada por las BSR es fundamental durante los procesos de bio-remediación (Miao *et al.*, 2012).



Los resultados encontrados para sulfato y sulfuro están relacionados debido al metabolismo de las BSR y a la oxidación de las nZVI, que reduce el sulfato hasta sulfuro. Los sulfuros fueron detectados en los reactores con mezcla reactiva a partir de la tercera semana y se encontró que, tal como en los sulfatos, existe un efecto significativo (Anova;  $p < 0,05$ ) del tamaño y la concentración de las nZVI sobre la producción de sulfuro.

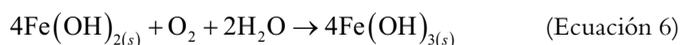
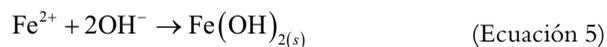
Asimismo, el control con mezcla reactiva de los RBP presentó la mayor concentración de sulfuro  $435,3 \pm 7,4 \text{ mg L}^{-1}$ , seguido por los reactores con nZVI de menor tamaño. En estos RBP las condiciones de pH y ORP fueron las adecuadas para el desarrollo de las BSR, no obstante, las mayores concentraciones de sulfuros se dieron en ausencia de nZVI, lo cual evidencia que existe una inhibición de las nZVI hacia las BSR.

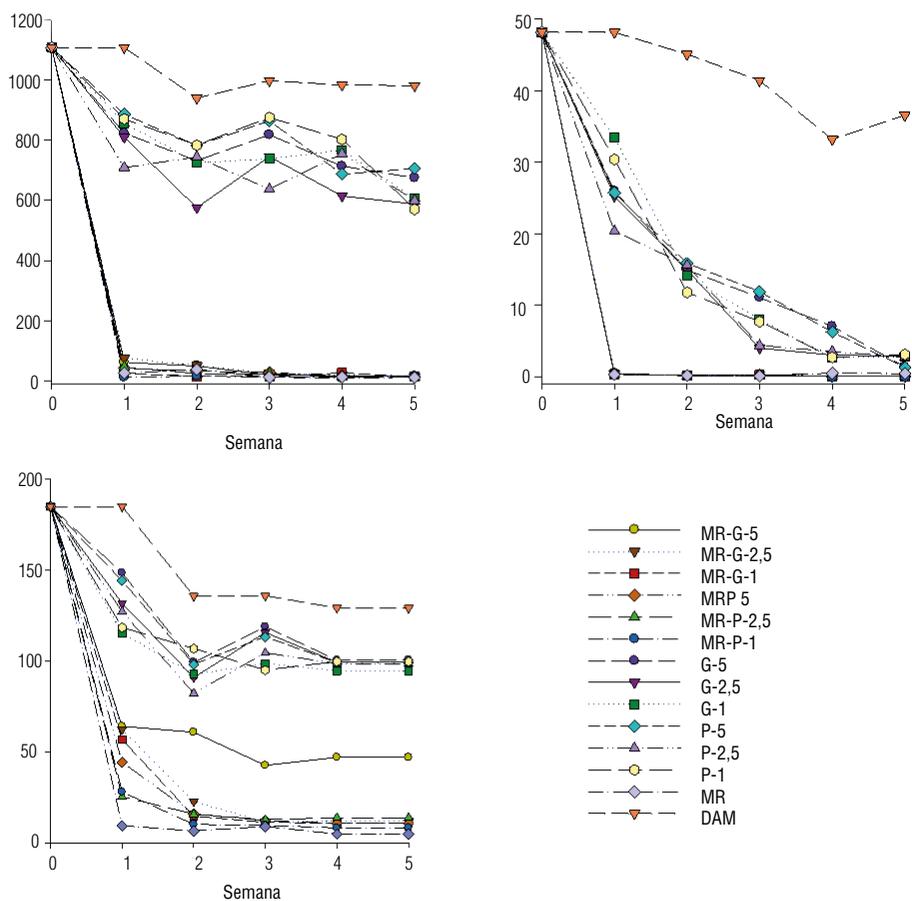
En los reactores sin mezcla reactiva la remoción de sulfato no fue significativa. Es posible que se hayan precipitado sulfuros metálicos, pero en cantidades mínimas. Diferentes estudios han demostrado que las nZVI pueden lograr reducciones significativas de sulfato, pero en muchos casos el sulfato se encuentra como co-contaminante y sus tasas de reducción se asocian a las tasas de eliminación de metales mediante la formación de sulfuros metálicos (Miao *et al.*, 2012).

### 3.1.3 Metales

Todos los metales ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{+2}$ ) presentaron altas tasas de remoción en los reactores que tenían mezcla reactiva (figura 3). La remoción de los metales del DAM inició desde la primera semana y se debe a diferentes mecanismos de remoción: la precipitación ocasionada por el aumento de pH debido a la formación de hidróxidos y carbonatos, la adsorción de los metales en la materia orgánica presente en la mezcla reactiva (Vásquez, 2016), la adsorción en la superficie reactiva de las nZVI, las reacciones de redox y la formación de sulfuros metálicos o una combinación de todos ellos.

El Fe posee la mayor concentración en el DAM en comparación con los demás metales ( $1107,57 \pm 0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ). La oxidación y la precipitación fueron los mecanismos de eliminación de este metal al inicio del tratamiento hasta removerlo en un porcentaje  $>96\%$ . Las condiciones reductoras producidas por los valores bajos de oxígeno disuelto favorecen la continua reducción del Fe (ecuaciones 5 y 6) y las condiciones alcalinas favorecen su precipitación (Calderón & Fullana, 2015). Es importante tener en cuenta que a partir de la tercera semana de tratamiento se detectó la presencia de sulfuros en estos reactores, de manera que también se presentó la remoción del Fe por medio del sulfuro. Esta observación se corrobora con los resultados del modelado en software Minteq 3.0, en el cual se evidencia que en las dos primeras semanas se produce hidróxido de hierro ( $\text{Fe}(\text{OH})_2$ ), a partir de la tercera semana y hasta el final del tratamiento se produce sulfuro de hierro (FeS) y mackinawita, que es un sulfuro de hierro con una concentración leve de níquel.





**Figura 3.** Cambios en la concentración de hierro, zinc y manganeso durante la determinación del efecto de las nZVI sobre la eficiencia de los RBP.  
**Fuente:** elaboración propia.

En los reactores sin mezcla reactiva, las tasas de remoción del Fe se encontraron entre 29% y 40%, de manera que las condiciones de estos reactores no favorecieron una remoción significativa del Fe, pues los valores bajos de pH provocan la disolución del Fe en el medio e interfieren en la precipitación. El pH ácido y el ORP elevado pueden conducir al rápido envejecimiento de la nZVI, lo cual ocasiona que pierda sus propiedades reductoras y su oxidación acelerada (Calderón & Fullana, 2015); como consecuencia, se obtiene un tratamiento con poca eficiencia. En estos reactores no se determinó la presencia de sulfuro, por lo cual probablemente los mecanismos principales de remoción fueron la adsorción de superficie y la precipitación de óxidos e hidróxidos.

Además, las tasas de eliminación de zinc (Zn) fueron elevadas en los reactores con mezcla reactiva, así como en los reactores sin mezcla. Las concentraciones de Zn disminuyeron para ambos casos en la primera semana de tratamiento, lo cual se asocia con el tamaño de la nZVI: los reactores con las partículas de menor tamaño presentaron las tasas más altas de remoción.

El Zn fue removido de los reactores con mezcla reactiva en >99%. Las tasas elevadas de remoción del Zn se logran cuando se cumplen las condiciones adecuadas de pH (8,8) y ORP (-320 mV) (Cruz *et al.*, 2009). Para cationes metálicos como el Zn, cuyo potencial estándar es negativo ( $E^\circ = -0,76$  V) y cercano al del Fe ( $E^\circ = -0,44$ V), la atracción electrostática y la adsorción química, la precipitación (con hidróxido) y la coprecipitación dentro de los productos de corrosión de Fe son probablemente los mecanismos principales de remoción (Kumar *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016). La precipitación con sulfuros también es otro mecanismo de remoción, según el modelo en el software Minteq 0.3, el cual indica que a partir de la tercera semana de tratamiento se observa la formación de minerales como la wurtzita y la esfalerita, dos tipos de sulfuro de Zn. En las dos semanas previas no se observaron precipitados de compuestos con zinc, pero sí se registró la disminución en su concentración, de lo cual se infiere que la adsorción de superficie y la precipitación con sulfuros son los mecanismos principales de eliminación.

En los reactores sin mezcla reactiva, el Zn fue removido en >74%. En estos reactores el mecanismo de eliminación fue la adsorción de superficie, ya que no se contaba con la presencia de BSR que produjeran sulfuro. En la figura 3 se observa que a medida que el tratamiento avanza, la concentración del Zn disminuye, y que la mayor tasa de remoción se encuentra en las últimas semanas de tratamiento, caso contrario a lo que sucede con los reactores con mezcla, que remueven rápidamente el Zn desde la primera semana. Posiblemente, si en estos reactores se hubiera contado con las condiciones de pH y ORP adecuadas, la eliminación del Zn sería más rápida y en tasas de remoción más elevadas.

Por último, en los reactores con mezcla reactiva, el manganeso (Mn) presentó tasas variadas de remoción. En el reactor enmendado con nZVI de ~100 nm al 5% (G5) se observaron las tasas más bajas (~70%), mientras que las tasas más altas se encontraron en el control de mezcla reactiva sin nZVI (~96%). La remoción de Mn se puede realizar mediante los diferentes mecanismos propuestos: adsorción y/o absorción, reacciones redox (biótica y abiótica) y precipitación o coprecipitación. Las condiciones para estos mecanismos varían y dependen de factores como la temperatura, el pH, el ORP, la acción bacteriana y las concentraciones de otros metales en el efluente. La precipitación, la adsorción o absorción por sí solas no permiten la eliminación eficiente del Mn presente en el DAM, sino que es necesario una combinación de mecanismos (Neculita & Rosa, 2018). La remoción del Mn en los reactores con mezcla es un tratamiento bioquímico en el que se presentan reacciones fisicoquímicas y formación de sulfuros por las BSR. Aunque estos tratamientos son efectivos para tratar metales, son ineficientes para eliminar Mn; además su adsorción en las células de la BSR debilita la capacidad sulfato-reductora de la bacteria (Neculita & Rosa, 2018).

Las tasas elevadas de eliminación (>95%) del Mn por sulfato-reducción se encuentran en concentraciones iniciales de 100-200 mg L<sup>-1</sup> (Neculita & Rosa, 2018). La concentración inicial de Mn en el DAM era 185,0 ± 0,1 mg L<sup>-1</sup> y las tasas de remoción están entre 70%-96%. Según el modelo en Minteq 3.0, en la tercera semana y hasta el final del tratamiento el Mn se precipita en forma de sulfuro MnS, lo cual demuestra que la capacidad reductora de las BSR no es afectada.

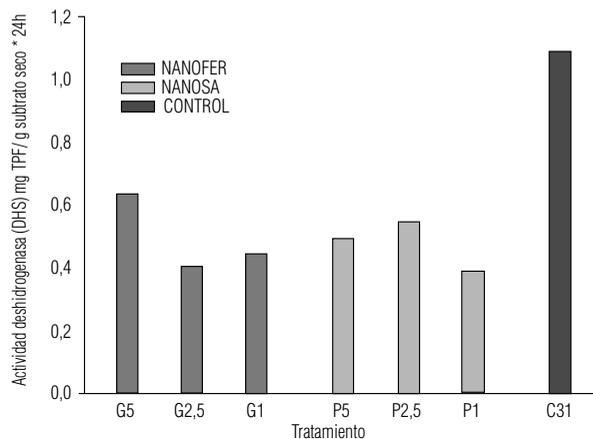
El Mn puede ser adsorbido por la materia orgánica presente en la mezcla y por la superficie de la nZVI, no obstante, la eliminación del Mn se inhibe con la presencia de altas concentraciones de Fe (Neculita & Rosa, 2018) y por la competencia entre los demás metales por los sitios de superficie disponibles para la adsorción. La eliminación del Mn está vinculada al aumento de la alcalinidad, además la adsorción es favorecida por valores de pH alcalinos, condición con la cual cumplen los reactores (Vásquez *et al.*, 2016b; Vásquez, 2016). Es probable que el Mn haya sido adsorbido en mayor proporción por la mezcla reactiva que por las nZVI debido a su contenido de Fe. La adsorción del Mn no se vio afectada ni siquiera en concentraciones de Fe bastante altas ni en concentraciones de otros metales (Zn) gracias a los diferentes mecanismos de remoción para cada metal.

En los reactores sin mezcla reactiva, las tasas de remoción del Mn fueron desde 39% hasta 46%; la elevada concentración del Fe, la adsorción de superficie del Zn y el bajo pH son factores que alteran las tasas de eliminación. La precipitación o coprecipitación del Mn con óxidos o hidróxidos generados a partir de la oxidación de la partícula es inhibida si existe una relación  $Fe/Mn > 4$  (Neculita & Rosa, 2018; Vásquez, 2016), como en este estudio (relación: 6,0). A pesar de los factores de inhibición ya mencionados, se logró la remoción de una fracción del Mn, además, en estos reactores no se determinó la precipitación de algún mineral con Mn (modelo Minteq 3.0), lo cual confirma la remoción por adsorción de las nZVI. Durante el tratamiento, en ninguno de los reactores (con o sin mezcla) se presentó la disolución del Mn: en los reactores con mezcla posiblemente se haya evitado la disolución por la cantidad de materia orgánica, la eficiente remoción del Fe y el pH alcalino. En los reactores sin mezcla, la remoción simultánea con el Fe que reduce su concentración evita la disolución del Mn (Neculita & Rosa, 2018).

### 3.2 Efecto en la actividad de la comunidad microbiana

Las nZVI pueden crear condiciones adecuadas para el crecimiento de la comunidad microbiana, especialmente de las BSR, ya que, al entrar en contacto con el medio, se consume rápidamente el oxígeno disuelto, se disminuye el ORP y se produce  $H_2$ , que se puede usar como donador de electrones por las BSR (Lefevre *et al.*, 2016). Algunos estudios han demostrado que las nZVI son tóxicas para las comunidades microbianas e inhiben completamente su actividad. También existen estudios como el de Saccá *et al.* (2013), los cuales demuestran que las nZVI no tienen efecto bactericida y bacteriostático en la comunidad microbiana.

Los resultados de la determinación de la actividad de la enzima deshidrogenasa en los reactores con mezcla reactiva muestran una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre el control y los demás reactores, la mayor actividad enzimática se presenta en ausencia de nanopartículas (figura 4). En su estudio, Huang *et al.* (2016) evaluaron el uso de nZVI modificadas con alginato de sodio en la recuperación de sedimentos contaminados con cadmio y determinaron que la presencia de nZVI inhibe la actividad de la enzima deshidrogenasa. Los autores concluyeron que esta inhibición se debe a la presencia de iones férricos.



**Figura 4.** Actividad de la enzima deshidrogenasa (DHs) en el control y los reactores con mezcla reactiva. En la figura, G y P hacen referencia al tamaño, el número final es la concentración de nZVI y C31 es el control.

**Fuente:** elaboración propia.

Las nanopartículas pueden afectar los sistemas biológicos a nivel celular, subcelular y proteico, sin embargo, el mecanismo de toxicidad aún no es claro. Algunos de los mecanismos de toxicidad propuestos incluyen: (1) Alteración en la membrana celular, (2) interferencia con la respiración, (3) daño al ADN o proteínas enzimáticas causado por iones metálicos (Chen *et al.*, 2010), (4) el tamaño reducido de la partícula, (5)  $\text{Fe}^{2+}$  que induce la generación de especies reactivas de oxígeno (moléculas inestables que contienen oxígeno y que reaccionan fácilmente con otras moléculas de la célula) o una combinación de todos estos (Kumar *et al.*, 2013).

La mayor parte de los estudios sugieren que la ruptura de la membrana celular y el estrés oxidativo a través de la generación de  $\text{Fe}^{2+}$  y especies reactivas de oxígeno son probablemente los principales mecanismos que contribuyen a la toxicidad de las nZVI, ambos mecanismos implican un contacto directo entre las nanopartículas y las BSR (Chen *et al.*, 2010). Sin embargo, en los RBP donde hay gran cantidad de materia orgánica se puede revertir el efecto de las nZVI aumentando el sistema donador de electrones (Barton & Tomei, 1995). Altas cantidades de materia orgánica ayudan en la adaptación de la comunidad microbiana al medio, diferentes fuentes donadoras de electrones son ventajosas en términos de resistencia al estrés oxidativo (Vásquez *et al.*, 2016b).

Otro de los posibles mecanismos de prevención de la materia orgánica es el recubrimiento de la nZVI y las BSR, este recubrimiento impide el contacto directo entre ambas, ya que se cargan negativamente y se repelen (repulsión electrostática). El recubrimiento de materia orgánica en la nZVI puede afectar su reactividad al reducir el contacto con el agua, por lo tanto afecta la oxidación de la partícula y la producción de  $\text{H}_2$  (Chen *et al.*, 2010). De igual manera que con los mecanismos de toxicidad, no se puede afirmar con certeza el mecanismo de mitigación de toxicidad.

También es importante tener en cuenta otros factores que pueden influir en la inhibición de las BSR, como la concentración y el tamaño de la partícula, según el análisis factorial (Anova;  $p < 0,05$ ), pues ambos factores influyen en la actividad enzimática. En su estudio,

Diao y Yao (2009) determinaron que a mayor concentración de nZVI, menor es la tasa de supervivencia de la comunidad microbiana. Asimismo, encontraron que las altas concentraciones pueden resultar en una agregación de la partícula, lo cual reduce su reactividad, su toxicidad y aumenta su tamaño. También mencionan que las agregaciones son difíciles de evitar y están influidas por el tamaño de la partícula y el ambiente. El tamaño de partícula puede causar estrés oxidativo, las partículas más pequeñas pueden atravesar la pared celular liberando  $\text{Fe}^{2+}$  y permitiendo la acumulación de  $\text{Fe}^{2+}$  que ingresa por la membrana dañada y posteriormente reacciona con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  intracelular, lo cual crea especies reactivas de oxígeno que causan estrés oxidativo y la muerte celular (Lefevre *et al.*, 2016).

Como se mencionaba anteriormente, la mayor actividad enzimática se observa en ausencia de nZVI, al tiempo que se registra actividad enzimática en los demás reactores. En general, se observa que la actividad no fue inhibida en su totalidad. Es probable que el tamaño y la concentración sean factores claves que determinen el mecanismo de toxicidad e inhibición presentes en los reactores: en altas concentraciones se encuentran menores tasas de supervivencia y mayor posibilidad de formación de agregados de las nZVI, mientras que a menor tamaño hay mayor probabilidad de causar estrés oxidativo. Por el contrario, se puede afirmar que la materia orgánica es el principal mecanismo de prevención de la toxicidad, dado su alto porcentaje contenido en los reactores. El comportamiento de los reactores no permite establecer un patrón fijo (menor y mayor actividad) debido a las diferentes condiciones de cada uno de los reactores y a los múltiples mecanismos de toxicidad propuestos.

#### 4. Conclusiones

El uso de nZVI como enmienda en la mezcla reactiva de los RBP para el tratamiento de DAM es una opción prometedora para la eliminación de metales ( $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ) y sulfatos. La adición de las nZVI en la mezcla reactiva fue eficiente en incrementar el pH y la alcalinidad, así como en disminuir el ORP, en la remoción de metales con tasas que superan el 80% y en la remoción de sulfatos con tasas de remoción del 83%. La remoción de los metales y el sulfato se dio por medio de diferentes mecanismos, que incluyen: la adsorción, la precipitación/coprecipitación con óxidos/hidróxidos, formación de sulfuros metálicos, reacciones redox y combinaciones de estos mecanismos. A su vez, las nZVI por sí solas no fueron muy eficientes en el aumento del pH y la alcalinidad, ni en la remoción de metales y sulfatos, pues únicamente lograron eliminar de manera eficiente el zinc. El tamaño y la concentración de las nZVI es determinante durante el tratamiento del DAM, puesto que estos dos factores pueden influir directamente en la eficiencia de remoción de metales y sulfatos.

Las nZVI conducen a una estimulación de la actividad microbiana, especialmente de las BSR, al acondicionar el medio para su óptimo desarrollo (disminuir el ORP y aumentar el pH), pero también conlleva la inhibición de su actividad. Se observó que las nZVI pueden inhibir la actividad microbiana por diferentes mecanismos, sin embargo dicha actividad no fue inhibida en su totalidad, dado que también existen mecanismos que evitan esta toxicidad.

En resumen, las nZVI mejoraron significativamente el tratamiento con mezcla reactiva en condiciones alcalinas y reductoras. Estas condiciones se mantienen durante el tratamiento sin presentar variación alguna, lo que evita que los metales y el sulfato vuelvan a disolverse en el DAM. Es recomendable realizar estudios más profundos de la toxicidad de las nZVI sobre la comunidad microbiana para plantear mecanismos que eviten dicha toxicidad, con lo cual se logrará un tratamiento aún más eficiente.

## Agradecimientos

Agradecemos a la Universidad Central por la financiación de esta investigación y al semillero de Biotecnología Ambiental. Agradecemos a la empresa Milpa S.A. por las muestras de DAM. Agradecemos también a Luis Ángel López Zhou por su ayuda en los análisis fisicoquímicos del laboratorio y a la profesora Yaneth Vásquez por su continuo acompañamiento durante la ejecución de este proyecto.

## Referencias

- Adams, B., Anderson, R., Bless, D., Butler, B., Conway, B., Dailey, A., & Hanley, J. (2014). *Reference guide to treatment technologies for mining-influenced water* [vol EPA 542-R-14-001]. Office of Superfund Remediation and Technology Innovation.
- American Public Health Association [APHA]. (1998). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. APHA.
- Ayala, P. P., Sierra, A. R., & Field, J. A. (2016). Treatment of acid rock drainage using a sulfate-reducing bioreactor with zero-valent iron. *Journal of Hazardous Materials*, 308, 97-105.
- Barton, L. L., & Tomei, F. A. (1995). Characteristics and activities of sulfate-reducing bacteria. En *Sulfate-reducing bacteria* (pp. 1-32). Springer.
- Calderón, B., & Fullana, A. (2015). Heavy metal release due to aging effect during zero valent iron nanoparticles remediation. *Water Research*, 83, 1-9.
- Chen, J., Xiu, Z., Lowry, G. V., & Alvarez, P. J. (2011). Effect of natural organic matter on toxicity and reactivity of nano-scale zero-valent iron. *Water Research*, 45(5), 1995-2001.
- Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca [CAR]. (2010). Lineamientos para el ordenamiento de la minería en los municipios carboníferos del departamento de Cundinamarca.
- Diao, M., & Yao, M. (2009). Use of zero-valent iron nanoparticles in inactivating microbes. *Water Research*, 43(20), 5243-5251.
- Garzón, C., Beltrán, J., Vásquez, Y., & Prieto F. (2019). *Selección de un sistema de tratamiento para los drenajes ácidos de mina (DAM) de la mina Incarsa Ltda del municipio de Samacá, Boyacá* [tesis de pregrado, Universidad Central].

- Grande Gil, J. A. (ed.). (2016). *Drenaje ácido de mina en la faja pirítica ibérica: Técnicas de estudio e inventario de explotaciones* (vol. 15). Servicio de Publicaciones de la Universidad de Huelva.
- Guo, X., Yang, Z., Dong, H., Guan, X., Ren, Q., Lv, X., & Jin, X. (2016). Simple combination of oxidants with zero-valent-iron (ZVI) achieved very rapid and highly efficient removal of heavy metals from water. *Water Research*, 88, 671-680.
- Huang, D., Xue, W., Zeng, G., Wan, J., Chen, G., Huang, C., & Xu, P. (2016). Immobilization of Cd in river sediments by sodium alginate modified nanoscale zero-valent iron: impact on enzyme activities and microbial community diversity. *Water Research*, 106, 15-25.
- Instituto Nacional de Normalización [INN]. (1979). *Mecánica de suelos. Determinación de la humedad. Método NCh 1515*. INN.
- Klimkova, S., Cernik, M., Lacinova, L., Filip, J., Jancik, D., & Zboril, R. (2011). Zero-valent iron nanoparticles in treatment of acid mine water from in situ uranium leaching. *Chemosphere*, 82(8), 1178-1184.
- Kumar, N., Omoregie, E. O., Rose, J., Masion, A., Lloyd, J. R., Diels, L., & Bastiaens, L. (2013). Inhibition of sulfate reducing bacteria in aquifer sediment by iron nanoparticles. *Water Research*, 51, 64-72.
- Lefevre, E., Bossa, N., Wiesner, M. R., & Gunsch, C. K. (2016). A review of the environmental implications of in situ remediation by nanoscale zero valent iron (nZVI): behavior, transport and impacts on microbial communities. *Science of the Total Environment*, 565, 889-901.
- Li, S., Wang, W., Liang, F., & Zhang, W. X. (2016). Heavy metal removal using nanoscale zero-valent iron (nZVI): Theory and application. *Journal of Hazardous Materials*, 322, 163-171.
- Lindsay, M., Wakeman, K., Rowe, F., Grail, B., Ptacek, C., Blowes, D., & Johnson, D. (2011). Microbiology and geochemistry of mine tailings amended with organic carbon for passive treatment of pore water. *Geomicrobiology Journal*, 28, 229-241.
- Martínez de Jesús, G. (2008). *Eliminación de sulfatos en un reactor de lecho móvil anaerobio-aerobio* [tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México]. Repositorio Institucional UNAM. [https://ru.dgb.unam.mx/handle/DGB\\_UNAM/TES01000632922](https://ru.dgb.unam.mx/handle/DGB_UNAM/TES01000632922)
- Miao, Z., Brusseau, M. L., Carroll, K. C., Carreón-Diazconti, C., & Johnson, B. (2012). Sulfate reduction in groundwater: characterization and applications for remediation. *Environmental Geochemistry and Health*, 34(4), 539-550.
- Ministerio de Minas y Energía. (2015). *Diseño de agenda para el desarrollo productivo y competitivo del distrito de Zipa-Samacá: informe final*.
- Mukherjee, R., Kumar, R., Sinha, A., Lama, Y., & Saha, A. K. (2016). A review on synthesis, characterization, and applications of nano zero valent iron (nZVI) for environmental remediation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 46(5), 443-466.
- Neculita, C. M., & Rosa, E. (2018). A review of the implications and challenges of manganese removal from mine drainage. *Chemosphere*, 214, 491-510.

- Neculita, C. M., Yim, G. J., Lee, G., Ji, S. W., Jung, J. W., Park, H. S., & Song, H. (2011). Comparative effectiveness of mixed organic substrates to mushroom compost for treatment of mine drainage in passive bioreactors. *Chemosphere*, 83(1), 76-82.
- Prieto, G., & Duitama, L. M. (2004). Acid drainage of coal mining in Cundinamarca Department, Colombia. En *Environmental geochemistry in tropical and subtropical environments* (pp. 125-134). Springer.
- Quicasán, D. F., Forero, N. F., & Vásquez, O. Y. (2017). Prevención de drenajes ácidos de mina utilizando compost de champiñón como enmienda orgánica. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(1), 92-100.
- Saccá, M. L., Fajardo, C., Costa, G., Lobo, C., Nande, M., & Martin, M. (2014). Integrating classical and molecular approaches to evaluate the impact of nanosized zero-valent iron (nZVI) on soil organisms. *Chemosphere*, 104, 184-189.
- Saccá, M. L., Fajardo, C., Nande, M., & Martín, M. (2013). Effects of nano zero-valent iron on *Klebsiella oxytoca* and stress response. *Microbial Ecology*, 66(4), 806-812.
- Serra-Wittling, C., Houot, S., & Barriuso, E. (1995). Soil enzymatic response to addition of municipal solid-waste compost. *Biology and Fertility of Soils*, 20(4), 226-236.
- Usepa, E. (2007). *Flame Atomic Absorption Spectrophotometry. Method 7000B*. US Environmental Protection Agency.
- Vangnai, A., Chaithawiwat, K., McEvoy, J. M., Pruess, B., Krajangpan, S., & Khan, E. (2015). Impact of nanoscale zero valent iron on bacteria is growth phase dependent. *Chemosphere*, 144, 352-359.
- Vásquez Ochoa, O. Y. (2016). *Evaluación de un biorreactor pasivo durante la remediación de drenajes ácidos de mina del distrito minero de Zipaquirá (Colombia)* [tesis de doctorado, Pontificia Universidad Javeriana]. Repositorio Institucional Universidad Javeriana. <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/19645>
- 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.
- Vicente, M. S. (2006). *Uso de bacterias sulfato-reductoras inmovilizadas para la precipitación de metales pesados* [tesis de doctorado, Universidad Nacional de La Plata]. Repositorio Institucional Universidad Nacional de la Plata. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/2191>
- Wilkin, R. T., & McNeil, M. S. (2003). Laboratory evaluation of zero-valent iron to treat water impacted by acid mine drainage. *Chemosphere*, 53(7), 715-725.
- Zagury, G. J., Kulnieks, V. I., & Neculita, C. M. (2006). Characterization and reactivity assessment of organic substrates for sulphate-reducing bacteria in acid mine drainage treatment. *Chemosphere*, 64(6), 944-954.