

REMOCIÓN DE MERCURIO POR *Phragmites australis* EMPLEADA COMO BARRERA BIOLÓGICA EN HUMEDALES ARTIFICIALES INOCULADOS CON CEPAS TOLERANTES A METALES PESADOS

Leonel Ernesto AMABILIS-SOSA^{1*}, Christina SIEBE², Gabriela MOELLER-CHÁVEZ³ y María del Carmen DURÁN-DOMÍNGUEZ-DE-BAZÚA¹

¹ Facultad de Química Conjunto E, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Circuito de la Investigación Científica s/n, Delegación Coyoacán, México D.F., México, C.P. 04510

² Instituto de Geología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Circuito de la Investigación Científica s/n, Delegación Coyoacán, México D.F., México, C.P. 04510

³ Universidad Politécnica del Estado de Morelos, Boulevard Cuauhnáhuac 566, Colonia Lomas del Texcal, Jiutepec, Morelos, México C.P. 062550

*Autor para correspondencia: leoamabilis@yahoo.com.mx

(Recibido enero 2015; aceptado junio 2015)

Palabras clave: biorremediación de mercurio, bacterias metalotolerantes, evapotranspiración de mercurio

RESUMEN

En la presente investigación se evaluó la acumulación y distribución de mercurio en carrizo (*Phragmites australis*) usado como barrera biológica en humedales artificiales (HA) durante el tratamiento de agua residual. Se construyeron seis HA sembrados con carrizos, de los cuales tres fueron inoculados con bacterias tolerantes a metales pesados y los otros sin inoculación. También fueron construidos otros tres sistemas sin plantas ni inoculación, que fungieron como control. El agua de alimentación fue residual sintética con 0.11 mg/L de mercurio, valor establecido en estudios previos y reportado para efluentes de industrias relacionadas con el uso del metal. Después de 304 días de operación, los sistemas con carrizo y bacterias metalotolerantes, removieron el 73 % del mercurio total. Con valores similares, los sistemas con la vegetación pero sin las bacterias tolerantes, removieron 66 % del metal. En ambos sistemas el mercurio fue transferido, en su mayoría, a la atmósfera por la acumulación, translocación y transpiración que exhibe el carrizo. Por otra parte, los sistemas usados como testigos removieron el 33 % del mercurio total y fueron los que transfirieron la menor cantidad del metal hacia la atmósfera. Los resultados obtenidos en este estudio aportan información básica para ampliar el conocimiento sobre la factibilidad técnica de utilizar HA para el tratamiento de aguas residuales con contenido de mercurio.

Key words: mercury bioremediation, metalotolerant bacteria, mercury evapotranspiration

ABSTRACT

In this study, accumulation and distribution of mercury in common reed (*Phragmites australis*) as a biological barrier in constructed wetlands (CW) were assessed during wastewater treatment. Six CW, planted with common reed, were built, three of them were inoculated with heavy metal-tolerant strains and the other three were

non-inoculated. Also three systems unplanted and non-inoculated were built as control. The feeding water was synthetic wastewater with 0.11 mg/L of mercury, value established in previous studies and reported for effluents of industries related to the use of this metal. After 304 operation days, systems with common reed and metal-tolerant bacteria were able to remove 73 % of total mercury. With similar values, systems with vegetation but without metal-tolerant bacteria, removed 66 % of it. In both systems, mercury was transferred, mostly, to atmosphere due to accumulation, translocation and transpiration exhibited by reed. Meanwhile, systems used as control, removed 52 % of total mercury and transferred the lowest amount of metal to the atmosphere. The results obtained from this study give important basic data to expand knowledge about the technical feasibility of using CW to treat wastewaters containing mercury.

INTRODUCCIÓN

Entre los problemas que enfrenta la sociedad actual destacan los relacionados con la contaminación del agua por la magnitud y diversidad que presentan. Como parte de éstos, la contaminación con metales pesados (MP) constituye una de las principales amenazas por su alta toxicidad y persistencia en el ambiente (Rajaganapathy *et al.* 2011, CONAGUA 2014). Dentro de los metales contaminantes sobresale el mercurio por su alta interacción con moléculas orgánicas en la cadena trófica y por sus características físicas y químicas que dificultan su control, manejo y tratamiento (Pirrone y Mahaffey 2005, Porto *et al.* 2005, Fu y Wang 2011).

Existen numerosas prácticas industriales que liberan mercurio al ambiente, tales como la minería, la producción de compuestos clorados e hidróxido de sodio, el tratamiento de residuos y la industria automotriz (Hylander y Goodsite 2006, Fu y Wang 2011). A pesar de ello, no se cuenta con sistemas para su tratamiento en aguas residuales, que sean tanto eficientes como asequibles para la mayoría de las poblaciones. En este sentido, los humedales artificiales (HA) pueden ser una alternativa, en especial en países en vías de desarrollo, dado sus bajos costos de instalación, operación y mantenimiento. Diversos estudios han demostrado su efectividad en la remoción de MP por la interacción biológica que se da entre organismos (autótrofos y heterótrofos) y el medio de empaque (Cheng *et al.* 2002). En efecto, Anjum *et al.* (2012) y Lominchar *et al.* (2015) reportan altas cantidades de mercurio en las especies de *Phragmites australis* y *Typha domingensis* presentes en humedales naturales. Además, recientemente se han investigado microorganismos procarióticos que presentan tolerancia a los MP, lo que plantea la posibilidad de utilizar HA inoculados con cepas metalotolerantes para la remoción de mercurio en aguas residuales.

Con base en lo anterior, el presente estudio tuvo como objetivos analizar la acumulación y la distribución de mercurio removido por el carrizo (*Phragmites australis*) como barrera biológica en un sistema de HA y su interacción con bacterias tolerantes a MP, lo que permitirá conocer la factibilidad técnica de utilizar estos sistemas para reducir la contaminación de aguas residuales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones y características experimentales

Se utilizaron nueve humedales artificiales (HA) a escala de laboratorio construidos con cilindros de cloruro de polivinilo de 39 cm de altura y 20 cm de diámetro. Los contenedores fueron llenados con roca volcánica denominada tezontle con diámetro de partícula de 4.2 mm y porosidad de 38 %, según las especificaciones de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, por sus siglas en inglés, 2000). En ellos, se mantuvo una columna de agua de 5 cm por debajo del nivel del tezontle, lo que resultó en un volumen de llenado de 4.06 L y una relación altura/diámetro de 1.7, proporciones sugeridas para este tipo de sistemas a escala de laboratorio (Wood 1995, Winter y Goetz 2003, Puigagut *et al.* 2008). Seis de los nueve reactores fueron sembrados con la macrófita *Phragmites australis*, de los cuales tres fueron inoculados con un consorcio de cepas bacterianas tolerantes a metales pesados (HAVI), mientras que otros tres no fueron inoculados (HAV). Los tres reactores restantes solamente contenían el medio de empaque (tezontle) y se consideraron como testigos (HC). Así, se contó con tres réplicas para cada HA estudiado.

Los ejemplares de *P. australis* utilizados son procedentes del HA de viveros de Coyoacán, Ciudad de México, con las consideraciones fisonómicas requeridas para este tipo experimento, que son la altura de

los tallos de aproximadamente 30 cm, longitud de las raíces alrededor de 10 cm y rizomas con cinco nudos (Kadlec y Wallace 2009). En esta etapa los rizomas y raíces de la vegetación de los tres HAVI fueron esterilizados con NaClO y C₂H₆O (De Souza *et al.* 1999) para que solamente contuvieran al consorcio bacteriano de interés.

Para la inoculación de los humedales HAVI, se empleó un consorcio microbiano conformado por bacterias del género *Bacillus*, que proviene de estudios previos a este trabajo por Salgado-Bernal *et al.* (2012). El inóculo tuvo una densidad de 4.5 x 10⁷ UFC/mL, obtenido durante la fase estacionaria de los cultivos bacterianos.

Los nueve HA operaron durante 304 días con alimentación discontinua (por lotes) de agua sintética cada cuatro días. La composición de esta agua de alimentación fue similar a la composición de aguas residuales municipales, con la adición de mercurio (**Cuadro I**).

Al transcurrir los 304 días de operación, se extrajeron las seis plantas (una por humedal) y se separaron en su sección hipogea (rizomas y raíces) y epigea (hojas y tallos). Posteriormente, todas las muestras fueron secadas a 70 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo se pulverizó el material para el análisis del contenido de mercurio en las plantas y del material de soporte. Para ello, se realizó una digestión ácida según el procedimiento analítico de Allen (1990) y Dulski (1996) y se determinó la concentración de mercurio en cada una de las muestras obtenidas (vegetación, medio de empaque, influente y efluente) por espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros, según el protocolo de USEPA (1996).

Acumulación y distribución de mercurio en la vegetación y otros compartimentos ambientales

Además de la vegetación, los posibles destinos ambientales del mercurio en los HA fueron el medio

de empaque, el efluente (agua retirada del humedal una vez transcurridos los cuatro días de tiempo de recambio de agua o reacción) y el volatilizado. Por lo que para conocer el efecto real de la vegetación sobre la remoción del mercurio, se cuantificó el metal en cada uno de los compartimentos ambientales mencionados. Acorde con esto, se realizó un balance de masa considerando el volumen de cada HA uniforme (4.06 L) y los cambios de agua que fueron realizados cada cuatro días durante los 304 días de operación (76 recambios de agua en total). Finalmente, la masa total de mercurio determinada en el efluente de cada sistema se calculó con la siguiente ecuación:

$$Hg_{\text{efluente}} \equiv 4.06 L \times 76 \sum_{t_4}^{t_{304}} Ct_4, Ct_8, Ct_{12} \dots Ct_{304}$$

donde: Hg_{efluente} = masa total de mercurio en el efluente no acumulada ni volatilizada (mg), Ct = concentración determinada en el día de operación respectivo (mg/L).

Para el influente (agua de alimentación de los humedales incorporada en cada tiempo de recambio de agua), la concentración de mercurio fue siempre la misma (0.11 mg/L), por lo que la masa del metal influente se calculó con la siguiente ecuación:

$$Hg_{\text{influyente}} \equiv (4.06 \times 76) \sum_{t_4}^{t_{304}} 0.11$$

donde: Hg_{influyente} = masa total del metal en el influente (mg).

La masa total de mercurio acumulada en la parte aérea de las plantas (Hg_{epigea}) se calculó al multiplicar la concentración del metal de cada muestra digerida (mg/kg), por su biomasa seca. La masa total en la parte radical (Hg_{vegetación hipogea}) se determinó de la

CUADRO I. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AGUA RESIDUAL SINTÉTICA UTILIZADA PARA LA ALIMENTACIÓN DE LOS HUMEDALES DURANTE EL TIEMPO DE OPERACIÓN

Constituyente	Concentración (mg/L)	Sal utilizada	Referencia
C*	400	C ₆ H ₂₂ O ₁₁	Stefanakis <i>et al.</i> 2014
N	30	(NH ₄) ₂ SO ₄	
P	6	NaH ₂ PO ₄	Orduña-Bustamante <i>et al.</i> 2011
K	30	KNO ₃	
Hg total	0.11	HgCl ₂	Salgado-Bernal <i>et al.</i> 2012

misma manera, al igual que la masa del mercurio total adherido al medio de empaque (Hg_{empaque}). El mercurio volatilizado ($Hg_{\text{volatilizado}}$) se determinó teóricamente con la ecuación:

$$Hg_{\text{volatilizado}} \equiv Hg_{\text{influyente}} - (Hg_{\text{efluente}} + Hg_{\text{epigea}} + Hg_{\text{hipógea}} + Hg_{\text{empaque}})$$

Análisis estadísticos

Para determinar las diferencias estadísticas entre los valores obtenidos para cada uno de los tres HA, se aplicó un análisis de varianza de un factor (mercurio acumulado) en conjunto con la prueba de rangos múltiples de Duncan. El grado de certeza de las pruebas fue del 95 % ($\alpha = 0.05$). Previamente, se evaluó la normalidad y homogeneidad de los datos con la prueba de Kolmogorov-Smirnov, con el paquete Minitab 15.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Acumulación y volatilización del mercurio en los humedales artificiales

La **figura 1** muestra la cantidad de mercurio acumulado y volatilizado en cada uno de los sistemas evaluados. Con base en los cálculos realizados, ingresaron 33.94 mg de mercurio, de los cuales el sistema con carrizo e inoculación bacteriana (HAVI) acumuló 11.14 mg (± 1.01 mg), seguido por los sistemas con carrizo sin inocular (HAV) con 9.08 mg (± 0.92 mg). Por último, los sistemas que presentaron menor acumulación fueron los que sólo contenían el medio de empaque (HC) con 6.5 mg (± 0.63 mg). El análisis estadístico evidenció diferencias significativas entre los tres sistemas ($P < 0.05$), en el que también se obtuvo como resultado que los sistemas con vegetación fueron diferentes al que se encontraba solamente empacado con tezontle. Esta similitud y mayor acumulación en los sistemas HAVI y HAV se relaciona con la capacidad de la vegetación para acumular metales pesados. Al respecto, Patra y Sharma (2000), Clemens *et al.* (2002) y Clemens (2006) mencionan que los MP se ligan con los ácidos carboxílicos (uniones a malato y citrato) y los exudados radicales, lo que permite que atraviesen las membranas de la raíz y del rizoma para después ser precipitados en la vacuola y posteriormente transportados por el xilema hacia las hojas y los tallos. En estos órganos de las plantas el mercurio puede encontrarse como especie orgánica, ya sea como metilmercurio o dimetilmercurio. Esta última se caracteriza por su alta volatilidad (Mason

y Sullivan 1998, Kabatas-Pendias y Pendias 2001), lo cual podría relacionarse con el hecho de que los sistemas HAVI y HAV hayan transferido mayor cantidad de mercurio a la atmósfera en comparación con el sistema HC que no contenía vegetación (**Fig. 1**).

Aunado a lo anterior, en solución acuosa, el dimetilmercurio sólo existe en condiciones neutras y oxidantes, que son precisamente en las que operaron los HA (Parequetti *et al.* 2004). Las condiciones físicas y químicas del medio acuoso también dan lugar al mercurio en su estado elemental, el cual además del dimetilmercurio, es la otra forma química del metal que tiende a volatilizarse debido a la presión de vapor (Kabata-Pendias y Pendias 2001, Ventura *et al.* 2005). Este hecho puede explicar que el sistema HC a pesar de no contener plantas ni bacterias, haya transferido a la atmósfera alrededor de 4 mg (± 0.45 mg) de mercurio al término de los 304 días de operación, aunque fue significativamente menor ($P < 0.05$) que la cantidad transferida por los sistemas con vegetación (**Fig. 1**).

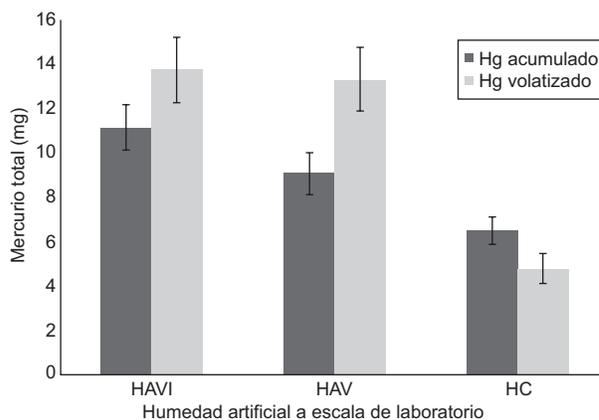


Fig. 1. Masa promedio de mercurio acumulado y volatilizado en cada uno de los sistemas de humedales artificiales evaluados. Se presenta la desviación estándar de las tres réplicas por sistema. HAVI = Humedal artificial con vegetación e inoculado, HAV = Humedal artificial con vegetación, HC = Humedal testigo (sin plantas ni inóculo)

Distribución del mercurio acumulado en los diversos compartimentos que integran los humedales artificiales

Los cuatro posibles destinos del mercurio ingresado en los HA son la vegetación, el medio de empaque, la evapotranspiración y el mercurio no removido en el efluente, según lo reportan Stottmeister *et al.* (2003). Al respecto, en la **figura 2** se indica la distribución del mercurio al término de los 304 días de operación. Los sistemas HAVI y HAV presentaron similitud

estadística ($P > 0.05$) en todos los compartimentos evaluados (**Fig. 2a y 2b**), lo cual puede estar relacionado con la capacidad que tienen las macrófitas emergentes para acumular cationes independientemente de la densidad y diversidad bacteriana presente en el sistema (Weis y Weis 2004, Sheoran y Sheoran 2006). En contraparte, la capacidad de acumulación de metales pesados que exhibe el material de empaque se encuentra en función de la cantidad de microorganismos asociados o adheridos a él, ya que en conjunto dan lugar a un bioadsorbente con capacidad de realizar intercambio iónico con los metales (Akar y Divriklioglu 2010, Zhang 2011). En efecto, el HAVI acumuló 7 % más de mercurio que el HAV (**Fig. 2a y 2b**). Este último contiene microorganismos convencionales asociados a la rizósfera, por lo que pudieron verse inhibidos y por ello, tener una menor capacidad de bioadsorción en comparación con los utilizados en el HAVI, tal y como lo describen Von Canstein *et al.* (1999) y Teitzel y Parsek (2003).

Con base en lo expuesto acerca de la acumulación de mercurio en la vegetación y el medio de empaque, era de esperarse que el sistema HC removiera significativamente menor cantidad del metal al compararlo con los sistemas con carrizo ($P < 0.05$). Estos últimos sistemas removieron 33 % del total ingresado, del cual el 21 % fue transferido a la atmósfera (**Fig. 2c**). Este fenómeno físico se relaciona con el gradiente de concentraciones que experimenta el mercurio metálico, que al igual que las formas metiladas del metal, se suscita en ambientes con condiciones similares a las de los HA utilizados (Von Canstein *et al.* 1999, Ventura *et al.* 2005).

Distribución del mercurio acumulado en *Phragmites australis*

La **figura 3** muestra la distribución del mercurio acumulado en los carrizos de los sistemas HAVI y HAV. La raíz y el rizoma constituyen la sección radical de la planta en las que no se encontraron diferencias entre los dos HA ($P > 0.05$). No obstante, tanto la cantidad de mercurio en el tallo como en las hojas fue diferente de manera significativa para los dos HA ($P < 0.05$). En la **figura 3a** se señala que el HAVI acumuló significativamente mayor cantidad del metal en las hojas que en el tallo ($P < 0.05$). Por su parte, en la **figura 3b** se indica que la vegetación presente del HAV acumuló 48 % de mercurio en las hojas y 41 % en el tallo, sin diferencias significativas entre los dos ($P > 0.05$).

Cabe mencionar que independientemente de la diferente distribución de mercurio en los HA sembrados con carrizo (HAVI y HAV), ambos acumularon

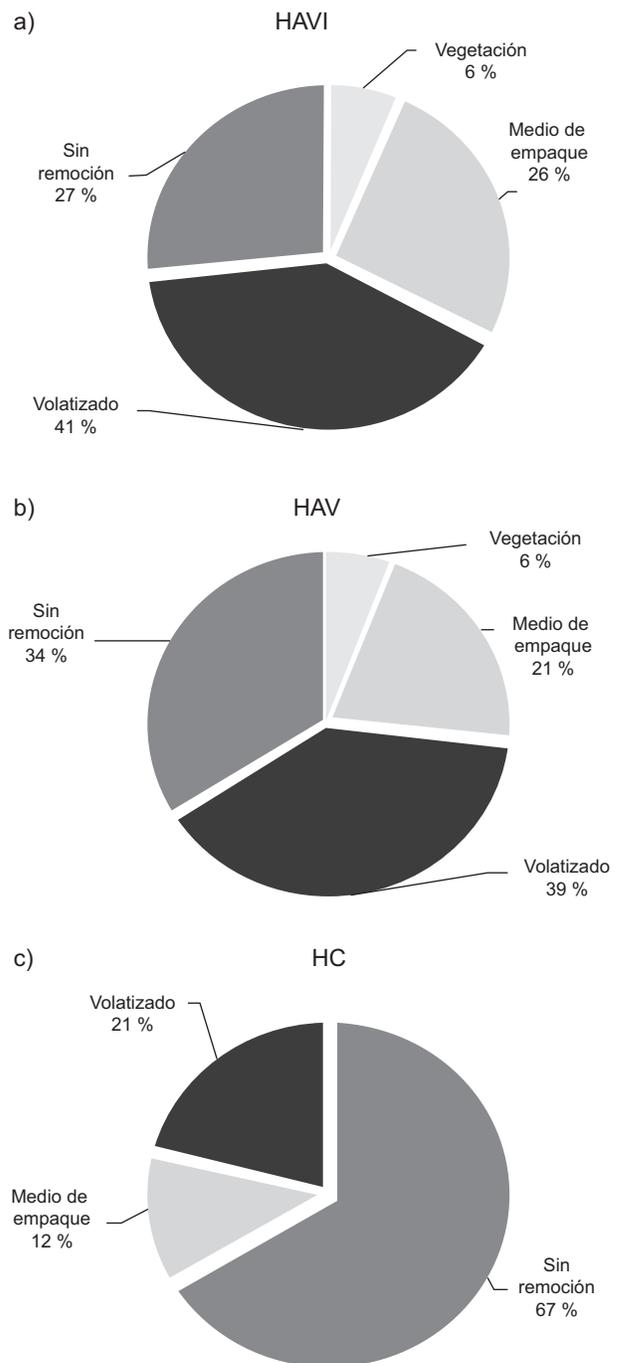


Fig. 2. Distribución del mercurio en humedales artificiales por compartimento ambiental. HAVI = Humedal artificial con vegetación e inoculado, HAV = Humedal artificial con vegetación, HC = Humedal testigo (sin plantas ni inóculo)

en la planta sólo el 6 % del mercurio total ingresado al sistema, tal y como se indica en la **figura 2a y 2b**.

La importancia que exhibió el carrizo como sistema de tratamiento de aguas residuales en los HA fue

la capacidad de translocar el metal para propiciar su continua volatilización (**Fig. 2**). Acorde con LeDuc y Terry (2005) y Clemens (2006), se trata de un mecanismo de desintoxicación de algunos metales como el mercurio, que no tienen afinidad por la raíz, aunque también es dependiente de la especie vegetal (García-Gallegos *et al.* 2011).

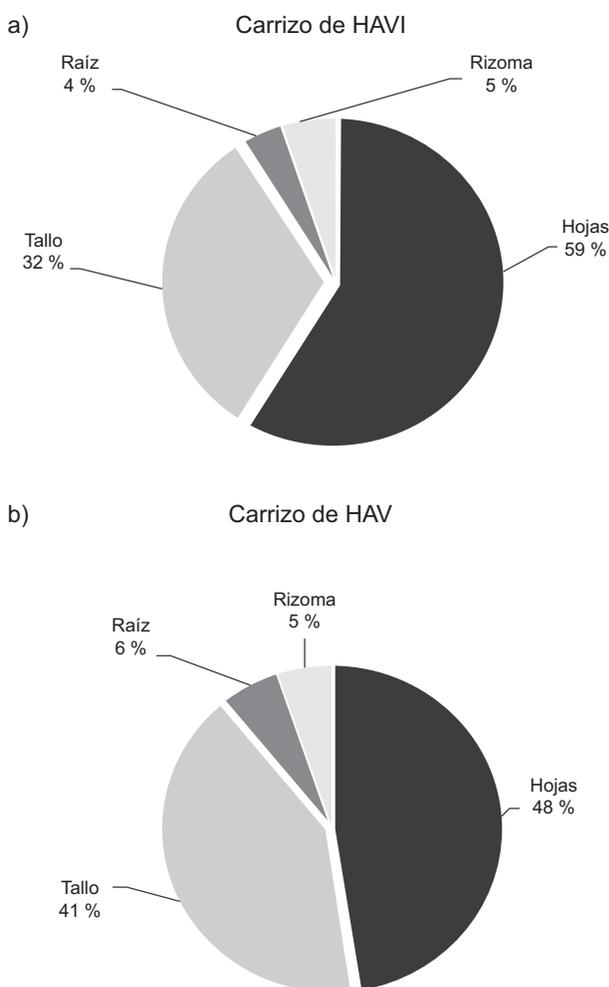


Fig. 3. Distribución de mercurio en *Phragmites australis* a 304 días de establecido el sistema. HAVI = Humedal artificial con vegetación e inoculado, HAV = Humedal artificial con vegetación, HC = Humedal control (sin plantas ni inóculo)

CONCLUSIONES

Con base en los resultados del presente trabajo es posible concluir que *Phragmites australis* puede ser utilizada como barrera biológica para mercurio en HA sin que la presencia de las bacterias metalotolerantes influya sobre la remoción y acumulación del metal dentro del sistema. No obstante, los resul-

tados también indicaron que la mayor proporción del mercurio removido es transferido a la atmósfera por volatilización, por lo que resulta necesario hacer una evaluación sobre los riesgos de contaminación atmosférica y de salud pública que pueda ocasionar la implementación de estos sistemas.

Finalmente, los datos generados en este estudio amplían el conocimiento sobre la factibilidad técnica de utilizar HA inoculados con bacterias tolerantes a metales para el tratamiento de aguas residuales con contenido de mercurio, por lo cual es conveniente realizar el estudio a escala piloto para su posterior análisis de factibilidad técnica-económica.

REFERENCIAS

- Akar T. y Divriklioglu M. (2010). Biosorption applications of modified fungal biomass for decolorization of Reactive Red 2 contaminated solutions: Batch and dynamic flow mode studies. *Bioresour. Technol.* 101, 7271-277.
- Allen S.E. (1990). *Chemical analysis of ecological materials*. Blackwell Science Inc. Oxford, Inglaterra, 380 pp.
- Anjum N.A., Ahmad I., Válega M., Pacheco M., Figueira E. y Duarte A.C. (2012). Salt Marsh macrophyte *Phragmites australis* strategies assessment for its dominance in mercury-contaminated coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal). *Environ. Scie. Pollution Res.* 19, 2879-2888.
- Cheng S., Grosse W., Karrenbrock F. y Thoennesen M. (2002). Efficiency of constructed wetlands in decontamination of water polluted by heavy metals. *Ecol. Eng.* 18, 317-325.
- CONAGUA (2014). *Estadísticas del agua en México*. Informe. Comisión Nacional del Agua. México, D.F., México, 164 pp.
- Clemens S., Palmgren G. y Krämer U. (2002). A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Plant Sci.* 7, 309-315.
- Clemens S. (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposures and mechanisms of tolerance in plants. *Biochim.* 88, 1707-1719.
- De Souza M.P., Huang C.P.A., Chee N. y Terry N. (1999). Rhizosphere bacteria enhance the accumulation of selenium and mercury in wetland plants. *Planta* 209, 259-263.
- Dulski T. (1996). *A manual for the chemical analysis of metals*. American Society for Testing and Materials. Massachusetts, EUA. 252 pp.
- USEPA (1996). Method 3005A. Acid digestion of waters for total recoverable or dissolved metals for analysis by FLAA or ICP spectroscopy. Método. United States Environmental Protection Agency. Ohio, EUA, 5 pp.

- USEPA (2000). Constructed wetlands treatment of municipal wastewaters. Manual. United States Environmental Protection Agency. Ohio, EUA, 165 pp.
- Fu F. y Wang Q. (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *J. Environ. Manag.* 92, 407-418.
- García-Gallegos E., Hernández-Acosta E., García-Nieto E. y Acevedo-Sandoval O.A. (2011). Contenido y traslocación de plomo en avena (*Avena sativa*, L.) y haba (*Vicia faba*, L.) de un suelo contaminado. *Revista Chapingo. Serie Cienc. For. Ambient.* 17, 19-29.
- Hylander L.D. y Goodsite M.E. (2006). Environmental cost of mercury pollution. *Scie. Total Environ.* 368, 352-370.
- Kabatas-Pendias A. y Pendias H. (2001). Trace elements in soils and plants. CRC Press. Florida, EUA. 415 pp.
- Kadlec R.H. y Wallace S. (2009) Treatment wetlands. CRC Press. Florida, EUA. 1020 pp.
- LeDuc D.L. y Terry N. (2005). Phytoremediation of toxic trace elements in soil and water. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32, 514-520.
- Lominchar M.A., Sierra M.J. y Millán R. (2015). Accumulation of Hg in *Typha dominguensis* under field conditions. *Chemosphere* 119, 994-999.
- Mason R.P. y Sullivan K.A. (1998). Mercury and methylmercury transport through an urban watershed. *Water Res.* 32, 321-330.
- Orduña-Bustamante M.A., Vaca-Mier M., Escalante-Estrada J.A. y Durán-Domínguez-de-Bazúa M.C. (2011). Nitrogen and potassium variation on contaminant removal for a vertical subsurface flow lab scale constructed wetland. *Biores. Technol.* 102, 7745-7754.
- Parequetti H.H.M., Lacerda L.D.L., Ayres G.A., Mounier S. y Almeida M.D. (2004). Mercury speciation and dissolved organic carbon characterization in the surface waters of Sepetiba Bay, Se Brazil. *Geochim. Brasiliensis* 18, 28-37.
- Patra M. y Sharma A. (2000). Mercury toxicity in plants. *Bot. Rev.* 66, 379-422.
- Pirrone N. y Mahaffey K.R. (2005). Dynamics of mercury pollution on regional and global scales. Springer Science and Business Media. Nueva York, EUA. 729 pp.
- Porto J.I.R., Araujo C.S.O. y Feldberg E. (2005). Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. *Environ. Res.* 97, 287-292.
- Puigagut J., Caselles-Osorio A., Vaello N. y García J. (2008). Fractionation biodegradability and particle-size distribution of organic matter in horizontal subsurface-flow constructed wetland. En: *Wastewater treatment, plant dynamics and management in constructed and natural wetlands* (J. Vymazal, Ed.). CBS Publishers, Nueva Delhi, India, pp. 289-297.
- Rajaganapathy V., Xavier F., Sreekumar D. y Mandal P.K. (2011). Heavy metal contamination in soil, water and fodder and their presence in livestock and products: A review. *J. Environ. Sci. Technol.* 4, 234-249.
- Salgado-Bernal I., Carballo-Valdés M.E., Martínez-Sardiñas A., Cruz-Arias M. y Durán-Domínguez de Bazúa M.C. (2012). Interacción de aislados bacterianos rizosféricos con metales de importancia ambiental. *Tecnol. Cienc. Agua* 3, 83-95.
- Sheoran A.S. y Sheoran V. (2006). Heavy metal removal mechanism of acid mine drainage in wetlands: A critical review. *Miner. Eng.* 19, 110-119.
- Stefanakis A., Akratos C.S. y Tsihrintzis V.A. (2014). Vertical flow constructed wetlands: Eco-engineering systems for wastewater and sludge treatment. Elsevier, Oxford, Inglaterra, 378 pp.
- Stottmeister U., Wießner A., Kusch P., Kapperlmeyer U., Kästner M., Bederski O., Müller R.A. y Moormann H. (2003). Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. *Biotechnol. Adv.* 22, 93-117.
- Teitzel G.M. y Parsek M.R. (2003). Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2313-2320.
- Ventura D.F., Simoes A.L., Tomaz S. y Costa M.F. (2005). Colour vision and contrast sensitivity losses of mercury intoxicated industry workers in Brazil. *Environ. Res.* 77, 173-177.
- Von Canstein H., Li Y., Timmis K.N., Deckwer W.D. y Wagner-Döbler I. (1999). Removal of mercury from chloralkali electrolysis wastewater by a mercury-resistant *Pseudomonas putida* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5279-5284.
- Weis J. S. y Weis P. (2004). Metal uptake, transport and release by wetland plants: implications for phytoremediation and restoration. *Environ. Int.* 30, 685-700.
- Winter K.J. y Goetz D. (2003). The impact of sewage composition on the soil clogging phenomena of vertical flow constructed wetlands. *Water Sci. Technol.* 48, 9-14.
- Wood A. (1995). Constructed wetlands in water pollution control: Fundamentals to their understanding. *Water Sci. Technol.* 32, 21-29.
- Zhang M. (2011). Adsorption study of Pb(II), Cu(II) and Zn(II) from simulated acid mine drainage using dairy manure compost. *Chem. Eng. J.* 172, 361-368.