

Remoción de mercurio, cromo y plomo por humedales artificiales inoculados con cepas tolerantes

• Leonel E. Amábilis-Sosa* • Christina Siebe •
Universidad Nacional Autónoma de México

*Autor de correspondencia

• Gabriela Moeller-Chávez •
Universidad Politécnica del Estado de Morelos

• María del Carmen Durán-Domínguez-De-Bazúa •
Universidad Nacional Autónoma de México

Resumen

Amábilis-Sosa, L. E., Siebe, C., Moeller-Chávez, G., Durán-Domínguez-De-Bazúa, M. C. (marzo-abril, 2015). Remoción de mercurio, cromo y plomo por humedales artificiales inoculados con cepas tolerantes. *Tecnología y Ciencias del Agua*, 6(2), 21-34.

En la presente investigación se evaluó el desempeño de humedales artificiales a escala de laboratorio, inoculados con cepas tolerantes a metales pesados. Estos sistemas fueron comparados con humedales artificiales con las mismas características constructivas y de operación, pero con bacterias convencionales que, naturalmente, se encuentran presentes en la rizosfera de los reactores. Ambos tipos de reactores fueron evaluados considerando la remoción de mercurio, plomo y cromo en solución durante 151 días de operación. A partir del día 100, los sistemas inoculados con bacterias tolerantes presentaron estabilidad en el porcentaje de remoción alrededor de 50% de Hg, 57% de Pb y 45% de Cr. Por su parte, los reactores con bacterias convencionales, a pesar de remover cierto porcentaje de metales pesados, fueron reduciendo su eficiencia en función de los días de operación, además de que no llegaron a presentar valores estables.

Palabras clave: bacterias rizosféricas, cepas tolerantes, humedales artificiales, metales pesados.

Introducción

Dentro de los diversos problemas ambientales y de salud pública, los relacionados con las aguas residuales con metales pesados han presentado un incremento en los últimos años

Abstract

Amábilis-Sosa, L. E., Siebe, C., Moeller-Chávez, G., Durán-Domínguez-De-Bazúa, M. C. (March-April, 2015). Mercury, Chromium and Lead Removal Using Constructed Wetlands Inoculated with Tolerant Strains. *Water Technology and Sciences (in Spanish)*, 6(2), 21-34.

The present investigation evaluated the performance of constructed wetlands inoculated with strains tolerant to heavy metals. The evaluation was conducted at the laboratory scale. These systems were compared to constructed wetlands having the same construction and operating conditions but containing conventional bacteria that is naturally present in the rhizosphere of the reactors. Both types of reactors were evaluated for the removal of mercury, lead and chromium in solution over 151 days of operations. By day 100, the systems inoculated with tolerant bacteria attained a stable removal percentage of roughly 50% for Hg, 57% for Pb and 45% for Cr. The reactors with conventional bacteria removed a percentage of heavy metals but the efficiency decreased as the days of operation increased and it did not reach stable values.

Keywords: Rhizospheric bacteria, tolerant strains, constructed wetlands, heavy metals.

Recibido: 23/04/2014
Aceptado: 12/12/2014

(Fu & Wang, 2011). La alta toxicidad de estos compuestos, aunada a su larga persistencia en el ambiente, les confiere la denominación de contaminantes prioritarios, establecida por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y por la Organización Mundial de la Salud

(OMS) (CEPIS, 2001). Entre los más peligrosos se encuentran el cromo (Cr), mercurio (Hg) y plomo (Pb), que son utilizados y generados de manera exhaustiva en todo el mundo por industrias relacionadas con la minería, papel, curtido de pieles, galvanoplastia, producción de baterías, etc. (Fu & Wang, 2011; Khan, Ahmad, Shah, Rehman, & Khaliq, 2009). Tan solo en México, 18 estados presentan problemas derivados de las industrias que utilizan como materia prima o subproducto Hg, Cr o Pb, e incluso una combinación de estos metales pesados (INE, 2004; SSA, 2006). La concentración en las formas totales de estos compuestos varía de modo amplio en función del tipo y la capacidad de producción de la industria. Los intervalos reportados en los efluentes descargados se encuentran entre 0.0005 y 2.2 mg l⁻¹ de Hg (Loredo, Álvarez, & Ordóñez, 2003), de 5 a 75 mg l⁻¹ de Cr (Barrera, Romero, & Martínez, 2003) y de 7 hasta 130 mg l⁻¹ de Pb (Lavado, Sun, & Bendezu, 2010). Las plantas de tratamiento de aguas residuales convencionales actualmente no son capaces de tratar las aguas con metales pesados, ya que el sistema biológico colapsaría por la toxicidad de estos cationes inorgánicos o saldrían sin tratamiento con el efluente. Las opciones fisicoquímicas que existen en la actualidad, como el carbón activado, intercambio iónico y precipitación química, siempre presentan alguna desventaja operacional, económica o de eficiencia (Barakat, 2010; Cheng, Grosse, Karrenbrock & Thoennessen, 2002).

En paralelo, recientes estudios se han enfocado en investigar los mecanismos de resistencia que presentan algunas bacterias hacia los metales pesados más tóxicos, incluyendo Hg, Cr y Pb. En este sentido, las bacterias que han sido aisladas y caracterizadas de forma genética han sido identificadas del género *Bacillus* y en la mayoría de los casos Gram (+) (Becerra-Castro *et al.*, 2012; Çolak, Atar, Yazicioğlu, & Olgun, 2011; Salgado-Bernal, Carballo-Valdés, Martínez-Sardiñas, Cruz-Arias, & Durán-Domínguez-de-Bazúa, 2012). En estos microorganismos se han identificado mecanismos que dan lugar a la tolerancia de

metales pesados, incluyendo la presencia de metaloproteínas transportasas, en conjunto con la capacidad de excretar sideróforos, los cuales brindan protección extracelular al ser compuestos quelantes (Schalk, Hannover, & Braud, 2011). Otro mecanismo de tolerancia hacia metales pesados, como el cromo, es la capacidad genética de reducir los cationes por medio de genes cromosómicos específicos que utilizan enzimas reductasas (He *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2013).

A raíz de los resultados anteriores autores como Rathnayake, Megharaj, Bolan y Naidu (2010), Salgado-Bernal *et al.* (2012), y Xie, Fu, Wang y Liu (2010), han trabajado con bacterias tolerantes a metales pesados, para el saneamiento de suelos y cuerpos de agua superficiales. Entre estas investigaciones destaca la de Salgado-Bernal *et al.* (2012), en la que las cepas bacterianas, además de tolerar la contaminación por Hg, Cr y Pb, presentaron cierta remoción de éstos en la fase acuosa. Estos resultados, en conjunto con la problemática expuesta, plantean que los sistemas de humedales artificiales, con presencia de bacterias tolerantes, pueden ser una opción técnicamente eficiente para el tratamiento de las aguas residuales que contienen metales pesados, dado que son sistemas caracterizados por remover contaminantes a través de la interacción de las bacterias con la vegetación. Esta interacción ha permitido que los humedales artificiales puedan tratar aguas con cierto contenido de metales pesados, a diferencia de otros sistemas biológicos que no contienen vegetación. Así, se plantea que el uso de bacterias tolerantes a metales pesados en humedales artificiales propiciará o mejorará la capacidad de remoción de Hg, Pb y Cr, en comparación con sistemas con bacterias convencionales de un agua residual. Asimismo, podrán tratarse niveles de concentración característicos de los efluentes industriales de las empresas que los generan.

El presente trabajo se circunscribe a evaluar el desempeño de un sistema de humedales artificiales inoculados con cepas tolerantes sobre la eficiencia de remoción de mercurio, cromo y plomo, comparado con el mismo sistema de

tratamiento, pero sin la adición de las bacterias tolerantes. Los resultados obtenidos aportan los primeros datos experimentales y elementos iniciales de diseño que pueden emplearse en futuros estudios a escala piloto, enfocados en el tratamiento de efluentes con los metales pesados en estudio.

Metodología

Diseño experimental

Se utilizaron seis reactores a escala de laboratorio, que consistieron en cilindros de cloruro de polivinilo (PVC por sus siglas en inglés) con dimensiones de altura y diámetro de 39 cm y 20 cm, respectivamente, lo cual exhibe una relación altura/diámetro de 1.7/1, que se encuentra dentro de las proporciones recomendadas y utilizadas de forma amplia para la implementación de este tipo de sistemas (Lüderitz, 2004; Puigagut, Caselles-Osorio, Vaello, & García, 2008; Winter & Goetz, 2003; Wood, 1995). Estas dimensiones corresponden al volumen de llenado con el medio de soporte, el cual consistió en roca volcánica denominada tezontle, con diámetro de partícula de 3.8 a 4.5 mm, lo cual exhibe una porosidad de 38% (Kadlec et al., 2000; USEPA, 2000). El nivel de agua en cada uno de los seis humedales fue ajustado a 5 cm por debajo de la superficie del medio de empaque, resultando en un volumen del líquido de ~ 4.0 l. Tres de los seis sistemas fueron esterilizados e inoculados con un consorcio de cepas bacterianas tolerantes, identificándose como RCT. Los otros tres sistemas no fueron esterilizados para que contuvieran a las bacterias asociadas con la rizosfera de la vegetación sembrada, identificándose como RCC por reactores con cepas convencionales.

Condiciones operacionales de los humedales artificiales

Todos los humedales artificiales (RCT y RCC) fueron sembrados con la especie *Phragmites australis* y en el caso de los tres inoculados

con cepas tolerantes (RCT), la rizosfera fue esterilizada por medio de la aplicación de NaClO (hipoclorito de sodio) al 10%, seguido por C₂H₆O (etanol) al 70% (De Souza, Huang, Chee, & Terry, 1999). De manera similar, el material de empaque fue lavado y esterilizado con calor húmedo a 115 °C durante 15 minutos, por medio de un autoclave (Black, 1999; Ramírez et al., 2011).

Una vez empacados y sembrados los seis sistemas de humedales, los tres RCT fueron inoculados con un consorcio bacteriano conformado por cinco cepas tolerantes a metales pesados estudiadas previamente por Salgado-Bernal et al. (2012), denominadas como TAN117, TAN119, TAN1113, TAN1115 y TAN217, todas del género *Bacillus* y Gram (+). La inoculación se realizó sembrando cada una de las cepas tolerantes mencionadas en un matraz Erlenmeyer con un litro de caldo nutriente. Una vez que las bacterias proliferaron, el medio fue diluido hasta obtener una solución con una concentración de 400 mg l⁻¹ de DQO. Posteriormente, esta solución fue vertida en cada uno de los tres reactores RCT que, considerando sus dimensiones, exhibieron una carga orgánica de 16 gm⁻²d⁻¹, el cual es un valor característico de los sistemas de humedales artificiales (Kadlec et al., 2000; Kadlec & Wallace, 2009).

Por su parte, los reactores RCC fueron alimentados con una solución con un contenido de C₁₂H₂₂O₁₁ (sacarosa), equivalente a 400 mg l⁻¹ de DQO (Masters & Ela, 2008), para que la carga orgánica mencionada antes sea la misma en todos los reactores.

Para los dos tipos de reactores, a partir del tercer día y de manera diaria, se cuantificó el desarrollo de la densidad microbiana a través de las unidades formadoras de colonias (UFC), que es un conteo de células viables subsecuente a un vertido en placa. Esta cuantificación se realizó hasta el día 15, punto en el que se consideraron colonizados los seis reactores, al presentar un comportamiento asintótico de la densidad bacteriana en función del tiempo, alcanzando un valor alrededor de 37 x 10⁶ UFC ml⁻¹.

Posterior a la colonización bacteriana, los seis reactores operaron durante 136 días (151 días en total desde la inoculación) de forma discontinua o por lotes ("batch", en inglés), con tiempos de cambio de agua de cuatro días. La composición del agua residual sintética con la que fueron alimentados se muestra en el cuadro 1 y se basa en los estudios de Orduña-Bustamante, Vaca-Mier, Escalante-Estrada y Durán-Domínguez-de-Bazúa (2011), además de ser valores característicos de agua residual municipal típica (Crites & Tchobanoglous, 2000; Masters y Ela, 2008). Asimismo, las concentraciones de metales pesados fueron establecidas con base en pruebas de toxicidad bacteriana y fitotoxicidad, para garantizar que los componentes biológicos de los humedales artificiales no sean inhibidos y estos sistemas puedan operar a lo largo de los días como sistemas de tratamiento de aguas residuales. Además, fueron consideradas las concentraciones características de metales pesados que contienen los efluentes de industrias propias de la rama (Barrera et al., 2003; Lavado et al., 2010; Loredó et al., 2003). A continuación se describe el procedimiento de las pruebas de toxicidad.

Pruebas de fitotoxicidad y toxicidad bacteriana

Para la prueba de fitotoxicidad se realizó un bioensayo con semillas de *Lactuca sativa*, para evaluar los efectos de la mezcla de metales pesados de interés. La metodología utilizada

fue la descrita por Sobrero y Ronco (2004), en la que se considera de manera estática tanto el proceso de germinación de las semillas como el desarrollo de las plántulas de lechuga a través de mediciones de la radícula (raíz en fase embrionaria) e hipocótilo (tallo en fase embrionaria). Las diferentes concentraciones probadas se describen en el cuadro 2. Las pruebas de germinación se realizaron por triplicado para cada concentración y cada réplica contenía, de manera dispersa, 10 semillas de *L. sativa*. Una vez incubadas las semillas, se procedió a observar las inhibiciones en germinación y/o desarrollo del hipocótilo y radícula, para contrastar los resultados contra el control (concentración cero de metales pesados) y así establecer los porcentajes de inhibición para cada concentración evaluada.

En relación con el bioensayo para conocer el efecto de cada una de las mezclas de metales pesados sobre la densidad bacteriana del consorcio tolerante, se evaluaron, al igual que con las pruebas de fitotoxicidad, las concentraciones indicadas en el cuadro 2, que de acuerdo con los estudios previos de Salgado-Bernal et al. (2012), son las máximas concentraciones a las que logran proliferar las bacterias de interés y son cercanas a las máximas evaluadas en este estudio. En términos generales, se preparó por triplicado caldo nutriente para cada concentración de la mezcla de metales pesados a probar (cuadro 2) y, posteriormente, se procedió a inocular, con asadas, tomando el inóculo por picadura de cada agar nutriente que contenía

Cuadro 1. Composición del agua residual sintética utilizada para la alimentación de cada uno de los sistemas de humedales artificiales.

Nutriente	Concentración, mg l ⁻¹	Compuesto utilizado
Carbono	400 (expresada como DQO)	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁
Nitrógeno	30	(NH ₄) ₂ SO ₄
Fósforo	6	Na ₃ PO ₄
Potasio	30	KNO ₃
Mercurio	0.106	HgCl ₂
Plomo	26	Pb(NO ₃) ₂
Cromo	16.5	Cr(NO ₃) ₆

las bacterias que conforman el consorcio tolerante. Luego de 40 horas de incubación a 34 °C, se realizó la cuantificación de las bacterias, posterior al vertido en placa, para así obtener los resultados en UFC ml⁻¹ (Aquiáhuatl & Pérez, 2004; Ramírez *et al.*, 2011). Al relacionar éstos con su respectiva concentración de metales pesados, se calcularon las concentraciones letales, CL, proporcionales al grado de inhibición. Es decir, la CL₅₀ se refiere a la concentración de metales pesados que inhibe 50% de la población bacteriana respecto al control sin metales pesados y en función de la ecuación resultante (comportamiento cinético). En efecto, la CL₅₀ es la variable utilizada en los estudios de pruebas de toxicidad, sobre todo cuando los organismos de prueba son bacterias, ya que a pesar de reducir su población en 50%, su inhibición es proporcional a su reproducción, pues ésta es por fisión binaria (duplicación) (Sobrero & Ronco, 2004).

Determinaciones analíticas y análisis estadísticos

La toma de muestras de cada reactor se realizó cada cuatro días, en función del tiempo de recambio del agua, en frascos de polietileno previamente lavados con HNO₃ (ácido nítrico) al 5%. La determinación de metales se realizó mediante espectrometría de absorción atómica, en un equipo Perkin-Elmer Optima 4 300DV, con generación de hidruros para las muestras de mercurio y con el método de flama para plo-

mo y cromo, siguiendo el protocolo del método 3 005A de la USEPA (1996).

Todos los resultados de metales pesados fueron analizados estadísticamente para contrastar las eficiencias de remoción entre los dos tipos de humedales artificiales, a través de un análisis de varianza, ANDEVA (ANOVA, en inglés) de medidas repetidas. Previo al análisis tipo ANOVA, se verificó la normalidad y homogeneidad de los datos con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para todo lo anterior se utilizó el paquete estadístico Minitab 15 para Windows.

Resultados y discusión

A continuación se presentan los resultados de esta investigación, más que en el orden en que fueron presentadas las metodologías seguidas, en el orden en que fueron realizados los experimentos. Esto es, las concentraciones adecuadas de metales para realizar las pruebas en los reactores de laboratorio que simulaban humedales artificiales y, posteriormente, los resultados de estas pruebas con metales pesados.

Pruebas de toxicidad de la mezcla de metales pesados

En la figura 1 se observan las curvas dosis-respuesta de cada una de las pruebas de toxicidad realizadas. Para las pruebas de fitotoxicidad no existieron efectos letales por parte de los metales pesados, ya que todas las semillas

Cuadro 2. Concentraciones de metales pesados en las mezclas aplicadas durante las pruebas de toxicidad tanto del consorcio microbiano como en las semillas de *L. sativa*.

Combinación de concentraciones de metales pesados, mg l ⁻¹			
Nivel de concentración	Cromo	Plomo	Mercurio
0	0	0	0
1	0.525	0.825	0.003
2	3.5	5.5	0.02
3	10.5	16.5	0.06
4	21	33	0.12
5	42	66	0.24
6	70	110	0.4

lograron germinar después del tiempo de incubación. No obstante, se observaron marcados efectos inhibitorios sobre el crecimiento de las plantas, en comparación con el control que no contenía mezcla de metales pesados, tal y como se muestra de manera objetiva en el cuadro 3. En este mismo cuadro también se aprecia que los tres últimos valores de la longitud del hipocótilo (correspondientes a las tres mezclas más altas de metales) son muy similares, por lo que la respuesta (efecto) a las dosis altas es prácticamente la misma. Por su parte, en la columna que se refiere a la longitud de la radícula, se puede observar que ésta decrece de manera proporcional conforme incrementa la concentración de los metales pesados. Estos comportamientos de los órganos vegetales ante el efecto de las altas dosis de metales pesados suministradas coincide con lo reportado por Di Salvatore, Carafa y Carratú (2008), y Walter, Martínez y Cala (2006), quienes también trabajaron con al menos los tres metales utilizados en la presente investigación. De acuerdo con lo anterior, en las figuras 1a y 1b se señalan los porcentajes de inhibición para la longitud de hipocótilo y radícula, respectivamente, en función de la concentración de metales aplicada. La tendencia asintótica de la inhibición exhibida es característica en este tipo de pruebas con especímenes fotoautótrofos debido a que los compuestos tóxicos inorgánicos pueden circular a través de sus tejidos con un límite de saturación, resultando en una asimilación de primer orden (Nagajyoti, Lee, & Sreekanth, 2010). Con base en las curvas de las figuras 1a y 1b, las concentraciones que causan 50% de inhibición en el desarrollo de la radícula e hipocótilo son muy similares entre ambas partes de la planta, con 0.109 mg l⁻¹ de Hg, 17.3 mg l⁻¹ de Cr y 27.2 mg l⁻¹ de Pb para la radícula, y 0.106 mg l⁻¹ de mercurio, 16.5 mg l⁻¹ de Cr y 26 mg l⁻¹ de Pb para el hipocótilo.

Por otra parte, la figura 1c señala la tendencia de inhibición bacteriana en función de la concentración de metales pesados aplicada. Por medio de la ecuación de la curva resultante (característica de primer orden), la CL₅₀ para el

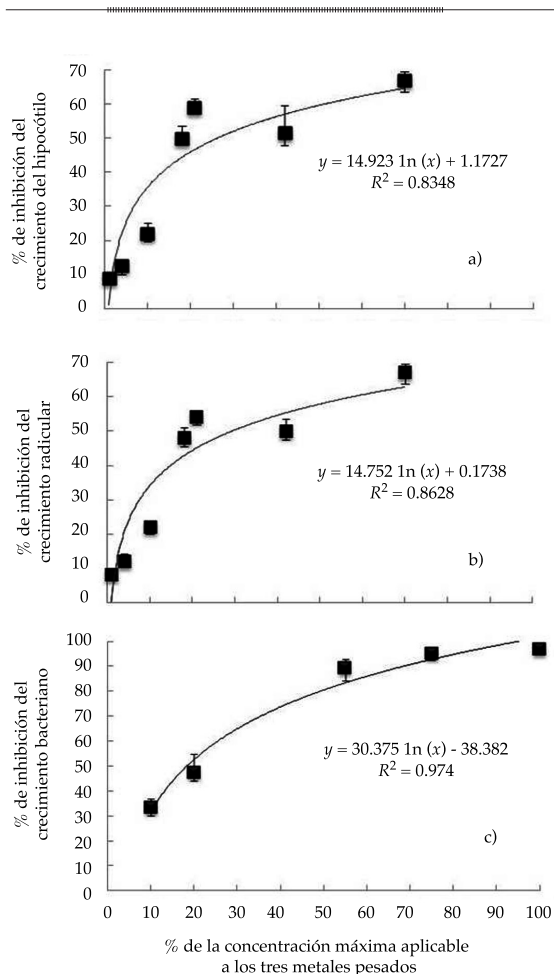


Figura 1. Resultados de las pruebas de toxicidad producida por la mezcla de los tres metales pesados: inhibición del crecimiento del hipocótilo (figura 1a); inhibición del crecimiento radicular (figura 1b); inhibición del desarrollo o "crecimiento" bacteriano (figura 1c) (\pm desviación estándar).

consorcio bacteriano resultó en 0.112 mg l⁻¹ de Hg, 18.2 mg l⁻¹ de Cr y 29.5 mg l⁻¹ de Pb, valores que se encuentran por arriba de los máximos tolerables por sistemas biológicos de tratamiento de aguas residuales (Jin, Yang, Yu, & Zheng, 2012; Karvelas, Katsoyiannis, & Samara, 2003), y son muy similares a los reportados por Viti, Pace y Giovannetti (2002), aunque por debajo del estudio *in vitro* realizado por Congeevaram, Dhanaran, Park, Dexilyn y Kaliannan (2007).

Considerando las concentraciones letales de las tres pruebas realizadas, se utilizaron las más

bajas en el agua de alimentación, que corresponden a las del hipocótilo, lo cual garantiza que los sistemas de humedales puedan operar sin colapsar bajo la presencia de metales pesados. Cabe mencionar que estas concentraciones se encuentran dentro de los intervalos reportados para las diferentes industrias que generan al menos uno de los metales pesados probados en este estudio, tal y como se mencionó en la metodología. Así, los resultados obtenidos en esta primera fase experimental aportan criterios para la realización de subsecuentes estudios de remoción de metales pesados a través de este tipo de sistemas biológicos. En específico, permitirán establecer los niveles factibles de concentración a remover, además del procedimiento a seguir para identificar dichos niveles en el caso de que varíen los microorganismos y/o los metales pesados a evaluar.

Remoción de metales pesados

En la figura 2 se presenta la remoción de los tres metales pesados que exhibieron los dos tipos de reactores evaluados, en función de los 151 días de operación. Al aplicar la prueba Kolmogorov-Smirnow para cerciorar la normalidad de los datos, se encontró que los resultados de Pb y Cr presentan una distribución normal ($P > 0.05$). Sin embargo, para los datos de mercurio, la distribución no se ajustó a la normal ($P < 0.05$), pero sí a una distribución Weibull, por lo que se procedió a una transformación

con el método de Box Cox y, posteriormente, a su análisis tipo ANOVA de medidas repetidas.

La figura 2a señala la tendencia de la remoción de mercurio en los humedales artificiales, que en promedio fue de 50% para los que contenían cepas bacterianas convencionales (RCC) y de 60% para los inoculados con bacterias tolerantes (RCT). Al inicio de la operación, para ambos tipos de sistemas, se observaron valores arriba de 90% de remoción, con tendencia a disminuir hasta el día 30, punto en el que ambos reactores volvieron a incrementar su remoción hasta el día 50, para nuevamente decaer de manera abrupta hasta llegar por debajo de 50% en el día de operación 74. Los altos porcentajes de remoción de mercurio hasta este punto probablemente se encuentren relacionados por fenómenos de volatilización, tal y como lo sugieren Ventura, Simoes, Tomaz y Costa (2005), y Schlüter (2000), aunado a la evapotranspiración del metal por parte de la vegetación (Han, Su, Monts, Waggoner, & Plo-dinec, 2006; Kabatas-Pendias & Pendias, 2001). Esto explicaría por qué el comportamiento y la remoción fue prácticamente la misma para los dos tipos de reactores en la primera mitad de los experimentos. No obstante, a partir del día 74 solamente los RCT mostraron un comportamiento estable, sobre todo en los últimos 30 días, lapso en el cual los reactores RCC, a pesar de presentar poca variación, exhibieron una tendencia a disminuir la eficiencia de remoción conforme transcurrían los días de operación,

Cuadro 3. Efecto cuantitativo de las dosis de metales pesados, aplicadas durante las pruebas de fitotoxicidad y toxicidad bacteriana (\pm desviación estándar).

Cromo, mg l ⁻¹	Plomo, mg l ⁻¹	Mercurio, mg l ⁻¹	Densidad bacteriana, UFC ml ⁻¹ x 10 ³	Longitud radícula, cm	Longitud hipocótilo, cm
0	0	0	30 000 \pm 2 900	2.70 \pm 0.08	4.50 \pm 0.06
0.525	0.825	0.003	27 000 \pm 3 100	2.14 \pm 0.20	4.10 \pm 0.46
3.5	5.5	0.02	22 000 \pm 2 100	1.93 \pm 0.20	3.96 \pm 0.43
10.5	16.5	0.06	10 000 \pm 1 400	1.41 \pm 0.16	3.31 \pm 0.25
21	33	0.12	3 900 \pm 300	0.31 \pm 0.26	1.87 \pm 0.12
42	66	0.24	12 \pm 1.10	0.26 \pm 0.35	2.20 \pm 0.51
70	110	0.4	2 \pm 0.15	0.18 \pm 0.23	1.60 \pm 0.20

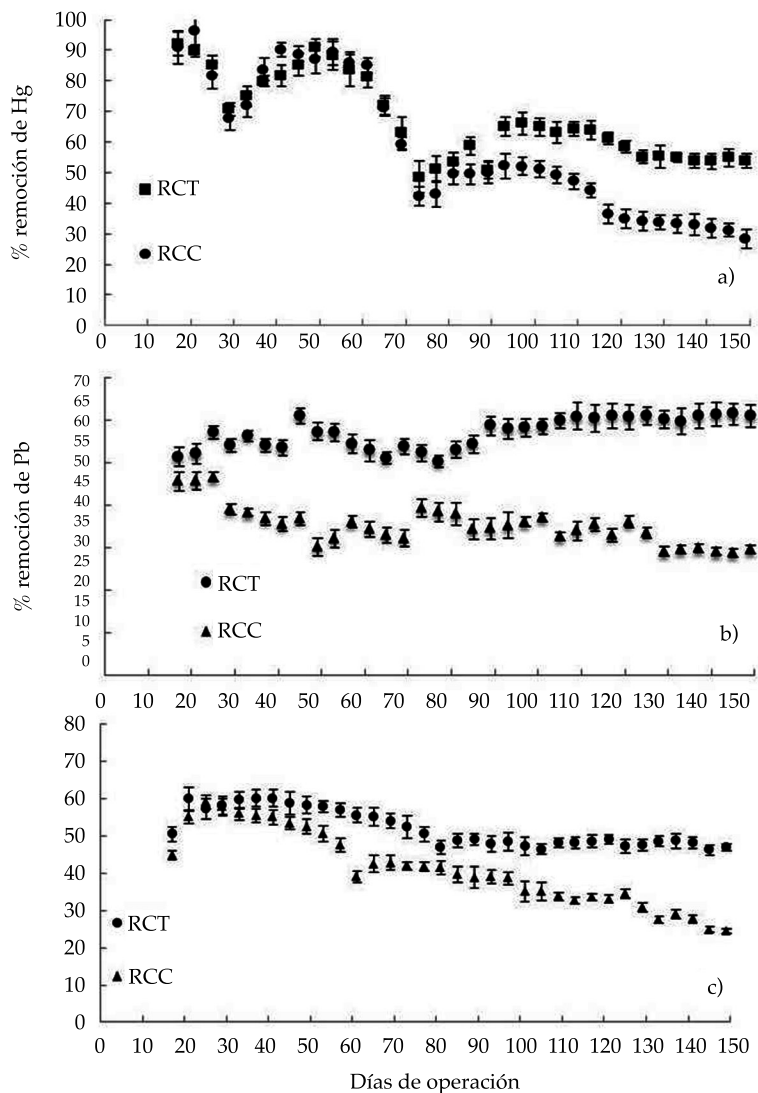


Figura 2. Resultados de la remoción de mercurio (figura 2a), plomo (figura 2b) y cromo (figura 2c), que exhibe cada uno de los tipos de reactores estudiados. RCC: reactores con cepas convencionales, RCT: reactores con cepas tolerantes (\pm desviación estándar).

además de que no lograron estabilidad en la eficiencia de remoción. Esta diferencia entre los sistemas RCT y RCC radica en el tipo de organismos con el que fueron inoculados, ya que en sus estudios, Salgado-Bernal *et al.* (2012) señalan que el consorcio de los reactores RCT posiblemente haya desarrollado la capacidad de tolerar y proliferar a ciertas concentraciones de metales pesados a través de adaptaciones generacionales, es decir, a pesar de verse inhi-

bidos por los metales pesados, su proliferación por fisión binaria permite que la población bacteriana sea estable (De, Ramaiah, & Vardanyan, 2008; Xie *et al.*, 2010). Esta diferencia se ve reflejada en el análisis estadístico, en el que se presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) a partir del día 80 de operación.

Las eficiencias de remoción de mercurio alcanzadas en este estudio se encuentran por debajo de las reportadas por De *et al.* (2008) y

por Filali *et al.* (2000), aunque las condiciones experimentales no son equiparables, ya que en estas dos investigaciones solamente realizaron pruebas *in vitro*, sin introducir las bacterias a condiciones operacionales de sistemas de tratamiento de agua residual.

En cuanto a la remoción de Pb, en la figura 2b se muestra que en el intervalo de 15 a 80 días, la eficiencia de remoción que exhiben los reactores inoculados con cepas tolerantes (RCT) oscila alrededor de 55%. Una vez transcurrido este intervalo de tiempo, el comportamiento es muy estable hasta el final de la operación, ya que las variaciones son menores a 5%. En efecto, una vez que se alcanza la máxima remoción (55%), la línea de tendencia se comporta de forma asintótica, lo cual probablemente se encuentra relacionado con la completa adaptación de las bacterias tolerantes a las condiciones de los humedales artificiales, en especial la interacción con la vegetación presente, ya que se tiene evidencia de que el plomo tiende a acumularse en el rizoma y las raíces de las plantas acuáticas durante los primeros días (Deng, Ye, & Wong, 2004), y precisamente en los primeros días de operación la remoción de plomo era alta de manera relativa, pero inestable (figura 2a). En este mismo orden de ideas, gran parte de la remoción exhibida durante los primeros 80 días de operación (figura 2b) es probable que se derive de la asimilación por parte de la rizosfera de la vegetación, la cual es mayor en los sistemas RCT, pues dicha asimilación se debe en gran medida al paso de los metales pesados, unidos a transportadores secundarios como las proteínas, a través de la membrana plasmática vegetal (Clemens, Plamgreen y Kramer, 2002; Guerinot, 2000), y precisamente los microorganismos asociados con la rizosfera promueven la regeneración de las proteínas y otros compuestos exudados por las plantas (Clemens *et al.*, 2002; Williams, Pittman y Hall, 2000).

Por su parte, los sistemas con bacterias convencionales (RCC) presentan una tendencia inversamente proporcional a los reactores RCT, decayendo en la remoción, hasta el día 80.

No obstante, a partir de este punto presentan variaciones cada vez menores, estabilizándose en los últimos 20 días de operación, aunque el porcentaje de remoción es alrededor de la mitad que el alcanzado por los RCT, encontrándose diferencias estadísticamente significativas a lo largo del factor tiempo ($P < 0.005$). Estos resultados denotan la habilidad de las bacterias para adaptarse a medios contaminados con plomo, y seguir desempeñando sus funciones metabólicas para interactuar con la vegetación y propiciar la remoción del metal, a pesar de no ser tolerantes en un principio, característica evolutiva que sugieren Rathnayake *et al.* (2010), y Vacca, Wand y Kuschik (2005). Esta afirmación coincide con lo mencionado por Lyer, Mody y Jha (2005), quienes establecen que los microorganismos contienen mecanismos naturales de desintoxicación de plomo por medio de exudados celulares, que a la vez funcionan como agentes quelantes.

Por último, la tendencia de remoción de cromo fue la que presentó el comportamiento más definido para ambos tipos de sistemas. En la figura 2c se observa que los reactores inoculados con cepas tolerantes (RCT) iniciaron con valores alrededor de 60% de remoción, que fue decayendo hasta 47% el día 80. A partir de este punto y hasta el último día de operación, la remoción fue estable alrededor de 50%, con variaciones menores a 10%. Este comportamiento contrasta con lo observado en los humedales artificiales con cepas convencionales (RCC), que presentaron cada vez menos eficiencia en la remoción de cromo conforme transcurría el tiempo. En los primeros días de operación alcanzaron remociones alrededor de 50%, pero esta eficiencia descendió hasta 24% al final de las pruebas de remoción; además, no se tuvo un comportamiento estable (figura 2c). De acuerdo con esto, los valores de los resultados entre ambos tipos de sistemas presentaron diferencias estadísticamente significativas a partir del día 40 de operación ($P < 0.05$). La mayor remoción registrada en los sistemas con cepas tolerantes es probable que se deba a lo mismo que ocurre con el plomo, en la que las bacterias tolerantes

tienen una relación sinérgica con la vegetación. Además, la literatura señala que el cromo es trasladado en mayor proporción que el plomo (Cheng *et al.*, 2002), situación que pudo haber propiciado que la remoción del cromo sea más estable que la del plomo, al exhibir movilidad en toda la planta y no sólo en las raíces (Khan *et al.*, 2009) (figuras 2b y 2c). Asimismo, como se había mencionado, las bacterias tolerantes a metales pesados presentan como uno de los mecanismos de protección la capacidad de reducir los cationes a través de enzimas reductasas (He *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2013) y en el presente estudio, esta reducción de valencia resulta beneficiosa en cuestiones de toxicidad para el caso del cromo.

Los porcentajes de remoción de cromo obtenidos en la presente investigación coinciden con los reportados por Kröpfelová, Vymazal, Švehla y Štichová (2009), y por Mant, Costa, Williams y Tambourgi (2006). Estos autores trabajaron con humedales artificiales y aguas residuales características de industrias curtidoras.

Los resultados de esta última parte experimental indicaron en general que, para los tres metales, los sistemas con presencia de bacterias tolerantes (RCT) lograron estabilizarse después de 100 días de operación, con lo cual proporcionan información a considerar en estudios a escala piloto y real sobre diseño, arranque, operación y niveles de remoción a obtener una vez estabilizados los humedales artificiales. En efecto, en las áreas de diseño y operación de sistemas de tratamiento de agua residual se requiere de una variación máxima de 10% en los efluentes (Crites & Tchobanoglous, 2000; Masters & Ela, 2008) y, en la presente investigación, se logró dicha estabilización, en especial para el caso del plomo, donde la variación del efluente fue alrededor de 5%.

Cabe mencionar que la anterior aportación, enfocada al escalamiento para tratar aguas con presencia de mercurio, plomo y/o cromo provenientes de industrias propias de la rama, resulta aplicable por los resultados obtenidos en los sistemas con cepas bacterianas tolerantes, cuya presencia dio lugar a la remoción estable de los metales pesados.

En este sentido, se sabe que los posibles mecanismos de remoción dentro de los humedales artificiales son la fitoextracción, la adsorción por parte del medio de empaque y la volatilización.

En efecto, la aportación de las cepas tolerantes a los sistemas es el incremento o mejora de estos mecanismos. En cuanto a la adsorción, las bacterias proliferan dentro de los humedales artificiales en forma de biomasa adherida al medio de empaque, lo que se conoce como biopelícula, la cual es un eficiente bioadsorbente de metales pesados (Chong, Ahmad, & Lim, 2009) que, de modo eventual, los va liberando en forma suspendida. Así, al ser organismos tolerantes, el crecimiento, desarrollo y regeneración de la biopelícula se tiene, a pesar de la presencia de metales pesados (Nies, 2003). Otro mecanismo maximizado por las bacterias tolerantes es la fitoextracción. En este fenómeno, la acumulación de los metales en los órganos vegetales se suscita porque estos cationes se encuentran unidos a proteínas bacterianas y las membranas de las raíces y rizomas son selectivas a dichas moléculas, permitiendo su ingreso. Esta modificación molecular a metaloproteínas es un mecanismo característico de microorganismos tolerantes a metales pesados (Schalk *et al.*, 2011), por lo cual también se encontraron diferencias significativas entre los dos tipos de sistemas evaluados. Este aumento en la fitoextracción propiciado por las bacterias tolerantes se hace más evidente en la remoción de mercurio, ya que es un elemento susceptible a ser evapotranspirado a través de los órganos superiores de la vegetación (Clemens, 2006), además de su transferencia a la atmósfera (volatilización) por su baja presión de vapor (Kabatas-Pendias & Pendias, 2001; Ventura *et al.*, 2005).

Con todo lo anterior, se pone de manifiesto la importancia de utilizar cepas tolerantes en humedales artificiales para la remoción de metales pesados. En este caso, la remoción de los tres metales fue similar (alrededor de 50%), aunque al considerar las concentraciones influentes mencionadas en párrafos anteriores,

no se logra cumplir con los límites máximos permisibles que establece la NOM-001-SE-MARNAT-1996 (DOF, 1996). No obstante, cabe resaltar que este hecho no es por el grado de eficiencia, sino por la alta concentración influente en tratamiento. Es decir, que aunque se hubieran obtenido eficiencias arriba de 95% de remoción, no se cumpliría con dicha norma. Ante esto, los pocos tratamientos de efluentes industriales con presencia de cromo, plomo y/o mercurio como contaminantes, siempre operan de manera secuencial o acoplados con otros sistemas (físicoquímicos o electroquímicos) (Fu & Wang, 2011; Khan *et al.*, 2009), los cuales podrían ser sustituidos por humedales artificiales como tratamiento principal o de pulimento en una segunda etapa, dado que son mucho más accesibles económica y operacionalmente, además de los beneficios colaterales que generan (Kadlec *et al.*, 2000; Kadlec y Wallace, 2009).

Conclusiones

Con base en los resultados de remoción de metales pesados por los sistemas en estudio, se puso de manifiesto el aporte de las cepas tolerantes en los humedales artificiales, al dar lugar a una mayor remoción y, sobre todo, al propiciar la estabilidad de dicha remoción. Este último aspecto hace factible su implementación como sistemas de tratamiento para aguas residuales que contengan mercurio, plomo y/o cromo.

Dado que la mayor remoción y estabilidad alcanzadas durante el tratamiento de metales pesados es probable que se deba a un incremento en los mecanismos de remoción que se suscitan dentro de los humedales (adsorción, fitoextracción y volatilización), es conveniente realizar estudios enfocados a identificar el papel que desempeñan las bacterias tolerantes en la acumulación y distribución de metales pesados dentro de los sistemas de humedales artificiales, considerando cada uno de los compartimientos implicados, los cuales son la vegetación, el medio de empaque, las bacterias y el efluente. Para este fin, los resultados del

presente estudio aportan criterios para la construcción y operación de los sistemas, basados en pruebas experimentales.

En función de las eficiencias de remoción alcanzadas y de las concentraciones de mercurio, cromo y plomo reportadas para los efluentes industriales, los humedales artificiales inoculados con las cepas tolerantes podrían ser una alternativa pertinente a implementar, necesariamente acoplada con un tratamiento físicoquímico para poder cumplir con lo estipulado en las normativas vigentes en la materia. Para poder corroborar esto, resulta conveniente la realización de estudios a escala piloto basados en los resultados de la presente investigación, ya que las concentraciones de metales pesados del influente, en función de las pruebas de toxicidad, y las características operacionales utilizadas, fueron las adecuadas, al garantizar la subsistencia y proliferación tanto de las bacterias como de la vegetación durante todo el tiempo de operación, además de encontrarse dentro de las reportadas para efluentes de industrias relacionadas con el uso y/o producción de los metales pesados.

Agradecimientos

El primer autor agradece la beca doctoral concedida por la Coordinación de Estudios de Posgrado de la UNAM y, posteriormente, por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México. Asimismo, los autores agradecen a la doctora Irina Salgado-Bernal, de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana, Cuba, las facilidades otorgadas para el uso de las cepas tolerantes a metales pesados aisladas por ella en el río Almendares de La Habana, Cuba. Las primeras mediciones de plomo se realizaron en la Universidad Autónoma de Campeche, México, con el valioso apoyo del doctor Jorge Arturo Benítez-Torres.

Referencias

- Aquiáhuatl, M. A., & Pérez, M. L. (2004). *Manual de prácticas del laboratorio de microbiología general* (75 pp.). México, DF: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Barakat, M. A. (2010). New Trends in Removing Heavy Metals from Industrial Wastewater. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, 1016-1034.

- Barrera, C., Romero, M., & Martínez, S. (2003). Chemical and Electrochemical Considerations on the Removal Process of Hexavalent Chromium from Aqueous Media. *Journal of Applied Electrochemistry*, 33, 61-71.
- Becerra-Castro, C., Monterroso, C., Prieto-Fernández, A., Rodríguez-Lamas, L., Loureiro-Viñas, M., Acea, M. J., & Kidd, P. S. (2012). *Pseudometallophytes colonising Pb/Zn Mine Tailings: A Description of the Plant-Microorganism-Rhizosphere Soil System and Isolation of Metal-tolerant bacteria. Journal of Hazardous Materials*, 217-218, 350-359.
- Black, J. G. (1999). *Microbiology: Principles and Explorations* (786 pp.). 4th edition. New York: Prentice Hall.
- CEPIS (2001). *Manual de evaluación y manejo de sustancias tóxicas en aguas superficiales* (24 pp.). Washington, DC: Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente, Organización Panamericana de la Salud, División de Salud y Ambiente, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud.
- Cheng, S., Grosse, W., Karrenbrock, F., & Thoennessen, M. (2002). Efficiency of Constructed Wetlands in Decontamination of Water Polluted by Heavy Metals. *Ecological Engineering*, 18, 317-325.
- Chong, H. L. H., Ahmad, M. N., & Lim, P. E. (2009). Growth of *Thypha angustifolia* and Media Biofilm Formation in Constructed Wetlands with Different Media. *Borneo Sciences*, 25(1), 11-21.
- Clemens, S. (2006). Toxic Metal Accumulation, Responses to Exposures and Mechanisms of Tolerance in Plants. *Biochemie*, 88, 1707-1719.
- Clemens, S., Plamgren, M. G., & Kramer, U. (2002). A Long Way Ahead: Understanding and Engineering Plant Metal Accumulation. *Trends Plant Science*, 7, 309-315.
- Çolak, F., Atar, N., Yazicioğlu, D., & Olgun, A. (2011). Biosorption of Lead from Aqueous Solutions by *Bacillus* Strains Possessing Heavy-metal Resistance. *Chemical Engineering Journal*, 173(2), 422-428.
- Congeevaram, S., Dhanaran, S., Park, J., Dexilin, M., & Kaliannan, T. (July, 2007). Biosorption of Chromium and Nickel by Heavy Metal Resistant Fungal and Bacterial Isolates. *Journal of Hazardous Materials*, 146(1-2), 270-277.
- Crites, R., & Tchobanoglous, G. (2000). *Tratamiento de aguas residuales en pequeñas poblaciones* (776 pp.). Bogotá: McGraw-Hill.
- De, J., Ramaiah, N., & Vardanyan, L. (2008). Detoxification of Toxic Heavy Metals by Marine Bacteria Highly Resistant to Mercury. *Marine Biotechnology*, 10, 471-477.
- Deng, H., Ye, Z. H., & Wong, M. H. (November, 2004). Accumulation of Lead, Zinc, Cooper and Cadmium by 12 Wetland Plant Species Thriving in Metal-contaminated Sites in China. *Environmental Pollution*, 132(1), 29-40.
- De Souza, M. P., Huang, C. P. A., Chee, N., & Terry, N. (August, 1999). Rhizosphere Bacteria Enhance the Accumulation of Selenium and Mercury in Wetland Plants. *Planta*, 209(2), 259-263.
- Di Salvatore, M., Carafa, A. M., & Carratú, G. (November, 2008). Assessment of Heavy Metal Phytotoxicity Using Seed Germination and Root Elongation Tests: A Comparison of Two Growth Substrates. *Chemosphere*, 73(9), 1461-1464.
- DOF (1996). Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996 Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. *Diario Oficial de la Federación*. México, DF: Poder Ejecutivo Federal.
- Filali, B. K., Taoufik, J., Zeroyal, Y., Dzairi, F.Z., Talbi, M., & Blaghhen, M. (2000). Waste Water Bacterial Isolate Resistant to Heavy Metal and Antibiotics. *Current Microbiology*, 41, 151-156.
- Fu, F., & Wang, Q. (2011). Removal of Heavy Metal Ions from Wastewaters: A Review. *Journal of Environmental Management*, 92, 407-418.
- Guerinot, M. L. (May, 2000). The ZIP Family of Metal Transporters. *Biochemica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1465(1-2), 190-198.
- Han, F. X., Su, Y., Monts, D. L., Waggoner, C. A., & Plodinec, M. J. (September, 2006). Binding, Distribution, and Plant Uptake of Mercury in a Soil from Oak Ridge, Tennessee, USA. *Science of the Total Environment*, 368(2-3), 753-768.
- He, M., Li, X., Liu, H., Miller, S.J., Wang, G., & Rensing, C. (2011). Characterization and Genomic Analysis of a Highly Chromate Resistant and Reducing Bacterial Strain *Lysinibacillus fusiformis* ZC1. *Journal of Hazardous Materials*, 185(2-3), 682-688.
- INE (2004). Instituto Nacional de Ecología. La contaminación por mercurio en México. *Gaceta Ecológica*, 72, 21-34.
- Jin, R. C., Yang, G. F., Yu, J. J., & Zheng, P. (2012). The Inhibition of the Anammox Process: A Review. *Chemical Engineering Journal*, 197, 67-79.
- Kabatas-Pendias, A., & Pendias, H. (2001). *Trace Elements in Soils and Plants* (412 pp.). 3th edition. Florida, USA: CRC Press.
- Kadlec, R. H., Knight, R., Vymazal, J., Brix, H., Cooper, P., & Haberl, R. (2000). *Constructed Wetlands for Pollution Control. Processes, Performance, Design and Operation*. London: IWA Publishing, 156 pp.
- Kadlec, R. H., & Wallace, S. (2009). *Treatment Wetlands* (1016 pp.). 2nd edition. Florida, USA: CRC Press.
- Karvelas, M., Katsoyiannis, A., & Samara, C. (2003). Occurrence and Fate of Heavy Metals in the Wastewater Treatment Process. *Chemosphere*, 53(10), 201-210.
- Khan, S., Ahmad, I., Shah, M. T., Rehman, S., & Khaliq, A. (2009). Use of Constructed Wetlands for the Removal of Heavy Metals from Industrial Wastewater. *Journal of Environmental Management*, 90, 3451-3457.
- Kröpfelová, L., Vymazal, J., Švehla, J. Y., & Štichová J. (April, 2009). Removal of Trace Elements in Three Horizontal Sub-surface Flow Constructed Wetlands in the Czech Republic. *Environmental Pollution*, 157(4), 1186-1194.

- Kumar, M., Kaur, N., Gautam, K., Pathak, R. K., Khasa, Y. P., & Gupta, L. R. (2013). Reporting Heavy Metal Resistance Bacterial Strains from Industrially Polluted Sites of Northern India Using Fatty Acid Methyl Ether (FAME) Analysis and Plasma Atomic Emission Spectroscopy (ICP-AES). *Advanced Science Letters*, 19(11), 3311-3314.
- Lavado, C., Sun, M. R., & Bendezu, S. (2010). Adsorción de plomo de efluentes industriales usando carbones activados con H_3PO_4 . *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 76(2), 1810-1836.
- Loredo, J., Álvarez, R., & Ordóñez, A. (2003). Release of Toxic Metals and Metalloids from Los Ruedos Mercury Mine (Asturias, Spain). *Science of the Total Environment*, 340, 247-260.
- Lüderitz, V. (2004). Towards Sustainable Water Resources Management: A Case Study from Saxony-Anhalt, Germany. *Management of Environmental Quality: An International Journal*, 15(1), 17-24.
- Lyer, A., Mody, K., & Jha, B. (March, 2005). Biosorption of Heavy Metals by a Marine Bacterium. *Marine Pollution Bulletin*, 50, 340-343.
- Mant, C., Costa, S., Williams, J., & Tambourgi, E. (October, 2006). Phytoremediation of Chromium by Model Constructed Wetland. *Bioresource Technology*, 97(15), 1767-1772.
- Masters, G., & Ela, W. (2008). *Introduction to Environmental Engineering* (708 pp.). 3th edition. New York: Prentice Hall.
- Nagajyoti, P. C., Lee, K. D., & Sreekanth, T. V. M. (2010). Heavy Metals, Occurrence and Toxicity for Plants: A Review. *Environmental Chemical Letters*, 8, 199-216.
- Nies, D. H. (June, 2003). Efflux Mediated Heavy Metals Resistance in Prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3), 313-339.
- Orduña-Bustamante, M. A., Vaca-Mier, M., Escalante-Estrada, J. A., & Durán-Domínguez-De-Bazúa, M. C. (2011). Nitrogen and Potassium Variation on Contaminant Removal for a Vertical Subsurface Flow Lab Scale Constructed Wetland. *Bioresource Technology*, 102, 7745-7754.
- Puigagut, J., Caselles-Osorio, A., Vaello, N., & García, J. (2008). Fractionation Biodegradability and Particle-size Distribution of Organic Matter in Horizontal Subsurface-Flow Constructed Wetland (pp. 289-297). In J. Vymazal (Ed.). *Wastewater Treatment, Plant Dynamics and Management in Constructed and Natural Wetlands*. ed. Czech Republic: Springer Netherlands.
- Ramírez, R. M., Luna, B., Velázquez, O., Hernández, L., Müggenburg, I., Camacho, A., & Urzúa, M. C. (2011). *Manual de prácticas de microbiología general* (159 pp.) Sexta edición. México, DF: Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rathnayake, I. V. N., Megharaj, M., Bolan, N., & Naidu, R. (2010). Tolerance of Heavy Metals by Gram Positive Soil Bacteria. *International Journal of Civil and Environmental Engineering and Technology*, 2(4), 191-195.
- Salgado-Bernal, I., Carballo-Valdés, M. E., Martínez-Sardiñas, A., Cruz-Arias, M. & Durán-Domínguez-De-Bazúa, M. C. (julio-septiembre, 2012). Interacción de aislados bacterianos rizosféricos con metales de importancia ambiental Rhizosphere Bacterial Isolates Environmentally Significant Metals. *Tecnología y Ciencias del Agua*, 3(3), 83-95.
- Schalk, I. J., Hannaver, M., & Braud, A. (2011). New Roles for Bacterial Siderophores in Metal Transport and Tolerance. *Environmental Microbiology*, 13(11), 2844-2854.
- Schlüter, K. (January, 2000). Review: Evaporation of Mercury from Soils. An Integration and Synthesis of Current Knowledge. *Environmental Geology*, 39(3-4), 249-271.
- Sobrero, M. C., & Ronco, A. (2004). Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) (pp. 71-79). En G. Castillo (Ed.). *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones* ed. G. . Ottawa: Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo e Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.
- SSA (2006). *Programa de Acción: Salud Ambiental* (210 pp.). México, DF: Secretaría de Salud, Programa Secretarial.
- USEPA (1996). *Method 3005A. Acid Digestion of Waters for Total Recoverable or Dissolved Metals for Analysis by FLAA or ICP Spectroscopy* (5 pp.). Cincinnati, Ohio: Environmental Protection Agency.
- USEPA (2000). *Constructed Wetlands Treatment of Municipal Wastewaters* (165 pp.). Cincinnati, Ohio: United States Environmental Protection Agency.
- Vaca, G., Wand, H., & Kusch, P. (April, 2005). Effect of Plants and Filter Materials on Bacteria Removal in Pilot Scale Constructed Wetlands. *Water Research*, 39(7), 1361-1373.
- Ventura, D. F., Simoes, A. L., Tomaz, S., & Costa, M. F. (2005). Colour Vision and Contrast Sensitivity Losses of Mercury Intoxicated Industry Workers in Brazil. *Environmental Research*, 77(2), 173-177.
- Viti, C., Pace, A., & Giovannetti, L. (2003). Characterization of Cr(VI)-resistant Bacteria Isolated for Chromium-contaminated Soil by Tannery Activity. *Current Microbiology*, 46, 1-5.
- Walter, I., Martínez, F., & Cala, V. (February, 2006). Heavy Metal Speciation and Phytotoxicity Effects of Three Representative Sewage Sludge for Agricultural Uses. *Environmental Pollution*, 139(3), 507-514.
- Williams, L. E., Pittman, J. K., & Hall, J. L. (May, 2000). Emerging Mechanisms for Heavy Metal Transport in Plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1465(1-2), 104-126.
- Winter, K. J., & Goetz, D. (2003). The Impact of Sewage Composition on the Soil Clogging Phenomena of Vertical Flow Constructed Wetlands. *Water Science and Technology*, 48(5), 9-14.

Wood, A. (1995). Constructed Wetlands in Water Pollution Control: Fundamentals to their Understanding. *Water Science and Technology*, 32(3), 21-29.

Xie, X., Fu, J., Wang, H., & Liu, J. (June, 2010). Heavy Metal Resistance by Two Bacteria Strains Isolated from a Copper Mine Tailing in China. *African Journal of Biotechnology*, 9(26), 4056-4066.

Dirección institucional de los autores

M.I. Leonel E. Amábilis-Sosa

Dra. María del Carmen Durán-Domínguez-De-Bazúa

Facultad de Química

Universidad Nacional Autónoma de México

Conjunto E, Ciudad Universitaria s/n

Delegación Coyoacán

04510 México, D.F., MÉXICO

Teléfono: 52 (55) 5622 5300 al 04

leoamabilis@yahoo.com.mx

mcduran@unam.mx

Dra. Christina Siebe

Instituto de Geología

Universidad Nacional Autónoma de México

Ciudad Universitaria s/n

Delegación Coyoacán

04510 México, D.F., MÉXICO

Teléfono: 52 (55) 5622 4265, extensión 155

siebe@unam.mx

Dra. Gabriela Moeller-Chávez

Universidad Politécnica del Estado de Morelos

Paseo Cuauhnáhuac 566, Colonia Lomas del Texcal

62550 Jiutepec, Morelos, MÉXICO

Teléfono: 52 (777) 2293533

gabriela.moeller@gmail.com