



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA  
INGENIERÍA AMBIENTAL – AGUA

REMOCIÓN DE METALES PESADOS EN HUMEDALES ARTIFICIALES  
INOCULADOS CON CEPAS TOLERANTES

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN INGENIERÍA

PRESENTA:  
M. en I. LEONEL ERNESTO AMÁBILIS SOSA

TUTOR PRINCIPAL  
Dra. MARÍA DEL CARMEN DURÁN DOMÍNGUEZ, FACULTAD DE QUÍMICA

COMITÉ TUTOR  
Dra. GABRIELA MOELLER CHÁVEZ, PROGRAMA DE MAESTRÍA Y  
DOCTORADO EN INGENIERÍA  
Dra. CHRISTINA SIEBE, INSTITUTO DE GEOLOGÍA  
DR. JORGE LUIS DE VICTORICA ALMEIDA, INSTITUTO DE INGENIERÍA  
DRA. REFUGIO RODRÍGUEZ VÁZQUEZ, PROGRAMA DE MAESTRÍA Y  
DOCTORADO EN INGENIERÍA

MÉXICO, D. F. JULIO 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

Presidente: Dra. Christina Siebe  
Secretario: Dr. Jorge Luis de Victorica Almeida  
1er. Vocal: Dra. Gabriela Eleonora Moeller Chávez  
2do. Vocal: Dra. Refugio Rodríguez Vázquez  
3er. Vocal: Dra. María del Carmen Durán Domínguez

Lugar donde se realizó la tesis: Facultad de Química, Conjunto E, UNAM

**TUTOR DE TESIS:**

Dra. María del Carmen Durán Domínguez



-----  
**FIRMA**

## DEDICATORIA

La culminación de la presente tesis se traduce en hacer realidad un gran sueño que he tenido toda mi vida, convirtiéndose en una gran meta alcanzada. Por todo este significado, se la dedico con todo mi cariño a mis abuelitos que, independientemente del lugar donde se encuentren, siempre estarán en mi corazón y pensamientos.

De manera muy satisfactoria externo la dedicación a mis padres Olga Sosa Huitz y José Fco. Amábilis García, quienes por amor, se han esforzado en una gran parte de su vida para darme lo mejor y han hecho, por mí, más de lo que yo hubiera podido desear. ¡Gracias por confiar en mí!. Quiero extender esta gratitud hacia mis hermanos y hacia mi tía Verónica, quien sabe que la quiero y considero más que una tía.

Sin lugar a duda, también le dedico y agradezco este logro a mi esposa Adriana Roé Sosa, quien ha sido la responsable de gran parte de mi felicidad en estos últimos años, ya que me ha otorgado su gran e incondicional amor, además de manifestar en cada momento los grandes valores que tiene como ser humano. Esto, claramente es el reflejo de las grandes personas que son sus padres, quienes me han considerado como un hijo más.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Coordinación de Estudios de Posgrado (CEP) de la UNAM, por la beca de tiempo completo para los estudios de Doctorado durante el periodo de agosto de 2011 a julio de 2013.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca tiempo completo para los estudios de Doctorado durante el periodo de agosto de 2013 a julio de 2015.

La consumación de los esfuerzos manifestados en la presente tesis no hubiera sido posible sin la constante asesoría por parte de la Dra. María del Carmen Durán y las Dras. Christina Siebe y Gabriela Moeller como parte del comité tutorial, quienes en todo momento contribuyeron con sus valiosos conocimientos. Así mismo, en el comité ampliado, se integró la Dra. Refugio Rodríguez con sus acertadas observaciones y el Dr. Jorge de Victorica a quien le agradezco mucho su tiempo y dedicación durante las sesiones de asesoría brindadas.

De manera particular agradezco a la Dra. Irina Salgado Bernal, por proporcionar las cepas tolerantes con las que se trabajó en la presente investigación y por su asesoría en los aspectos microbiológicos.

Agradezco al Dr. Jorge Benítez Torres por motivarme en mi vida académica y personal, además de su constante apoyo manifestado en el transcurso de todo el Doctorado.

Agradezco mis amigos del laboratorio, quienes han hecho que el doctorado sea aún más satisfactorio, muchas gracias por su amistad Mtra. Landy, Lupita Salinas, Lupita Soto, Surya Ramírez, Eliana Arias, Tania Espinosa, Mtro. Rolando, José Manuel Barrera, Víctor García y varios más que estuvieron en diferentes etapas de mi estancia en el laboratorio. Además quiero precisar a Victoria Jiménez y Elisabet Pérez, porque además de ser grandes amigas, contribuyeron invaluablemente en el desarrollo de la tesis.

En la parte experimental del proyecto colaboraron estudiantes de licenciatura que en todo momento exhibieron un gran desempeño como futuros profesionistas y con mucho empeño, por lo que les agradezco Rosa Cruz, Daniel Estrada, Brendy García, Diana Bautista, Tania Bobadilla, Karen Ganado, Ruth Pérez y por supuesto a Marce Arroyo e Irving Jiménez, quienes fueron muy perspicaces en aplicar sus conocimientos sobre hidrometalurgia.

## ÍNDICE

	Pág.
<b>Nomenclatura y acrónimos</b>	
<b>Resumen</b>	
<b>Abstract</b>	
<b>CAPÍTULO I. PROBLEMÁTICA</b>	
I.1.    Introducción	1
I.2.    Objetivos y alcances	4
I.2.1. Objetivo general	4
I.2.2. Objetivos específicos	4
I.2.3. Alcances	5
<b>CAPÍTULO II. FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b>	6
II.1.    Metales pesados en el ambiente	6
II.2.    MÉTODOS CONVENCIONALES PARA LA REMOCIÓN DE METALES PESADOS DE LAS AGUAS RESIDUALES	8
II.2.1. Precipitación con hidróxidos	8
II.2.2. Precipitación con sulfuros	9
II.2.3. Intercambio iónico	10
II.2.4. Adsorción	10
II.2.5. Filtración con membranas	10
II.3.    SISTEMAS DE HUMEDALES ARTIFICIALES	11
II.3.1. Remoción de metales pesados empleando humedales artificiales	13
II.3.2. Consideraciones para el diseño de los humedales artificiales	19
II.4.    BACTERIAS TOLERANTES A METALES PESADOS	22

	Pág.
<b>CAPÍTULO III. METODOLOGÍA</b>	
III.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	27
III.2. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE LOS HUMEDALES ARTIFICIALES A ESCALA DE LABORATORIO	30
III.2.1. Dimensiones y medio de empaque	30
III.2.3. Vegetales utilizados y pruebas de fitotoxicidad	30
III.3. USO DE CEPAS TOLERANTES A METALES PESADOS	32
III.3.1. Prueba de tolerancia a metales pesados por parte del consorcio bacteriano	32
III.3.2. Inoculación de los humedales artificiales	33
III.4. OPERACIÓN DE LOS SISTEMAS DE LOS HUMEDALES ARTIFICIALES	33
III.4.1. Características del agua de alimentación	33
III.4.2. Operación de los humedales artificiales y toma de muestras	34
III.4.3. Nomenclatura de los humedales artificiales	35
III.5. BALANCE DE MASA	35
III.5.1. Metales pesados en influente y efluente	37
III.5.2. Metales pesados en la biomasa vegetal	38
III.5.3. Metales pesados en el medio de empaque	38
III.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	39
III.6.1. Análisis estadísticos de la remoción de metales pesados y otros parámetros fisicoquímicos	39
III.6.2. Análisis estadístico de la acumulación y distribución de metales pesados en los humedales artificiales	39

	Pág.
<b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS y DISCUSIÓN</b>	
IV.1. PRUEBAS DE FITOTOXICIDAD	41
IV.2. SELECCIÓN DEL CONSORCIO MICROBIANO	42
IV.3. INOCULACIÓN DE LOS HUMEDALES ARTIFICIALES	46
IV.4. DESARROLLO BACTERIANO EN LOS HUMEDALES ARTIFICIALES	47
IV.5. SEGUIMIENTO DE PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS	49
IV.5.1. Remoción de la demanda química de oxígeno	49
IV.5.2. Sólidos suspendidos volátiles en los efluentes de los humedales artificiales	51
IV.5.3. Potencial de óxido reducción	53
IV.6. REMOCIÓN DE METALES PESADOS	54
IV.6.1. Remoción de mercurio	54
IV.6.2. Remoción de cromo	55
IV.6.3. Remoción de plomo	57
IV.7. DESTINOS AMBIENTALES DE LOS METALES PESADOS, EN HUMEDALES ARTIFICIALES	59
IV.7.1. Acumulación y distribución de plomo y cromo en los humedales artificiales	63
IV.7.1.1. Acumulación de plomo y cromo en el medio de empaque de los humedales artificiales	65
IV.7.1.2. Distribución de plomo y cromo en la biomasa vegetal de los humedales artificiales	74
IV.7.1.3. Distribución de plomo y cromo en el efluente de los humedales artificiales	76



IV.7.2. Acumulación, volatilización y distribución de mercurio en los humedales artificiales	78
IV.7.2.1. Distribución de mercurio en la biomasa vegetal de los humedales artificiales	81
IV.7.2.2. Distribución de mercurio en el efluente y medio de empaque de los humedales artificiales	85
<b>CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>87</b>
V.1. CONCLUSIONES	87
V.2. RECOMENDACIONES	88
<b>ANEXOS</b>	
<b>Anexo 1.</b> Datos experimentales de figuras del capítulo 4	90
<b>Anexo 2.</b> Datos de los análisis estadísticos realizados en Minitab 15	98
<b>Anexo 3.</b> Acervo fotográfico	101
<b>Anexo 4.</b> Disposición controlada de los residuos producidos en esta investigación	105
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>108</b>

## LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

	Pág.
<b>Tabla 2.1.</b> Efecto tóxico y concentración letal media de los metales pesados más peligrosos. Tomado de Babel y Kurniawan (2004)	7
<b>Tabla 2.2.</b> Concentraciones de metales pesados reportadas en los efluentes de diversas industrias	7
<b>Tabla 2.3.</b> Eficiencias de remoción de metales pesados, por medio del sistema de humedales implementado por Khan y col. (2009)	14
<b>Tabla 2.4.</b> Composición del agua residual sintética utilizada por Cheng y col. (2002) para alimentar el humedal artificial evaluado en su investigación	15
<b>Tabla 2.5.</b> Familias y especies de plantas utilizadas en los humedales artificiales estudiados por Liu y col. (2007)	18
<b>Tabla 2.6.</b> Eficiencias de remoción obtenidas a diferentes cargas hidráulicas en diferentes estudios	23
<b>Tabla 2.7.</b> Eficiencias de remoción obtenidas a diferentes cargas orgánicas, en diferentes estudios	23
<b>Tabla 2.8.</b> Concentraciones letales medias de Cd, Cu y Zn para el género <i>Paenibacillus</i> y la especie <i>B. thuringiensis</i> (Rathnayake y col., 2010)	25
<b>Tabla 3.1.</b> Conformación de los ocho humedales artificiales en función de la presencia de la inoculación y presencia de plantas	27
<b>Tabla 3.2.</b> Diseño experimental propuesto de tipo “Parcelas subdivididas con más de un factor” adaptado de Webster y Payne (2002); Montgomery (2012)	29

	Pág.
<b>Tabla 3.3.</b> Concentraciones de metales pesados en las mezclas aplicadas durante las pruebas de toxicidad tanto del consorcio microbiano como en las semillas de <i>L. sativa</i>	31
<b>Tabla 4.1.</b> Crecimiento de la radícula e hipocotilo en presencia de cada una de las mezclas de metales pesados evaluadas (promedios $\pm$ desviación estándar)	41
<b>Tabla 4.2.</b> Resultados de UFC y porcentaje de inhibición bacteriana en función de la concentración de metales pesados de cada mezcla evaluada	45
<b>Tabla 4.3.</b> Balance de masa de Pb en los sistemas de humedales artificiales, estableciendo como única entrada la cantidad del metal en el influente y como salidas el efluente y como acumulaciones la biomasa vegetal y el tezontle	60
<b>Tabla 4.4.</b> Balance de masa de Cr en los sistemas de humedales artificiales, estableciendo como única entrada la cantidad del metal en el influente y como salidas el efluente y como acumulaciones la biomasa vegetal y el tezontle	61
<b>Tabla 4.5.</b> Balance de Hg en los humedales artificiales, estableciendo como única entrada la cantidad del metal en el influente y como salidas el efluente y la transferencia a la atmósfera y como acumulaciones la biomasa vegetal y el tezontle	62
<b>Figura 2.1.</b> Diferentes tipos de humedales artificiales usados en el tratamiento de aguas residuales. A) de flujo libre superficial, B) de flujo vertical subsuperficial y C) de flujo horizontal subsuperficial. Modificado de Tilley y col. (2014)	13
<b>Figura 2.2.</b> Mecanismos de interacción entre metales pesados y microorganismos. La localización de algunos procesos puede variar entre grupos y cepas. Tomada de White y col. (1995)	24

	Pág.
<b>Figura 3.1.</b> Conformación de los cuatro tipos de humedales artificiales implementados y características constructivas de cada uno de ellos	28
<b>Figura 3.2.</b> Diagrama del balance de masa para cada metal pesado ingresado en los humedales artificiales, donde se muestran los posibles destinos ambientales	36
<b>Figura 4.1.</b> Curva Dosis-Respuesta de inhibición del desarrollo de la radícula en presencia de diferentes concentraciones de metales pesados (promedios $\pm$ desviación estándar)	43
<b>Figura 4.2.</b> Curva Dosis-Respuesta de inhibición del desarrollo del hipocotilo en presencia de diferentes concentraciones de metales pesados (promedios $\pm$ desviación estándar)	44
<b>Figura 4.3</b> Curva Dosis-Respuesta del efecto tóxico de la mezcla de metales pesados sobre el consorcio bacteriano seleccionado (promedios $\pm$ desviación estándar)	44
<b>Figura 4.4.</b> Cepas bacterianas seleccionadas para inocular en los humedales artificiales a escala laboratorio	46
<b>Figura 4.5.</b> Cuantificación promedio de Unidades Formadoras de Colonias posterior a la inoculación	47
<b>Figura 4.6.</b> Tendencia de remoción de la materia orgánica expresada como DQO, para cada uno de los humedales evaluados con TRH de 2 y 4 días	50
<b>Figura 4.7.</b> Concentración de sólidos suspendidos volátiles en el efluente de cada humedal artificial, con TRH de 2 y 4 días	52
<b>Figura 4.8.</b> Valores del potencial de óxido reducción en cada humedal artificial durante la operación con TRH de 2 y 4 días	53
<b>Figura 4.9.</b> Remoción promedio de mercurio en cada humedal, con TRH de 2 y 4 días	55

	Pág.
<b>Figura 4.10.</b> Remoción promedio de cromo en cada humedal, con TRH de 2 y 4 días	56
<b>Figura 4.11.</b> Remoción promedio de plomo en cada humedal, con TRH de 2 y 4 días	59
<b>Figura 4.12.</b> Distribución de plomo en los humedales RIV (con inóculo y vegetación) con tiempos de residencia hidráulica de 2 y 4 días	66
<b>Figura 4.13.</b> Distribución de plomo en los humedales RV (con vegetación sin inóculo) con tiempos de residencia hidráulica de 2 y 4 días	67
<b>Figura 4.14.</b> Distribución de plomo en los humedales RI (con inóculo sin vegetación) con tiempos de residencia hidráulica de 2 y 4 días	68
<b>Figura 4.15.</b> Distribución de plomo en los humedales RC (solamente tezontle) con tiempos de residencia hidráulica de 2 y 4 días	69
<b>Figura 4.16.</b> Distribución de cromo en los reactores RIV (con inóculo y vegetación) con tiempos de residencia hidráulica de 2 y 4 días	70
<b>Figura 4.17.</b> Distribución de cromo en los reactores RV (con vegetación sin inóculo) con tiempos de residencia hidráulica de 2 y 4 días	71
<b>Figura 4.18.</b> Distribución de cromo en los humedales RI (con inóculo sin vegetación) con tiempos de residencia hidráulica de 2 y 4 días	72
<b>Figura 4.19.</b> Distribución de plomo en los humedales RC (solamente tezontle) con tiempos de residencia hidráulica de 2 y 4 días	73
<b>Figura 4.20.</b> Diagrama de fase del mercurio (Pourbaix) considerando las condiciones ambientales y químicas a las que operaron los 4 humedales artificiales evaluados. Los valores de pH y pOR entre las líneas rojas, son el rango registrado a lo largo de la fase experimental (pH de 6.1 a 7.4 y pOR de 50 a 208 mV)	79
<b>Figura 4.21.</b> Distribución de mercurio en los humedales RIV (con inóculo y vegetación) con tiempos de residencia hidráulica de 2 y 4 días	81

	Pág.
<b>Figura 4.22.</b> Distribución de mercurio en los humedales RV (con vegetación sin inóculo) con tiempos de residencia hidráulica de 2 y 4 días	82
<b>Figura 4.23.</b> Distribución de mercurio en los humedales RI (con inóculo sin vegetación) con tiempos de residencia hidráulica de 2 y 4 días	83
<b>Figura 4.24.</b> Distribución de plomo en los humedales RC (solamente tezontle) con tiempos de residencia hidráulica de 2 y 4 días	84

### Nomenclatura y acrónimos

$C^0$	Concentración residual o de fondo
$C_0$	Concentración del contaminante en el influente, $\text{mg L}^{-1}$
CE	Conductividad eléctrica
$c_i$	Concentración del metal pesado en el influente, $\text{mg L}^{-1}$ (Ec. 3-2)
CLM	Concentración letal media, $\text{mg L}^{-1}$
$C_t$	Concentración del contaminante en el efluente, $\text{mg L}^{-1}$ (Ec. 2-4)
$ct$	Concentración en el tiempo respectivo ( $c_1 =$ concentración en el tiempo 1), $\text{mg L}^{-1}$
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno, $\text{mg L}^{-1}$
DQO	Demanda química de oxígeno, $\text{mg L}^{-1}$
$h$	Profundidad del medio de empaque, m
HFLS	Humedales artificiales de flujo libre superficial
HAFSS	Humedales artificiales de flujo subsuperficial
HAFVS	Humedales artificiales de flujo vertical subsuperficial
$K_T$	Constante de degradación del contaminante, $t^{-1}$
L	Longitud de un humedal artificial
MME	Masa de metal en el efluente, mg
$MME_D$	Cantidad de masa del metal disuelto en el efluente (Ec. 3-1)

MME <sub>S</sub>	Masa de metal suspendida en el efluente
MMI	Masa del metal pesado en el influente, mg
MMT	Masa del metal pesado en el tezontle, mg
MMV	Masa total de metal presente en la biomasa vegetal, mg
MMV <sub>A</sub>	Masa de metal en la parte aérea de la planta, mg
MMV <sub>R</sub>	Masa de metal en las raíces y rizoma de la planta, mg
MP	Metales pesados
<i>n</i>	Porosidad que exhibe el medio de empaque, adimensional
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Nitrógeno amoniacal
pH	Potencial de hidrógeno
pOR	Potencial de oxidación-reducción o redox
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Fósforo inorgánico medido como ortofosfatos
Q	Gasto de entrada al humedal, volumen tiempo <sup>-1</sup>
RA	Relación de acumulación
SST	Sólidos suspendidos totales
t, TRH	Tiempo de residencia hidráulica (tiempo de recambio de agua)
t <sub>1</sub>	Día de operación inicial, d
t <sub>f</sub>	Número total de días de alimentación, d
UFC	Unidades formadoras de colonias, UFC mL <sup>-1</sup>
v	Volumen del agua de alimentación, L
W	Ancho de un humedal artificial por <i>width</i> en inglés

## RESUMEN

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. Entre los más peligrosos se encuentran el mercurio, cromo y plomo que son descargados con los efluentes de diversas industrias. Actualmente las plantas de tratamiento de aguas residuales convencionales no son capaces de tratar las aguas con metales pesados, ya que el sistema biológico colapsaría por la toxicidad de estos cationes inorgánicos o, en el mejor de los casos, no presentarían remoción alguna. Aunado a esto, las opciones fisicoquímicas que existen en la actualidad como adsorción con carbón activado, intercambio iónico y precipitación química, siempre presentan alguna desventaja operacional, económica o de eficiencia. Derivado de esto, los humedales artificiales (HA) han sido evaluados en los últimos años para la remoción de metales pesados, presentando considerables eficiencias de remoción, lo cual podría ser una opción técnica y económicamente viable. No obstante, las eficiencias observadas en estos sistemas de tratamiento, sólo han sido exploradas desde el punto de vista de la fitorremediación, sin considerar el papel que desempeñan las bacterias y el medio de empaque utilizado, además de que se sabe que existe sinergismo entre estos componentes. En este orden de ideas, también existen microorganismos tolerantes a metales pesados que pueden ser empleados en diversos sistemas de tratamiento para incrementar la capacidad de remoción. Considerando lo anterior, en la presente investigación se evaluó la remoción, acumulación y distribución de mercurio, cromo y plomo en HA inoculados con cepas tolerantes a dichos compuestos. Basado en cálculos ingenieriles y bioensayos, se implementaron cuatro diferentes sistemas de humedales empacados con roca volcánica. Dos de los humedales contenían plantas *Phragmites australis*, de los cuales sólo uno contenía el inóculo bacteriano proveniente del aislamiento de humedales naturales. De los otros dos sin plantas, sólo uno fue inoculado. Todos fueron operados bajo las mismas condiciones durante 151 días, incluyendo concentraciones de metales pesados típicas de efluentes industriales reportadas en México. Además, entre las condiciones de operación se evaluaron dos tiempos de residencia



hidráulica (TRH), 2 y 4 días. Los resultados indicaron que los HA con plantas e inóculo bacteriano tolerante, presentaron mayor eficiencia de remoción, pero sobre todo estabilidad al final de la operación en comparación con los otros HA. En cuanto a la operación con los dos TRH, no se observaron diferencias al respecto para los cuatro tipos de HA, exceptuando el caso de la remoción de mercurio, en la que sí se observó mayor remoción del metal con TRH de 4 días. Al final de los 151 días de operación y para ambos TRH, se encontró que los HA con inóculo y plantas, acumularon alrededor del 23.5% del cromo ingresado en la parte aérea de la planta, lo cual sólo fue observado en este tipo de HA. Para este mismo HA, fue cuantificado alrededor del 25% del total de plomo ingresado en la fracción suspendida del efluente, lo cual tampoco se suscitó en los otros HA, en los que incluso predominó la fracción disuelta. En lo que respecta a la acumulación y distribución del mercurio, en los dos HA con plantas (con inóculo y sin inóculo) la mayor cantidad de mercurio fue transferida hacia la atmósfera, alcanzando 31.5% del total ingresado durante la operación con TRH de 2 días y 40.5% con TRH de 4 días. Con base en los resultados descritos para el sistema de HA con plantas e inóculo bacteriano tolerante a metales pesados, se ve conveniente su implementación a escala piloto para posteriormente realizar una evaluación técnica y económica sobre su posible aplicación a escala real. Así mismo, se considera pertinente realizar estudios complementarios sobre la recuperación de plomo posterior a la sedimentación y la del cromo por procesos posteriores a la poda del humedal. Finalmente, en cuanto al mercurio podría evaluarse su remoción con el mismo sistema, pero bajo otras condiciones de operación que eviten su volatilización.

Palabras clave: Remoción de metales pesados, humedales artificiales, inoculación con cepas tolerantes a metales pesados

## ABSTRACT

Among the extensive environmental and public health problems, those related to wastewater containing heavy metals have shown an increase in recent years. Among the most dangerous are mercury, chromium and lead, which are discharged by effluents from various industries. Nowadays the conventional wastewater treatment plants are not capable to treat sewage containing heavy metals, since biological systems collapse due to the toxicity of these inorganic cations or, do not register any removal. Likewise, current physicochemical options as adsorption by activated carbon, ion exchange and chemical precipitation, always have some operational, economic or efficiency disadvantage. Constructed wetlands (CW) have been evaluated in the last years for their capacity to remove heavy metals, with considerable efficiency, which could be a viable technique and economical option. In spite of observed efficiencies for these treatment systems, these have been only explored from the viewpoint of phytoremediation, without considering the role of bacteria and the support media; also the synergy between these components is unknown. Pursuant to this, microorganisms that are tolerant to heavy metals also exist. They can be used in various treatment systems to increase the removal capacity. Considering this, the removal, accumulation and distribution of mercury, chromium and lead were evaluated in CW inoculated with heavy metal-tolerant strains. Four different systems of wetlands packed with volcanic rock were implemented based on engineering calculations and bioassays. Two wetlands were planted and two were unplanted. In each case one was inoculated and the other not inoculated with heavy metal tolerant strains. All CW were operated for 151 days under the same conditions, including typical heavy metal concentrations from industrial effluents reported in Mexico. Two hydraulic retention times (HRT) were evaluated, namely 2 and 4 days. Results indicated that the planted CW inoculated with heavy metal tolerant bacteria showed higher removal efficiency, and mostly higher stability at the end of the operation compared to the other treatments. Regarding the operation with both HRT, no differences were observed, which applies for the four kinds of CW, with exception of mercury removal, which was higher with HRT of 4 days. After 151

operation days and for two HRT, 23.5% of total chromium input had accumulated in the aerial part of the plant biomass of the CW with vegetation and inoculum. In this CW, around 23.5% of total lead was quantified in the suspended fraction of the effluent; the latter was not observed in the others wetlands, in which the dissolved fraction predominated. In both planted CW (with inoculum and without inoculum) most of the mercury was transferred into the atmosphere, reaching 31.5% of the total mercury input with HRT of 2 days and 40.5% with HRT of 4 days. Based on the described results for the system of planted and inoculated CW, it seems advisable to implement the system at pilot-scale for ensuing a technical and economic assessment before their application at large-scale. Likewise, complementary studies should be done to investigate the recovery of lead after sedimentation, and the recovery of chromium after plant harvest of the CW. Finally, with regard to mercury, an evaluation of its removal with the same systems, but under other operating conditions, to avoid its volatilization, should be conducted.

Key Words: Heavy metals removal, artificial or constructed wetlands, inoculation with heavy-metal tolerant strains

# CAPÍTULO I. PROBLEMÁTICA

## I.1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, los problemas derivados de la contaminación han adquirido mayor relevancia derivada de su gran magnitud y diversidad. Esto ha provocado que la sociedad en general, vaya tomando cada vez mayor conciencia de los riesgos actuales y potenciales que puedan ocasionar. Dentro de este ámbito, uno de los temas de mayor importancia es el referente a la contaminación del agua, ya que genera una gran preocupación, sobre todo en lo que respecta al tratamiento de aguas residuales contaminadas por procesos industriales. Éstos generan un gran impacto negativo en los ecosistemas, tanto desde el punto de vista de salud pública como ambiental, debido a sus constituyentes físicos, químicos y biológicos.

Dentro de los componentes arriba mencionados, destacan los que son de tipo inorgánico disuelto como los metales pesados, ya que alteran de manera significativa las condiciones naturales de un ecosistema (Crites y Tchobanoglous, 2000; Manahan, 2007; Masters y Ela, 2008). La rápida industrialización ha ocasionado el incremento de la disposición de los metales pesados en los ecosistemas, su uso extensivo durante las últimas décadas, inevitablemente origina un incremento en el flujo de sustancias metálicas hacia los ambientes acuáticos, en donde son descargados en grandes cantidades a través de aguas residuales de las industrias relacionadas con la minería, producción de baterías, papel, curtido de pieles, galvanoplastia, manufactura de circuitos integrados, entre otras (Fu y Wang, 2011).

Aunado a lo mencionado en el párrafo anterior, los metales pesados que se encuentran disueltos y, por ende, biodisponibles, como el Cd, Cr, Pb y Hg, se consideran de las sustancias más peligrosas presentes en aguas residuales, ya que propician graves efectos

sobre la salud de los ecosistemas incluyendo a los seres humanos, pudiendo causar daños por toxicidad, teratogenicidad, carcinogénesis o mutagénesis (Brown, 2000; Dickson, 2006).

Un ejemplo de lo anterior es el efecto de autoinmunidad que provocan ciertos niveles de mercurio y plomo en el cuerpo humano, donde el sistema inmune ataca a sus propias células, dando como resultados secundarios la artritis reumatoide, daño en los sistemas circulatorio y nervioso, y daños en general al cerebro (Amuda y col., 2007).

En paralelo con lo anterior y en lo que respecta a los procesos convencionales de tratamiento de aguas residuales, especialmente los que emplean sistemas biotecnológicos, la presencia de los metales pesados, dada su naturaleza inorgánica, provoca que en general dichos contaminantes inorgánicos no puedan ser metabolizados, sino se acumulen en los organismos responsables de esos procesos biológicos (Barakat, 2011; Cheng y col., 2002).

Todo lo anterior representa un gran reto al momento de seleccionar y proyectar tecnologías sostenibles para el tratamiento de las aguas residuales con metales pesados y a su vez, constituye una oportunidad para el desarrollo pertinente y creativo de la ingeniería ambiental (Ascuntar y col., 2006).

Ante la problemática expuesta, se han venido implementado tecnologías para la remoción de metales en las aguas residuales, que consisten principalmente en adsorción con carbón activado, precipitación en forma de hidróxidos o sulfuros, intercambio iónico con resinas y filtración con membranas que, en algunos casos, presentan altas eficiencias de remoción. Sin embargo, además de transferirlos a otra fase (lodos con altos contenidos de metales pesados y de grandes volúmenes), tienen altos costos de instalación, operación (especialmente energéticos) y mantenimiento (Barakat, 2011). En este sentido, los sistemas naturales, en especial los humedales artificiales, son una alternativa ya explorada en algunas empresas que los generan ya que se han reportado buenas eficiencias de remoción, tanto de contaminantes orgánicos como inorgánicos, sumado a sus bajos costos de

construcción operación y mantenimiento, así como los beneficios colaterales que se generan (espacios verdes, hábitats para vida silvestre, etc.) (Akratos y col., 2008).

Los humedales artificiales de flujo subsuperficial (HAFSS) presentan algunas ventajas en comparación con otros sistemas de tratamiento de aguas residuales, dentro de las que se pueden mencionar la mínima o nula necesidad de equipos mecánicos, electricidad u operadores calificados (EPA, 2000; García, 2005). Aunado a lo anterior, las raíces de macrofitas, también contribuyen en la depuración del agua por medio de la fitodepuración y provocan un mayor tiempo de residencia hidráulico, dada la interacción entre el agua y las raíces (DeLaune y Pezeshki, 2001), aspecto que permite que se lleven a cabo con mayor eficiencia las reacciones bioquímicas y, por ende, la remoción de los contaminantes dentro de este tipo de sistemas (IWA, 2000).

Los sistemas de HAFSS presentan altas eficiencias de remoción de compuestos tanto orgánicos como de metales pesados, debido a los procesos combinados que resultan de las interacciones entre las plantas, el medio de empaque y las bacterias (Vymazal y Kröpfelová, 2009). De los dos primeros, se han realizado numerosos estudios con el fin de lograr mayor entendimiento, y con esto, entender y optimizar los procesos para la remoción de los metales pesados presentes en el agua residual. Sin embargo, para un completo entendimiento y optimización, resulta conveniente investigar, también, la intervención de las bacterias en el proceso, ya que desempeñan un papel importante al acumular los metales en su biomasa, especialmente si ésta es tolerante a dichos contaminantes en estudio.

Existen recientes trabajos de investigación sobre aislamientos bacterianos expuestos a soluciones con metales pesados (Carballo y col., 2009; Rathnayake y col., 2010; Salgado-Bernal y col., 2012; Xie y col., 2010). Entre éstos, destaca el desarrollado por Salgado-Bernal y col. (2012) quienes aislaron consorcios bacterianos provenientes de un humedal natural, encontrándose cepas bacterianas que además de presentar tolerancia a ciertos metales pesados, exhibieron remoción de los mismos en la fase acuosa.

Bajo este esquema, surge el interés del presente tema de investigación, enfocado a la remoción de los metales pesados a través de un sistema que simula un humedal artificial, enfatizando en el análisis de su remoción el efecto de la inoculación con consorcios bacterianos tolerantes.

## **I.2. OBJETIVOS y ALCANCES**

### **I.2.1. Objetivo general**

Estudiar la remoción de mercurio, plomo y cromo en humedales artificiales inoculados con cepas tolerantes a metales pesados.

### **I.2.2. Objetivos específicos**

- Implementar un sistema, a escala de laboratorio que simule un humedal artificial capaz de remover mercurio, cromo y plomo en disolución.
- Evaluar la remoción de metales pesados en humedales artificiales bajo la operación de dos tiempos de residencia hidráulica.
- Estudiar los destinos ambientales de los metales pesados de interés, dentro de un humedal artificial.
- Evaluar el efecto de inocular humedales artificiales con cepas tolerantes a metales pesados sobre la remoción, acumulación y distribución de mercurio, plomo y cromo en los sistemas en estudio.

### **I.2.3. Alcances**

La presente tesis se circunscribe al diseño, instalación y seguimiento de un sistema a escala de laboratorio que simula un humedal artificial, inoculado con cepas tolerantes a metales, para su remoción de un agua residual sintética que los contiene en concentraciones reportadas para efluentes industriales. Así mismo, se evalúa incluyen los resultados del efecto de adicionar los microorganismos tolerantes sobre la acumulación y distribución de los metales pesados dentro de estos sistemas de humedales artificiales a escala de laboratorio.



## CAPÍTULO II. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

En el presente capítulo se describen los aspectos teóricos relacionados con los temas desarrollados a lo largo de la investigación.

### II.1. METALES PESADOS EN EL AMBIENTE

Los metales pesados (MP) constituyen un grupo cercano a los 40 elementos de la Tabla Periódica, que poseen una densidad mayor a  $5 \text{ g cm}^{-3}$ . Sin embargo, desde el punto de vista ecotoxicológico, el rango distintivo es que a pesar de que muchos de ellos son esenciales para el metabolismo como el V, Fe y Zn, se ha reportado que también tienen efectos tóxicos sobre las células, principalmente como resultado de su capacidad para alterar o desnaturalizar las proteínas. Existe vasta información sobre los efectos a la salud que pueden causar los MP, incluyendo un incorrecto desarrollo del cuerpo humano, cáncer, daño a los órganos internos y trastornos al sistema nervioso. En altas dosis, los MP pueden causar daños irreversibles a diferentes partes del cerebro y en casos extremos la muerte (Barakat, 2011). En la Tabla 2.1 se mencionan los principales efectos que propician los MP con mayor relevancia ambiental, así como los efectos a la salud al alcanzar su concentración letal media (CLM).

Debido a la movilidad que presentan los MP en los ecosistemas acuáticos naturales y a su toxicidad para las formas superiores de vida, los iones de MP presentes en aguas superficiales y subterráneas son considerados como los contaminantes inorgánicos más importantes en el ambiente (CEPIS, 2001). Aun cuando se encuentren en cantidades bajas, sus características recalcitrantes y su consiguiente persistencia en cuerpos de agua implican que, a través de procesos naturales como la biomagnificación, su concentración puede llegar a ser tóxica. Los MP pueden encontrarse en su estado elemental o en forma de sales por medio de enlaces iónicos. De cualquier manera, los iones metálicos no pueden ser mineralizados como la materia orgánica (Cañizares-Villanueva, 2000; Khan y col., 2009).

Numerosas industrias, a través de alguno de sus procesos, generan efluentes con concentraciones de metales pesados como el Hg, Pb y Cr superiores a las CLM presentadas en la Tabla 2.1. En efecto, en la Tabla 2.2 se muestran las concentraciones de esos tres metales, reportadas para los efluentes de las industrias que los generan en mayor cantidad.

**Tabla 2.1.** Efecto tóxico y concentración letal media de los metales pesados con mayor relevancia ambiental y de salud pública. Tomado de Babel y Kurniawan (2004)

Metal pesado	Efecto tóxico	CLM, mg L <sup>-1</sup>
Arsénico	Manifestaciones cutáneas y enfermedades vasculares	0.05
Cadmio	Desórdenes renales y carcinogénico humano	0.01
Cromo	Dolor de cabeza, náuseas, diarrea, vómitos y carcinogénico humano	0.05
Cobre	Daños al hígado, Enfermedad de Wilson e insomnio	0.25
Zinc	Depresión, letargo y daño neurológico	0.20
Plomo	Enfermedades en el sistema nervioso central y circulatorio	0.006
Mercurio	Problemas reumatoides y enfermedades en el sistema nervioso y circulatorio	0.0003

**Tabla 2.2.** Concentraciones de metales pesados reportadas en los efluentes de diversas industrias que los manejan en/para su proceso de producción

Principal industria o proceso	Metal que generan	concentración mg L <sup>-1</sup>	Referencia
Curtido de Pieles y galvanoplastia	Cr	5 - 75	Barrera, 2003
Subproducto de minería, refinerías, baterías y plomo	Pb	7-130	Lavado y col., 2010
Minería, amalgamación	Hg	0.0005-0.2	Loredo y col, 2003

## **II.2. MÉTODOS CONVENCIONALES PARA LA REMOCIÓN DE METALES PESADOS DE LAS AGUAS RESIDUALES**

Ante la problemática, tanto ambiental como de salud pública, derivada de los efectos potenciales que producen las descargas de aguas residuales con presencia de metales pesados, las normativas<sup>1</sup> en materia aplicables son sumamente estrictas, tanto a nivel nacional como internacional, estableciendo límites máximos permisibles cada vez menores (Fu y Wang, 2011). Dentro del campo de la Ingeniería Ambiental, se han implementado varias tecnologías para la remoción de metales pesados, de las cuales a continuación se realiza una breve descripción.

### **II.2.1. Precipitación con hidróxidos**

En la actualidad, la precipitación con hidróxidos es la técnica más utilizada a nivel industrial para la precipitación de los metales pesados. Se basa en adicionar hidróxidos de calcio o sodio, propiciando un pH de 8 a 11, lo cual conlleva a que los metales contenidos en el agua residual reaccionen con los hidróxidos, dando lugar a hidróxidos metálicos, los cuales pueden ser removidos por floculación y sedimentación (Huisman y col., 2006). Al respecto, autores como Charemtanyarak (1999) y Chong y col. (2009) reportan buenos resultados de esta tecnología en pruebas experimentales de aguas residuales tanto sintéticas como provenientes de complejos industriales.

A pesar de lo mencionado en el párrafo anterior, se sabe que la precipitación con hidróxidos presenta dos grandes limitaciones. En primer lugar, los lodos producidos que contienen los hidróxidos metálicos exhiben una densidad muy baja, por lo que abarcan grandes volúmenes, presentando dificultades técnicas y económicas para su deshidratación y reutilización o disposición controladas (Polprasert, 1996). La segunda limitación es que

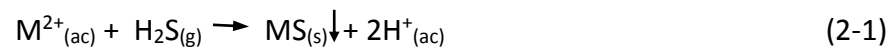
---

<sup>1</sup> Normativa: Conjunto de normas aplicables a una determinada materia o actividad. Normatividad no está registrada en el *DPD (Diccionario Panhispánico de Dudas, 2005)*

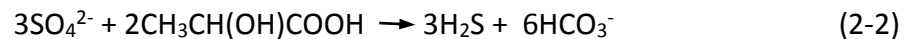
algunos de los hidróxidos metálicos son de naturaleza anfótera y la mezcla de ellos puede provocar que el pH óptimo de alguno provoque la solubilidad de otro (Dickson, 2006).

### II.2.2. Precipitación con sulfuros

La solubilidad de los sulfuros metálicos, es menor que la de los hidróxidos metálicos y no presentan naturaleza anfótera como los segundos. Özverdi y Erdem (2006) mencionan que el mecanismo de remoción que gobierna la remoción de los iones metálicos se presenta a valores bajos de pH (<3), y se ilustra en la siguiente ecuación:



Con base en este principio, en los últimos años se ha venido implementado el uso de bacterias sulfato-reductoras (BSR) que, a través de la reacción (2-2), producen H<sub>2</sub>S factible para unirse a los iones de interés, esto es:



en la ecuación anterior(CH<sub>3</sub>CH(OH)COOH) corresponde al compuesto microbiano (sin considerar el nitrógenos, fósforo y arsénico).

Autores como Álvarez y col. (2007) y Morling (2010) han utilizado reactores biológicos secuenciales (SBR, por sus siglas en inglés) y reportan buenas eficiencias de remoción, tanto de materia orgánica como de metales pesados.

Sin embargo, cabe destacar que el proceso de precipitación con sulfuros es peligroso, ya que los iones metálicos en soluciones ácidas pueden evolucionar a H<sub>2</sub>S que es un gas tóxico, aunado a que los sulfuros metálicos tienden a formar precipitados coloidales, lo cual puede provocar problemas en las etapas de sedimentación (Fu y Wang, 2011).

### II.2.3. Intercambio iónico

El proceso de intercambio iónico para la remoción de metales ha sido utilizado por muchas clases de industrias, ya que presenta atractivas ventajas como la capacidad para tratar grandes volúmenes y presentar altas eficiencias de remoción. No obstante, las ventajas que se mencionan se refieren al uso de resinas sintéticas (Alyüz y Veli, 2009), que son sumamente costosas.

Ante esto, lo ideal es llevar a cabo el proceso de intercambio iónico utilizando resinas inorgánicas de origen natural como la zeolita. Investigadores como Doula (2009) han trabajado y reportado que, a pesar de obtener resultados aceptables (eficiencias de remoción entre 25 y 50 %), la capacidad de remoción de metales pesados de las zeolitas es limitada en comparación con las resinas sintéticas, además de que aún se necesita mucha investigación para la aplicación de zeolitas a escala industrial (Motsi y col., 2009).

#### **II.2.4. Adsorción**

Actualmente la adsorción es una opción económica y efectiva para el tratamiento de metales pesados en las aguas residuales. El carbón activado es la principal materia prima utilizada por este método, dada su gran área superficial (Jusoh y col., 2007; Kang y col., 2008). Sin embargo, en la actualidad se experimenta el agotamiento de la fuente del carbón activado comercial, propiciando que se incremente su precio de adquisición, por lo que se empieza a limitar su utilización como adsorbente, además de la problemática derivada de su disposición final.

#### **II.2.5. Filtración con membranas**

La filtración con membranas es una tecnología que puede remover los iones de metales pesados con gran eficiencia, pero es sumamente costosa y compleja en su funcionamiento y operación, aunado a que con el transcurso del tiempo presenta “ensuciamiento” o colmatación, que da lugar a un bajo flujo por unidad de área o *flux* en inglés (Fu y Wang, 2011).

### II.3. SISTEMAS DE HUMEDALES ARTIFICIALES

Los primeros estudios sistemáticos sobre los humedales artificiales se realizaron en el Siglo XX, en la década de los cincuenta en el Instituto Max Planck en Alemania. En los años setenta y ochenta se dio su construcción y ya para la década de los noventa esta tecnología, inicialmente desarrollada para el tratamiento de aguas residuales municipales, se extendió para el tratamiento de escurrimientos superficiales o escorrentías y para drenes agrícolas, así como para algunas aguas residuales industriales. Así mismo, autores como Giraldi y col. (2003), Kadlec y Knight (1993) y Kadlec y Wallace (2009), dan cuenta de una buena historia del empleo de humedales naturales y artificiales para el tratamiento de aguas residuales.

Como se mencionó en la introducción, los humedales artificiales se clasifican en dos grupos según el tipo de flujo que presenten. Estos son de flujo libre superficial (HAFLS) y de flujo subsuperficial (HAFSS). Los primeros son similares a las lagunas de estabilización, por lo que el agua residual es depurada al transitar libremente a través del humedal, con la inclusión de que éste contiene plantas acuáticas, emergentes o flotantes. Por su parte, los de flujo subsuperficial consisten en hacer pasar el agua residual a través de un medio poroso o empaque (arena, grava, tezontle<sup>2</sup>, arcilla o combinación de éstas) que sirve de soporte para las raíces de las plantas emergentes. Cabe aclarar, que independientemente del aspecto hidráulico (flujo continuo, intermitente o por lotes), lo que marca la diferencia entre los HAFLS y los HAFSS es la presencia del medio de empaque.

En efecto, la presencia de dicho material de empaque proporciona una mayor área superficial disponible para el establecimiento de microorganismos dentro del sistema, los cuales se desarrollan en forma de biopelícula (biomasa adherida a un medio de soporte). Esto se ve reflejado en las altas tasas de remoción para los contaminantes biodegradables

---

<sup>2</sup> Tezontle es una palabra de origen náhuatl para designar a rocas de origen volcánico muy ligeras y porosas, de *tetl*, piedra y *tzontli*, cabello (ligeras como los cabellos) (Cabrera, 2002)

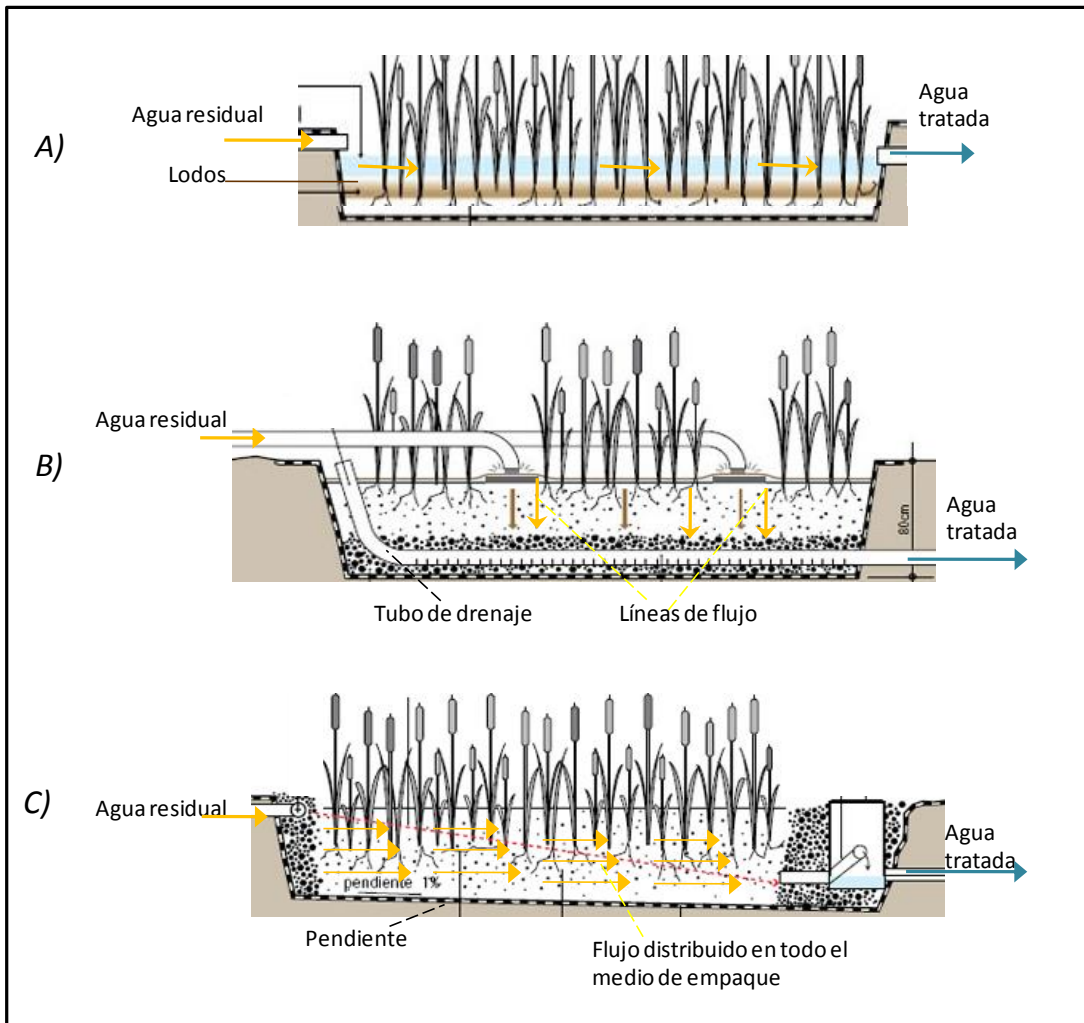
disueltos, medidos como demanda bioquímica de oxígeno (DBO), que presentan los HAFSS ( $0.85 \text{ d}^{-1}$  a  $20^{\circ}\text{C}$ ) en comparación con los de flujo libre superficial ( $0.09 \text{ d}^{-1}$  a  $20^{\circ}\text{C}$ ) (IWA, 2000; Kadleck y Knight, 1993; Wood, 1995). Aunado a esto, la presencia subsuperficial del agua residual, evita que se presenten olores y vectores desagradables, lo cual abate algunas desventajas de estos sistemas de tratamiento.

Dentro de los de tipo subsuperficial, existen los de flujo horizontal y vertical. Los primeros son reactores de flujo continuo que requieren cierta pendiente para garantizar un gradiente hidráulico que permita el flujo del agua y las características de su diseño permite que exista remoción de nitrógeno, debido a la ocurrencia de condiciones aerobias, anóxicas y anaerobias.

Por su parte, los humedales de flujo subsuperficial vertical son dosificados de manera intermitente por lo que son reactores de flujo semicontinuo. Esto propicia una mayor transferencia de oxígeno por convección, lo cual ayuda a evitar la colmatación, ya que se mineralizan más eficientemente los compuestos suspendidos volátiles, además de que es necesario para su degradación y para la nitrificación (Langergraber y col., 2007; Lightbody y col., 2009).

En la Figura 2.1 se observa la constitución y patrón de flujo que diferencian a los tres tipos de humedales artificiales utilizados para el tratamiento de aguas residuales.

Como se mencionó anteriormente, también pueden ser operados como sistemas por lotes (batch en el idioma inglés) en el que puede existir tiempo de residencia hidráulica (de reacción o de permanencia del agua dentro del sistema para sistemas batch) pero sin cargas orgánicas ni hidráulicas.



**Figura 2.1.** Diferentes tipos de humedales artificiales usados en el tratamiento de aguas residuales. A) de flujo libre superficial, B) de flujo vertical subsuperficial y C) de flujo horizontal subsuperficial. Modificado de Tilley y col. (2014)

### II.3.1. Remoción de metales pesados empleando humedales artificiales

Los humedales artificiales de flujo subsuperficial (HAFSS) han demostrado ser sistemas eficientes para el tratamiento de diversos tipos de agua residual. Autores como Hadad y col. (2006), Jayaweera y col. (2008) y Khan y col. (2009), describen casos en los que los HAFSS son utilizados por el sector industrial para remover metales pesados de las aguas residuales, concluyendo buenos resultados de su implementación, aunado a las ventajas económicas y operacionales que presentan (Kadleck y Wallace, 2009; Kivaisi, 2001; Vymazal y Kröpfelová, 2009). Esto da lugar a que investigaciones recientes se basen en explorar sus



ventajas y profundizar en el análisis de su funcionamiento, con la finalidad de obtener una mejor comprensión de sus procesos y poder incursionar en nuevas aplicaciones dentro del tratamiento de las aguas residuales.

Un ejemplo de lo arriba mencionado, es el estudio realizado por Khan y col. (2009), quienes implementaron un sistema de humedal artificial para tratar los efluentes de la zona industrial de Swabi, localizada al suroeste de Pakistán. El sistema de tratamiento consistió en siete celdas arregladas en línea, con un área total de 4,145.72 m<sup>2</sup>, un tiempo de residencia hidráulico de 40 h y las plantas utilizadas fueron macrofitas de la región. Los contaminantes de interés en el estudio, fueron Pb, Cd, Fe, Ni, Cr y Cu, cuyos porcentajes de remoción se muestran en la Tabla 2.3.

**Tabla 2.3.** Eficiencias de remoción de metales pesados, por medio del sistema de humedales implementado por Khan y col. (2009)

	<b>Pb</b>	<b>Cd</b>	<b>Fe</b>	<b>Ni</b>	<b>Cr</b>	<b>Cu</b>
Influente del humedal, mg L <sup>-1</sup>	1.56	0.62	0.27	2.76	0.35	1.45
Efluente del humedal, mg L <sup>-1</sup>	0.78	0.05	0.07	1.63	0.07	0.75
Eficiencia de remoción, %	50	91.9	74.1	40.9	89	48.3

Con base en los resultados obtenidos, los autores concluyen que los humedales artificiales son una tecnología eficiente y sostenible para la remoción de metales pesados, además de presentar la gran ventaja de costo-beneficio. No obstante, la remoción de dichos contaminantes se la atribuyen solamente a la fitorremediación y a las precipitaciones que pueden ocurrir dentro del sistema, sin considerar la intervención de los consorcios microbianos y del material de empaque de los humedales.

Otro estudio relacionado con el uso de humedales artificiales para el tratamiento de metales pesados, es el realizado por Cheng y col. (2002) quienes analizaron durante 14

meses el comportamiento de un humedal artificial de flujo vertical subsuperficial con vegetación de la especie *Cyperus alternifolius*, empacado con grava y arena que en promedio propiciaban una porosidad del 35%. Con la finalidad de inocular el sistema, el humedal fue alimentado con agua residual tratada por un sistema lagunar anaerobio convencional. Posteriormente los autores procedieron a alimentarlo con agua sintética cuya composición además de contener las mismas características del primer influente, contenía metales pesados. La composición del agua residual utilizada durante la última fase experimental se indica en la Tabla 2.4.

**Tabla 2.4.** Composición del agua residual sintética utilizada por Cheng y col. (2002) para alimentar el humedal artificial evaluado en su investigación

Compuesto químico	miligramos disueltos en 1 L de agua residual
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.5
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2.1
KCl	3.51
NH <sub>4</sub> Cl	5.95
NaCl	3.75
MgSO <sub>4</sub>	1.25
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	22.5
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	10.79
Cd SO <sub>4</sub>	0.009
Cu SO <sub>4</sub>	1.04
MnSO <sub>4</sub>	0.302
PbSO <sub>4</sub>	0.0103
ZnSO <sub>4</sub>	4.25

Los autores destacan que las concentraciones de metales pesados en el efluente se encontraron por debajo de los límites de detección del método analítico, exceptuando los valores de Mn, para el cual se presentaron porcentajes de remoción arriba del 80%, lo cual permitía, al igual que para los otros metales, que se cumpliera con los límites máximos permisibles que establece la Organización Mundial de la Salud (WHO por sus siglas en inglés). En paralelo con lo anterior, los autores determinaron la cantidad de metales

pesados acumulados en la vegetación y adsorbidos por el medio de empaque, estableciendo el término Relación de Acumulación (RA), el cual se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$RA = \frac{\text{Concentración de metal en la planta, mg kg}^{-1} \times \text{masa seca de la planta, kg}}{\text{Concentración de metal en influente, mg L}^{-1} \times \text{volumen del humedal, L}} \quad (2-3)$$

Finalmente, los autores mencionan que la acumulación de metales pesados que presentó la especie *C. alternifolius* respecto a la cantidad ingresada, fue de 13.5% para el Al, 6.6% para el Cd, 32.3% para el Cu, 37.2% para el Mn, 14.6% para el Pb y 5.1% para el caso del Zn. Todos los resultados expuestos por Cheng y col. (2002) dan indicios del potencial que pueden tener los sistemas de humedales artificiales para la remoción de metales pesados del agua residual, ya que además de la fitorremediación se suscitan otros procesos dentro del sistema de tratamiento que involucran a los otros componentes de los humedales artificiales.

Por su parte, Buddhawong y col. (2005) estudió la ruta y destino del arsénico y zinc dentro de humedales artificiales, relacionando la presencia de ambos compuestos en la vegetación y el sustrato, con el potencial redox y las concentraciones de hierro disuelto. Para ello, construyó humedales artificiales a escala de laboratorio con dimensiones de 0.5 m de longitud, 0.3 m de ancho y 0.3 m de altura, resultando en un volumen total de 45 L. La vegetación utilizada fue *Juncus effusus* plantadas en grava de 2-5 mm de diámetro, con volumen efectivo de agua residual dentro del humedal de 14 L, cabiendo destacar que el contenido de hierro en la grava fue de 43 mg kg<sup>-1</sup>. Los reactores fueron alimentados de manera discontinua y presentaban tres puntos de muestreo, uno en la parte superior, uno en la parte media y uno en el fondo de la estructura. Aunque el autor no menciona las concentraciones de As y Zn en el influente, en sus resultados señala que el arsénico decreció a lo largo del tiempo para los tres puntos de muestreo de cada reactor. Además 95 % del As fue removido del agua por la acción conjunta del medio de empaque y la vegetación. En lo que respecta al comportamiento del Zn, éste decreció rápidamente, observándose que las

concentraciones de hierro disuelto aumentaron proporcionalmente a dicho decremento. Por su parte, los valores de redox oscilaron entre 430 y 600 mV, sin mostrarse diferencias entre los tres niveles de toma de muestras. A pesar de que Buddhawong y col. (2005) mantiene mucha información de manera implícita, los resultados que reporta dan indicios del potencial de los humedales artificiales para la remoción de As y Zn por medio del intercambio catiónico que propician los constituyentes del medio de empaque coadyuvado por la asimilación de la vegetación.

Otro estudio relacionado con la capacidad de los humedales artificiales para la remoción de metales es el de Liu y col. (2007), quienes probaron las eficiencias de remoción de Cd, Pb y Zn, usando 19 especies vegetales distintas. La experimentación consistió en 19 humedales rectangulares de 2 m<sup>2</sup> de área superficial, utilizando como medio de empaque 25 cm de arena con 2.47% de materia orgánica, lo cual propicia una capacidad de intercambio catiónico de 12.4 cm kg<sup>-1</sup>. El agua residual para la alimentación de los reactores fue preparada en laboratorio con concentraciones de 0.5 mg L<sup>-1</sup> de Cd, 2 mg L<sup>-1</sup> de Pb y 5 mg L<sup>-1</sup> de Zn, siguiendo la metodología de Demirezen y Aksoy (2004). Por su parte, las 19 especies vegetales que se utilizaron (una por cada humedal) provenían de siete familias diferentes, lo cual se muestra en la Tabla 2.5.

Después de cuatro meses de operación, el autor determinó la cantidad de metales pesados acumulados en cada una de las especies vegetales, a través de una digestión con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HF, HNO<sub>3</sub> y HClO<sub>4</sub> seguida por su medición con espectrometría de absorción atómica. Los resultados del estudio denotaron que, para los tres metales analizados, el porcentaje de remoción (traslocado del agua hacia la planta) osciló entre 40.5 y 90%. Así mismo, la especie que presentó el mayor porcentaje de traslocación fue *Isachne gobosa* con más del 90%, seguida por las especies *Cyperus iria* y *Cyperus difformis* que presentaron en promedio 85% de traslocación para los tres metales pesados.

**Tabla 2.5.** Familias y especies de vegetación utilizadas en los humedales artificiales estudiados por Liu y col. (2007)

Código usado por el autor	Familia	Género y especie
A	Polygonaceae	<i>Polygonum lapathifolium</i>
B	Polygonaceae	<i>Polygonum hydrpiper</i>
C	Compositae	<i>Eclipta prostrata</i>
D	Compositae	<i>Aster sunulatus</i>
E	Cyperaceae	<i>Cyperus iria</i>
F	Cyperaceae	<i>Cyperus difformis</i>
G	Cyperaceae	<i>Fimbristylies miliacea</i>
H	Leguminosae	<i>Aeschynomene indica</i>
I	Pontederiaceae	<i>Monochoria vaginalis</i>
J	Amaranthaceae	<i>Alternanthera philoxeroides</i>
K	Gramineae	<i>Echinochloa crus-galli</i>
L	Gramineae	<i>Echinochloa candata</i>
M	Gramineae	<i>Echinochloa oryzicola</i>
N	Gramineae	<i>Zizania latifolia</i>
O	Gramineae	<i>Digitaria sanguinalis</i>
P	Gramineae	<i>Eleusine indica</i>
Q	Gramineae	<i>Phragmites communis</i>
R	Gramineae	<i>Isachne globosa</i>
S	Gramineae	<i>Oryza sativa L.</i>

En contraste, las especies que acumularon la menor cantidad de los contaminantes inorgánicos fueron *Echinochloa candata* y *Eleusine indica* con menos del 41%. El estudio realizado por Liu y col. (2007) denota la importancia del papel que desempeñan las hidrofitas dentro de los humedales artificiales en la remoción de metales pesados. Así mismo, permite conocer las diferencias en cuanto a capacidad de acumulación entre diferentes familias y especies vegetales.

Al igual que Lui Dong y col. (2007) y Khan y col. (2009), hay numerosos estudios en todo el mundo como los de Carballo y col. (2009), Rathnayake y col. (2010), Ruiz-López

(2009), Yalcuk y Ugurlu (2009) que denotan la eficiencia de los humedales artificiales para la remoción de metales pesados por medio de la fitodepuración. Sin embargo, el papel que desempeñan los consorcios microbianos en este proceso, aún no se ha estudiado a profundidad, lo cual limita la explotación de las ventajas potenciales de los sistemas de humedales artificiales.

### II.3.2. Consideraciones para el diseño de los humedales artificiales

En lo que respecta al dimensionamiento de los humedales artificiales, es habitual la modelación de estos sistemas como reactores químicos basados en ecuaciones cinéticas de primer orden (Kadlec y Knight, 1996; Kadlec y Wallace, 2009), las cuales, en condiciones de estado estacionario y flujo pistón ideal, predicen un perfil exponencial de las concentraciones de los contaminantes no conservativos y se denomina modelo K-C. Con esto es posible definir la concentración requerida en el efluente ( $C_t$ ) por medio de la siguiente ecuación fundamental para el dimensionamiento de los humedales artificiales de flujo subsuperficial (HAFSS):

$$C_t = C_0 \cdot \exp(-K_T \cdot t) \quad (2-4)$$

donde:

$C_t$  = concentración del contaminante en el efluente,  $\text{mg L}^{-1}$

$C_0$  = concentración del contaminante en el influente,  $\text{mg L}^{-1}$

$K_T$  = constante de degradación del contaminante,  $\text{t}^{-1}$

$t$  = tiempo de residencia hidráulico, t

En la ecuación 2-4, se puede observar la dependencia que tiene la concentración del contaminante en el efluente con el tiempo de residencia hidráulica (TRH o  $t$ ), ya que a medida de que el TRH se incrementa, mayor será la remoción que se logre, es decir, menor será la concentración del contaminante en el efluente ( $C_t$ ).

Lo mencionado en el párrafo anterior, implica que si se incrementa cada vez más el TRH,  $C_t$  tiende al valor de cero. Sin embargo, existirá una concentración final mínima, que por lo general no es cero, y el valor de la concentración en el efluente se convierte en un valor asintótico conforme el TRH siga aumentando. Es así como se introduce un nuevo parámetro asintótico a la ecuación 2-4, que considera que aunque el TRH sea infinito, la concentración en la salida del humedal nunca será cero. Este parámetro se denomina concentración residual o de fondo ( $C^0$ ), lo que da lugar a un nuevo modelo K- $C^0$ , establecido por Kadleck y Knight (1996):

$$C_t - C^0 = (C_0 - C^0) \cdot \exp(-K_T \cdot t) \quad (2-5)$$

Con las relaciones que establecen las dos ecuaciones anteriores, Reed (1995) formuló la ecuación actualmente utilizada para dimensionar los humedales artificiales de flujo subsuperficial, en la cual el parámetro a obtener es el área superficial necesaria para lograr la concentración deseada en el efluente:

$$\text{Área superficial del humedal} = \frac{Q}{K_T * h * n} \ln\left(\frac{C_0}{C_t}\right) \quad (2-6)$$

donde

$Q$  = Gasto de entrada al humedal, volumen tiempo<sup>-1</sup>

$h$  = Profundidad del medio de empaque, longitud

$n$  = porosidad que exhibe el medio de empaque, adimensional

Determinada el área con la ecuación anterior, sólo resta definir las dimensiones de la longitud y el ancho del humedal, las cuales normalmente se obtienen utilizando las relaciones longitud:ancho (L:W) recomendadas en la literatura.

Aunado a lo anterior, los humedales artificiales, al igual que todos los sistemas de tratamiento de aguas residuales, tienen que considerar en su diseño los aspectos de carga hidráulica y orgánica, ya que en ellas intervienen variables determinantes para el adecuado desarrollo de los microorganismos y correcto acoplamiento de las estructuras que componen al sistema de tratamiento. Tanto la carga hidráulica como la orgánica se encuentran en función del tiempo de residencia hidráulico (TRH), del gasto de diseño (Q) y del área superficial del humedal. Además, la carga orgánica se refiere a la relación que existe entre la cantidad de sustrato orgánico suministrado en el agua de alimentación, con la cantidad de microorganismos que utilizan dicho sustrato para realizar sus funciones bioquímicas, por lo que dicha carga también se encuentra en función de la DQO (u otra medida del material orgánico presente). Debido a que la Ecuación 2-4 solamente es aplicable cuando  $C_0$  se refiere a un contaminante no conservativo, y la importancia que conlleva diseñar los humedales artificiales con las cargas hidráulicas y orgánicas adecuadas, a continuación se menciona una pequeña reseña de estudios enfocados a la variación del TRH, que finalmente redundan en la variación de las cargas hidráulicas y orgánicas, con la finalidad de proporcionar las bases hidráulicas necesarias para el desarrollo de la parte experimental del presente trabajo de investigación.

Numerosos autores como Platzer y Mauch (1997); Langergraber y col. (2007); Prochaska y Zouboulis (2009), mencionan que los humedales artificiales de flujo vertical subsuperficial (HAFVS) diseñados con cargas hidráulicas de 0.05 a 0.060  $\text{mm}^3\text{mm}^{-2} \text{d}^{-1}$  y orgánicas de 10 a 40 g DBO  $\text{m}^{-2}\text{d}^{-1}$  presentan remociones alrededor del 90% para los sólidos suspendidos totales (SST), demanda química de oxígeno (DQO) y nitrógeno amoniacal ( $\text{NH}_4^+$ ). En lo que respecta a la remoción de fósforo inorgánico, medido como ortofosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), los porcentajes de remoción oscilan entre 20 y 30%. Cabe mencionar que estos resultados fueron obtenidos en agua residual doméstica sometida a sedimentación primaria antes de entrar a los sistemas de humedales.



Entre los autores más citados por los diferentes investigadores en el área de tratamiento de aguas residuales por medio humedales artificiales, se encuentran Wood y col. (1995) quienes pertenecen al área de especialistas de la Asociación Internacional del Agua (IWA por sus siglas en inglés) y mediante sus investigaciones recomienda como carga orgánica para el diseño de humedales artificiales de flujo vertical  $7.5 \text{ g DBO m}^{-2}\text{d}^{-1}$ . Así mismo, señalan una relación largo:ancho de 0.25:1-5:1 y un tiempo de residencia hidráulico de 2 a 7 días.

Por su parte, Healy y col. (2006) y Winter y Goetz (2003) mencionan que los humedales artificiales de flujo vertical subsuperficial deben ser diseñados con un valor de carga orgánica que se encuentre entre 6 y  $12 \text{ g DBO m}^{-2}\text{d}^{-1}$ . Con este valor garantizado, las otras condiciones en el diseño como la porosidad, relación largo:ancho y tipo de vegetación pueden ser variables. En la Tabla 2.6 se mencionan las cargas hidráulicas utilizadas por diversos autores en el diseño de humedales artificiales de flujo vertical subsuperficial y los porcentajes de eficiencia de remoción obtenidos. Del mismo modo, la Tabla 2.7 se refiere a las cargas orgánicas.

#### **II.4. BACTERIAS TOLERANTES A METALES PESADOS**

Para el presente trabajo, es importante tener como antecedentes tanto la interacción de los microorganismos con los metales pesados, como los estudios relacionados con la tolerancia y/o capacidad de remoción hacia éstos, que pueden presentar algunas bacterias.

Los procesos por los cuales los organismos interactúan con los metales pesados son muy diversos. Sin embargo, Cañizares-Villanueva (2000) menciona que existen en la práctica tres categorías generales de procesos biotecnológicos para el tratamiento de residuos líquidos que contienen metales tóxicos: la biosorción, la precipitación extracelular y la captación a través de biopolímeros purificados y de otras moléculas especializadas, derivadas de las células microbianas. Estos procesos no son excluyentes y pueden involucrar fenómenos fisicoquímicos y biológicos.

**Tabla 2.6.** Eficiencias de remoción de materia orgánica obtenidas en humedales artificiales a diferentes cargas hidráulicas

Autor	Localización	Carga hidráulica mm <sup>3</sup> mm <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup>	Remoción DQO %	Remoción DBO %
Masi y col., 2007	Italia	18	83	93.8
		150	94	95
Langergraber y col., 2007	Austria	≤27	93.8	98.2
Zhao y col., 2009	China	120	N.r.	90
Wood, 1995	USA	2 a 30	N.r.	92
Kadleck y Knight, 1996	USA	80-300	N.r.	70-95
Vymazal y Kröpfelová, 2009	República Checa	<200	N.r.	>80
Kantawanich y Brix, 2009	Dinamarca	20	40	N.r.
		50	65	N.r.
		80	90	N.r.
Ramírez-Carrillo y Luna-Pabello, 2009	México	72	>90	N.r.
Vacca y col., 2005	Alemania	60	90.5	N.r.
Prochaska y col., 2009	Grecia	17	88.5	N.r.
Platzer y Mauch, 1997	Alemania	45-60	≥90%	N.r.

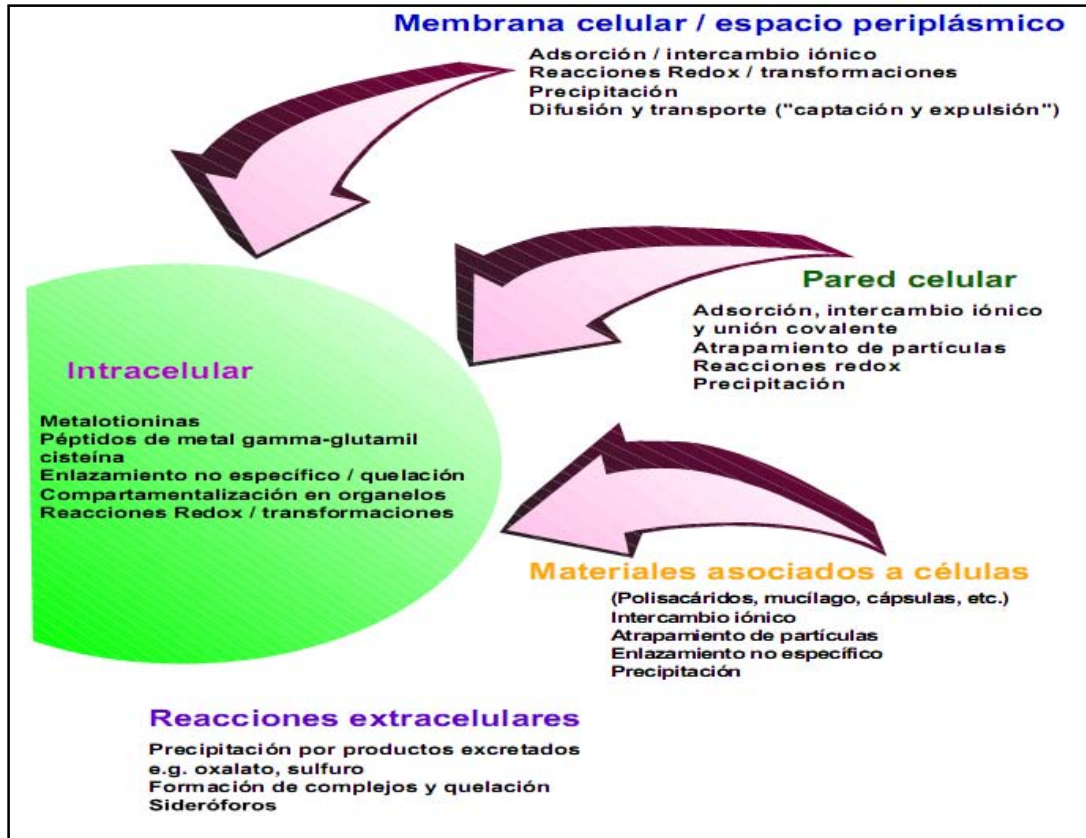
N.r. No reportado

**Tabla 2.7.** Eficiencias de remoción obtenidas en humedales artificiales a diferentes cargas orgánicas

Autor	Localización	Carga orgánica		TRH (d)	Remoción (%)
		gDBO m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup>	gDQO m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup>		
Lüderitz y col., 2001	Alemania	21	N.r.	N.r.	91
		10	N.r.	N.r.	95
Brix y Arias, 2005	Dinamarca	N.d.	≤20	N.r.	92
Winter y Goetz, 2003	Alemania	< 20	N.r.	N.r.	93.5
Zhao y col., 2009	China	N.d.	1055	N.r.	75
Puigagut y col., 2006	España	22.8 a 29.8	N.r.	N.r.	88
Salas, 2010	México	20	N.r.	N.r.	90
García y col., 2008	México	N.r.	23.1	0.011	36
		N.r.	5.4	0.056	80
Prochaska, 2009	Grecia	20	N.r.	1.5	96.13
		40	N.r.	1.5	88.315
		40	N.r.	3.0	92.05
		20	N.r.	3.0	96.78
Yalcuk y Ugurlu, 2009	Turquía	7.6	N.r.	11	22.95
		11	N.r.	8	26.20
Guido, 2008	México	14.6	N.r.	N.r.	N.r.
Massi y col., 2007	Italia	N.r.	2.9	1.5	83
		N.r.	2	3	94
Platzer y Mauch, 1997	Alemania	10 a 40	N.r.	N.r.	≥90

N.r. No reportado

En la Figura 2.2 se muestran las posibles interacciones que se suscitan cuando los microorganismos entran en contacto con los metales pesados presentes en solución.



**Figura 2.2.** Mecanismos de interacción entre metales pesados y microorganismos. La localización de algunos procesos puede variar entre grupos y cepas. Tomado de White y col. (1995)

Existen investigaciones a nivel experimental sobre la remoción de metales pesados por parte de los organismos procarióticos. Un ejemplo de esto es el trabajo de Orellana (2009), quien evaluó la producción de sulfuro de hidrógeno por parte de un consorcio de bacterias sulfato-reductoras. El autor reporta que se utilizaron concentraciones de sulfatos de 10, 20 y 30 mg L<sup>-1</sup> y ácido láctico como fuente de carbono suministrado en concentraciones de 70, 50 y 20 mg L<sup>-1</sup> respectivamente. La mejor producción de sulfuro de hidrógeno se obtuvo con la combinación de 70 mg L<sup>-1</sup> de ácido láctico y 30 mg L<sup>-1</sup> de sulfatos, el cual se redujo hasta una concentración 11 mg L<sup>-1</sup> en el transcurso de 12 horas.

Rathnayake y col. (2010) estudiaron la tolerancia de dos especies de bacterias Gram positivas, colonizadoras de suelos prístinos, hacia los metales Zn, Cd y Cu. En su trabajo aislaron dos especies de bacterias: *Bacillus thuringiensis* y *Paenibacillus polymixa*, para posteriormente someterlas a diferentes concentraciones de los metales en un rango de 0-8 mg L<sup>-1</sup> e identificar las concentraciones letales medias para cada una de las dos especies bacterianas.

Los autores reportan que ambas especies de bacterias Gram positivas resultaron altamente sensibles a la presencia de Cu, lo cual es principalmente cierto para el consorcio del género *Paenibacillus* que presentó una concentración letal media de 0.011 ±0.003 mg L<sup>-1</sup>. En la Tabla 2.8 se presentan las concentraciones letales medias determinadas para cada especie bacteriana y para cada metal pesado estudiado.

**Tabla 2.8.** Concentraciones letales medias de Cd, Cu y Zn para el género *Paenibacillus* y la especie *B. thuringiensis* (Rathnayake y col., 2010)

Bacteria	Cd <sup>2+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Cu <sup>2+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Zn <sup>2+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )
<i>Paenibacillus</i>	1.77 ± 0.16	0.011 ± 0.003	7.02 ± 0.44
<i>polymixa</i>			
<i>Bacillus. thuringiensis</i>	1.53 ± 0.01	0.082 ± 0.004	2.98 ± 0.2

Una investigación que resalta para el presente proyecto de tesis, es el trabajo de Salgado-Bernal y col. (2012), quienes evaluaron la resistencia a metales pesados y su remoción del agua que presentaron 13 aislados bacterianos provenientes de un humedal natural, ubicado en Cuba, de la especie *Typha dominguensis*. Los metales y sus concentraciones, que le fueron suministrados a las cepas bacterianas fueron 207, 414 y 621 mg L<sup>-1</sup> de Pb; 104, 208 y 312 mg L<sup>-1</sup> de Cr; 67.4, 134.8 y 202.2 mg L<sup>-1</sup> de Cd y 2, 4 y 6 mg L<sup>-1</sup> de Hg. Los resultados de Salgado-Bernal y col. (2012) señalan que para el caso del plomo, la

mayoría de los aislados resultaron resistentes y presentaron remoción del metal. Con respecto al cromo, cuatro aislados lograron tanto tolerancia como remoción del metal. Por otra parte, dos aislados resultaron resistentes al cadmio, sin remover el metal de la fase acuosa y de manera similar al caso del plomo, los resultados del mercurio indican que la mayoría de los aislados removieron el metal de la solución. En síntesis, los autores señalan que los 13 aislados mostraron resistencia a más de un metal, además de que por lo menos seis de ellos presentaron la propiedad de remover los cationes de la solución acuosa. Este resultado plantea el mejoramiento del proceso depurativo de los metales pesados a través de humedales artificiales, que contengan cepas bacterianas tolerantes que en conjunto con la vegetación, sean agentes biorremediantes.

## CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

En el presente capítulo se describe en secuencia la metodología empleada para la obtención de los resultados enfocados al cumplimiento de los objetivos del trabajo de tesis previamente planteado.

### III.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la parte experimental se trabajó a escala de laboratorio con ocho reactores, que simulan humedales artificiales, alimentados con agua residual sintética con un contenido conocido de metales pesados. Cuatro de los reactores contenían plantas, de los cuales dos fueron inoculados con cepas bacterianas específicas y los otros dos se mantuvieron sin inoculación. De los otros cuatro reactores sin plantas, dos fueron inoculados con las cepas bacterianas y los otros no. Acorde a esto, se trabajó por duplicado con cuatro tipos de reactores que resultan de las combinaciones entre inoculación y vegetación presente, tal y como se muestra en la Tabla 3.1 y Figura 3.1.

**Tabla 3.1.** Conformación de los ocho humedales artificiales en función de la presencia de la inoculación y presencia de vegetación

<i>TRH</i>	<i>Con inóculo</i>				<i>Sin inóculo</i>			
	<i>Con planta</i>		<i>Sin planta</i>		<i>Con planta</i>		<i>Sin planta</i>	
	<b>RIV</b>		<b>RI</b>		<b>RV</b>		<b>RC</b>	
2 d	X	X	X	X	X	X	X	X
4 d	X	X	X	X	X	X	X	X

RIV = Reactor con inóculo y con vegetación

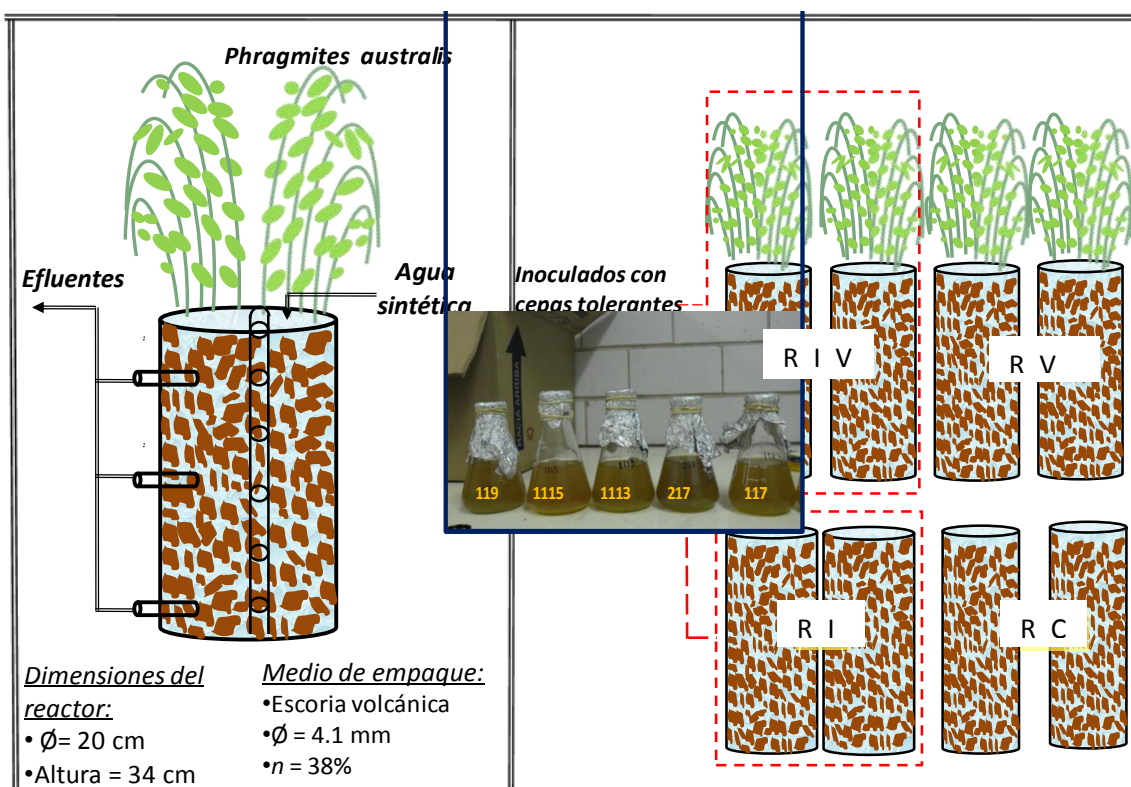
RV = Reactor con vegetación

RI = Reactor con inóculo

RC = Reactor sin inóculo y sin vegetación

En la Tabla 3.1 se indica que el experimento consideró dos factores: tipo de reactor y tiempo de residencia hidráulico (TRH), teniendo como variable de respuesta o

dependiente, el porcentaje de remoción de cada metal pesado. Para el primer factor, los niveles son: reactor inoculado con vegetación (RIV), reactor inoculado (RI), reactor con vegetación (RV) y reactor sin inóculo y sin vegetación (RC). Para el segundo factor, los TRH son 2 y 4 días. Este análisis estadístico, en apariencia, presentaba un arreglo factorial  $2^4$  de tipo mixto, ya que contiene como factor aleatorio el TRH y como fijo el tipo de humedal artificial, lo cual da un total de 8 observaciones por réplica, 16 observaciones en total.



**Figura 3.1.** Conformación de los cuatro tipos de humedales artificiales implementados y características constructivas de cada uno de ellos

No obstante, el apego a la aleatorización completa del diseño factorial, implicaba tener 16 unidades experimentales de manera concomitante, lo cual experimentalmente resultó complicado por la cantidad y dimensiones de los reactores, volúmenes de agua, acumulación de residuos, y tiempos analíticos. Además y de suma importancia, los humedales artificiales fueron operados durante 151 días, teniendo 34 mediciones de la

remoción del metal pesado de interés cada 4 días (intervalo aplicable para los dos niveles del factor TRH). Esta consideración por su naturaleza de temporalidad, también restringió la aleatorización entre bloques del diseño factorial.

Aunado a lo arriba mencionado, el experimento propuesto (Tabla 3.1) se encontraba en el contexto de parcelas subdivididas con más de dos factores (que es un caso específico del diseño factorial), en el cual las mediciones u observaciones de cada 4 días también se consideran como un factor (Montgomery, 2012; Jones y Nachtsheim, 2009). Así, el arreglo en parcelas subdivididas para los 3 factores fue el siguiente: 8 parcelas completas, derivadas de la combinación de cada uno de los niveles de los factores (tipo de reactor con 4 niveles y TRH con 2 niveles). Dado que se tuvieron 34 observaciones o mediciones en el tiempo, este fue el número de subparcelas para cada una de las parcelas completas (Webster y Payne, 2002). Así, se tuvieron 272 observaciones en total por cada réplica, y considerando que el experimento fue por duplicado, en total se tuvieron 544 observaciones para cada metal pesado. Este arreglo se muestra de manera objetiva en la Tabla 3.2.

**Tabla 3.2.** Diseño experimental de “Parcelas subdivididas con más de un factor” basado de Webster y Payne (2002); Montgomery (2012)

<i>Subparcelas</i>	<i>Parcelas completas con dos factores (Tipo de reactor y TRH)</i>															
<b>Día de observación</b>	<b>RV TRH 4 d</b>		<b>RC TRH 4 d</b>		<b>RIV TRH 4 d</b>		<b>RI TRH 4 d</b>		<b>RIV TRH 2 d</b>		<b>RI TRH 2 d</b>		<b>RV TRH 2 d</b>		<b>RC TRH 2 d</b>	
<b>1</b>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<b>2</b>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<b>3</b>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<b>4</b>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
.																
.	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
.																
<b>34</b>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x



Lo anterior corresponde a un experimento balanceado, ya que los tratamientos son replicados igualmente. Más adelante se describen los análisis estadísticos aplicables a los experimentos realizados.

## **III.2. DISEÑO y CONSTRUCCIÓN de los HUMEDALES ARTIFICIALES a ESCALA de LABORATORIO**

### **III.2.1. Dimensiones y medio de empaque**

Los humedales artificiales, a escala de laboratorio, fueron construidos con cilindros de cloruro de polivinilo de 39 cm de altura y 20 cm de diámetro. Los contenedores fueron llenados con roca volcánica (tezontle) con diámetro de partícula de 3.8-4.5 mm y porosidad de 38% (EPA, 2000). Esta porosidad ha demostrado, en diversos estudios, propiciar un buen funcionamiento por parte de los humedales artificiales al coadyuvar en evitar el fenómeno de colmatación, tanto de manera experimental como teórica. Además, dados los objetivos del proyecto, el tezontle fue lavado y esterilizado en autoclave previo a su disposición en los reactores.

Durante toda la experimentación, se mantuvo una columna de agua cinco centímetros por debajo del nivel del tezontle, resultando 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 (Puigagut y col., 2006; Winter y Goetz, 2003).

### **III.2.2. Vegetales utilizados y pruebas de fitotoxicidad**

La especie vegetal utilizada en cada uno de los humedales a escala de laboratorio fue la especie *Phragmites australis*, que es una hidrófita emergente propia de la región donde se realizó la experimentación. Así mismo, ha demostrado coadyuvar en los procesos de remoción que se presentan dentro de los humedales, aunado a que es menos sensible a variaciones en las condiciones ambientales y fluctuaciones en la alimentación de los sistemas de tratamiento (Bonanno, 2011; Cui, 2010; Orduña-Bustamante y col., 2011). Cabe

mencionar que para el caso del humedal que contenía vegetales y microorganismos tolerantes (HAIV), la raíz y el rizoma fueron esterilizados por medio de NaClO (10%) y C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O (70%) (De Souza y col., 1999).

Para conocer los niveles de metales pesados que pueden tolerar las plantas, se realizó un bioensayo de toxicidad con semillas de lechuga *L. sativa*, evaluando los efectos fitotóxicos de la mezcla de metales pesados de interés. La metodología fue la descrita por Sobrero (2004), la cual permite evaluar dicha fitotoxicidad de manera estática, tanto en el proceso de germinación de semillas, como en el desarrollo de las plántulas de lechuga a través de mediciones de longitud de la radícula e hipocótilo. En términos generales, el bioensayo consistió en suministrar la mezcla de metales pesados (Cr, Pb y Hg) sobre papel filtro y algodón contenidos en cajas petri. Las diferentes concentraciones probadas se describen en la Tabla 3.3. 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 incubados los especímenes de *L. sativa* 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).

**Tabla 3.3.** Concentraciones de metales pesados en las mezclas aplicadas durante las pruebas de toxicidad tanto del consorcio microbiano como en las semillas de *L. sativa*

Nivel de Concentración	Combinación de concentraciones de metales pesados, mg L <sup>-1</sup>		
	Cromo	Plomo	Mercurio
0	0.0	0.0	0.0
1	0.52	0.82	0.003
2	3.50	5.50	0.02
3	10.50	16.50	0.06
4	21.00	33.00	0.12
5	42.00	66.00	0.24
6	70.00	110.00	0.40

### **III.3. USO DE CEPAS TOLERANTES A METALES PESADOS**

La inoculación se realizó en los humedales artificiales RIV y RI con un consorcio bacteriano conformado por cinco cepas designadas, aisladas y clasificadas genéticamente por Salgado-Bernal y col. (2012) como TAN117, TAN119, TAN1113, TAN1115 y TAN217. Todas del género *Bacillus* y Gram positivas.

Estas cepas se encontraban en medio agar nutritivo a 4 °C en posición inclinada y fueron resembradas en condiciones de asepsia en un nuevo medio previamente esterilizado para obtener cepas viables, para posteriormente inocular los humedales artificiales con los procedimientos descritos a continuación.

#### **III.3.1. Prueba de tolerancia a metales pesados por parte del consorcio bacteriano**

Para determinar el grado de inhibición bacteriana y conocer la concentración letal (CL) o efectiva (CE), se realizó un bioensayo con las cinco cepas seleccionadas, con base en los estudios de Salgado-Bernal y col. (2012). De manera similar a las pruebas de fitotoxicidad, las concentraciones probadas de los cationes fueron las descritas en la Tabla 3.3, ya que se encuentran cercanas a las máximas reportadas para efluentes industriales de industrias propias de la rama.

En términos generales, se preparó por triplicado Caldo Nutriente por cada concentración de la mezcla de metales pesados a probar (Tabla 3.3). Posteriormente se procedió a inocular, con asadas, tomando el inóculo por picadura de cada Agar Nutriente que contenía a las bacterias de interés. Luego de 40 horas de incubación a 32 °C y 55 rpm se realizó la cuantificación de organismos procarióticos por medio del vertido en placa para obtener los resultados en unidades formadoras de colonias (UFC). La CL<sub>50</sub> y/o CE<sub>50</sub> se calcularon relacionando las mencionadas UFC con su respectiva concentración de metales pesados.

### **III.3.2. Inoculación de los humedales artificiales**

Una vez que se seleccionaron las cepas del consorcio microbiano y se realizaron las pruebas de toxicidad, se dividió el volumen efectivo del reactor (4.05 L) entre el número de cepas que conforman el consorcio. Entonces cada porción de volumen estuvo compuesta por una de las cepas, en su respectivo caldo nutritivo disuelto en agua sintética. Cabe mencionar que en esta etapa el agua sintética aun no contenía los metales pesados.

Posteriormente, los humedales (RIV y RI) fueron inoculados vertiendo una por una las fracciones de volumen de manera aleatoria. Los dos humedales sin inoculación (RV y RC) también fueron llenados con la misma agua solución, pero sin el inóculo bacteriano. La concentración de DQO de dicha solución para cada uno de los humedales artificiales fue de aproximadamente 700 mg L<sup>-1</sup>.

Finalmente, a partir del tercer día de la inoculación y de manera diaria, se tomaron muestras de agua para realizar la prueba de UFC, hasta que conocer en qué tiempo los reactores se encontraban colonizados.

## **III.4. OPERACIÓN DE LOS SISTEMAS DE HUMEDALES ARTIFICIALES**

### **III.4.1. Características del agua de alimentación**

Los reactores operaron de forma discontinua (“batch”, en inglés), con agua residual sintética con contenido de fuente de carbono (expresada como 500 mg L<sup>-1</sup> de DQO), nitrógeno (30 mg L<sup>-1</sup>), fósforo (6 mg L<sup>-1</sup>) y potasio (30 mg L<sup>-1</sup>), utilizando sacarosa (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>) sulfato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), fosfato de sodio (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) y nitrato de potasio (KNO<sub>3</sub>) respectivamente (Orduña y col., 2011); que fueron disueltos en agua de la llave. A esta solución le fueron añadidas las cantidades de sales necesarias de nitrato de cromo, Cr(NO<sub>3</sub>)<sub>6</sub>, nitrato de plomo, Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, y cloruro mercuríco HgCl<sub>2</sub>, para conseguir las concentraciones deseadas (21 mg L<sup>-1</sup> de Cr, 0.11 mg L<sup>-1</sup> de Hg y 28 mg L<sup>-1</sup> de Pb. Estas

concentraciones fueron definidas con base en los resultados de las pruebas de fitotoxicidad y de tolerancia del consorcio bacteriano hacia los metales pesados, además de considerar las concentraciones características de metales pesados que contienen los efluentes de industrias propias de la rama (Tabla 2.2).

#### **III.4.2. Operación de los humedales artificiales y toma de muestras**

Como se ha mencionado, los humedales artificiales operaron de forma discontinua, por lo que las variables carga orgánica y carga hidráulica no son aplicables, ya que contienen al flujo volumétrico en su estructura matemática. Por su parte, la variable tiempo de residencia hidráulico no es aplicable en cuanto al concepto de volumen dividido por el gasto volumétrico. No obstante, por definición, también se refiere al tiempo de permanencia del agua en un sistema, que es particularmente como se maneja en el presente trabajo, que a la vez se interpreta como el tiempo de recambio de agua que precisamente es la frecuencia con la que el volumen total, de cada uno de los reactores, es removido y sustituido con nueva agua de alimentación. Además, los resultados de este tipo de operación son representados por la ecuación de balance de masa en estado estacionario. En este sentido, los tiempos de recambio de agua a probar en la presente investigación son 2 y 4 días.

A lo largo de la fase experimental se tomaron muestras del influente y efluente, cuantificando los parámetros de pH, temperatura, pOR, DQO, SSV, UFC y la cantidad de metales disueltos. Las primeras tres determinaciones se realizan con lo establecido en la normativa mexicana (DOF, 2000), la DQO por el método que estipula la NMX-AA-030-SCFI-2001, la determinación de SSV por la NMX-AA-034-SCFI-2001 y las UFC por la metodología descrita de Aquiahuatl y Pérez (2004). Por su parte, la determinación de metales se realizó mediante espectrometría de absorción atómica, en un equipo Perkin-Elmer Optima 4300DV siguiendo el protocolo del Método 3005A de la EPA (1996). En este método se indica que las muestras tienen que ser filtradas previas a su medición en el espectrómetro de absorción atómica, por lo que se aprovechó para filtrar en filtros de membrana Millipore®

de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro, y así obtener las muestras de metales en suspensión para su posterior determinación por el método establecido en el DOF (2002) y EPA (1996).

Finalmente, para el cálculo del balance de masa, también se determinó la cantidad de metales pesados contenidos en el medio de empaque y en los precipitados que existan, a través de la ISO 11466:1995. Con el mismo objetivo, la biomasa vegetal fue retirada de los reactores y se le determinó la cantidad de metales al separar la parte aérea de la raíz para conocer si existió hiperacumulación. La metodología a seguir es la descrita en Liu y col. (2007).

#### **III.4.3. Nomenclatura de los humedales artificiales**

Para facilitar el análisis de los resultados de los experimentos, los humedales artificiales fueron denominados dependiendo de sus características:

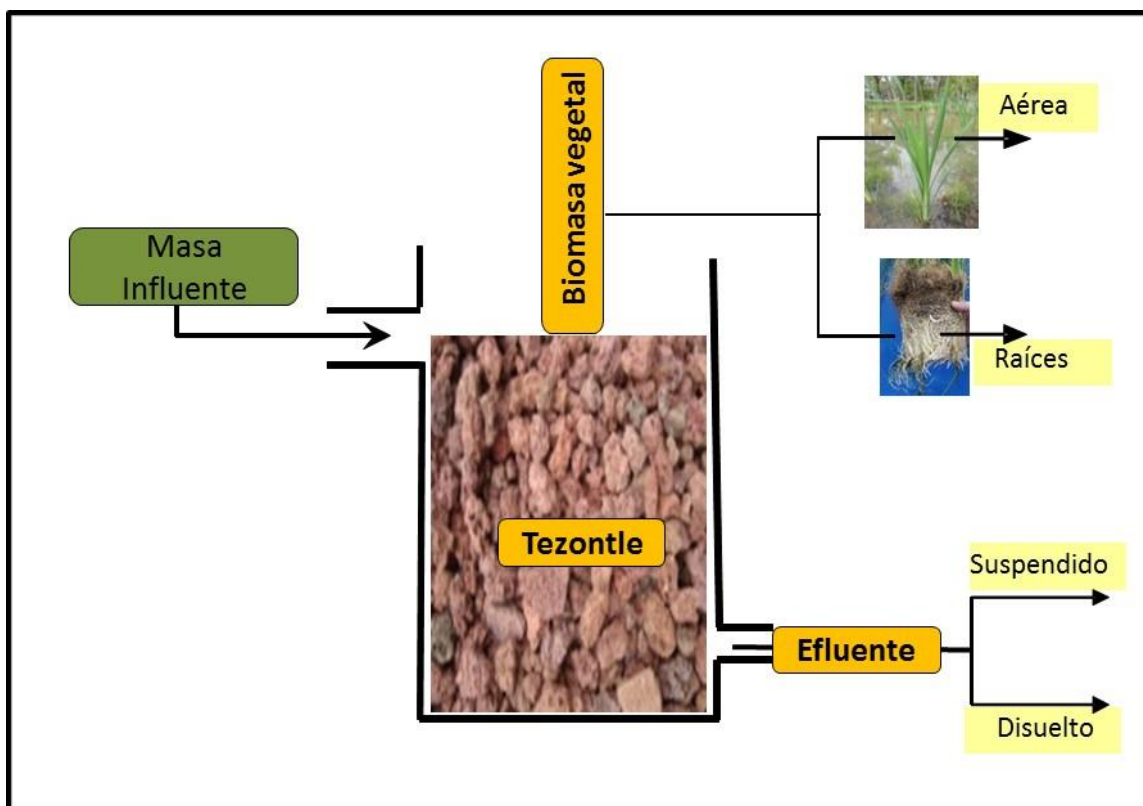
RC	Reactor control, sólo medio de empaque
RV	Reactor con vegetales
RI	Reactor sin vegetales inoculado con cepas tolerantes
RIV	Reactor con vegetales inoculado con cepas tolerantes

#### **III.5. BALANCE DE MASA**

En relación al objetivo enfocado a estudiar la acumulación y distribución de los metales pesados dentro de los humedales artificiales, se calculó un balance de masa con cada metal. En la Figura 3.2 se muestra en términos generales el balance de masa aplicable a cada metal, considerando las características de los humedales artificiales. El recuadro verde representa la masa total influente que al ingresar al humedal tiene como destinos ambientales el efluente, el tezontle y la biomasa vegetal, representados con recuadros

amarillo intenso. De éstos, la biomasa vegetal se subdivide en la parte aérea y la parte subterránea (rizoma y raíz) y el efluente se subdivide en su fracción disuelta y suspendida. Cada una de estas subdivisiones se consideran subcompartimientos ambientales y se representan en la Figura 3.2 con recuadros amarillo tenue. Cabe mencionar que en el caso del mercurio existieron pérdidas por evaporación y/o transpiración, lo cual depende de la especie química del metal, que a la vez se encuentra en función del pOR y pH del medio (Huang y Cunningham, 1996; Robinson y col., 2006).

Partiendo de lo anterior, a continuación se describe la metodología seguida para conocer la cantidad de metales pesados en cada uno de los compartimientos indicados en la Figura 3.2.



**Figura 3.2.** Diagrama del balance de masa para cada metal pesado ingresado en los humedales artificiales, donde se muestran los posibles destinos ambientales

### III.5.1. Metales pesados en influente y efluente

Dado que se tiene como valor constante el volumen ( $v$ ) para cada reactor y se determinó la concentración de cada metal pesado posterior a cada día de alimentación ( $c$ ), la fórmula para conocer la masa del metal pesado en el efluente se describe en la ecuación (3-1).

$$MME = v \sum_{t=1}^n c_t \quad t = 1, \dots, n \quad (3-1)$$

donde

MME = Masa de metal en el efluente, mg

$v$  = volumen del agua de alimentación, L

$c_t$  = concentración en el tiempo respectivo ( $c_1$  = concentración en el tiempo 1),  $\text{mg L}^{-1}$

$t_i$  = día de operación inicial, d

$t_f$  = número total de días de alimentación, d

Para el caso del influente, la concentración es siempre la misma, por lo que la fórmula queda de la siguiente manera:

$$MMI = v \sum_{i=1}^a c_i \quad i = 1, \dots, a \quad (3-2)$$

donde

MMI = masa del metal en el influente, mg

$c_i$  = concentración en el influente,  $\text{mg L}^{-1}$

En lo que respecta a la masa del metal en los sólidos suspendidos, el procedimiento analítico seguido considera, a través de la microfiltración, una separación entre la fracción suspendida y disuelta del metal, y la cuantificación se realiza a las partes totales y disueltas, por lo que la cantidad de masa del metal disuelto en el efluente ( $MME_D$ ) se calcula con la



ecuación (3-1) y la masa de metal suspendida en el efluente ( $MME_S$ ) es la diferencia entre el contenido en el efluente total y disuelto:

$$MME_S = MME - MME_D \quad (3-3)$$

### III.5.2. Metales pesados en la biomasa vegetal

En el caso de la masa total de metal presente en los vegetales ( $MMV$ ), solamente se utiliza la concentración de metal cuantificada, ya que por procedimiento analítico se encuentra en  $mg\ kg^{-1}$ . Así, este valor es multiplicado por la masa seca de toda la planta, obteniéndose  $MMV$ .

Para conocer la masa de metal en la parte aérea y en la raíz, al momento de extraer la planta se realizó la separación de estas dos partes, procesándose desde ese momento como muestras independientes y así obtener la masa de metal en la parte aérea de la planta ( $MMV_A$ ) y la masa de metal en la raíz y rizoma de los vegetales ( $MMV_R$ ).

### III.5.3. Metales pesados en el medio de empaque

Al igual que con la biomasa vegetal, la concentración de metal pesado en el tezontle es expresado en  $mg\ kg^{-1}$ , por lo que para conocer la cantidad de metal pesado en el tezontle ( $MMT$ ) solamente se multiplica dicha concentración por la masa seca de todo el tezontle contenido en cada reactor.

Finalmente, el balance de masa por cada metal pesado queda definido por la ecuación (3-4), donde entrada es igual a salida más acumulación.

$$MMI = MME + MMV_A + MMV_R + MMT \quad (3-4)$$

### **III.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Partiendo del diseño experimental planteado en el apartado III.1 y de lo descrito en el apartado III.5, acerca de los destinos ambientales de los metales pesados, a continuación se describen brevemente los análisis estadísticos empleados para la interpretación de los resultados del presente trabajo de tesis. Cada uno de estos análisis fueron conducidos utilizando el paquete estadístico Minitab 15 Inc, 2014.

#### **III.6.1. Análisis estadísticos de la remoción de metales pesados y otros parámetros fisicoquímicos**

Como se mencionó anteriormente, el experimento estipulado en la Tabla 3.2 señala que no fue posible la formación de bloques completamente aleatorios, cuya ventaja es que disminuyen el efector perturbador o ruido que pueda perjudicar en la precisión de los análisis. Consecuentemente, los resultados de remoción de metales pesados y los valores de las variables dependientes pOR, pH, DQO, SSV, y temperatura fueron analizados con un análisis de varianza de medidas repetidas, ya que se encuentran en función del tiempo.

Aunado a lo anterior, se analizó la covarianza entre cada variable independiente para que, en el caso de existir (positiva o negativa), fuera introducida al momento de correr los análisis y así conseguir la antidependencia, eliminando algún efecto perturbador o de ruido (Montgomery, 2012).

#### **III.6.2. Análisis estadísticos de la acumulación y distribución de metales en los humedales artificiales**

La cantidad de metal acumulado (variable dependiente) en cada compartimiento ambiental fue contrastada entre los cuatro tipos de humedales artificiales y entre el tiempo de residencia hidráulico (TRH) utilizado, siendo el tipo de humedal y el TRH las variables independientes (factores con cuatro y dos niveles respectivamente). Además, por cada muestra se procuraron tres réplicas. Acorde a lo anterior, se aplicó un análisis de varianza de dos vías.

Previo a los análisis estadísticos mencionados en los puntos III.6.1 y III.6.2 se aplicó una prueba de normalidad y homocedasticidad de Kolmogorov-Smirnov. En los casos en que la distribución no resultaba normal, se aplicó una transformación Box-Cox. Sin embargo, para el caso particular del mercurio, no fue posible la normalización de los datos, por lo que se procedió a analizarlos a través del Modelo Lineal General (MLG) en el que la variable respuesta puede tener cualquier distribución exponencial (normal, gamma, poisson, etc.) y la varianza de los errores puede variar respecto al tiempo (Montgomery, 2012).

## CAPÍTULO IV. RESULTADOS y DISCUSIÓN

### IV.1. PRUEBAS DE FITOTOXICIDAD

Con los procedimientos descritos en el apartado III.2.2, se encontró que no existieron efectos letales por parte de los metales pesados hacia la vegetación, ya que todas las semillas lograron germinar después del tiempo de incubación. No obstante, se observaron marcados efectos inhibitorios sobre el desarrollo de las plantas en comparación con el control que no contenía mezcla de metales pesados, tal y como se muestra de manera objetiva en la Tabla 4.1.

**Tabla 4.1.** Crecimiento de la radícula e hipocótilo en presencia de cada una de las mezclas de metales pesados evaluadas (promedios  $\pm$  desviación estándar)

Cromo, mg L <sup>-1</sup>	Plomo, mg L <sup>-1</sup>	Mercurio, mg L <sup>-1</sup>	Longitud Promedio Radícula, cm	Longitud promedio Hipocótilo, cm
0	0	0	2.70 $\pm$ 0.16	4.45 $\pm$ 0.32
0.525	0.825	0.003	2.14 $\pm$ 0.20	4.13 $\pm$ 0.46
3.5	5.5	0.02	1.93 $\pm$ 0.21	3.96 $\pm$ 0.43
10.5	16.5	0.06	1.41 $\pm$ 0.16	3.31 $\pm$ 0.25
21	33	0.12	0.31 $\pm$ 0.26	1.87 $\pm$ 0.12
42	66	0.24	0.26 $\pm$ 0.35	2.15 $\pm$ 0.51
70	110	0.45	0.18 $\pm$ 0.23	1.65 $\pm$ 0.20

En esta misma Tabla 4.1, 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 metales pesados. Estas respuestas de los órganos vegetales ante el efecto de altas dosis de metales

pesados suministradas, coincide con lo reportado por Di Salvatore y col. (2008) y por Walter y col. (2006), quienes también trabajaron con los mismos metales utilizados en la presente investigación.

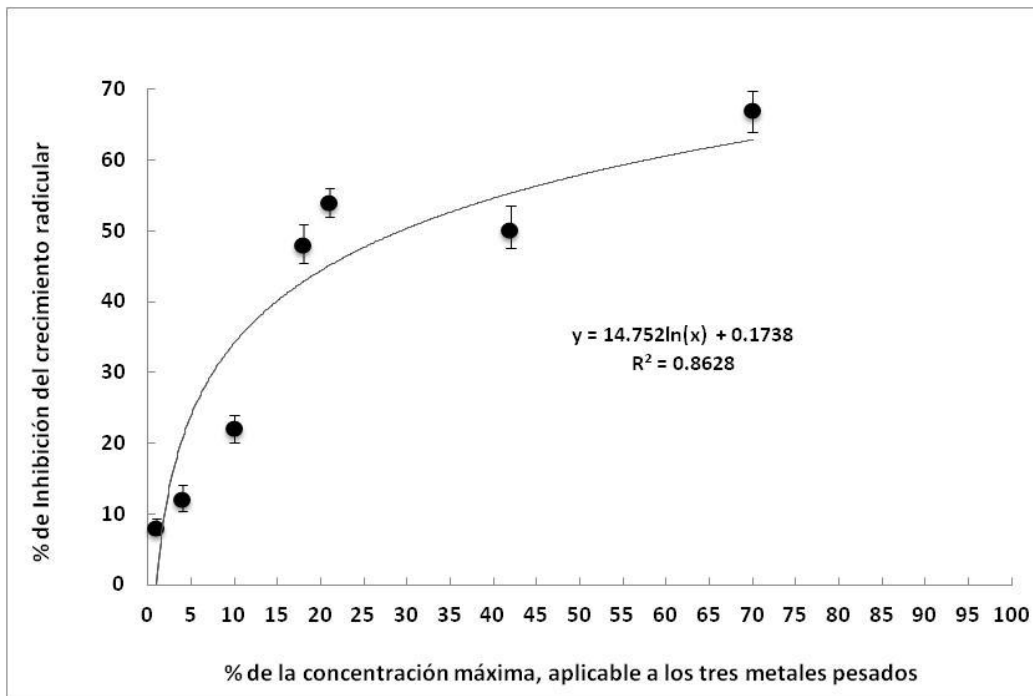
Acorde con esto, en las Figuras 4.1 y 4.2 se señalan los porcentajes de inhibición para la longitud del hipocótilo y radícula, respectivamente, en función de la concentración de metales aplicada. La tendencia asintótica de la inhibición es característica de este tipo de pruebas con especímenes fotoautótrofos, 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 y col., 2010).

Con base en las curvas de las Figuras 4.1 y 4.2, las concentraciones que causan el 50% de inhibición en el desarrollo de la radícula e hipocótilo son muy similares entre ambas partes de la planta, con 0.10 mg L<sup>-1</sup> de Hg, 17.43 mg L<sup>-1</sup> de Cr y 25.45 mg L<sup>-1</sup> de Pb para la radícula y 0.108 mg L<sup>-1</sup> de Hg, 16.5 mg L<sup>-1</sup> de Cr y 26.0 mg L<sup>-1</sup> de Pb para el hipocótilo.

Finalmente, cabe mencionar que los cuatro reactores que contenían vegetales, operaron durante toda la parte experimental, observándose que las plantas solo presentaron ligera necrosis en los ápices de las hojas, lo cual se encuentra relacionado con el hecho de que los efectos obtenidos en el presente bioensayo fueron subletales y no letales.

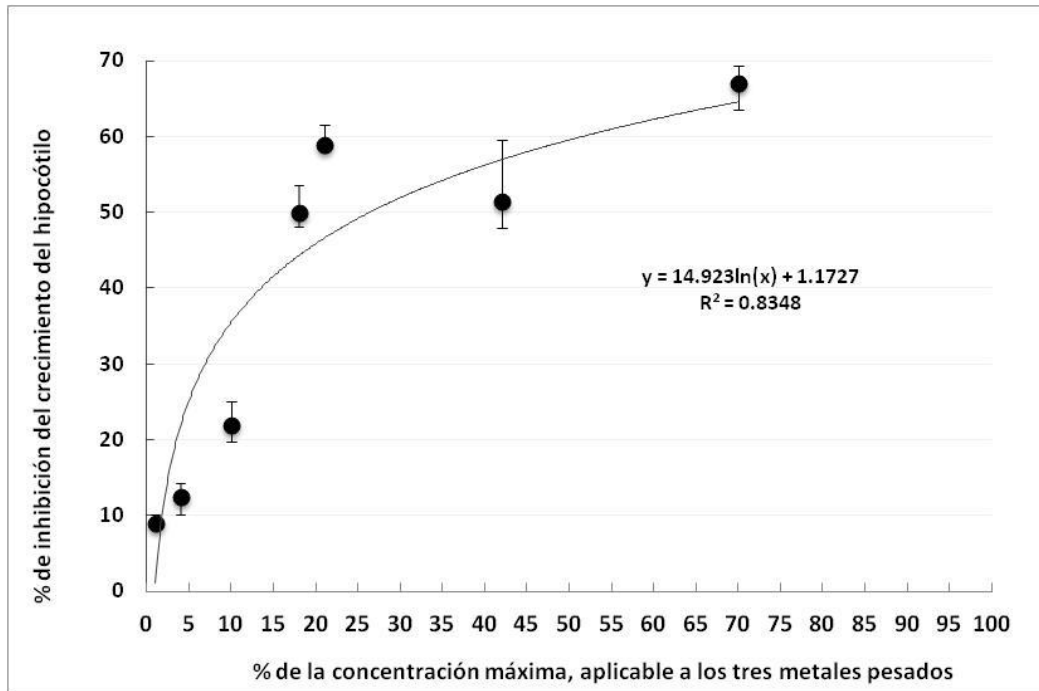
## **IV.2. SELECCIÓN DEL CONSORCIO MICROBIANO**

Con base en los procedimientos descritos en el apartado III.3, en la Tabla 4.2 se muestran los resultados de la prueba de toxicidad bacteriana, con la cual se generó la Figura 4.3. En ambas se señala la tendencia de inhibición bacteriana en función de la concentración de metales pesados aplicada.

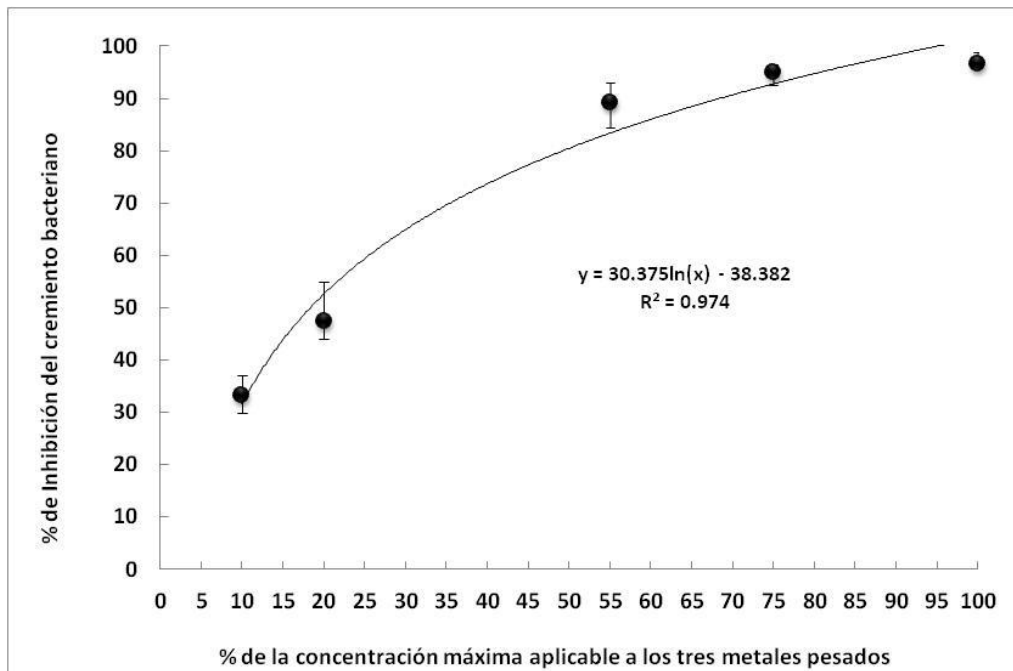


**Figura 4.1.** Curva Dosis-Respuesta de inhibición del desarrollo de la radícula, en presencia de diferentes concentraciones de metales pesados (promedios  $\pm$  desviación estándar)

Por medio de la ecuación de la curva resultante (característica de primer orden), la  $CL_{50}$  para el consorcio bacteriano resultó en  $28.1 \text{ mgL}^{-1}$  de plomo,  $0.11 \text{ mgL}^{-1}$  de mercurio y  $21 \text{ mgL}^{-1}$  de cromo, valores que se encuentran por arriba de los máximos tolerables por sistemas biológicos de tratamiento de aguas residuales (Jin y col., 2012; Karvelas y col., 2003) y muy similares a los reportados por Viti y col. (2002), aunque por debajo del estudio realizado por Congeevaram y col. (2007) quienes realizaron toda su parte experimental *in vitro*.



**Figura 4.2.** Curva dosis-respuesta de inhibición del desarrollo del hipocótilo en presencia de diferentes concentraciones de metales pesados (promedios  $\pm$  desviación estándar)



**Figura 4.3.** Curva dosis-respuesta del efecto tóxico de la mezcla de metales pesados sobre el desarrollo o crecimiento bacteriano (promedios  $\pm$  desviación estándar)

Estas concentraciones son ligeramente mayores que las obtenidas en las pruebas de fitotoxicidad. Así, para definir la concentración de metales pesados se consideraron los resultados del presente apartado en combinación con la Tabla 2.2. Es decir, concentraciones de Cr, Hg y Pb que se encuentren dentro del rango de los efluentes industriales característicos de empresas que generan estos compuestos inorgánicos y que solamente lleguen a inhibir alrededor del 50% el desarrollo de la vegetación y la densidad bacteriana.

**Tabla 4.2.** Resultados de UFC y porcentaje de inhibición en función de la concentración de metales pesados de cada mezcla evaluada

<i>Concentración del metal, mg L<sup>-1</sup></i>			<i>Porcentaje de la concentración de metales</i>	<i>Promedio UFC mL<sup>-1</sup></i>	<i>Inhibición %</i>
<i>Cromo</i>	<i>Mercurio</i>	<i>Plomo</i>			
100	0.5	120	100	1,300,000	98.9
75	0.375	90	75	5,900,000	95.1
55	0.275	66	55	13,000,000	89.2
20	0.1	24	20	63,000,000	47.5
10	0.05	12	10	80,000,000	33.3
0	0	0	0	1,200,000,000	0

En concordancia con esto y tal como se mencionó en el apartado III.4.1, las concentraciones de metales pesados en el agua de alimentación para cada uno de los humedales artificiales fueron de 21 mg L<sup>-1</sup> de Cr, 28 mg L<sup>-1</sup> de Pb y 0.11 mg L<sup>-1</sup> de Hg. Cabe recordar 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. 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.

### IV.3. INOCULACIÓN DE LOS HUMEDALES ARTIFICIALES

Con base en lo descrito en el apartado III.3.2, cada una de las cinco cepas seleccionadas fue inoculada en 250 mL de caldo nutritivo (por cada uno de los cuatro humedales artificiales que operaron con las cepas tolerantes) el cual, con el agua de alimentación (Ver III.4.1), fue llevado a un volumen de 800 mL. Finalmente los cinco volúmenes fueron vertidos aleatoriamente dentro del humedal, resultando un volumen de ~4.0 L por humedal, el cual ya contaba con el medio de empaque y los vegetales (Figura 4.4).

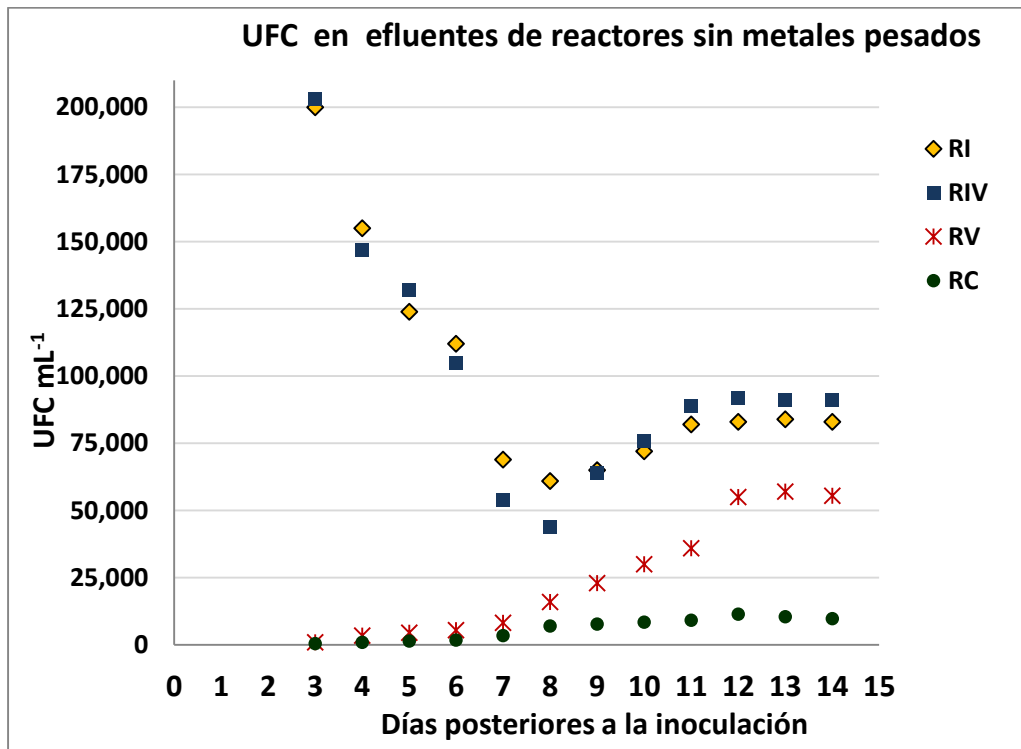


**Figura 4.4.** Cepas bacterianas utilizadas para inocular los humedales artificiales. Cada porción de caldo nutritivo fue llevada a 800 mL para que en total se tuviera el volumen efectivo de cada sistema (4.0 L)

Cabe mencionar que en esta etapa el agua de alimentación no contiene metales pesados y es el mismo procedimiento seguido para los dos tiempos de residencia hidráulicos evaluados. Además, los otros cuatro humedales (RV y RC) fueron llenados con la misma solución (caldo nutritivo disuelto en agua de alimentación) pero sin la inoculación bacteriana.

#### IV.4. DESARROLLO BACTERIANO EN LOS HUMEDALES ARTIFICIALES

Las mediciones de unidades formadoras de colonias (UFC) en cada uno de los humedales artificiales iniciaron tres días posteriores a la inoculación, considerando el tiempo de proliferación de los organismos procarióticos (Figura 4.5).



**Figura 4.5.** Cuantificación promedio de unidades formadoras de colonias, UFC, posterior a la inoculación, en función del tiempo. Los resultados son aplicables a las fases experimentales con 2 y 4 días de operación

Acorde con esto, en la Figura 4.5 se indica la cantidad promedio de bacterias presentes en cada uno de los diferentes humedales artificiales (HA), en función del tiempo transcurrido a partir de la inoculación que fue considerada como el tiempo cero. Se observa que los HA inoculados (RI y RIV) iniciaron con una gran población bacteriana derivada de la reciente adición del consorcio microbiano en caldo nutritivo, el cual resulta una gran fuente nutrimental para los organismos heterótrofos. No obstante, al irse consumiendo este medio, la población desciende hasta el séptimo día aproximadamente, lo cual probablemente es resultado de que las bacterias empiecen a adherirse al medio de empaque en forma de biopelícula, ya que este fenómeno se suscita al presentarse condiciones adversas o menos óptimas, como lo es el agotamiento del sustrato (Langergraber y col. 2007). Esto se ve reflejado en una menor cantidad de bacterias suspendidas, aunque eventualmente ocurren desprendimientos de la biopelícula, tal y como lo mencionan Yalcuk y Ugurlu (2009); Zhao y col. (2009).

En cuanto a los dos HA sin inoculación (RV y RC), en la Figura 4.5 se muestra que presentaron bajas concentraciones de UFC en los primeros días. Sin embargo, al estar expuestos a la intemperie, la densidad poblacional fue aumentando, aunque muy por debajo en comparación de los reactores inoculados, hasta presentar prácticamente un comportamiento asintótico en el día 12, en el que se asume que los microorganismos se encuentran en forma de biopelícula adherida al material de empaque (Langergraber y col., 2007; Yalcuk y Ugurlu, 2009).

Así mismo, puede observarse que a pesar de que la densidad poblacional en los dos tipos de HA sin inóculo presentan la misma tendencia, el RV exhibe una mayor concentración aproximadamente seis veces que la del RC, lo cual era de esperarse, al saber que las plantas al ser organismos autótrofos, aportan carbono al sistema (exudados) coadyuvando a un mayor crecimiento bacteriano (Clemens, 2006).

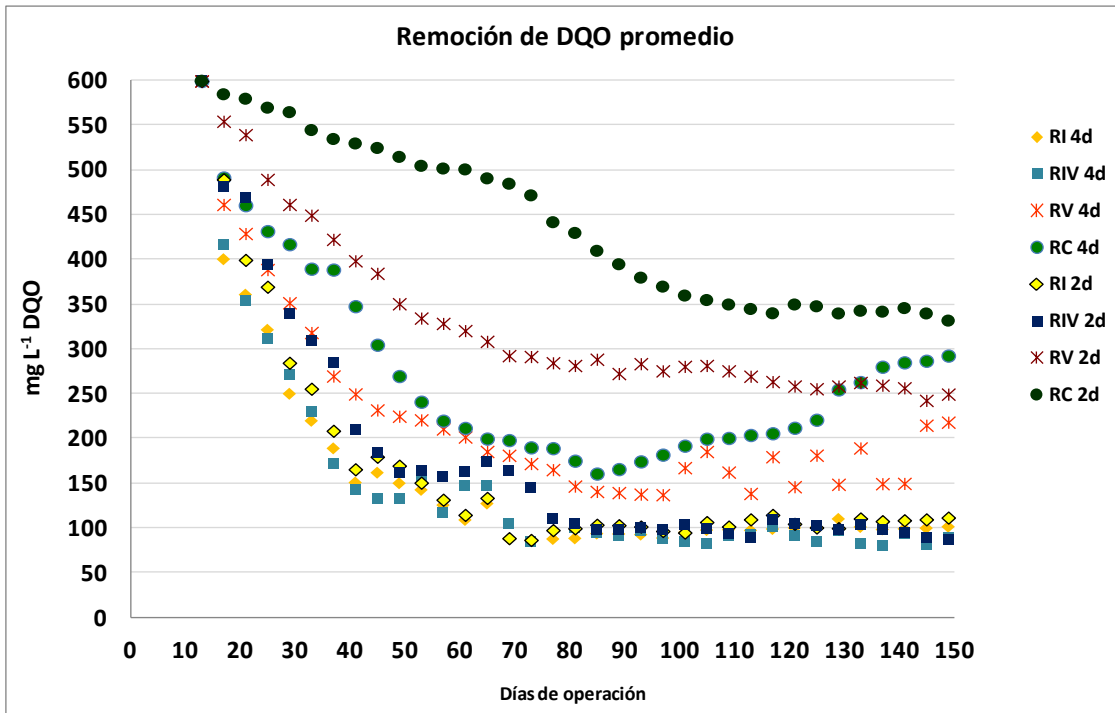
Cabe mencionar que la Figura 4.5 es aplicable para las dos fases experimentales de 2 y 4 días de TRH, ya que los resultados del desarrollo microbiano previo a la adición de metales son prácticamente los mismos.

#### **IV.5. SEGUIMIENTO DE PARÁMETROS FISCOQUÍMICOS**

Los resultados anteriores indican que la biomasa de microorganismos es estable en todos los HA a los 12 días de la inoculación, por lo que el primer llenado con el agua de alimentación (nutritiva y con metales pesados) se realizó el día 15 (ya que se corroboró que la biomasa fuera estable), iniciando en este punto el seguimiento de la temperatura, pH y pOR. También se tomó una muestra para SSV el día 15 antes de verter el agua de alimentación. Por su parte, el seguimiento de la remoción de DQO y metales pesados inició una vez transcurrido el tiempo de residencia hidráulico (TRH) que fue el día 19 para TRH = 4 y el día 17 para TRH = 2.

##### **IV.5.1. Remoción de la demanda química de oxígeno**

La Figura 4.6 muestra la tendencia de remoción de materia orgánica (expresada como demanda química de oxígeno, DQO) de los cuatro tipos de sistemas evaluados, para ambos TRH utilizados. En esta figura se puede observar que hasta alrededor del día de operación 65 existe un decaimiento abrupto de la concentración de DQO para todos los HA con ambos TRH, aunque el sistema RC presenta una menor degradación en el mismo periodo de tiempo, en especial cuando fue operado con TRH de 2 días. A partir de este punto y hasta el día 151 en el que se terminó la operación, los sistemas inoculados (RIV y RI) fueron estables en la remoción de DQO, al exhibirse variaciones menores al 10%, además de que este comportamiento se presentó para ambos TRH. Esta tendencia de remoción también se observa en el reactor RV operado con TRH de 2 días. Por su parte, los reactores RV y RC operados con 4 d de TRH, disminuyeron su eficiencia de remoción conforme transcurría el tiempo de operación.



**Figura 4.6.** Tendencia de remoción de la materia orgánica expresada como DQO, para cada uno de los humedales artificiales evaluados con TRH de 2 y 4 días

En la Figura 4.6 se indica que los reactores inoculados (con vegetales y sin vegetales) presentan la mayor remoción de DQO, llegando a valores alrededor de  $90 \text{ mg L}^{-1}$  en el efluente, equivalentes a un 85 % de remoción. Este proceso fue para ambos TRH evaluados, resultando valores sin diferencia estadística tanto entre tipo de humedal (RIV y RI) como entre los TRH, caso contrario al comparar estos sistemas contra los no inoculados (RV y RC), presentándose diferencias significativas ( $F_{15,3} = 67.45$ ;  $P < 0.05$ ). Además los reactores RV y RC también presentaron diferencias estadísticas entre ellos ( $F_{7,3} = 41.25$ ;  $P < 0.05$ ) y entre los resultados de su operación a diferentes TRH ( $F_{3,1} = 23.48$ ;  $P < 0.05$ ).

Los valores de remoción de materia orgánica coinciden con los reportados por otros autores que trabajaron con HA a concentraciones similares (Puigagut y col., 2006; Stottmeister y col., 2003), destacando que en este estudio el agua residual contenía metales pesados que interfieren con las funciones metabólicas de los microorganismos (en este caso asimilación de materia orgánica).

Por otra parte, destaca el hecho de la remoción exhibida por el RC con ambos TRH, aunque significativamente menor que la de los otros sistemas ( $F_{15,3} = 59.8$ ;  $P < 0.05$ ). Este abatimiento de la materia orgánica se explica por la proliferación bacteriana suscitada por el intemperismo al que están expuestos los sistemas de humedales (Kantawanichkul y col., 2009). Acorde con esto, en la Figura 4.7 se corrobora la presencia de microorganismos procarióticos en el efluente de los sistemas RC (expresada como SSV).

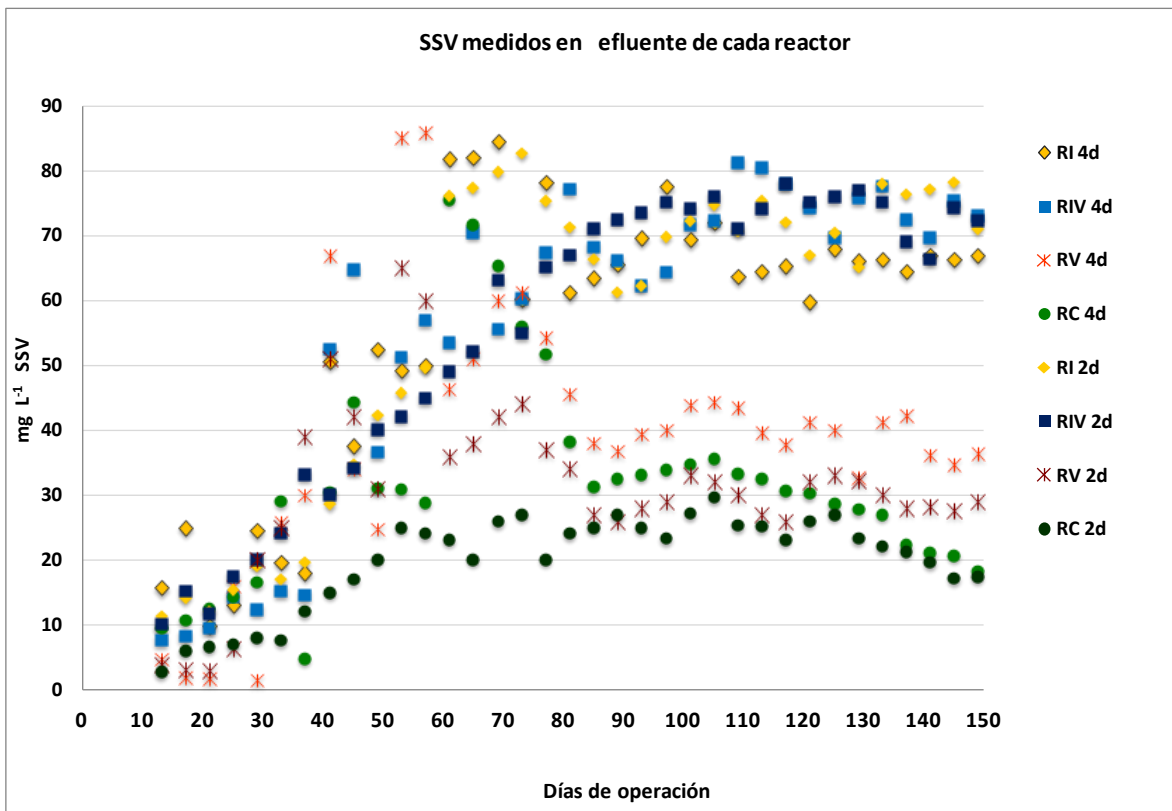
#### **IV.5.2. Sólidos suspendidos volátiles en los efluentes de los humedales artificiales**

En la Figura 4.7 se muestra la tendencia de la concentración de sólidos suspendidos volátiles (SSV) en los efluentes de los humedales artificiales (HA). Se denota que para los dos tipos de HA que se encuentran inoculados (con vegetales y sin vegetales) la cantidad de SSV, que se asocia con la cantidad de microorganismos suspendidos, incrementa de manera proporcional conforme lo hace el tiempo de operación, tanto para el TRH de 2 días como de 4 días. Esto sucede hasta aproximadamente el día 105, en el que los valores tienden a presentar la misma concentración en función del tiempo, observándose así una tendencia asintótica.

Para ambos TRH, los valores entre los dos tipos de HA inoculados no presentaron diferencia significativa ( $F_{7,3} = 42.36$ ;  $P < 0.05$ ). Además, la concentración de SSV en el efluente de los sistemas inoculados a partir de los 100 días de operación, coincide con los rangos reportados en investigaciones previas de humedales artificiales, aunque sin contenido de metales pesados (Cui y col., 2010; Tietz y col., 2007). Esto indica que la presencia de estos tóxicos en el sistema no inhibió de manera considerable las funciones metabólicas de los microorganismos presentes en los HA inoculados, tal y como lo sugiere Salgado-Bernal y col. (2012).

Por su parte, los HA sin inoculación presentaron un incremento en la concentración de SSV similar a los HA inoculados. No obstante, el comportamiento asintótico se observa a partir del día 60 y con mayores fluctuaciones en la concentración de SSV hasta el último

día de operación. Además, se puede observar que alrededor del día de operación 100 existió una tendencia descendente en la concentración de SSV. Esto, independientemente de la remoción de metales pesados, marca la diferencia entre los microorganismos tolerantes a metales pesados y los convencionales, que es más de tres veces la densidad bacteriana (expresada como  $\text{mg L}^{-1}$  de SSV). Entre los sistemas RIV y RI no existieron diferencias significativas ( $F_{7,3} = 58.62$ ;  $P > 0.05$ ) ni entre el reactor RV y el RC ( $F_{7,3} = 39.53$ ;  $P > 0.05$ ).



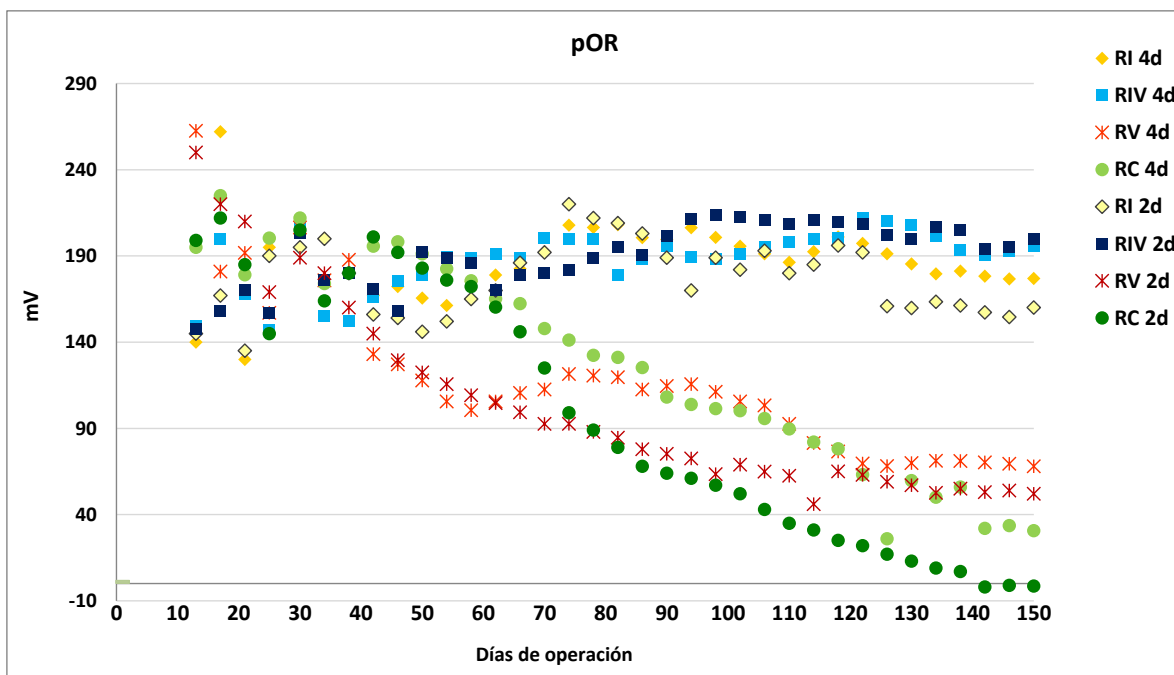
**Figura 4.7.** Concentración de sólidos suspendidos volátiles en el efluente de cada humedal artificial con TRH de 2 y 4 días

#### IV.5.3. Potencial de óxido reducción

Las mediciones del potencial de óxido reducción (pOR) durante los primeros 40 días, indican que no existe tendencia alguna para ninguno de los cuatro tipo de reactores, ya que en la Figura 4.8 solamente se aprecia una nube de puntos alrededor de los 175 mV.

Entre los días 60 y 70 empezó a notarse la marcada diferencia entre los HA inoculados y los no inoculados, ya que para los primeros, los valores del pOR se mantuvieron cercanos a los 200 mV hasta el último día de operación, mientras que en los HA no inoculados, el pOR disminuyó a partir del día 40 hasta 70 mV para el reactor con vegetales y hasta valores alrededor 0 mV para el reactor control, en especial cuando se operó con TRH de 2 días, en el que se llegó a valores negativos (Figura 4.8).

Al igual que con la remoción de materia orgánica y los SSV, los valores de pOR registrados en RIV, RV y RI se encuentran en los rangos de valores reportados en otras investigaciones, aunque sin emplear metales pesados (Brix y Arias, 2004; Cui y col., 2010; Orduña-Bustamante y col., 2011).



**Figura 4.8.** Valores del potencial de óxido reducción en cada humedal artificial con TRH de 2 y 4 días



## **IV.6. REMOCIÓN DE METALES PESADOS**

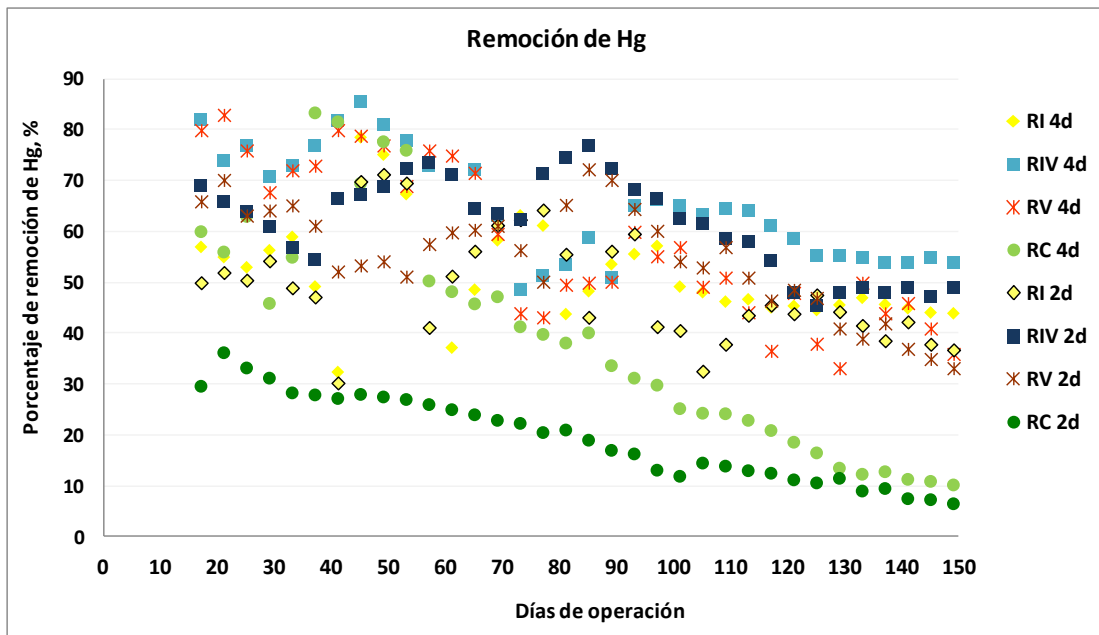
Para ambos TRH (tiempos de recambio de agua para el presente estudio), los humedales artificiales (HA) fueron operados durante 151 días, punto en el que se observó la estabilización de los sistemas inoculados en cuanto a remoción de metales pesados, cabiendo mencionar que en la remoción de materia orgánica, fueron estables desde los primeros 60 días de operación, tal y como se detalló en el apartado IV.5.1. Aunado a lo anterior, en el apartado IV.7 se describe la cantidad de metal pesado asociado con los diferentes componentes de los sistemas de humedales, donde se muestra en términos de masa, la cantidad retenida y distribución de metales en cada uno de los HA evaluados.

### **IV.6.1 Remoción de mercurio**

En la Figura 4.9 se señala la tendencia de remoción de mercurio que presentaron, en promedio, cada uno de los diferentes tipos de HA. Al respecto, se observa que hasta el día 60, los que contienen vegetación (tanto inoculado como sin inoculación), tuvieron la mayor remoción del metal, y prácticamente tienen el mismo comportamiento. A partir de ese mismo punto y hasta aproximadamente el día 74, la eficiencia descendió hasta el 50%. Los altos porcentajes de remoción de mercurio hasta este punto, pueden relacionarse con fenómenos de volatilización, tal y como lo sugiere Schlüter (2000), aunado a la evapotranspiración del metal por parte de la vegetación (Han y col., 2006), lo cual también podría explicar el hecho de que los sistemas con vegetación presentaron mayor remoción (Figura 4.9).

A partir del día 90 y hasta el final de la operación, las oscilaciones fueron menores y los HA inoculados mantuvieron su eficiencia alrededor del 50%, mientras que los RV y RI removieron alrededor del 35%. Aunque, debido a las grandes oscilaciones, se obtuvieron diferencias significativas entre todos los HA ( $F_{15,3} = 31.29$ ;  $P < 0.05$ ). Además, el HA control (RC) descendió en la remoción de mercurio conforme transcurrían los días de operación, en especial el operado con TRH de 2 días (Figura 4.9).

En cuanto a la operación con diferentes TRH, se encontraron diferencias significativas para todos los HA ( $F_{3,1} = 18.61$ ;  $P < 0.05$ ), lo cual puede relacionarse con el hecho de que a un mayor tiempo de contacto en los HA, exista una mayor transferencia del mercurio a la atmósfera por gradiente de concentración, tal y como lo sugieren Kabata-Pendias y Pendias (2001); Schlüter (2000) y Ventura y col. (2005), fenómeno del que se hace mención en el apartado IV.7.2.



**Figura 4.9.** Remoción promedio de mercurio en cada humedal artificial con TRH de 2 y 4 días

#### IV.6.2 Remoción de cromo

En la Figura 4.10 se observa la remoción de cromo que exhibió cada uno de los HA con ambos TRH. Durante los primeros 80 días todos los sistemas, con excepción del RC, presentaron una tendencia de remoción estable, al oscilar entre las mediciones alrededor de un 15%, cabiendo mencionar que el RIV presentó aproximadamente 20% más de remoción que los otros HA, sobre todo cuando se operó con un TRH de 4 días. Posterior al día 80 y conforme transcurría el tiempo de operación, solamente los HA inoculados (RIV y

RI) fueron estables hasta el último día de operación, comportamiento observado para ambos TRH.

Aunado a lo anterior, en la Figura 4.10 se aprecia que los HA RIV mostraron fluctuaciones cada vez menores, considerándose desde el punto de vista de operación de reactores, estables al tener una variación menor del 10 %. Por su parte, la eficiencia de remoción de los HA con vegetación sin inóculo (RV) fue decayendo a partir del día 80 y hasta el final de la operación. Esta misma tendencia, pero de manera más pronunciada, fue observada en los sistemas RC, ya que a lo largo de la operación la remoción decayó del 50% hasta menos del 10% (Figura 4.10). Acorde a esto, los humedales RC presentaron diferencias estadísticamente significativas con los demás HA y fueron los únicos significativamente diferentes al operarse con diferente TRH ( $F_{15,3} = 62.75$ ;  $P < 0.05$ ).

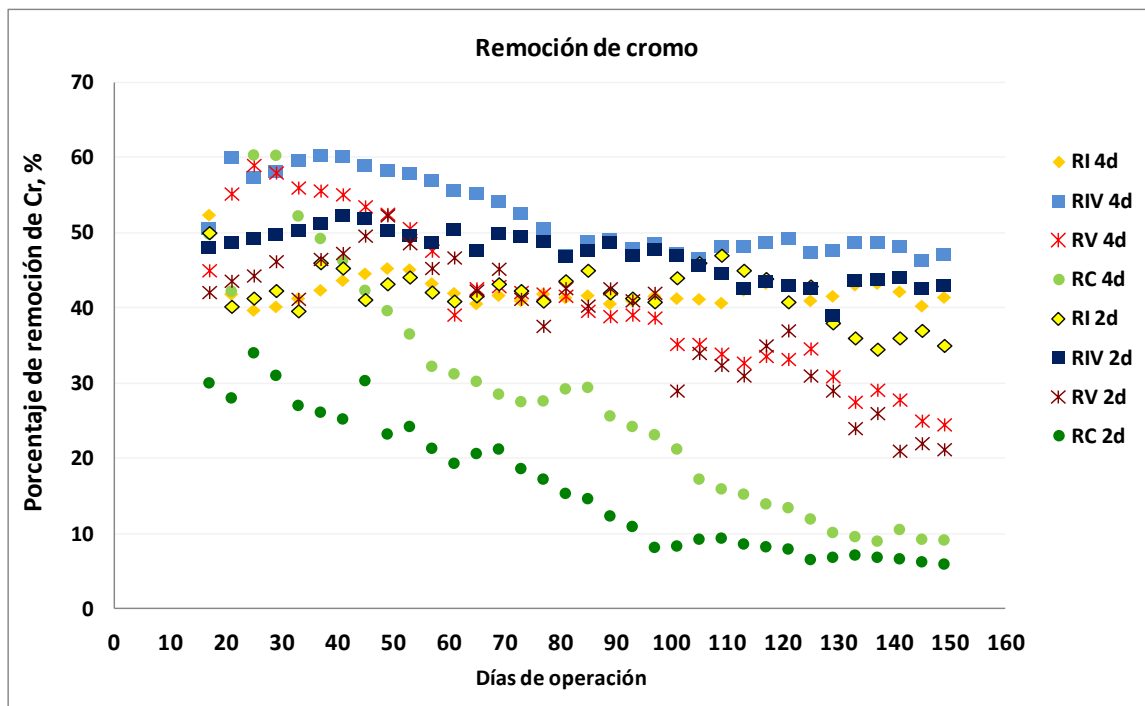


Figura 4.10. Remoción promedio de cromo en cada humedal artificial con TRH de 2 y 4 días

Al final de la operación, los resultados de remoción de cromo total fueron del 45% para los HA propuestos (RIV), eficiencia que se encuentra por debajo de las reportadas por Hadad y col. (2006) y por Khan y col. (2009), pero similares a las reportadas por Calheiros y col. (2007), cabiendo mencionar que, en los tres estudios referidos, las concentraciones iniciales de cromo eran menores a  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$ , mientras que las utilizadas en la presente investigación fueron de  $21.0 \text{ mg L}^{-1}$ .

#### **IV.6.3 Remoción de plomo**

En la Figura 4.11 se presentan los resultados de la remoción de plomo total medida en los efluentes de los HA operados con 2 y 4 días de TRH. En dicha figura se observa que en el intervalo de 15 a 80 días, la eficiencia de remoción exhibida en los HA inoculados con cepas tolerantes (RIV y RI) oscila alrededor de un 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 al 10% en los RI y del 5% en los RIV. En efecto, una vez que se alcanza la máxima remoción (55%) la línea de tendencia se comporta asintóticamente, 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 raíces de las plantas acuáticas durante los primeros días (Deng y col., 2004), y precisamente en los primeros días de operación la remoción de plomo era relativamente alta pero inestable (Figura 4.11). En este mismo orden de ideas, gran parte de la remoción exhibida durante los primeros 80 días de operación, probablemente sea derivada de la asimilación por parte de las raíces de las plantas, la cual es mayor en los sistemas RIV, ya que dicha asimilación es debida en gran medida al paso de los metales pesados, unidos a transportadores secundarios como las proteínas, a través de la membrana plasmática vegetal (Clemens y col., 2002; Guerinot, 2000) y precisamente los microorganismos asociados con las raíces promueven la regeneración de las proteínas y otros compuestos exudados por las plantas (Clemens y col., 2002; Williams y col., 2000).

En cuanto a los HA que no fueron inoculados, el RV presentó eficiencias de remoción alrededor del 30%, pero con oscilaciones continuas de aproximadamente 20 días. Esto posiblemente se relaciona con la tasa de asimilación de plomo por parte de las plantas, a pesar de que los microorganismos pudieron haber sido inhibidos por la presencia de los metales, lo cual se relaciona con los resultados de SSV a través de la Figura 4.7, en la que se aprecia que la diferencia de SSV entre los HA inoculados (RIV y RI) y el RV es precisamente la misma (en proporción) que la eficiencia encontrada en los porcentajes de remoción de la Figura 4.11. Lo anterior sugiere que una importante fracción de la remoción de plomo en los HA es debida a la adhesión del metal en las células bacterianas que se encuentran suspendidas (Obarska-Pempkowiak y Limkowska, 1999; Yeh y col., 2009).

En lo que respecta al HA que solamente contiene el medio de empaque (RC), la eficiencia de remoción fue inversamente proporcional al tiempo de operación, cabiendo mencionar que desde aproximadamente el día 80, el decaimiento fue más abrupto, indicando probablemente la saturación del material de empaque como adsorbente (en conjunción con biopelícula bacteriana) (Sheroan y Sheroan, 2009).

Los resultados de remoción de plomo considerando los dos TRH evaluados presentaron similitud estadística con excepción del RI ( $F_{7,1} = 19.66$ ;  $P > 0.05$ ), aunque en la Figura 4.11 se observa que en los últimos 35 días de operación, los valores ya eran muy similares para los cuatro HA.

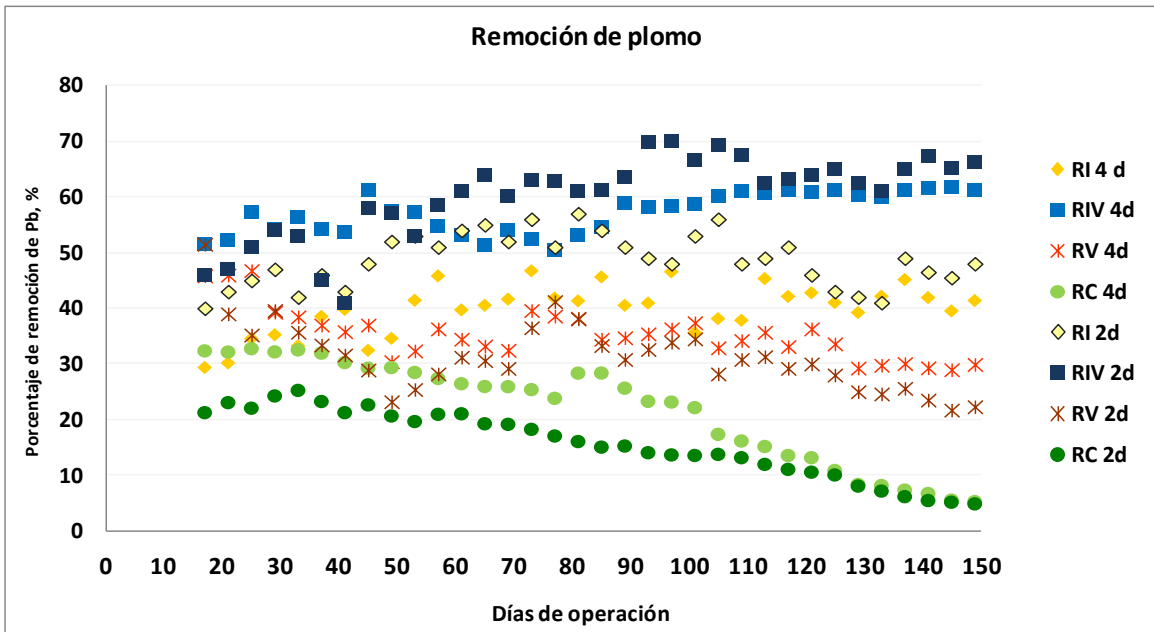


Figura 4.11. Remoción promedio de plomo en cada humedal artificial con TRH de 2 y 4 días

#### IV.7. DESTINOS AMBIENTALES DE LOS METALES PESADOS EN LOS HUMEDALES ARTIFICIALES

Con los procedimientos descritos en los apartados III.4.2 y III.5.2 se obtuvieron los resultados para calcular el balance de masa para cada uno de los tres metales pesados de interés, considerando los compartimientos definidos en la metodología como destinos ambientales. En este orden de ideas, en las Tablas 4.3 a 4.5 se presentan los balances de masa, en los que, para el caso específico del mercurio, se consideró la pérdida del metal por evapotranspiración, fenómeno que se detalla más adelante.

**Tabla 4.3.** Balance de masa de Pb en los sistemas de humedales artificiales, estableciendo como única entrada la cantidad del metal en el influente, como salidas el efluente y como acumulaciones la biomasa vegetal y el tezontle

		<b><i>g</i></b> <b><i>influyente</i></b>	<b><i>g</i></b> <b><i>efluente</i></b>	<b>g</b> suspensionados	<b>g</b> disueltos	<b><i>g en</i></b> <b><i>vegetación</i></b>	<b>g en parte</b> aérea	<b>g en</b> rizoma y raíz	<b><i>g en</i></b> <b><i>Tezontle</i></b>	<b>Sumatoria</b> <b>destinos</b> <b>ambientales</b>
<b>R_I_V</b>	4 d	<b>3.86</b>	<b>1.34</b> <b>± 0.32</b>	0.55 ± 0.11	0.79 ± 0.20	1.25 ± 0.24	0.51 ± 0.10	0.74 ± 0.32	<b>1.04</b> <b>± 0.34</b>	<b>3.64</b> <b>± 0.92</b>
	2 d	<b>7.72</b>	<b>2.94</b> <b>±0.58</b>	1.85 ± 0.29	1.03 ±0.27	2.6 ±0.43	0.92 ±0.23	1.61 ±0.47	<b>2.14</b> <b>±0.52</b>	<b>7.59</b> <b>±1.63</b>
<b>R_V</b>	4 d	<b>3.86</b>	<b>2.03</b> <b>± 0.45</b>	0.16 ± 0.034	1.86 ± 0.41	1.15 ± 0.22	0.54 ± 0.11	0.62 ± 0.15	<b>0.56</b> <b>± 0.15</b>	<b>3.74</b> <b>± 1.03</b>
	2 d	<b>7.72</b>	<b>4.26</b> <b>±0.73</b>	0.28 ±0.47	3.98 ±0.74	2.80 ±0.31	1.02 ±0.17	1.78 ±0.39	<b>0.93</b> <b>±0.22</b>	<b>7.9</b> <b>±1.87</b>
<b>RC</b>	4 d	<b>3.86</b>	<b>2.68</b> <b>± 0.46</b>	0.049 ± 0.01	2.63 ± 0.58	N.A.	N.A.	N.A.	<b>1.17</b> <b>± 0.29</b>	<b>3.85</b> <b>± 0.86</b>
	2 d	<b>7.72</b>	<b>6.63</b> <b>±0.93</b>	0.37 ±0.1	6.26 ±1.25	N.A.	N.A.	N.A.	<b>1.06</b> <b>±0.25</b>	<b>7.69</b> <b>±1.47</b>
<b>R_I</b>	4 d	<b>3.86</b>	<b>2.06</b> <b>± 0.29</b>	0.56 ± 0.096	1.50 ± 0.32	N.A.	N.A.	N.A.	<b>1.58</b> <b>± 0.26</b>	<b>3.78</b> <b>± 0.81</b>
	2 d	<b>7.72</b>	<b>5.48</b> <b>±0.72</b>	2.33 ±0.33	3.15 ±0.52	N.A.	N.A.	N.A.	<b>2.16</b> <b>±0.31</b>	<b>7.64</b> <b>±1.82</b>

**Tabla 4.4.** Balance de masa de Cr en los sistemas de humedales artificiales, estableciendo como única entrada la cantidad del metal en el influente, como salidas el efluente y como acumulaciones la biomasa vegetal y el tezontle

		<b><i>g</i></b> <b><i>influyente</i></b>	<b><i>g</i></b> <b><i>efluente</i></b>	<b><i>g</i></b> suspensos	<b><i>g</i></b> disueltos	<b><i>g en</i></b> <b><i>vegetación</i></b>	<b><i>g en</i></b> parte aérea	<b><i>g en</i></b> rizoma y raíz	<b><i>g en</i></b> <b><i>Tezontle</i></b>	<b>Sumatoria</b> <b>destinos</b> <b>ambientales</b>
<b>R<sub>I-V</sub></b>	4 d	<b>2.89</b>	<b>1.13</b> <b>± 0.28</b>	0.31 ± 0.05	0.81 ± 0.20	<b>0.8019</b> <b>± 0.20</b>	0.63 ± 0.18	0.17 ± 0.03	<b>0.82</b> <b>± 0.20</b>	<b>2.76</b> <b>± 0.39</b>
	2 d	<b>5.78</b>	<b>2.53</b> <b>±0.33</b>	0.72 ±0.09	1.81 ±0.39	<b>1.88</b> <b>±0.41</b>	1.45 ±0.37	0.43 ±0.05	<b>1.36</b> <b>±0.32</b>	<b>5.67</b> <b>±0.74</b>
<b>R<sub>V</sub></b>	4 d	<b>2.89</b>	<b>1.38</b> <b>± 0.27</b>	0.47 ± 0.09	0.91 ± 0.21	<b>1.01</b> <b>± 0.28</b>	0.52 ± 0.13	0.49 ± 0.11	<b>0.41</b> <b>± 0.10</b>	<b>2.80</b> <b>± 0.55</b>
	2 d	<b>5.78</b>	<b>2.88</b> <b>± 0.51</b>	1.15 ±0.21	1.73 ±0.43	<b>1.73</b> <b>±0.38</b>	1.15 ±0.29	0.58 ±0.13	<b>1.15</b> <b>±0.23</b>	<b>5.76</b> <b>±1.03</b>
<b>RC</b>	4 d	<b>2.89</b>	<b>1.85</b> <b>± 0.22</b>	0.035 ± 0.02	1.82 ± 0.28	<b>N.A.</b>	N.A.	N.A.	<b>0.99</b> <b>± 0.32</b>	<b>2.84</b> <b>± 0.41</b>
	2 d	<b>5.78</b>	<b>4.64</b> <b>±0.45</b>	0.58 ±0.04	4.02 ±0.47	<b>N.A.</b>	N.A.	N.A.	<b>1.11</b> <b>±0.38</b>	<b>5.75</b> <b>±0.78</b>
<b>R<sub>I</sub></b>	4 d	<b>2.89</b>	<b>1.49</b> <b>± 0.26</b>	0.29 ±0.06	1.19 ± 0.22	<b>N.A.</b>	N.A.	N.A.	<b>1.39</b> <b>± 0.28</b>	<b>2.78</b> <b>± 0.81</b>
	2 d	<b>5.78</b>	<b>3.83</b> <b>±0.53</b>	1.07 ±0.13	2.76 ±0.41	<b>N.A.</b>	N.A.	N.A.	<b>1.94</b> <b>±0.33</b>	<b>5.76</b> <b>±1.72</b>



**Tabla 4.5** Balance de Hg en los humedales artificiales, estableciendo como única entrada la cantidad del metal en el influente, como salidas el efluente y la transferencia a la atmósfera y como acumulaciones la biomasa vegetal y el tezontle

		<i>mg influyente</i>	<i>mg efluente</i>	<i>mg volatilizados</i>	mg suspendidos	mg disueltos	<i>mg en vegetación</i>	mg en parte aérea	mg en rizoma y raíz	<i>mg en Tezontle</i>	Sumatoria destinos ambientales
<b>R_I_V</b>	4 d	<b>15.18</b>	<b>4.04</b> ± 1.77	<b>6.14</b> ± 1.56	0.50 ± 0.14	3.50 ± 1.4	<b>2.35</b> ± 0.7	1.35 ± 0.46	1.0 ± 0.32	<b>2.65</b> ± 0.57	<b>15.04</b> ± 3.96
	2 d	<b>30.36</b>	<b>10.14</b> ±3.06	<b>10.16</b> ±2.04	3.20 ± 1.02	6.92 ± 2.12	<b>5.06</b> ±1.56	3.0 ± 0.98	2.04 ±0.57	<b>5.45</b> ±1.06	<b>30.20</b> ±7.41
<b>R_V</b>	4 d	<b>15.18</b>	<b>5.16</b> ±1.15	<b>4.90</b> ±1.67	1.71 ± 0.34	3.44 ± 1.02	<b>2.3</b> ± 0.67	1.8 ± 0.58	0.5 ± 0.125	<b>2.16</b> ± 0.57	<b>15.11</b> ±4.1
	2 d	<b>30.36</b>	<b>12.13</b> ±2.71	<b>9.21</b> ±3.15	2.85 ±0.39	9.17 ±2.63	<b>4.97</b> ±1.29	2.99 ±0.97	1.97 ±0.27	<b>3.99</b> ±1.01	<b>30.23</b> ±6.67
<b>RC</b>	4 d	<b>15.18</b>	<b>10.03</b> ±2.53	<b>3.22</b> ±0.68	4.45 ± 1.25	5.62 ± 1.76	<b>N.A.</b>	N.A.	N.A.	<b>1.8</b> ± 0.54	<b>14.89</b> ±3.28
	2 d	<b>30.36</b>	<b>21.08</b> ±4.02	<b>5.51</b> ±0.75	5.51 ±1.32	15.57 ±3.84	<b>N.A.</b>	N.A.	N.A.	<b>3.69</b> ±1.27	<b>30.28</b> ±6.47
<b>R_I</b>	4 d	<b>15.18</b>	<b>5.90</b> ±1.16	<b>4.70</b> ±0.82	3.57 ± 1.2	2.36 ± 0.45	<b>N.A.</b>	N.A.	N.A.	<b>4.3</b> ± 0.57	<b>14.77</b> ±3.01
	2 d	<b>30.36</b>	<b>13.13</b> ±2.08	<b>8.21</b> ±1.06	5.61 ±2.03	7.52 ±1.02	<b>N.A.</b>	N.A.	N.A.	<b>8.91</b> ±0.92	<b>30.22</b> ±5.24

#### IV.7.1. Acumulación y distribución de plomo y cromo en los humedales artificiales

En la Tabla 4.5 se señala que después de 151 días operación ingresó un total de 3.86 g de plomo en cada HA evaluado con TRH de 4 días y 7.72 g con TRH de 2 días. Para ambos casos, el HA con bacterias tolerantes y vegetales (RIV) fue el que presentó la mayor remoción al retener  $2.38 \pm 0.22$  g con TRH de 4 días y  $4.64 \pm 0.48$  g con TRH de 2 días. Esto equivale a una remoción del plomo ingresado del 62% y 60% respectivamente, proporciones significativamente mayores que las cuantificadas en los otros tres HA, para ambos TRH utilizados ( $F_{7,16}=133$ ;  $P=0.00001$ ). En efecto, para el RIV no se encontraron diferencias significativas por el TRH utilizado ( $F_{4,1}=3.9$ ;  $P=0.12$ ).

Considerando el TRH de 4 días, al RIV le siguieron los HA RV y RI con valores de  $1.71 \pm 0.19$  g (41%) y  $1.21 \pm 0.26$  g (33%); En cuanto al TRH de 2 días, el RV retuvo  $3.73 \pm 0.31$  g por parte del RI, equivalente al 44.6% y 29% respectivamente. Con estos resultados, el análisis estadístico reflejó diferencias entre los dos humedales sólo con TRH de 2 días ( $F_{7,16}=133$ ;  $P=0.0001$ ).

Por su parte, el RC fue el que retuvo la menor cantidad de plomo con  $1.18 \pm 0.29$  g con TRH de 4 días y  $1.08 \pm 0.25$  g con TRH de 2 días, que equivalen al 30% y 15 % respectivamente, por lo que se encontraron diferencias significativas entre la operación con los dos TRH empleados ( $F_{4,1}=3.9$ ;  $P=0.001$ ).

Con resultados similares, en la Tabla 4.4 se indica que la masa total de cromo ingresada en cada uno de los HA evaluados fue de 2.89 g para el TRH de 4 días y de 5.78 g para el TRH de 2 días. El RIV mostró la mayor acumulación del metal con  $1.64 \pm 0.20$  g para el TRH de 4 días y  $3.24 \pm 0.33$  g para el TRH de 2 días, lo cual equivalen al 56.8% y 56.1% respectivamente. Le sigue el RV con  $1.47 \pm 0.27$  g para el TRH de 4 días y  $2.9 \pm 0.51$  g con TRH de 2 días, lo cual equivale a una remoción del 51.1% y 50.1% respectivamente. Con lo que cabe destacar que los porcentajes de acumulación del cromo fueron similares

estadísticamente entre los HA RIV (con ambos TRH) y los RV con TRH de 4 días ( $F_{7,16}=65.86$ ;  $P=0.19$ ).

Por su parte, el RI logró retener  $1.1\pm 0.26$  g de cromo al operarse con TRH de 4 días y  $1.95\pm 0.53$  g con TRH de 2 días, valores que equivalen al 36.8% y 33.7% respectivamente. Finalmente, el RC (sin inóculo ni vegetales) logró retener  $0.65\pm 0.22$  g (23.5%) de cromo al operarse con TRH de 4 días y  $1.10\pm 0.45$  g (19%) con TRH de 2 días. Tanto el RI como el RC presentaron diferencias significativas al variar el TRH durante su operación ( $F_{7,16}=65.86$ ;  $P=0.0001$ ).

La mayor acumulación de plomo en los HA con inóculo y con vegetales (RIV) probablemente se relaciona con la sinergia entre organismos vegetales y bacterias tolerantes a metales descrita por Kosolapov y col. (2004), quienes mencionan que dichas bacterias al no verse inhibidas, asimilan los exudados orgánicos de las raíces, propiciando que las membranas plasmáticas vegetales puedan albergar cationes tales como los metales pesados, los cuales ingresan a través de acarreadores secundarios como las proteínas (Clemens y col., 2002).

En el caso particular del cromo, a pesar de que el RIV acumuló mayor cantidad del metal (sin diferencia estadística entre los dos TRH), no se encontraron diferencias significativas con el RV operado con TRH de 4 días, lo cual se puede relacionar con la habilidad de las macrofitas para asimilar y distribuir hacia sus órganos cromo y otros metales, independientemente de los organismos presentes en organismos asociados al rizoma, en especial cuando el metal no es tóxico en alguno de sus estados de oxidación tal y como lo sugieren en sus estudios de fitorremediación Domingos y col. (2009) y Eapen y D'Souza (2005).

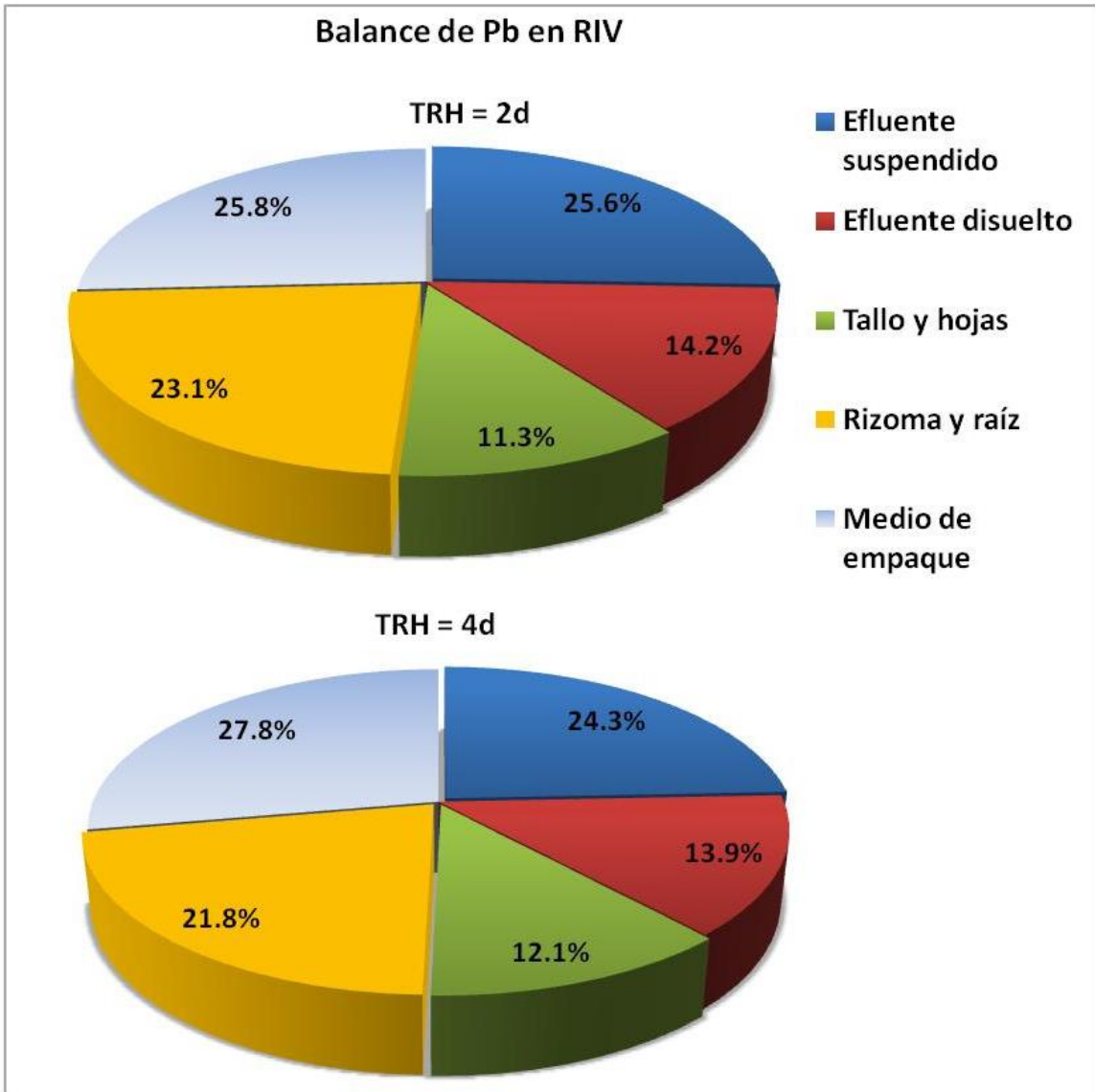
En cuanto a la operación con diferentes TRH, tanto para plomo como para cromo, los HA que presentaron diferencias estadísticas entre su operación con TRH de 2 y 4 días

fueron los que no contenían vegetales (RI y RC), lo cual evidencia la importancia de la presencia de plantas en humedales artificiales, ya que los microorganismos independientemente de ser tolerantes a metales pesados, cuentan con condiciones más propicias para su desarrollo como lo son los exudados orgánicos de las raíces, el continuo suministro de oxígeno a través de las aerénquimas, aunado a la propia fitoextracción de los metales (Marchand y col., 2010; Stottmeister y col., 2003).

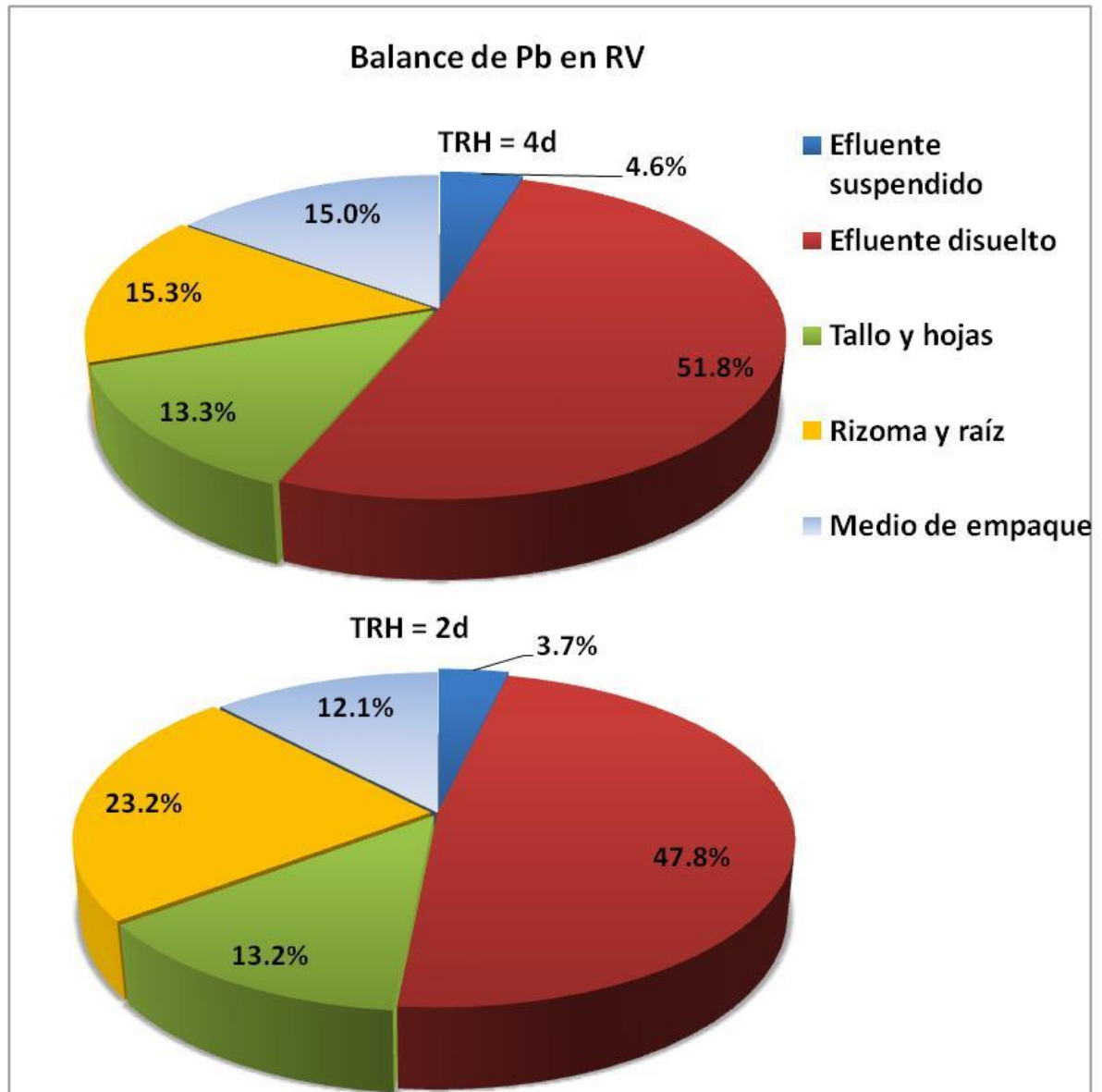
Finalmente, los resultados de las Tablas 4.3 y 4.4 indicaron que los HA sin vegetales ni inóculo (RC), alcanzaron a retener hasta 30% del total del metal ingresado. Como se ha mencionado, el material de empaque fue tezontle, el cual está compuesto por silicatos y minerales de hierro que no presentan intercambio iónico con cromo y/o plomo. No obstante, considerando el tiempo de operación a la intemperie, la considerable remoción de materia orgánica (~50%, ver en IV.5.1) y los valores positivos de redox (Apartado IV.5.3), son condiciones que hacen factible el desarrollo de microorganismos en el medio de soporte formando biopelícula (Kadlec y Wallace, 2009), estructura bacteriana que incluso es usada como bioadsorbente para algunos iones metálicos (Zhai y col., 2004; Sheoran y Sheoran, 2006). Acorde a esto, en las Figuras 4.12-4.19 se señala que una considerable proporción de cromo y plomo fue cuantificada en el tezontle.

#### **IV.7.1.1. Acumulación de plomo y cromo en el medio de empaque de los humedales artificiales**

En las Tablas 4.3, 4.4 y las Figuras 4.12 a 4.19 se puede apreciar que los porcentajes de plomo y cromo cuantificados en tezontle son muy similares entre ellos, tanto para el TRH de 4 días como de 2 días. En la operación con diferentes TRH, el único HA que presentó diferencias significativas al respecto fue el RC ( $F_{7,16}=36.82$ ;  $P=0.0001$ ), ya que para el caso del plomo, acumuló 0.82 g en el tezontle con TRH de 4 días, equivalentes al 20%, mientras que con TRH de 2 días acumuló 1.06 g que sólo equivalen al 14.01% del total ingresado (Tabla 4.4 y Figura 4.15). En el caso del cromo, los porcentajes de acumulación del metal en el tezontle fueron muy similares a los exhibidos para el plomo (Tabla 4.5 y Figura 4.19).



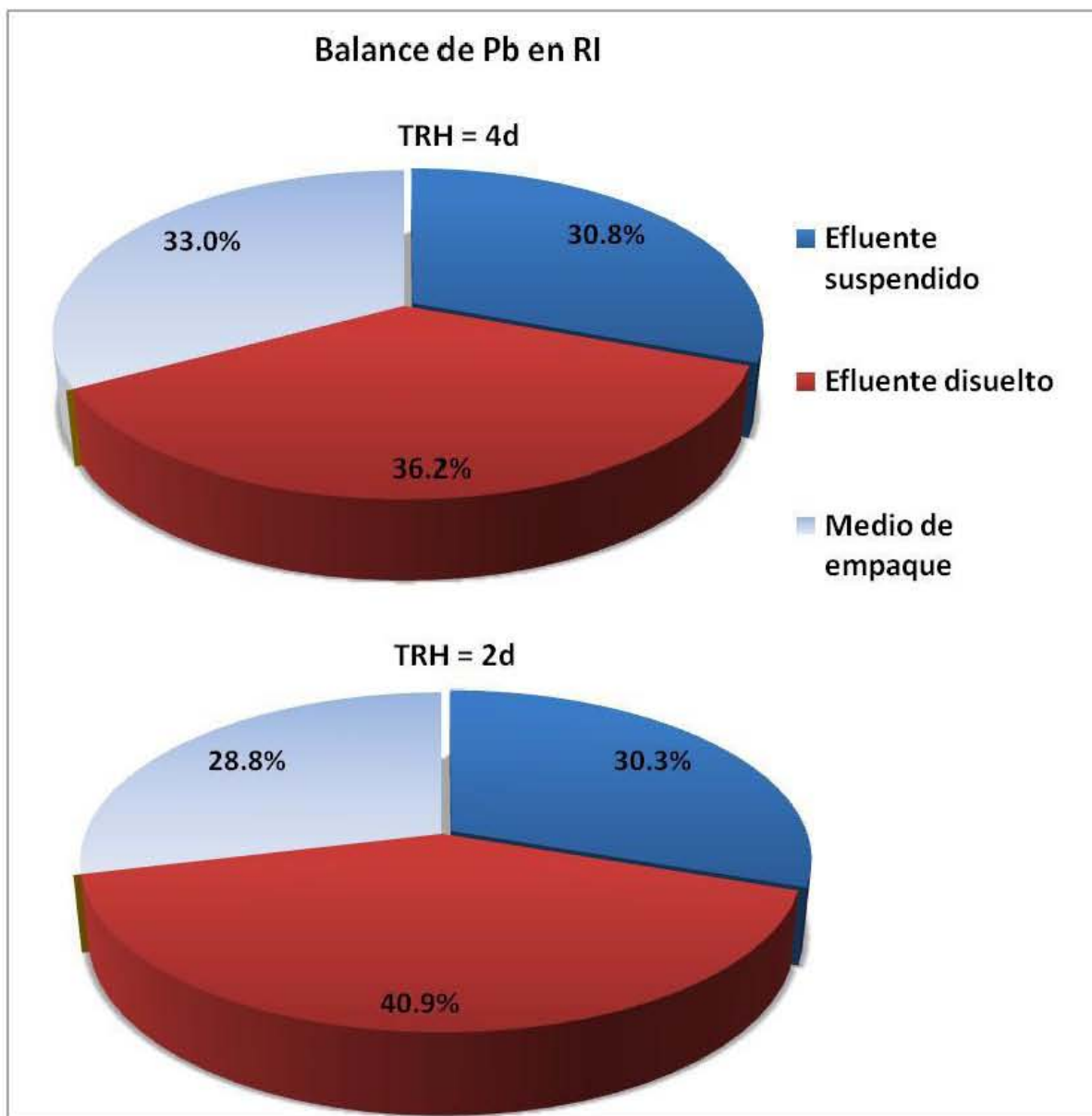
**Figura 4.12.** Distribución de plomo en los reactores RIV (con inóculo y vegetales) con tiempos de residencia hidráulica de 2 y 4 días



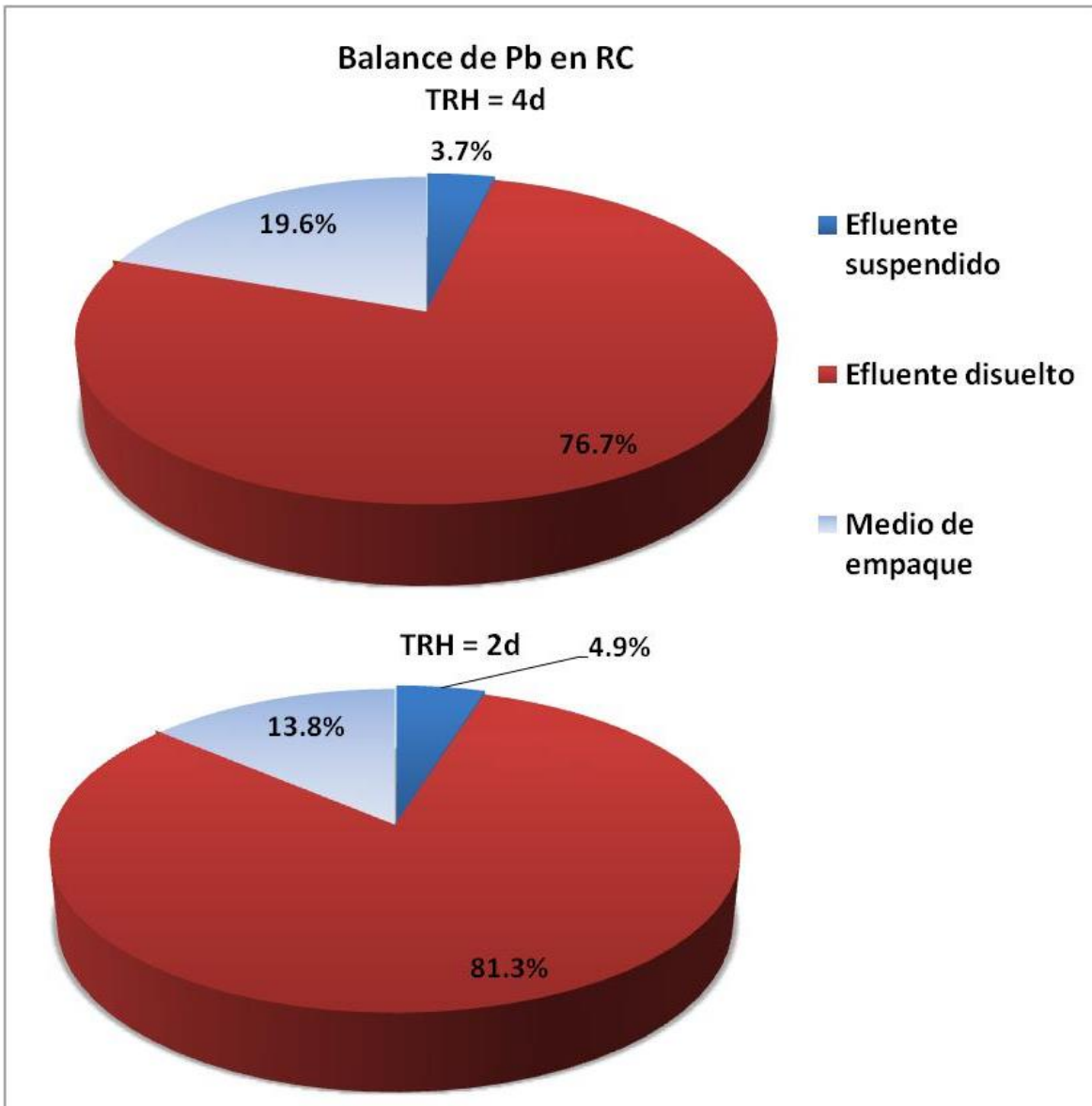
**Figura 4.13.** Distribución de plomo en los reactores RV (con vegetales sin inóculo) con tiempos de residencia hidráulica de 2 y 4 días

El RC operado con TRH de 4 días acumuló en el tezontle 0.82 g de plomo y 0.65 g de cromo, valores que equivalen cerca del 20% del total ingresado, siendo significativamente mayor que la acumulación en tezontle exhibida por los otros HA y que el mismo RC pero con TRH de 2 días ( $F_{7,16}=36.82$ ;  $P=0.0001$ ).

Los humedales sin presencia de bacterias tolerantes (RV y RC) acumularon en el tezontle, para ambos TRH, porcentajes de retención significativamente menores al de los sistemas inoculados ( $F_{7,16}=36.82$ ;  $P=0.0001$ ).



**Figura 4.14.** Distribución de plomo en los reactores RI (con inóculo sin vegetales) con tiempos de residencia hidráulica de 2 y 4 días

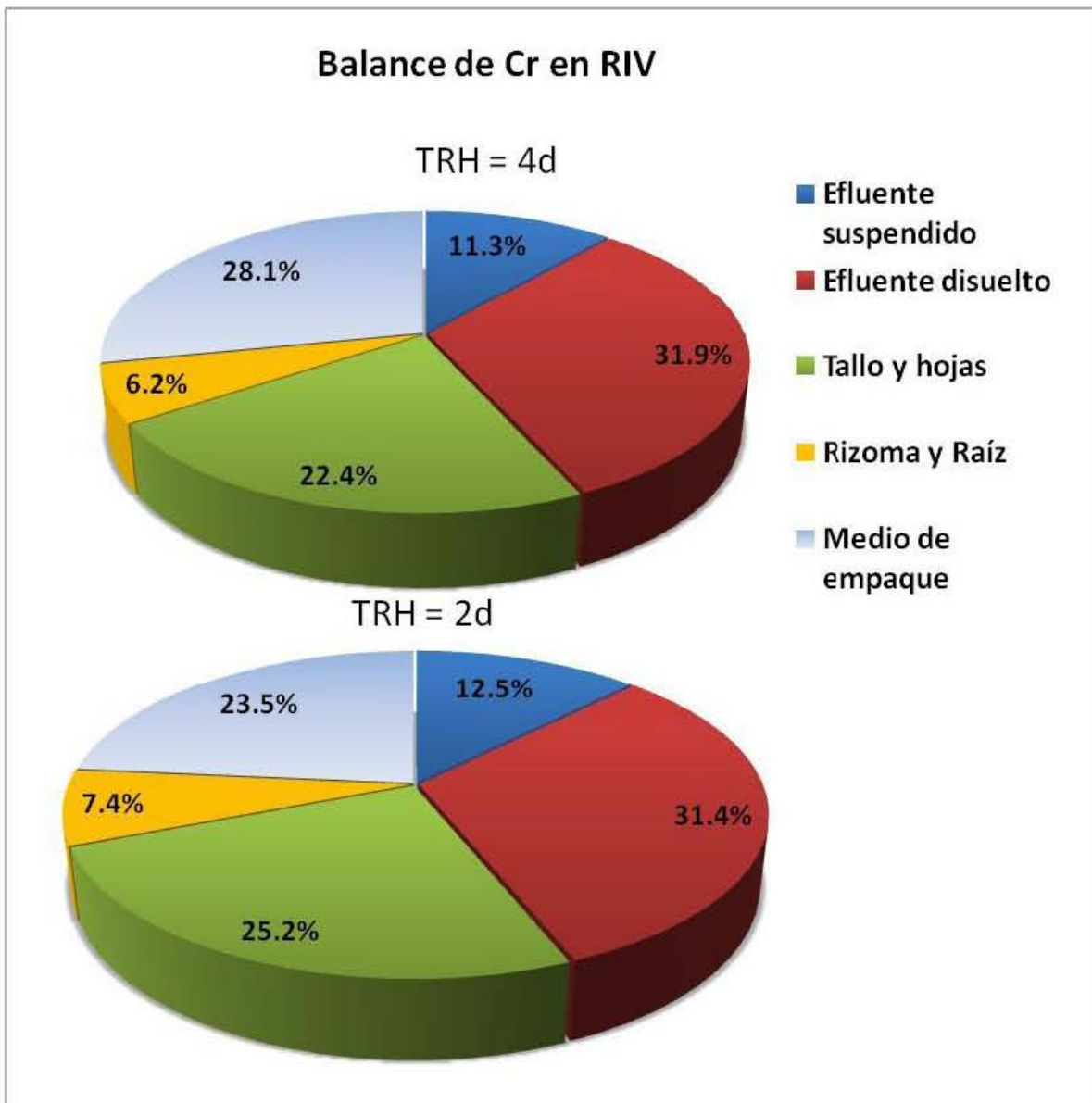


**Figura 4.15.** Distribución de plomo en los reactores RC (solamente tezontle) con tiempos de residencia hidráulica de 2 y 4 días

Acorde con esto, los HA RIV y RI presentaron un porcentaje de acumulación similar estadísticamente ( $F_{7,16}=36.82$ ;  $P=0.15$ ), con valores alrededor del 30% para ambos metales y ambos TRH.

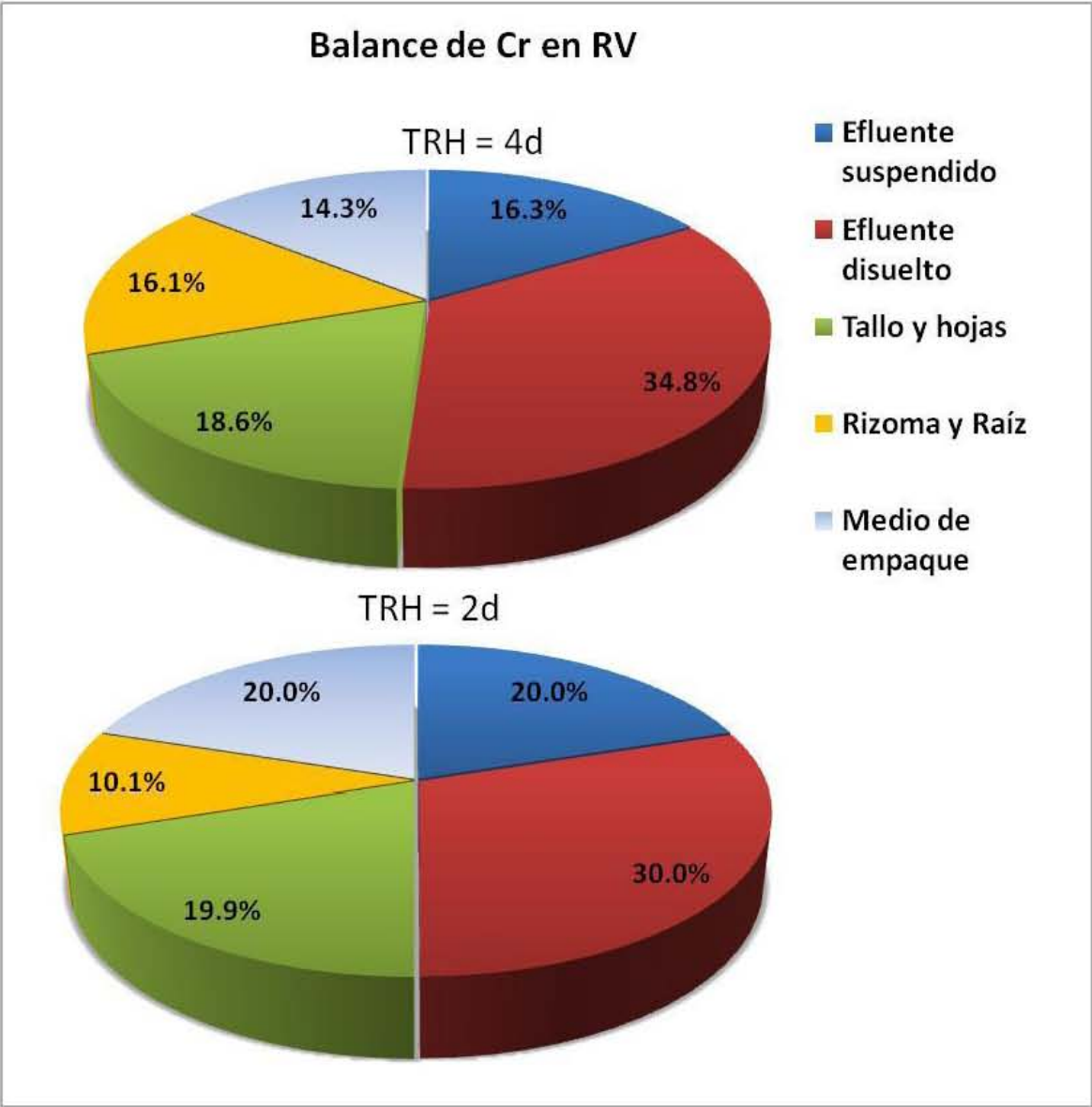


Como se ha mencionado, el tezontle no presenta intercambio iónico con metales pesados dada su composición. No obstante, el crecimiento bacteriano en forma de biopelícula se presenta al existir medios de soporte adecuados como lo son precisamente los intersticios de roca volcánica, dando lugar a un efectivo bioadsorbente (Chong y col., 2009).

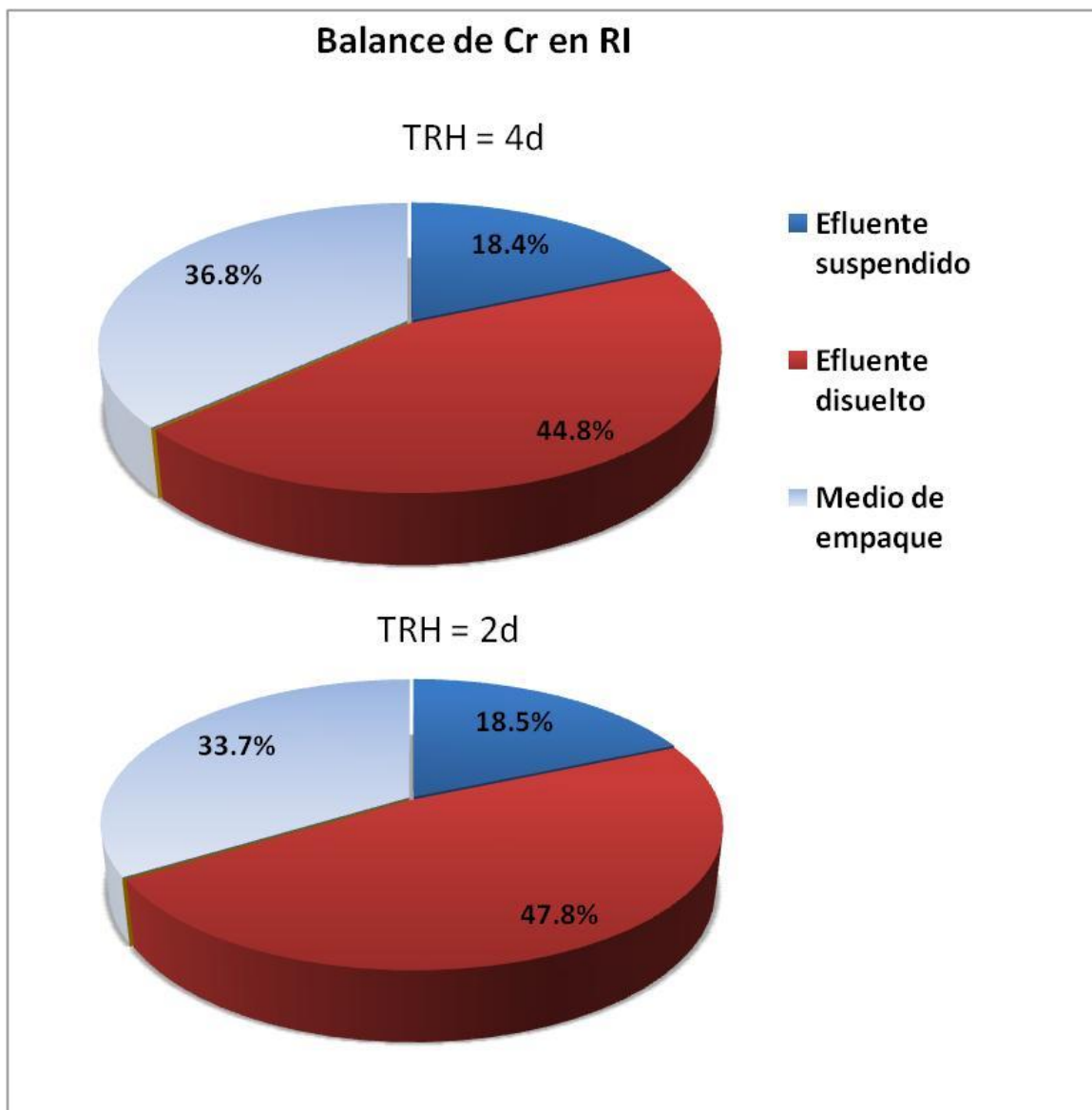


**Figura 4.16.** Distribución de cromo en los reactores RIV (con inóculo y vegetales) con tiempos de residencia hidráulica de 2 y 4 días

De acuerdo con esto, los resultados descritos indican que los sistemas inoculados con cepas tolerantes (RIV y RI) acumularon una alta cantidad de plomo y cromo en el tezontle, lo cual posiblemente se relacione a que dichos microorganismos al ser tolerantes a metales pesados, no fueron inhibidos en el desarrollo de sus funciones metabólicas, tal y como lo es la formación de biopelícula (Nies, 2003; Silver y Phung, 2005).

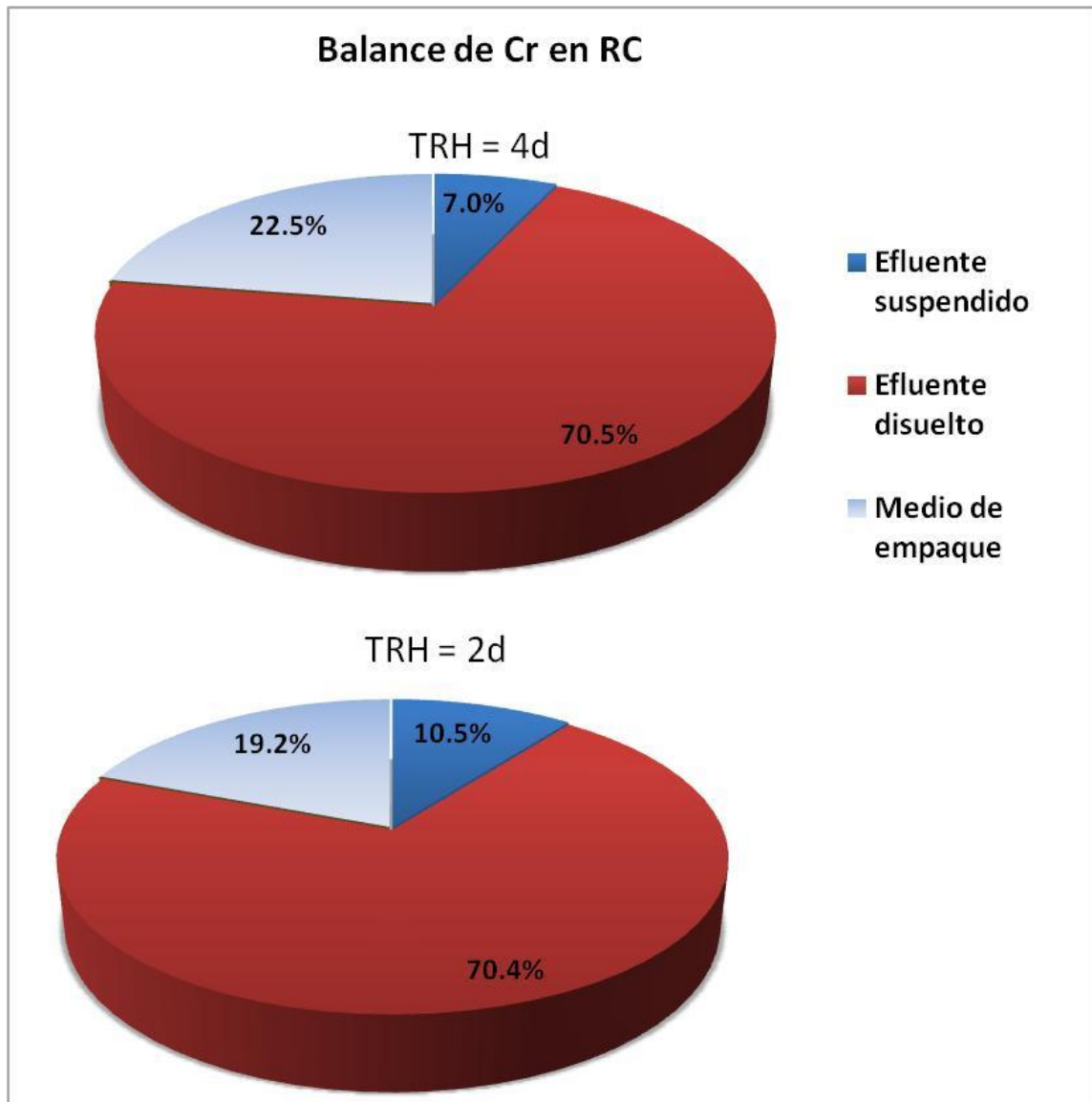


**Figura 4.17.** Distribución de cromo en los reactores RV (con vegetales sin inóculo) con tiempos de residencia hidráulica de 2 y 4 días



**Figura 4.18.** Distribución de cromo en los reactores RI (con inóculo sin vegetales) con tiempos de residencia hidráulica de 2 y 4 días

Esto obedece al considerar ambos TRH, cabiendo recordar que los sistemas RC acumularon una considerable cantidad de plomo y cromo (Tabla 4.3 y 4.4 y Figuras 4.12-4.14) a pesar de no estar inoculado ni contener vegetales. Este suceso podría explicarse por el ingreso de microorganismos al sistema, que a pesar de no subsistir por no ser tolerantes, su material celular puede quedar adherido al tezontle, dando lugar a un bioadsorbente del cual se han reportado buenas eficiencias de remoción de metales pesados (Gavrilescu, 2004; Odukuma y Emedolu, 2005).



**Figura 4.19.** Distribución de plomo en los reactores RC (solamente tezontle) con tiempos de residencia hidráulica de 2 y 4 días

En efecto, los resultados de SSV en la Figura 4.7 señalan que la concentración de microorganismos en el sistema RC fue incrementándose de manera proporcional al tiempo de operación. Otro sustento teórico, son los valores de pOR registrados para el RC (Figura 4.8), los cuales son muy cercanos a cero pero sin alcanzar valores reductores, condición que

propicia que las moléculas orgánicas de las células bacterianas (posterior a la lisis) queden adheridas a medios de soporte como el tezontle, fenómeno que a la vez se ve incrementado por su porosidad ocluida (Milliken y col., 2013).

Por otra parte, también cabe mencionar que la menor cantidad de cromo y plomo registrada en tezontle corresponde a los sistemas RV, incluso menor que en los RC (Tablas 4.3 y 4.4), lo cual posiblemente se relaciona con la mayor tasa de asimilación de metales pesados que presenta *Phragmites australis* en comparación con la del tezontle (Chong y col., 2009; Dhir, 2010), en especial si éste no contiene microorganismos tolerantes (Leung y col. 2000). En este orden de ideas, en el siguiente apartado se detalla la acumulación y distribución de plomo y cromo en la vegetación de los HA.

Finalmente, la cantidad de plomo y cromo cuantificada en el tezontle de los sistemas RV (humedales artificiales convencionales) es similar a la reportada en los estudios de Matagi y col. (1998) y Wood y McAtamney (1996) quienes trabajaron con diferentes medios de empaque pero con características constructivas similares a las del presente estudio. En este sentido, la cantidad de metales pesados cuantificada en los sistemas RIV es mayor a la reportada en estudios similares, en los que no emplearon bacterias tolerantes a los metales.

#### **IV.7.1.2. Distribución de plomo y cromo en la biomasa vegetal de los humedales artificiales**

Reeves y Baker (2000) mencionan que las plantas hiperacumuladoras de metales pesados, son aquellas que pueden almacenar al menos 1,000 mg del metal por kg de masa seca. Acorde a esto, la masa seca de los vegetales no excedió los 800 mg en ningún caso, y considerando los resultados de masa de metal acumulada (en la biomasa) de las Tablas 4.3 y 4.4, la acumulación es mayor a 1,000 mg kg<sup>-1</sup>, tanto de plomo como de cromo. Con este criterio, puede considerarse que la especie vegetal empleada (*Phragmites australis*) es hiperacumuladora de plomo y cromo, tal y como lo han descrito Liu y Dong. (2007) y Bonanno, (2011), quienes también utilizaron *Phragmites australis* en su investigación.

En la Tabla 4.3 se indica que la cantidad de plomo acumulada en la biomasa vegetal de los sistemas RIV y RV es muy similar entre ellos, con valores alrededor de 1.2 g de plomo que equivalen al 34% del total ingresado. Esto considerando la operación con TRH de 4 días y de aproximadamente 2.70 g para el TRH de 2 días, que equivalen al 35% del total. Acorde a esto, no se encontraron diferencias significativas entre el tipo de HA y el TRH empleado ( $F_{3,8}=2.71;P=1.12$ ).

En lo que respecta a la distribución de plomo en la biomasa, en las Figuras 4.12 y 4.13 se indica que los dos HA con vegetales (RIV y RV) acumularon cantidades muy similares en las secciones aérea y subterránea (rizoma y raíz) de la planta. En efecto, no existieron diferencias significativas entre los valores reportados, tanto para el TRH de 2 días como de 4 días. A pesar de que, al considerar la definición de Reeves y Baker (2000), existe hiperacumulación de plomo, la cantidad acumulada en la parte aérea es significativamente menor que la acumulada en la raíz y rizoma ( $F_{3,8}=1.65;P=0.00001$ ), resultado que coincide con los de Cheng y col. (2002) y Clemens y col. (2002), quienes mencionan que es usual que exista poca traslocación de plomo, debido a que presenta mayor afinidad por el rizoma de las especies vegetales que por cualquier otro órgano.

Por su parte la cantidad de cromo acumulado en las plantas, se indica a detalle en la Tabla 4.4, en la que se observa que, al igual que el caso del plomo, los valores registrados en la biomasa vegetal son muy similares entre ambos tipos de HA (RIV y RV) sin encontrarse diferencias significativas entre ellos ( $F_{3,8}=2.65;P=0.121$ ). Al respecto, ambos HA lograron acumular alrededor de 0.9 g de cromo, con TRH de 4 días, equivalentes al 30% del total ingresado al sistema durante los 151 días de operación. Así mismo, con TRH de 2 días los dos HA acumularon aproximadamente 1.8 g, equivalente al 35% del total ingresado.

Ahora bien, en cuanto a la distribución de cromo en la biomasa vegetal, las Figuras 4.16 y 4.17 señalan que, para ambos TRH en el sistema con cepas tolerantes (RIV), la cantidad de cromo acumulado en la parte aérea es significativamente mayor que en la parte

subterránea de la planta ( $F_{3,8}=1.83;P=0.001$ ). En el RV, también se cumple esto, pero sólo con el TRH de 2 días. Con esto, cabe destacar que para ambos TRH, la cantidad de cromo acumulada en la parte aérea fue alrededor de un 20% más en los HA RIV que contienen las bacterias tolerantes en comparación con los HA convencionales. En relación a esto, si el RIV se opera con TRH de 2 días y demás parámetros descritos en la metodología, se acumularían en la parte aérea alrededor del 11% del total de cromo ingresado, alrededor de  $0.82 \text{ g Cr kg}^{-1}$  de biomasa vegetal, con lo que cabe destacar que sería la cantidad susceptible a ser recuperada a través de la poda y cosecha de las plantas (Clemens y col., 2002), que precisamente es parte del mantenimiento preventivo de los HA (Kadlec y Wallace, 2009).

Finalmente, la mayor proporción de cromo en la sección aérea de las plantas indica el fenómeno de traslocación, con lo que para este metal la hiperacumulación existe tanto por la cantidad acumulada (Reeves y Baker, 2000) como por el factor de traslocación (Olivares y Peña, 2009; Zhang y col., 2006). Lo anterior coincide con los resultados de Amuda (2009); Baker y col. (1994); Cunningham y Ow (1996); Obarska-Pempkowiak y Limkowska (1999) y Raskin y col. (1997) quienes reportan mayor cantidad de cromo en la sección aérea de la vegetación que en la raíz y rizoma de diferentes especies vegetales.

#### **IV.7.1.3. Distribución de plomo y cromo en el efluente de los humedales artificiales**

Las Tablas 4.3 y 4.4 y las Figuras 4.12 a 4.19 indican la distribución de plomo y cromo en el efluente de los cuatro tipos de humedales artificiales (HA) evaluados, tanto para el TRH de 4 días como para el de 2 días. Las fracciones que conforman el efluente de los reactores son la parte disuelta y la suspendida. Esta última se refiere a la cantidad de plomo y cromo adheridos a las bacterias, que no conformaron o se han desprendido de la biopelícula por algún mecanismo extracelular o intracelular desarrollado para la tolerancia a metales pesados (Obarska-Pempkowiak y Klimkowska 1999; Yeh y col., 2009).

En la Tabla 4.3 y Figuras 4.12 a 4.15 se observa que, para ambos TRH, la fracción suspendida de plomo en el RIV es cercana al doble de la disuelta. En efecto, cerca del 25%

del total ingresado se cuantificó en forma suspendida en el efluente del RIV, mientras que en el RI las fracciones suspendidas y disueltas son muy similares entre ellas y en los HA sin inóculo (RV y RC) predominó la fracción disuelta. Acorde a esto, se encontraron diferencias significativas entre los resultados de plomo suspendido en el efluente de los cuatro HA ( $F_{7,16}=39.6$ ;  $P=0.0001$ ).

La cantidad y distribución de plomo en el efluente de los RV, que son los sistemas que emulan un humedal artificial convencional, coinciden con lo reportado en los estudios previos de Walker y Hurl (2002) y por ende, difieren con la distribución reportada para los sistemas RIV que son los de interés en el presente proyecto.

Cabe mencionar que la cantidad de plomo suspendido en el efluente del sistema de interés (RIV) con TRH de 4 días fue de 0.92 g y con el TRH de 2 días fue de 1.9 g (Tabla 4.3 y Figura 4.12), lo que representa un 24.3% y 25.6 % respectivamente del total de plomo ingresado al sistema. Este resultado sugiere que el plomo suspendido es factible de ser recuperado por sedimentación física o química, la cual es una importante etapa dentro de los procesos de tratamiento de aguas residuales (Kadlec y Wallace, 2009; Masters y Ela, 2008). En efecto, recientes estudios se han enfocado a la optimización de procesos de recuperación de metales pesados presentes en lodos de aguas residuales, incluyendo métodos enzimáticos (Peruzzi y col., 2009; Sheoran y Sheoran 2006).

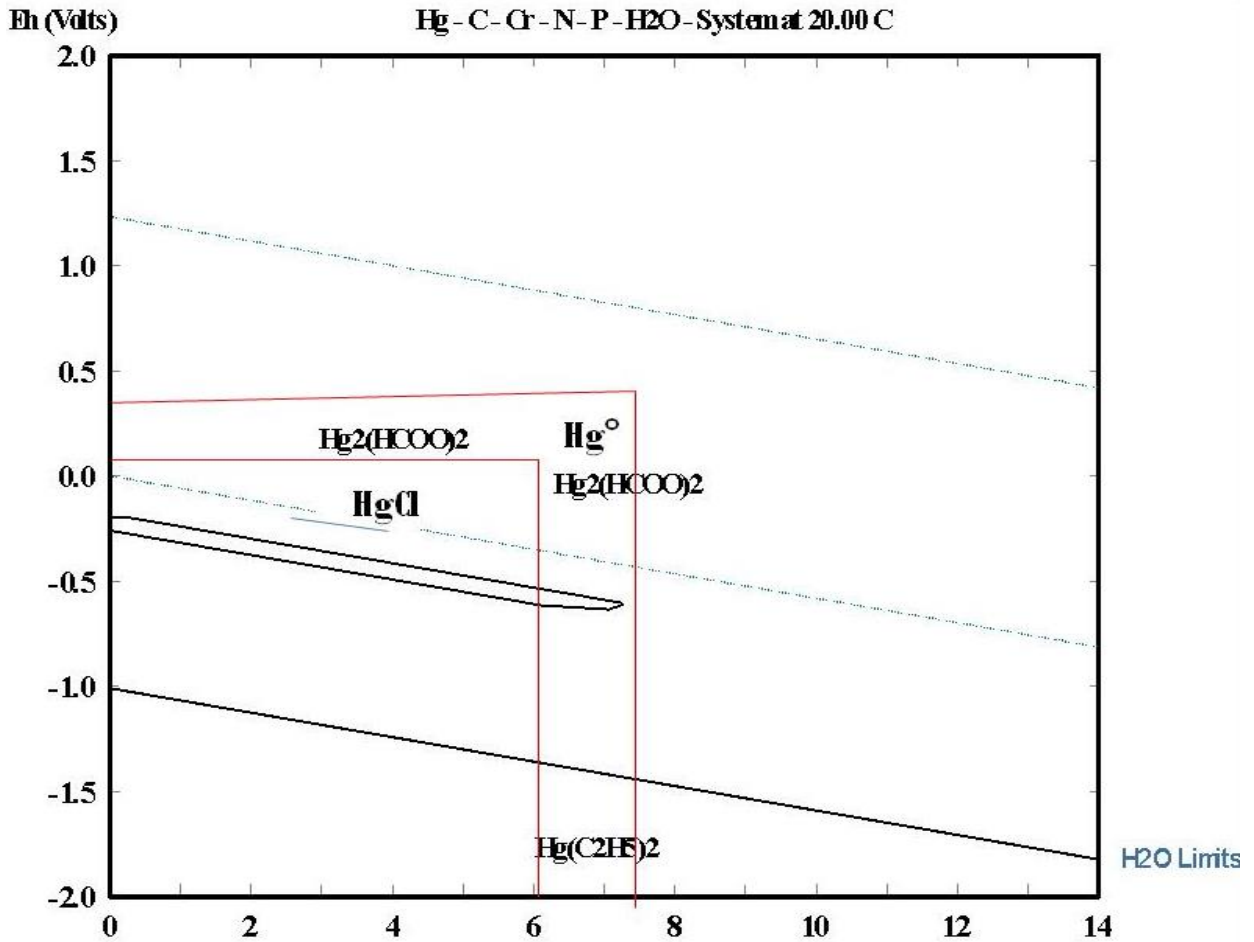
En lo que respecta al cromo, para ambos TRH, la fracción que prevalece en el efluente de los cuatro HA, es la disuelta (Tabla 4.4 y Figuras 4.16 a 4.19). El HA que acumuló mayor cantidad del metal fue el inoculado con las cepas tolerantes, ya que presentó la menor cantidad en su efluente total con 1.13 g considerando TRH de 4 días y 2.53 g con TRH de 2 días, lo que equivale al 45.2% y 43.5% respectivamente, valores que se encuentran por arriba de lo reportado para estudios similares (Amuda, 2009; Sheoran y Sheoran, 2006; Ye y col., 2009). Además, no se encontraron diferencias significativas en los resultados (en porcentaje) de los dos TRH evaluados ( $F_{7,16}=35.2$ ;  $P=0.19$ ), mientras que los valores de las



fracciones disueltas fueron muy similares entre los dos HA con vegetales y ambos, significativamente menores que los RI y RC (ambos sin vegetales) ( $F_{7,16}=35.2$ ;  $P=0.0001$ ). Este hecho se relaciona directamente con la eficiencia de remoción coadyuvada por las plantas, ya que en la Tabla 4.4 se observa que los HA RIV y RV acumulan mayor cantidad de cromo, coincidiendo con los resultados descritos en el apartado IV.7.1.2, en los que se puso de manifiesto el papel de las plantas al acumular y traslocar el metal pesado.

#### **IV.7.2. Acumulación, volatilización y distribución de mercurio en los humedales artificiales**

En el presente estudio, el mercurio fue el único elemento para el que se consideró la evapotranspiración del metal, debido al déficit en el balance de masa que fue hasta de un 39 % del total ingresado en cada sistema (5.9 mg). Para corroborar esto, se realizó un diagrama de estabilidad de fase para el mercurio, considerando como variables de entrada los valores de pH, pOR, temperatura, presión y concentraciones de otros elementos químicos que también se encontraban en el sistema (carbono, nitrógeno, fósforo, potasio, plomo y cromo). El resultado de este diagrama se muestra en la Figura 4.20, en la que se puede observar que el mercurio se encuentra en considerables proporciones como dimetil mercurio y/o mercurio elemental (especies encontradas entre las líneas rojas), las cuales por naturaleza fisicoquímica son transferidos a la atmósfera por gradiente de concentración (Kabata-Pendias y Pendias, 2001; Mason y Sullivan, 1998).



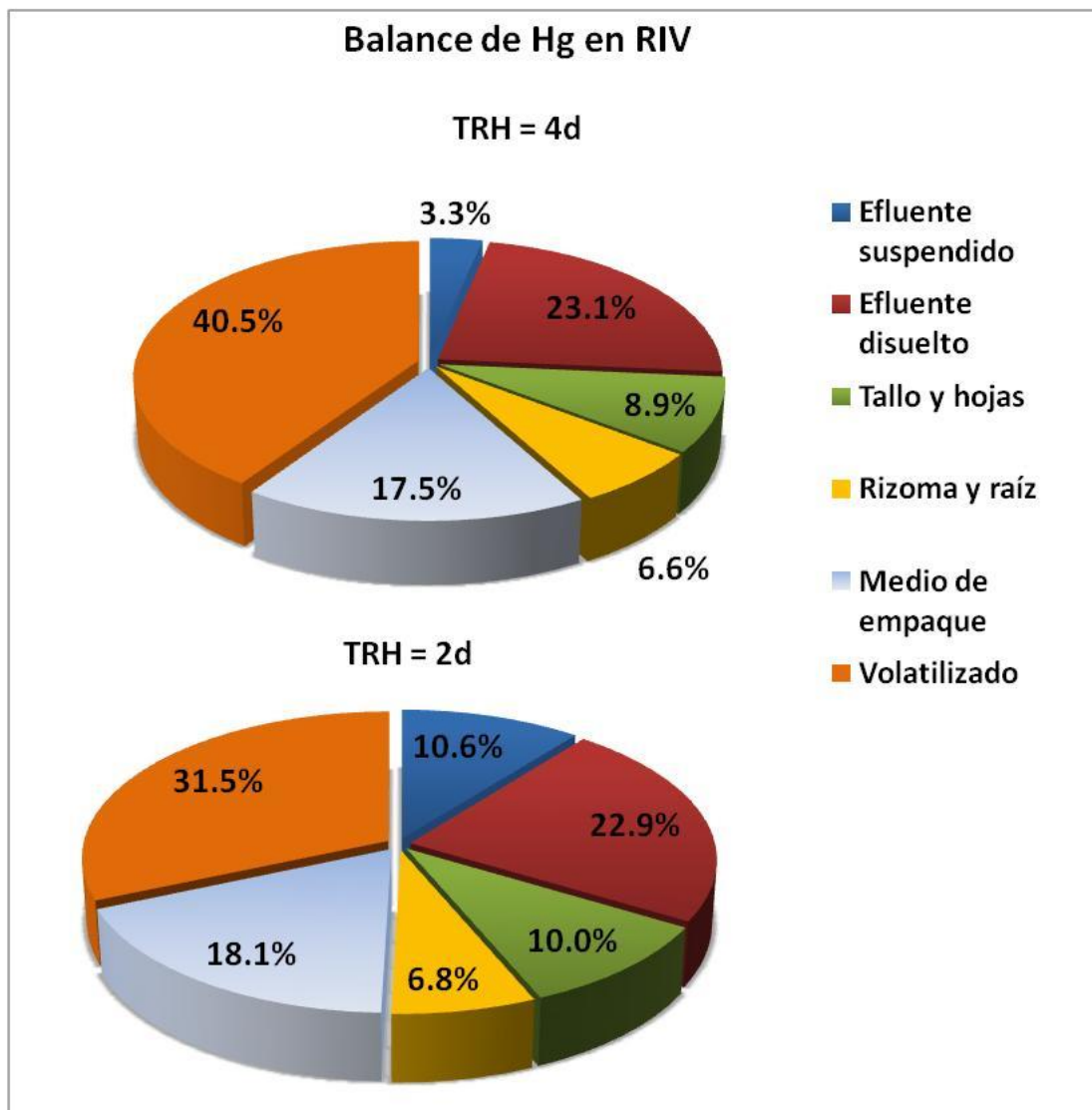
**Figura 4.20.** Diagrama de fase del mercurio (Pourbaix) considerando las condiciones ambientales y químicas a las que operaron los 4 humedales artificiales evaluados. Los valores de pH y pOR entre las líneas rojas, son el rango registrado a lo largo de la fase experimental (pH de 6.1 a 7.4 y pOR de 50 a 208 mV)

En la Tabla 4.5 se muestra la cantidad de mercurio acumulado y volatilizado en cada uno de los HA evaluados. Con base en la ecuación 2, para el TRH de 4 días ingresaron 15.18 mg de mercurio, de los cuales los dos sistemas con vegetales (RIV y RV) acumularon alrededor de 5.0 mg de mercurio, equivalentes al 33%. Les sigue con valores similares el HA sin vegetales, pero con inóculo bacteriano (RI) que acumuló 4.03 mg que equivalen al 30.1%. Por su parte, el HA que sólo fue empacado con tezontle (RC) solamente acumuló 1.9 mg de mercurio, equivalentes al 12.5%, cantidades significativamente menores a las registradas

en los otros tres HA ( $F_{7,16}=27.26$ ;  $P=0.0001$ ). En la misma Tabla 4.5, puede apreciarse que para el TRH de 2 días ingresaron 30.36 mg de mercurio, cuya acumulación porcentual en los cuatro HA es prácticamente la misma que con el TRH de 4 días. La similitud y mayor acumulación de los sistemas RIV y RV se relaciona con la capacidad de las plantas para acumular metales pesados. Al respecto, Clemens y col. (2002); Clemens (2006); Patra y Sharma (2000) mencionan que, en la rizosfera, los metales pesados se ligan con sitios activos del malato y citrato, lo que permite que atraviesen las membranas de la raíz y el rizoma, para después ser precipitados en la vacuola y posteriormente ser transportados por el parénquima del xilema hacia las hojas y tallos. Esto también puede explicar que los sistemas RIV y RV transfieran mayor cantidad de mercurio a la atmósfera (Figura 4.21-4.24), ya que el metal al estar en los órganos del carrizo se encuentra como especie orgánica, y precisamente una de ellas es el dimetil mercurio, que se caracteriza por ser fácilmente transferido hacia la atmósfera por la vegetación (Kabatas-Pendias y Pendias, 2001; Mason y Sullivan, 1998).

Considerando lo mencionado arriba, el dimetil mercurio sólo existe en condiciones neutras y oxidantes del medio, que son precisamente a las que operaron los HA (Parequetti y col., 2004) y en el caso específico del sistema sin vegetales pero con inóculo bacteriano (RI), esto puede explicar la ocurrencia de volatilización de mercurio hacia la atmósfera, dada la interacción del metal con los microorganismos para dar lugar a la mencionada forma metilada de mercurio (King y col., 2002). En este mismo orden de ideas, las condiciones fisicoquímicas descritas para el medio acuoso, también dan lugar al mercurio en su estado elemental, el cual además del dimetil mercurio, es la otra forma química del metal que tiende a volatilizarse debido a la ocurrencia natural de la presión de vapor (Kabata-Pendias y Pendias, 2001; Ventura y col., 2005). Este hecho puede explicar que el sistema HC a pesar de no contener plantas ni bacterias, haya transferido a la atmósfera 3.22 mg ( $\pm 0.68$  mg) de mercurio al término de los 151 días de operación con TRH de 4 días y 5.51 mg (0.75 mg) con TRH de 2 días. Aunque estas cantidades fueron significativamente menores ( $F_{7,16}=28.33$ ;

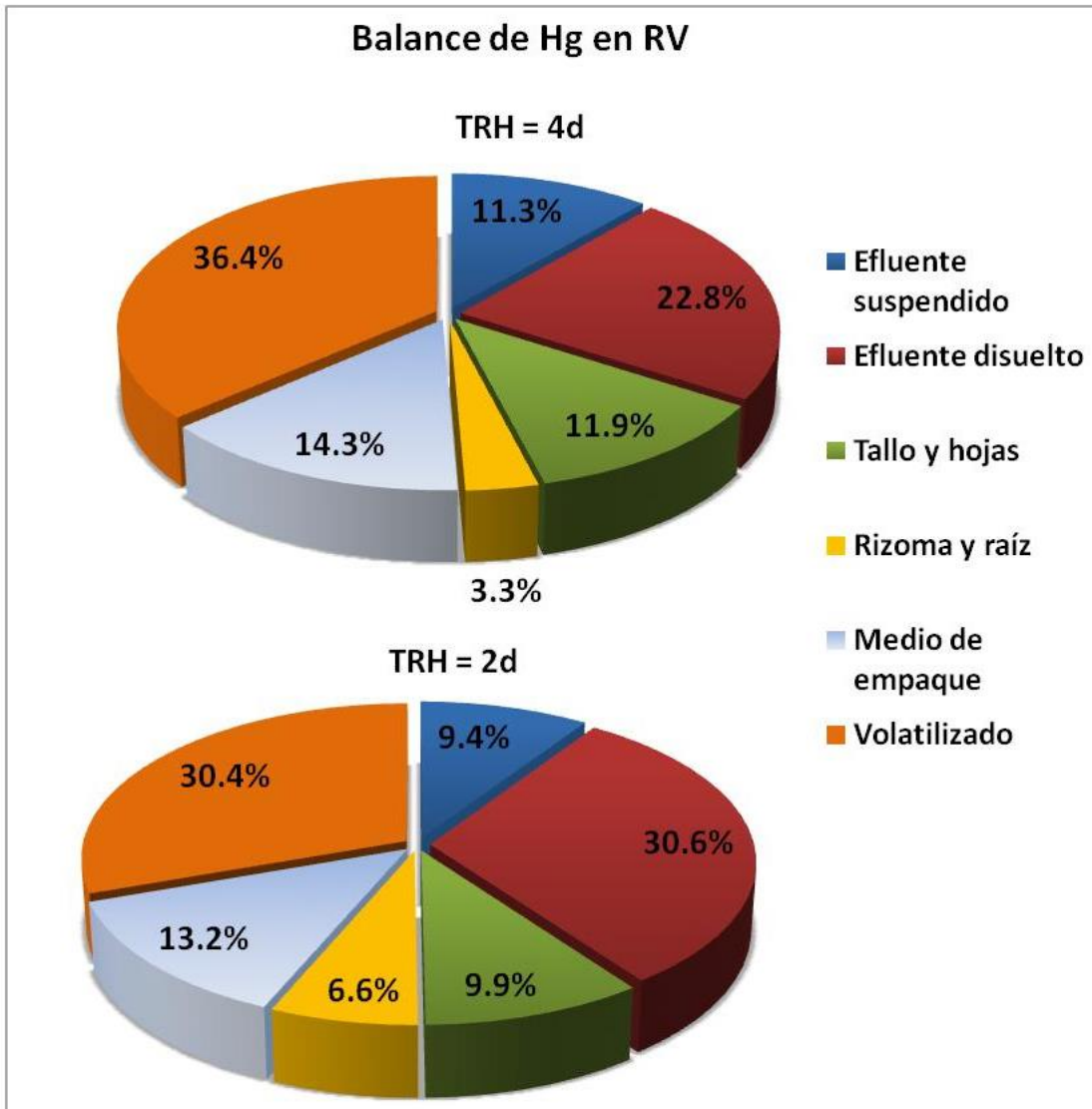
$P=0.0001$ ) que la transferida por los otros HA, tal y como se muestra en la Tabla 4.5 y Figuras 4.21 a 4.24.



**Figura 4.21.** Distribución de mercurio en los reactores RIV (con inóculo y vegetales) con tiempos de residencia hidráulica de 2 y 4 días

#### IV.7.2.1. Distribución de mercurio en la biomasa vegetal de los humedales artificiales

La Tabla 4.5 y Figuras 4.21 y 4.22 muestran la distribución del mercurio acumulado en la biomasa vegetal de los humedales artificiales RIV y RV, observándose valores muy similares entre los dos sistemas, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas para ambos TRH ( $F_{3,8}=2.16$ ;  $P = 0.1453$ ).

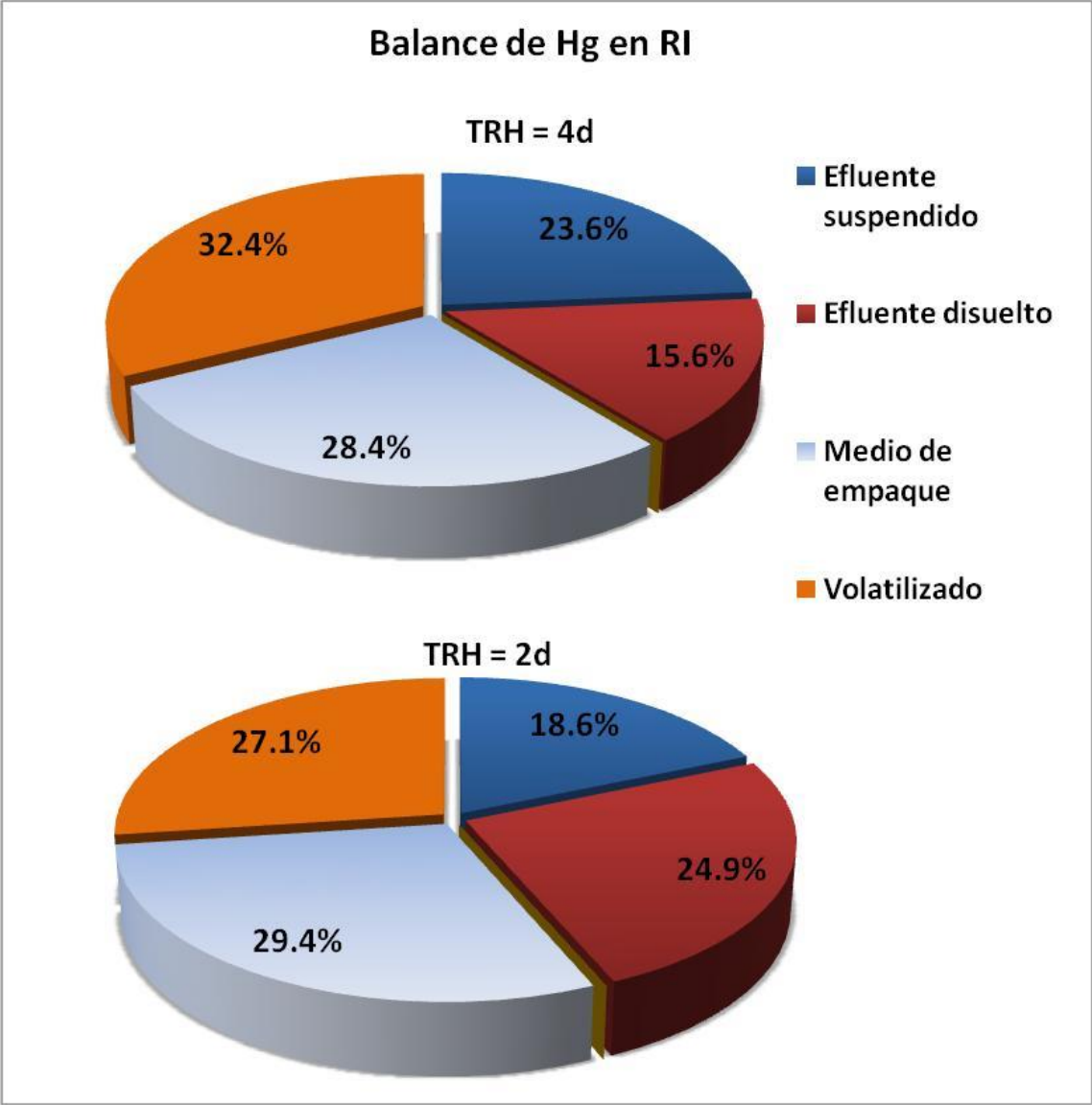


**Figura 4.22.** Distribución de mercurio en los reactores RV (con vegetales y sin inóculo) con tiempos de residencia hidráulica de 2 y 4 días

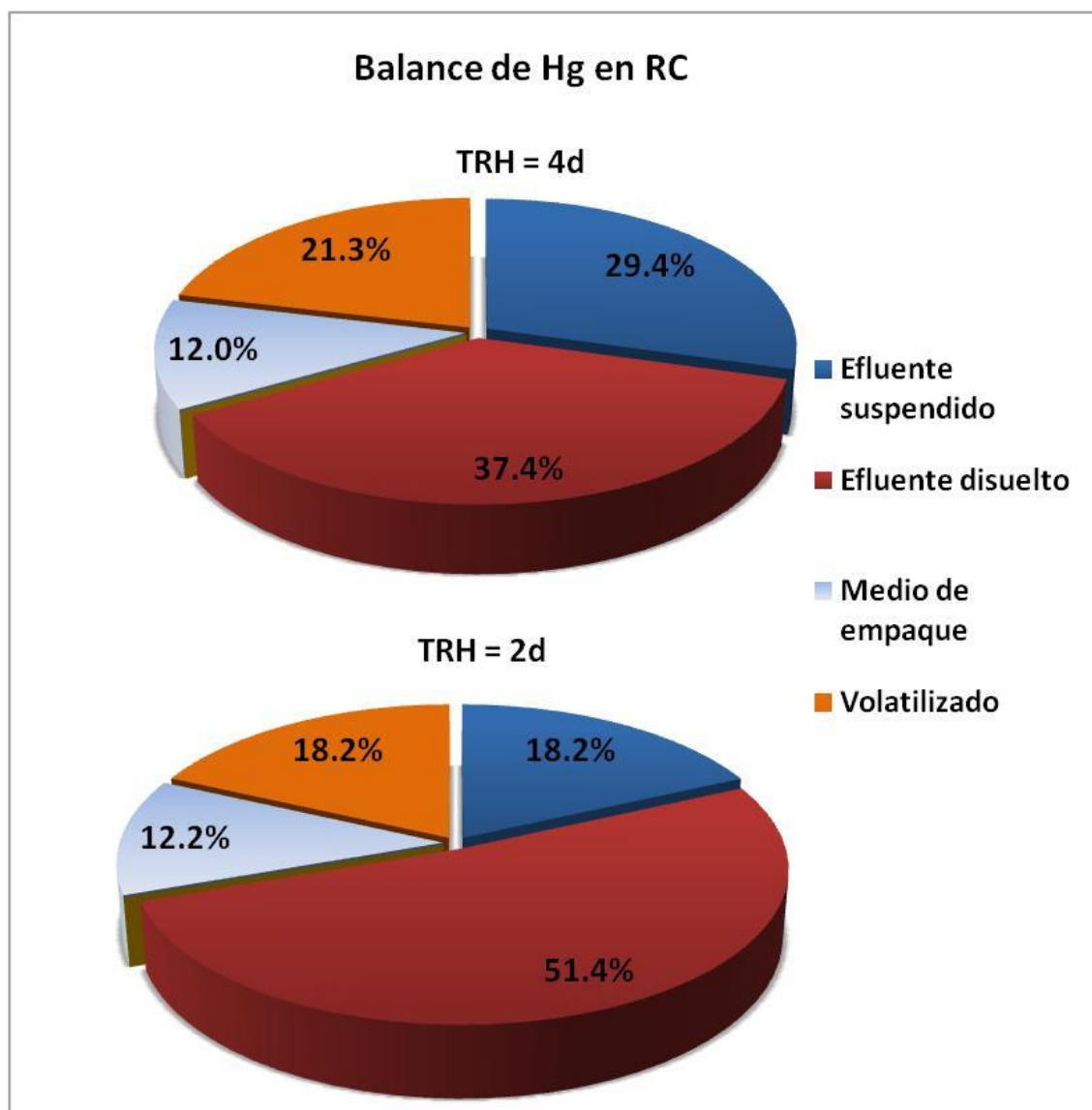
Así, para el TRH de 4 días la cantidad de mercurio acumulado en la biomasa vegetal del RIV es  $2.35 \pm 0.7$  mg, lo que equivalen al 15%. De esta cantidad,  $1 \pm 0.32$  g se cuantificó en raíz y rizoma y  $1.35 \text{ mg} \pm 0.46 \text{ mg}$  en la parte aérea, lo que equivalen al 6.6% y 10.5% respectivamente.

En cuanto a la operación con TRH de 2 días, la cantidad de mercurio acumulada en la biomasa vegetal fue  $5.06 \text{ mg} \pm 1.56 \text{ mg}$  (aproximadamente el 16.7% del total ingresado),

de los cuales  $2.04 \text{ mg} \pm 0.57 \text{ mg}$  se encontraron en rizoma y raíz y  $3.0 \text{ mg} \pm 0.98 \text{ mg}$  en la sección aérea de la planta, siendo equivalentes al 6.7% y 9.9% del total ingresado respectivamente.



**Figura 4.23.** Distribución de mercurio en los reactores RI (con inóculo sin vegetales) con tiempos de residencia hidráulica de 2 y 4 días



**Figura 4.24.** Distribución de mercurio en los reactores RC (solamente con contenido de tezontle) con tiempos de residencia hidráulica de 2 y 4 días

De manera similar, en la vegetación del RV se cuantificaron  $2.3 \pm 0.67$  mg de mercurio al final de la operación con TRH de 4 días. De esta cantidad  $0.5 \pm 0.12$  mg se registraron en el rizoma y raíz y  $1.8 \pm 0.58$  mg en la parte aérea de la planta; valores que equivalen al 3.3% y 5.9%, respectivamente.

Por su parte, durante la operación del RV con TRH de 2 días, las plantas acumularon  $4.97 \pm 1.2$  mg de mercurio al final de la operación, de los cuales  $1.97 \pm 0.27$  mg se registraron en rizoma y raíz y  $2.99 \pm 0.97$  mg en la sección aérea de la planta. Estas cantidades equivalen al 6.5% y 9.8% del total ingresado, respectivamente.

Cabe mencionar que independientemente de la distribución de mercurio en la biomasa vegetal de los humedales, la acumulación en cualquiera de ellos fue la menor de todos los compartimientos ambientales, tal y como se indica en las Figuras 4.21 y 4.22. Sin embargo, la importancia que exhibieron las plantas en los humedales artificiales fue la capacidad de traslocar el metal, para propiciar su continua volatilización. Acorde con Clemens (2006) y con LeDuc y Terry (2005) se trata de un mecanismo de desintoxicación de algunos metales, que no tienen afinidad por la raíz, aunque también es dependiente de la especie vegetal (García-Gallegos y col., 2011). En efecto, si se aplica un factor de bioconcentración y de traslocación (Olivares y Peña, 2009; Zhang y col., 2006), las Figuras 2.21 y 2.22 evidencian que al dividir la cantidad de mercurio presente en la parte aérea entre la cantidad presente en la raíz y rizoma, el resultado sería superior a 1. Este hecho indica que a pesar de existir poca acumulación de mercurio en las plantas, la mayoría se encuentra en la parte aérea.

#### **IV.7.2.2. Distribución de mercurio en el efluente y medio de empaque de los humedales artificiales**

Por la naturaleza del mercurio, los compartimientos importantes en su distribución fueron la biomasa vegetal y la cantidad evapotranspirada. Sin embargo, al observar las Figuras 4.21 a 4.24, se indica que para ambos TRH el medio de empaque también acumuló una cantidad considerable del metal, en especial en los sistemas inoculados y aún más en el RI que no contiene vegetales, alcanzando alrededor del 28.5 %, que equivalen a 4.24 mg del mercurio total ingresado. Como se ha mencionado para otros metales, la capacidad de acumulación de mercurio por parte del 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 quimisorción hacia el mercurio (Akar y Divriklioglu, 2010; Zhang, 2011).

Por su parte, la distribución del mercurio en el efluente de los sistemas indica que se encontró mayoritariamente en su fracción disuelta para los reactores RIV, RV y RC en ambos TRH de operación (Figuras 4.21, 4.22 y 4.24). En contraste, el reactor RI exhibió mayor cantidad del metal en su fracción suspendida (Figura 4.23), lo cual puede explicarse con el hecho de que al contener las bacterias tolerantes, se formaron compuestos organometálicos, que son suspendidos, y egresaban del sistema por el efluente al no poder interactuar con las plantas por ausencia de éstas, tal y como lo mencionan Teitzeln y Parsek (2003). En efecto, solamente en el reactor RI la fracción de mercurio suspendido en el efluente es considerable (Figura 4.23) alcanzando hasta 23.6 % al operarse con TRH de 4 días, lo que equivale a  $3.57 \pm 1.2$  mg del metal, resultado que coincide con lo reportado por Von Canstein y col. (1999).

Finalmente, cabe destacar que el reactor de interés no exhibe factibilidad de recuperar este metal, de su fase suspendida, al acumular solamente 3.3% del total ingresado con el TRH de 4 días y 10% con el TRH de 2 días (Figura 4.21).

## V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### V.1. CONCLUSIONES

- Del análisis de los resultados obtenidos, se establece que el sistema de humedales artificiales implementado operó eficientemente en la remoción de metales pesados y materia orgánica, al presentar eficiencias de remoción considerablemente altas y estabilidad para ambos parámetros.
- Derivado de la evaluación de los resultados de remoción de metales pesados y de los relacionados con su acumulación y distribución dentro de los humedales artificiales, se concluye que es posible disminuir los tiempos de residencia hidráulica si se usan las cepas tolerantes a metales pesados. Esto se reflejaría en menores áreas superficiales requeridas durante su dimensionamiento.
- De la descripción y análisis del balance de masa realizado, es posible concluir que las plantas utilizadas son hiperacumuladoras de metales pesados, en especial de cromo, que mayoritariamente fue traslocado hacia la parte aérea. Así mismo, el medio de empaque logró retener una considerable cantidad de metales pesados a pesar de su composición geológica, por lo que se concluye que, dada la presencia de biopelícula bacteriana en su superficie, es un componente importante a considerar en la implementación de humedales artificiales para remover metales pesados. En específico para el mercurio, la mayor cantidad se cuantificó transferida a la atmósfera por volatilización y transpiración, por lo que las plantas y el medio de empaque no retienen el metal bajo las condiciones de operación evaluadas y, por ende, no es factible sugerir parámetros de diseño para la remoción de mercurio. Además, dadas las condiciones fisicoquímicas de operación, no se encontraron formas precipitadas de los metales, por lo que se puede prescindir de ellas en el balance de masa.

- Del análisis de la distribución de metales pesados, se concluye que el uso de cepas tolerantes permitió que las plantas asimilaran mayor cantidad de cromo en las hojas y tallos, planteando su recuperación posterior a la cosecha vegetal. De manera similar, el inóculo bacteriano dio lugar a una mayor proporción de plomo suspendido en los efluentes, el cual puede ser objeto de separación luego de su sedimentación. Para el caso del mercurio, la inoculación no originó cambios relevantes en su acumulación y distribución. En términos generales, se concluye que el inóculo bacteriano además de propiciar una mayor eficiencia y estabilidad en la remoción de cromo y plomo, posibilita su continua recuperación durante la operación del sistema.

## **V.2. RECOMENDACIONES**

- Dado que los resultados de la presente investigación ponen de manifiesto el potencial de los humedales artificiales inoculados con cepas tolerantes a metales pesados para la remoción de estos compuestos, a escala de laboratorio, es recomendable escalar el experimento a nivel piloto, para posteriormente establecer la propuesta técnico-económica de su implementación a escala real.
- Aunque en el Capítulo IV se puso de manifiesto la factibilidad de operar los humedales artificiales con un menor tiempo de residencia que el calculado con organismos convencionales, se considera pertinente realizar pruebas cinéticas de degradación de materia orgánica con el consorcio tolerante a metales pesados. Así mismo, se recomienda realizar cinéticas de crecimiento bacteriano, que consideren el efecto inhibitorio de los metales, para elucidar su intervención observada en la acumulación y distribución de los metales dentro de los humedales artificiales.
- Dado que los resultados indican que la mayor cantidad de mercurio es transferida a la atmósfera durante su tratamiento con humedales artificiales, es recomendable

evaluar dicho tratamiento bajo otras condiciones de operación, en especial en anaerobias/facultativas, que puedan evitar las especies químicas volátiles del mercurio.

- A pesar de que las bacterias del consorcio tolerante utilizado fueron identificadas genéticamente en un estudio previo, es recomendable una identificación durante y al final de la operación para conocer las bacterias que subsisten y las que se incorporan en el humedal artificial, lo cual podría redituarse en conformar un nuevo y más apto consorcio bacteriano.

## ANEXOS

### ANEXO 1

#### DATOS EXPERIMENTALES DE FIGURAS DEL CAPÍTULO IV

##### ANEXO 1A. PRUEBAS DE TOXICIDAD

Fitotoxicidad Radícula			
Concentración ejemplo de Cr	% medio de inhibición	% Inhibición máxima	% inhibición mínima
0	0	0	0
1	8	1.3	0.9
4	12	2.2	1.5
10	22	2	1.9
20	48	3	2.5
55	54	2	2
75	50	3.6	2.5
100	67	2.7	3.1

Fitotoxicidad hipocotilo			
Concentración ejemplo de Cr	% medio de inhibición	% Inhibición máxima	% inhibición mínima
0	0	0	0
1	8	1.1	0.7
4	12	1.8	2.38
10	22	3	2.3
20	48	3.6	1.8
55	54	2.5	1
75	50	8	3.6
100	67	2.4	3.4

Densidad bacteriana, UFC mL <sup>-1</sup>	[%Metales]	% Inhibición	Nivel de mezcla	UFC máxima	UFC mínimas
1300000	100	96.70	100	2.20	0.70
5900000	75	95.08	75	1.42	2.58
13000000	55	89.17	55	3.83	4.77
63000000	20	47.50	20	7.50	3.50
80000000	10	33.33	10	3.67	3.33
120000000	0	0.00	0		

**ANEXO 1B. CRECIMIENTO BACTERIANO POSTERIOR A LA INOCULACIÓN Y PREVIO A LA ADICIÓN DE METALES PESADOS**

UFC promedio mL <sup>-1</sup> , previos a vertimiento de metales pesados				
Días de operación	RI	RIV	RV	RC
3	195,000	195,000	1,000	500
4	155,000	147,000	3,500	1,000
5	124,000	132,000	4,500	1,500
6	112,000	105,000	5,500	1,800
7	69,000	54,000	8,200	3,500
8	61,000	44,000	16,000	7,000
9	65,000	64,000	23,000	7,800
10	72,000	76,000	30,000	8,500
11	82,000	89,000	36,000	9,200
12	83,000	92,000	55,000	11,500
13	84,000	91,000	57,000	10,500
14	83,000	91,000	55,500	9,800

UFC = Unidades formadoras de colonias; RI = Reactor inoculado; RIV = Reactor inoculado con vegetación; RV = Reactor con vegetación; RC = Reactor control (sin plantas ni inóculo)

**ANEXO 1C. DATOS EXPERIMENTALES DE LA DQO EN FUNCIÓN DE LOS DÍAS DE OPERACIÓN**

Días de operación	DQO, mg L <sup>-1</sup>							
	RI 4d	RIV 4d	RV 4d	RC 4d	RI 2d	RIV 2d	RV 2d	RC 4d
15	600.0	600.0	600.0	600.0	600.0	600.0	600.0	600.0
19	400.6	417.0	462.0	492.1	489.2	481.8	554.9	585.2
23	361.0	355.0	429.5	461.2	400.6	470.1	539.6	580.0
27	321.7	312.0	389.2	432.2	370.8	395.2	589.7	570.4
31	250.2	272.1	352.1	417.6	284.8	340.4	461.6	565.1
35	220.0	230.6	318.9	390.2	256.2	309.6	449.8	544.6
39	189.2	172.8	270.2	389.2	209.1	285.1	422.9	535.2
43	151.0	142.7	250.2	348.3	166.1	210.2	398.7	529.7
47	162.0	133.2	232.3	305.2	179.6	185.0	384.6	525.3
51	150.2	133.2	225.3	270.2	170.4	162.1	351.0	515.4
55	142.8	155.6	221.2	241.5	151.2	164.5	334.8	505.2
59	125.8	117.6	211.1	220.3	132.0	158.2	329.0	502.5
63	109.2	147.6	202.1	212.2	115.3	163.6	320.7	501.2
67	127.5	147.6	185.9	200.3	133.9	175.1	308.5	490.5
71	88.1	105.6	181.6	198.6	89.1	165.4	292.6	485.2
75	86.4	85.2	172.4	190.5	87.2	144.9	292.0	471.7
79	87.9	110.6	165.6	189.6	98.2	110.6	285.2	441.8
83	88.6	101.2	147.2	175.6	100.3	105.2	282.3	430.2
87	93.9	95.6	141.2	161.2	104.2	98.6	289.1	410.1
91	93.5	92.1	139.9	166.2	103.5	98.1	273.5	394.4
95	92.8	97.9	138.2	174.8	102.0	101.0	283.8	380.3
99	89.0	88.5	137.6	182.4	97.1	98.7	275.4	370.0
103	95.3	85.3	167.8	192.4	95.3	103.5	281.0	360.1
107	97.9	82.5	185.8	200.2	107.0	99.8	282.1	355.2
111	98.3	91.3	162.9	201.0	102.6	94.0	275.8	350.0

<b>115</b>	97.5	92.6	139.0	204.3	109.8	90.0	269.7	344.7
<b>119</b>	99.1	101.4	180.0	206.2	115.2	110.0	264.4	340.2
<b>123</b>	100.3	91.5	146.5	212.4	104.7	105.0	259.2	350.0
<b>127</b>	100.9	84.6	181.7	221.4	100.9	103.0	256.1	347.9
<b>131</b>	110.3	97.5	149.2	255.2	100.2	99.0	258.8	340.9
<b>135</b>	101.3	82.4	189.8	263.5	111.2	104.0	263.4	342.8
<b>139</b>	98.5	80.2	149.9	280.6	108.7	99.0	260.3	342.7
<b>143</b>	99.2	93.6	150.2	285.5	109.0	95.0	256.9	345.6
<b>147</b>	100.0	81.3	215.3	287.3	110.0	90.0	243.0	340.4
<b>151</b>	101.6	89.0	218.7	293.1	111.9	87.1	249.8	332.1

UFC = Unidades formadoras de colonias; RI = Reactor inoculado; RIV = Reactor inoculado con vegetación; RV = Reactor con vegetación; RC = Reactor control (sin plantas ni inóculo)

#### ANEXO 1D. DATOS EXPERIMENTALES DE SÓLIDOS SUSPENDIDOS VOLÁTILES EN FUNCIÓN DE LOS DÍAS DE OPERACIÓN

Días de operación	Sólidos Suspendidos volátiles, mg L <sup>-1</sup>							
	RI 4d	RIV 4d	RV 4d	RC 4d	RI 2d	RIV 2d	RV 2d	RC 2d
<b>15</b>	15.7	7.5	4.8	9.3	11.3	10.1	3.9	2.6
<b>19</b>	25.0	8.2	1.8	10.6	14.0	15.2	3.1	6
<b>23</b>	9.8	9.4	1.6	12.5	12.0	11.6	2.8	6.5
<b>27</b>	13.1	14.3	16.0	14.2	15.3	17.3	6.3	7
<b>31</b>	24.4	12.3	1.5	16.5	19.0	20.0	20.0	8
<b>35</b>	19.5	15.2	25.8	29.0	17.0	24.0	25.0	7.6
<b>39</b>	18.0	14.4	30.0	4.8	19.5	33.0	39.0	12
<b>43</b>	50.6	52.5	67.0	30.4	28.6	30.0	51.0	15
<b>47</b>	37.5	64.7	34.1	44.3	34.6	34.0	42.0	17
<b>51</b>	52.5	36.5	24.6	31.1	42.3	40.0	31.0	20
<b>55</b>	49.2	51.2	85.0	30.8	45.7	42.0	65.0	25
<b>59</b>	50.1	57.0	85.9	28.8	49.6	45.0	60.0	24
<b>63</b>	81.9	53.5	46.3	75.6	76.2	49.0	36.0	23
<b>67</b>	82.1	70.4	51.1	71.6	77.3	52.0	38.0	20
<b>71</b>	84.5	55.6	59.9	65.3	79.8	63.0	42.0	26
<b>75</b>	60.3	60.3	61.2	55.9	82.6	55.0	44.0	27
<b>79</b>	78.2	67.3	54.3	51.6	75.4	65.0	37.0	20
<b>83</b>	61.2	77.2	45.6	38.2	71.3	67.0	34.0	24
<b>87</b>	63.5	68.2	37.9	31.2	66.3	71.0	27.0	25
<b>91</b>	65.6	66.2	36.7	32.5	61.3	72.5	26.0	27
<b>95</b>	69.6	62.2	39.3	33.1	62.3	73.5	28.0	25
<b>99</b>	77.6	64.2	40.1	33.9	69.8	75.0	29.0	23.2
<b>103</b>	69.3	71.7	43.9	34.6	72.3	74.0	33.0	27.2
<b>107</b>	72.1	72.3	44.3	35.6	74.6	76.0	32.0	29.6
<b>111</b>	63.7	81.3	43.4	33.3	70.6	71.0	30.0	25.4
<b>115</b>	64.5	80.4	39.5	32.4	75.3	74.0	27.0	25.2

<b>119</b>	65.4	77.9	37.7	30.6	72.1	78.0	26.0	23
<b>123</b>	59.8	74.3	41.2	30.2	66.9	75.0	32.0	26
<b>127</b>	67.9	69.7	40.1	28.6	70.4	76.0	33.0	27
<b>131</b>	66.0	75.6	32.6	27.7	65.2	77.0	32.3	23.2
<b>135</b>	66.4	77.5	41.3	26.9	77.9	75.0	30.0	22
<b>139</b>	64.6	72.5	42.2	22.3	76.3	69.0	28.0	21.2
<b>143</b>	67.0	69.7	36.1	21.1	77.2	66.3	28.2	19.5
<b>147</b>	66.4	75.2	34.6	20.5	78.2	74.3	27.5	17.2
<b>151</b>	67.0	73.1	36.3	18.3	71.1	72.2	28.9	17.4

UFC = Unidades formadoras de colonias; RI = Reactor inoculado; RIV = Reactor inoculado con vegetación;  
RV = Reactor con vegetación; RC = Reactor control (sin plantas ni inóculo)

#### ANEXO 1E. DATOS EXPERIMENTALES DE POTENCIAL DE ÓXIDO-REDUCCIÓN EN FUNCIÓN DE LOS DÍAS DE OPERACIÓN

Día operación	pOR, mV							
	RI 4d	RIV 4d	RV 4d	RC 4d	RI 2d	RIV 2d	RV 2d	RC 2d
<b>13</b>	140	149.5	262.5	195.6	145.2	147.3	250.7	198.6
<b>17</b>	262.3	200.2	181	224.39	167.2	158.3	119.9	211.8
<b>21</b>	130.0	168.0	191.8	178.8	135.3	170.2	210.2	185.2
<b>25</b>	195.0	147.0	157.0	200.3	189.7	156.38	169.3	145.1
<b>30</b>	-	208.6	206.5	212.0	195.2	203.6	187.9	204.8
<b>34</b>	200.1	155.1	175.9	174.0	199.6	175.6	180.2	163.2
<b>38</b>	-	152.3	187.8	-	179.9	179.6	159.6	179.5
<b>42</b>	167.2	166.1	133.0	195.6	155.6	171.9	145.3	201.2
<b>46</b>	172.2	175.2	127.2	198.2	154.3	158.3	129.6	192.5
<b>50</b>	165.6	179.2	117.8	191.2	146.3	192.3	122.4	182.4
<b>54</b>	161.2	189.2	105.6	182.6	152.4	189.7	115.6	176.3
<b>58</b>	175.2	188.6	100.5	175.6	164.6	186.4	109.2	172.2
<b>62</b>	178.9	191.3	105.6	165.1	170.3	170.3	104.6	160.3
<b>66</b>	182.5	188.6	110.6	162.3	186.2	179.1	99.3	146
<b>70</b>	192.5	200.2	112.6	147.9	192.1	181.2	92.6	125.3
<b>74</b>	207.8	200.1	121.5	141.2	220.7	181.9	92.6	98.8
<b>78</b>	206.5	199.5	120.6	132.3	212	189.6	87.9	89.9
<b>82</b>	208.1	178.6	119.6	131.2	209.6	194.3	84.6	79.2
<b>86</b>	200.6	188.2	112.5	125.2	203	191.4	77.9	67.3
<b>90</b>	199.6	195.6	114.6	108.2	189	201.3	75.2	66.6
<b>94</b>	206.3	189.6	115.6	103.9	170	211.3	72.5	65.1
<b>98</b>	200.7	188.2	111.2	101.5	189.3	214	63.4	60.3
<b>102</b>	195.6	191.4	105.7	100.2	182.3	212.6	68.9	54.9
<b>106</b>	191.3	195.4	103.3	95.7	192.6	210.6	64.9	49.8



110	186.3	198.4	92.6	89.7	179.8	208.5	62.5	45.1
114	192.4	199.7	81.6	82.1	185.6	210.6	46.2	39.8
118	201.0	200.5	76.5	78.2	196.3	209.6	64.9	41.2
122	197.2	212.2	69.66	63.2	192.1	208.4	63.7	44.6
126	191.3	210.2	68.11	25.9	160.8	201.9	59.6	42.1
130	185.3	207.7	69.87	59.7	159.8	199.6	57.8	39.4
134	179.7	201.3	71.22	50.1	163.4	206.9	52.6	37.6
138	181.2	193.7	71.06	56.0	161.3	204.7	55.6	35.3
142	178.3	190.3	70.33	32.0	157.2	193.6	53.2	37.2
146	176.6	193.1	69.46	33.7	154.6	194.3	53.9	38.9
150	176.9	195.61	67.93	30.7	159.8	200.1	51.8	38.5

UFC = Unidades formadoras de colonias; RI = Reactor inoculado; RIV = Reactor inoculado con vegetación;  
RV = Reactor con vegetación; RC = Reactor control (sin plantas ni inóculo)

**ANEXO 1F. DATOS EXPERIMENTALES DEL PORCENTAJE DE REMOCIÓN DE MERCURIO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE OPERACIÓN**

<i>% Remoción de Hg con concentración inicial (100%) de 0.11 mg L<sup>-1</sup></i>								
<i>Días de Operación</i>	<i>RI 4d</i>	<i>RIV 4d</i>	<i>RV 4d</i>	<i>RC 4d</i>	<i>RI 2d</i>	<i>RIV 2d</i>	<i>RV 2d</i>	<i>RC 2d</i>
15	57.00	82.00	80.00	60.00	50.2	68.7	66.1	29.3
19	55.00	74.00	83.00	56.00	52.3	66.0	70.2	36.0
23	53.00	77.00	76.00	63	50.5	64.0	63.2	33.2
27	56.35	70.85	67.80	45.89	54.3	61.0	64.2	31.0
31	58.98	73.00	72.10	54.96	48.9	56.9	65.2	28.0
35	49.21	77.00	73.00	83.36	47.2	54.5	61.2	27.9
39	32.40	81.81	80.00	81.60	30.3	66.5	52.2	27.2
43	78.55	85.50	78.90	69.50	69.9	67.3	53.4	28.0
47	75.15	81.00	77.00	77.68	71.3	68.9	54.2	27.5
51	67.38	78.20	69.00	76.00	69.6	72.4	51.2	27.0
55	26.05	73.00	76.00	50.31	41.2	73.6	57.6	26.0
59	37.20	71.20	75.00	48.20	51.3	71.2	59.9	25.0
63	48.60	72.30	71.60	45.80	56.2	64.5	60.4	24.0
67	58.30	63.10	59.60	47.20	61.3	63.6	61.2	22.2
71	63.20	48.70	44.00	41.30	62.4	62.3	56.4	21.6
75	61.20	51.30	43.20	39.80	64.3	71.5	50.2	20.0
79	43.80	53.60	49.60	38.10	55.6	74.6	65.3	21.0
83	48.30	58.90	50.00	40.10	43.0	76.9	72.3	19.0
87	53.60	51.00	50.20	33.65	55.8	72.4	70.2	17.0
91	55.60	65.20	60.00	31.20	58.6	68.2	64.5	16.0
95	57.20	66.30	55.20	29.82	40.6	66.6	60.2	12.2

<b>99</b>	49.20	65.20	56.90	25.20	40.1	62.5	54.2	11.0
<b>103</b>	48.10	63.30	49.2	24.30	31.8	61.6	53.0	13.0
<b>107</b>	46.25	64.5	51	24.2	36.7	58.6	57.0	12.9
<b>111</b>	46.70	64.10	44.2	22.90	43.2	58.0	51.0	12.0
<b>115</b>	45.10	61.30	36.6	20.90	44.9	54.3	46.5	11.5
<b>119</b>	45.40	58.60	48	18.60	43.0	48.0	48.6	11.0
<b>123</b>	44.60	55.30	38	16.50	46.8	45.5	47.0	10.0
<b>127</b>	45.60	55.40	33.2	13.50	43.9	48.0	41.0	11.2
<b>131</b>	47.00	55.00	50	12.30	41.2	49.0	39.0	8.9
<b>135</b>	45.70	54.00	44	12.80	38.0	48.0	42.0	9.2
<b>139</b>	44.95	53.90	46	11.30	41.7	49.0	37.0	7.1
<b>143</b>	44.10	55.00	41	10.90	37.3	47.2	35.0	7.1
<b>147</b>	43.95	53.95	36	10.20	36.1	49.0	33.2	6.1

UFC = Unidades formadoras de colonias; RI = Reactor inoculado; RIV = Reactor inoculado con vegetación;  
RV = Reactor con vegetación; RC = Reactor control (sin plantas ni inóculo)

**ANEXO 1G. DATOS EXPERIMENTALES DEL PORCENTAJE DE REMOCIÓN DE CROMO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE OPERACIÓN**

<i>% Remoción de Cr con concentración inicial (100%) de 21.0 mg L<sup>-1</sup></i>								
<i>Días de Operación</i>	<i>RI 4d</i>	<i>RIV 4d</i>	<i>RV 4d</i>	<i>RC 4d</i>	<i>RI 2d</i>	<i>RIV 2d</i>	<i>RV 2d</i>	<i>RC 2d</i>
<b>19</b>	52.30	50.50	45.00	49.8	50	48	42.1	30
<b>23</b>	41.77	60.00	55.20	42.20	40.20	48.60	43.60	28.00
<b>27</b>	39.63	57.34	59.00	60.31	41.30	49.20	44.30	34.00
<b>31</b>	40.10	58.10	58.00	60.26	42.30	49.70	46.20	31.00
<b>35</b>	41.20	59.60	56.00	52.20	39.60	50.20	41.20	27.00
<b>39</b>	42.30	60.20	55.60	49.20	46.00	51.20	46.50	26.10
<b>43</b>	43.60	60.10	55.10	46.30	45.30	52.30	47.30	25.20
<b>47</b>	44.50	58.90	53.50	42.30	41.10	51.90	49.60	30.30
<b>51</b>	45.20	58.30	52.50	39.60	43.20	50.20	52.30	23.20
<b>55</b>	45.05	57.90	50.60	36.50	44.10	49.60	48.60	24.20
<b>59</b>	43.20	56.90	47.60	32.20	42.10	48.70	45.30	21.30
<b>63</b>	41.90	55.60	39.10	31.20	40.90	50.40	46.70	19.30
<b>67</b>	40.50	55.20	42.60	30.20	41.60	47.60	42.30	20.60
<b>71</b>	41.60	54.10	42.90	28.50	43.20	49.80	45.20	21.20
<b>75</b>	40.90	52.50	42.10	27.50	42.30	49.50	41.20	18.60
<b>79</b>	41.8	50.5	41.9	27.6	40.9	48.8	37.6	17.2
<b>83</b>	41.3	47	41.6	29.2	43.6	46.8	42.63	15.3
<b>87</b>	41.6	48.8	39.6	29.4	45	47.6	40.3	14.6
<b>91</b>	40.5	49.1	38.9	25.6	42	48.6	42.6	12.3
<b>95</b>	40.9	47.9	39.1	24.2	41.3	47	41	10.9
<b>99</b>	41.5	48.5	38.7	23.1	40.8	47.8	42	8.12
<b>103</b>	41.2	47.2	35.2	21.2	44	46.9	29	8.3

<b>107</b>	41.1	46.5	35.2	17.2	46	45.6	34	9.21
<b>111</b>	40.6	48.1	33.9	15.9	47	44.5	32.4	9.35
<b>115</b>	42.3	48.2	32.7	15.2	45	42.6	31	8.57
<b>119</b>	43.2	48.6	33.6	13.9	43.9	43.5	35	8.2
<b>123</b>	42.9	49.2	33.2	13.4	40.8	42.9	37	7.9
<b>127</b>	40.9	47.3	34.6	11.9	42.9	42.6	31	6.5
<b>131</b>	41.5	47.6	30.9	10.1	38	39	29	6.8
<b>135</b>	43	48.6	27.5	9.55	36	43.6	24	7.1
<b>139</b>	43.2	48.7	29.1	8.95	34.5	43.8	26	6.8
<b>143</b>	42.1	48.1	27.8	10.5	36	44	21	6.6
<b>147</b>	40.2	46.3	25	9.2	37	42.5	22	6.2
<b>151</b>	41.35	47.1	24.5	9.1	35	43	21.2	5.9

UFC = Unidades formadoras de colonias; RI = Reactor inoculado; RIV = Reactor inoculado con vegetación; RV = Reactor con vegetación; RC = Reactor control (sin plantas ni inóculo)

**ANEXO. 1H. DATOS EXPERIMENTALES DEL PORCENTAJE DE REMOCIÓN DE PLOMO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE OPERACIÓN**

<i>% Remoción de Pb con concentración inicial (100%) de 28.0 mg L<sup>-1</sup></i>								
<i>Días de Operación</i>	<i>RI 2d</i>	<i>RIV 2d</i>	<i>RV 2d</i>	<i>RC 2d</i>	<i>RI 4 d</i>	<i>RIV 4d</i>	<i>RV 4d</i>	<i>RC 4d</i>
<b>15</b>								
<b>19</b>	40.2	46.0	51.5	21.2	29.3	51.6	45.8	32.3
<b>23</b>	42.9	47.0	39.0	23.0	30.1	52.3	46.0	32.1
<b>27</b>	44.6	51.0	35.2	22.3	34.5	57.3	46.8	32.7
<b>31</b>	46.8	54.0	39.6	24.2	35.2	54.3	39.3	32.1
<b>35</b>	41.6	53.0	35.7	25.2	33.2	56.4	38.5	32.5
<b>39</b>	45.9	44.8	33.4	23.2	38.5	54.2	37.0	31.9
<b>43</b>	43.2	41.3	31.6	21.2	39.8	53.7	35.8	30.2
<b>47</b>	48.1	58.0	28.9	22.6	32.4	61.2	37.0	29.2
<b>51</b>	51.9	56.6	23.2	20.6	34.6	57.5	30.4	29.3
<b>55</b>	52.6	52.4	25.4	19.6	41.4	57.3	32.3	28.4
<b>59</b>	51.9	58.5	28.2	20.9	45.8	54.7	36.3	27.3
<b>63</b>	53.8	61.0	31.2	21.0	39.7	53.1	34.5	26.4
<b>67</b>	54.8	64.1	30.6	19.2	40.5	51.3	33.2	25.9
<b>71</b>	52.2	60.2	29.2	19.1	41.6	54.1	32.5	25.9
<b>75</b>	55.8	63.1	36.5	18.2	46.7	52.5	39.6	25.3
<b>79</b>	51.2	62.8	41.2	17.0	41.8	50.5	38.6	23.8
<b>83</b>	57.4	61.1	38.1	16.0	41.3	53.2	38.2	28.3
<b>87</b>	53.8	61.2	33.3	14.7	45.6	54.5	34.4	28.3
<b>91</b>	51.0	63.5	30.8	15.2	40.5	58.9	34.7	25.6
<b>95</b>	49.1	69.8	32.6	14.0	40.9	58.2	35.4	23.2

<b>99</b>	47.6	70.0	33.9	13.6	46.5	58.4	36.3	23.1
<b>103</b>	53.2	66.6	34.5	13.5	35.6	58.7	37.4	22.1
<b>107</b>	55.7	69.3	28.2	13.7	38.1	60.1	32.9	17.3
<b>111</b>	48.2	67.6	30.8	13.1	37.8	61.1	34.2	16.1
<b>115</b>	49.1	62.5	31.3	11.9	45.3	60.7	35.7	15.1
<b>119</b>	50.2	63.2	29.2	11.0	42.1	61.2	33.1	13.5
<b>123</b>	45.6	63.9	30.0	10.5	42.8	61.0	36.3	13.1
<b>127</b>	42.3	65.0	28.1	10.0	41.0	61.2	33.6	10.8
<b>131</b>	41.2	62.4	25.0	8.0	39.2	60.4	29.3	8.3
<b>135</b>	40.8	61.0	24.6	7.1	42.1	59.9	29.8	8.1
<b>139</b>	48.7	65.0	25.6	6.1	45.1	61.2	30.1	7.3
<b>143</b>	46.5	67.3	23.5	5.4	41.9	61.7	29.3	6.7
<b>147</b>	45.5	65.2	21.7	5.1	39.5	61.7	29.0	5.5
<b>151</b>	48.0	66.3	22.3	4.8	41.4	61.2	29.9	5.2

UFC = Unidades formadoras de colonias; RI = Reactor inoculado; RIV = Reactor inoculado con vegetación;  
RV = Reactor con vegetación; RC = Reactor control (sin plantas ni inóculo)

## ANEXO 2

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

#### ANEXO 2A. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LA REMOCIÓN DE LOS TRES METALES CONSIDERANDO LOS DOS TRH UTILIZADOS

##### ANOVA: %Remoción Pb versus HA, TRH, Días operación

Factor	Type	Levels
HA	random	4
TRH	fixed	2
Días operación	fixed	34

Factor	Values
HA	RC, RI, RIV, RV
TRH	2, 4
Días operación	4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76, 80, 84, 88, 92, 96, 100, 104, 108, 112, 116, 120, 124, 128, 132, 136

##### Analysis of Variance for %Remoción Pb

Source	DF	SS	MS	F	P
HA	3	109813.8	36604.6	858.85	0.000*
TRH	1	112.3	112.3	0.08	0.801
Días operación	33	2214.3	67.1	0.51	0.986
HA*TRH	3	4462.0	1487.3	34.90	0.000*
HA*Días operación	99	13143.4	132.8	3.11	0.000*
TRH*Días operación	33	646.0	19.6	0.83	0.729
HA*TRH*Días operación	99	2344.8	23.7	0.56	1.000
Error	272	11592.8	42.6		
Total	543	144329.4			

S = 6.52845    R-Sq = 91.97%    R-Sq(adj) = 83.97%

Source	Variance component	Error term	Expected Mean Square for Each Term (using restricted model)
1 HA	268.838	8	(8) + 136 (1)
2 TRH		4	(8) + 68 (4) + 272 Q[2]
3 Días operación		5	(8) + 4 (5) + 16 Q[3]
4 HA*TRH	21.246	8	(8) + 68 (4)
5 HA*Días operación	22.535	8	(8) + 4 (5)
6 TRH*Días operación		7	(8) + 2 (7) + 8 Q[6]
7 HA*TRH*Días operación	-9.468	8	(8) + 2 (7)
8 Error	42.621	(8)	

##### Residual Plots for %Remoción Pb

##### ANOVA: % Remoción Cr versus HA, TRH, Días operación

Factor	Type	Levels
HA	random	4
TRH	fixed	2
Días operación	fixed	34

Factor	Values
HA	RC, RI, RIV, RV
TRH	2, 4
Días operación	4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76, 80, 84, 88, 92, 96, 100, 104, 108, 112, 116, 120, 124, 128, 132, 136

##### Analysis of Variance for % Remoción Cr

Source	DF	SS	MS	F	P
HA	3	57809.40	19269.80	751.18	0.000
TRH	1	3002.60	3002.60	3.57	0.155
Días operación	33	21333.43	646.47	5.66	0.000
HA*TRH	3	2520.98	840.33	32.76	0.000
HA*Días operación	99	11307.28	114.21	4.45	0.000
TRH*Días operación	33	1204.08	36.49	1.86	0.010
HA*TRH*Días operación	99	1945.34	19.65	0.77	0.939
Error	272	6977.50	25.65		

Total 543 106100.60

S = 5.06484 R-Sq = 93.42% R-Sq(adj) = 86.87%

Source	Variance component	Error term	Expected Mean Square for Each Term (using restricted model)
1 HA	141.501	8	(8) + 136 (1)
2 TRH		4	(8) + 68 (4) + 272 Q[2]
3 Días operación		5	(8) + 4 (5) + 16 Q[3]
4 HA*TRH	11.980	8	(8) + 68 (4)
5 HA*Días operación	22.141	8	(8) + 4 (5)
6 TRH*Días operación		7	(8) + 2 (7) + 8 Q[6]
7 HA*TRH*Días operación	-3.001	8	(8) + 2 (7)
8 Error	25.653	(8)	

**Residual Plots for % Remoción Cr**

**ANOVA: %Remoción Hg versus HA, TRH, Días operación**

Factor	Type	Levels
HA	random	4
TRH	fixed	2
Días operación	fixed	34

Factor	Values
HA	RC, RI, RIV, RV
TRH	2, 4
Días operación	4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76, 80, 84, 88, 92, 96, 100, 104, 108, 112, 116, 120, 124, 128, 132, 136

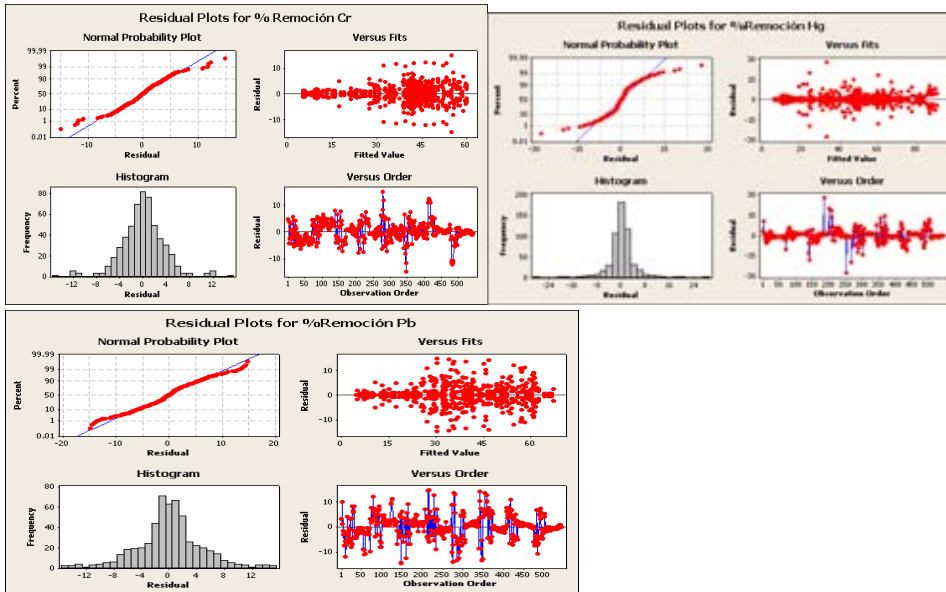
**Analysis of Variance for %Remoción Hg**

Source	DF	SS	MS	F	P
HA	3	87681.1	29227.0	827.56	0.000
TRH	1	15776.7	15776.7	7.68	0.065
Días operación	33	67459.0	2044.2	10.19	0.000
HA*TRH	3	6163.8	2054.6	58.18	0.000
HA*Días operación	99	19860.0	200.6	5.68	0.000
TRH*Días operación	33	16008.8	485.1	3.77	0.000
HA*TRH*Días operación	99	12724.3	128.5	3.64	0.000
Error	272	9606.3	35.3		
Total	543	235280.0			

S = 5.94283 R-Sq = 95.92% R-Sq(adj) = 91.85%

Source	Variance component	Error term	Expected Mean Square for Each Term (using restricted model)
1 HA	214.64	8	(8) + 136 (1)
2 TRH		4	(8) + 68 (4) + 272 Q[2]
3 Días operación		5	(8) + 4 (5) + 16 Q[3]
4 HA*TRH	29.70	8	(8) + 68 (4)
5 HA*Días operación	41.32	8	(8) + 4 (5)
6 TRH*Días operación		7	(8) + 2 (7) + 8 Q[6]
7 HA*TRH*Días operación	46.61	8	(8) + 2 (7)
8 Error	35.32	(8)	

**Residual Plots for %Remoción Hg**



**ANEXO 2B. HOJA DE CÁLCULO UTILIZADA EN EL SOFTWARE ESTADÍSTICO MINITAB 15 PARA LAS COMPARACIONES DEL BALANCE DE MASA (EJEMPLO DEL CASO DEL PLOMO)**

Minitab - Untitled - [Mass balance lead.MTW \*\*\*]

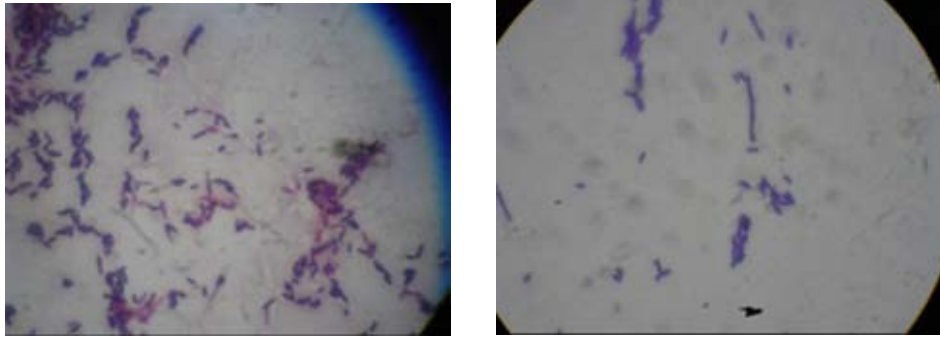
File Edit Data Calc Stat Graph Editor Tools Window Help Assistant

	C1-T	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9-T	C10
	CW	Pb in effluent	dissolved effluent	suspended effluent	Pb in support media	Pb in vegetation	Pb in rizhosphere	Pb in aerial section	System	
1	CWP_I	1.3424	0.7889	0.5535	1.0443	1.2522	0.5922	0.6600	CWP_I	
2	CWP_I	1.4970	0.9250	0.5720	1.1100	1.3200	0.6350	0.6850	CWP_I	
3	CWP_I	1.2500	0.7720	0.4780	0.9800	1.0100	0.6300	0.3800	CWP_I	
4	CWP	2.0274	1.8640	0.1674	0.5629	1.1484	0.5458	0.6026	CWP	
5	CWP	2.3100	2.1280	0.1820	0.6400	1.2800	0.5160	0.6500	CWP	
6	CWP	1.9010	1.7420	0.1590	0.4621	1.0500	0.6300	0.5340	CWP	
7	CWC	2.6800	2.6329	0.0488	1.1716					
8	CWC	2.9300	2.8748	0.0552	1.2710					
9	CWC	2.4750	2.4360	0.0390	1.1000					
10										
11										
12										
13										
14										
15										
16										
17										
18										
19										
20										
21										
22										
23										
24										
25										

Current Worksheet: Mass balance lead.MTW

**ANEXO 3**  
**ACERVO FOTOGRÁFICO**

**ANEXO 3A. OBSERVACIÓN EN MICROSCOPIO (100X) DEL CONSORCIO BACTERIANO SIN METALES (IZQUIERDA) Y CON METALES (DERECHA)**

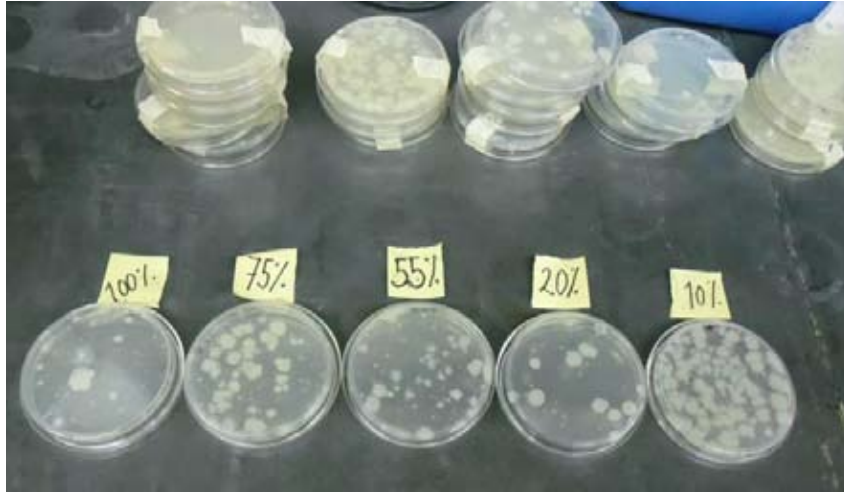


**ANEXO 3B. PRUEBA DE TOXICIDAD BACTERIANA HACIA LA MEZCLA DE METALES PESADOS. CALDOS DE CULTIVO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE METALES PESADOS PREVIO A SU INOCULACIÓN *IN VITRO***





**ANEXO 3C. CONTEO DE LAS UFC POSTERIOR A LA INCUBACIÓN DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD BACTERIANA**



**ANEXO 3D. VEGETACIÓN CULTIVADA EN HIDROPONIA PARA SU "SEMBRADO" EN LOS HUMEDALES ARTIFICIALES**



**ANEXO 3E. MUESTRA DE PRUEBAS DE GERMINACIÓN (ENSAYO DE FITOTOXICIDAD)**



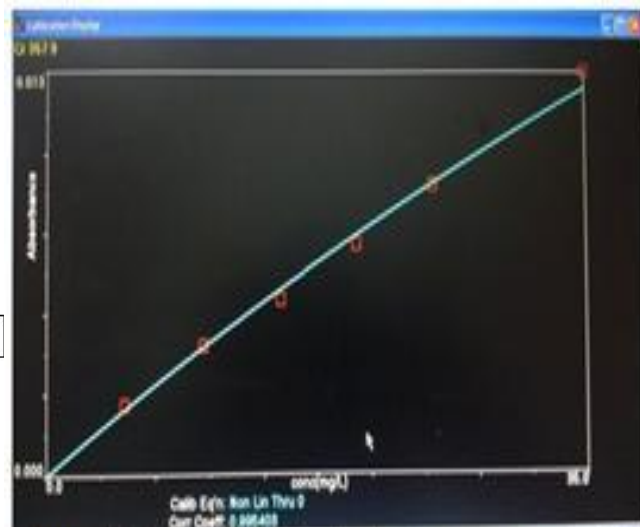
**ANEXO 3F. ISOTERMAS DE ADSORCIÓN CON EL MEDIO DE EMPAQUE (TEZONTLE) UTILIZADO EN LOS HUMEDALES ARTIFICIALES**



**ANEXO 3G. INOCULACIÓN (IZQUIERDA) Y OPERACIÓN DE LOS HUMEDALES ARTIFICIALES (DERECHA)**



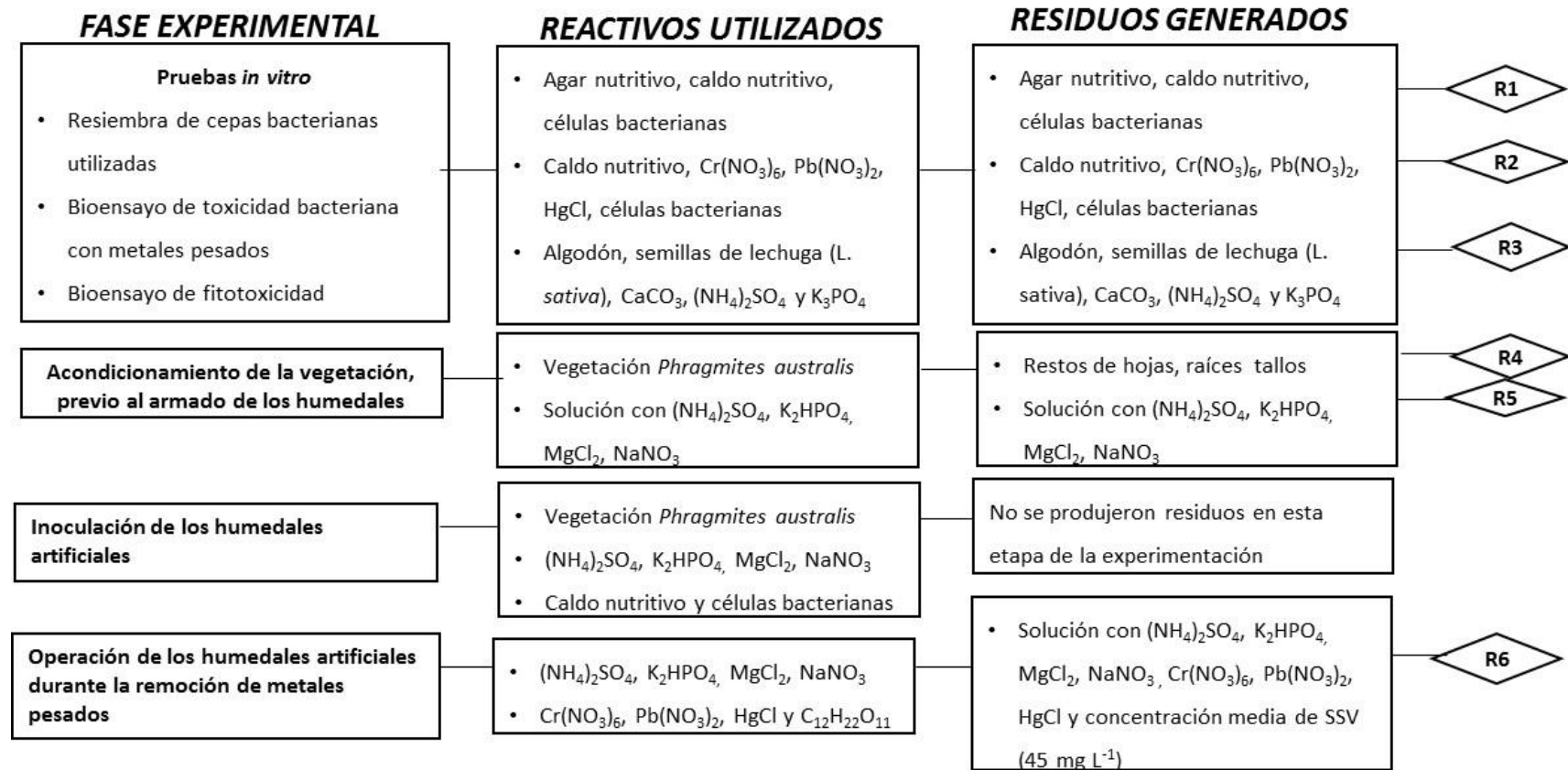
**ANEXO 3H. PRUEBAS DE REQUERIMIENTO DE OXÍGENO DEL CONSORCIO BACTERIANO (IZQUIERDA) Y CURVA DE CALIBRACIÓN DE CROMO GENERADA POR EL ESPECTRO DE ABSORCIÓN ATÓMICA**

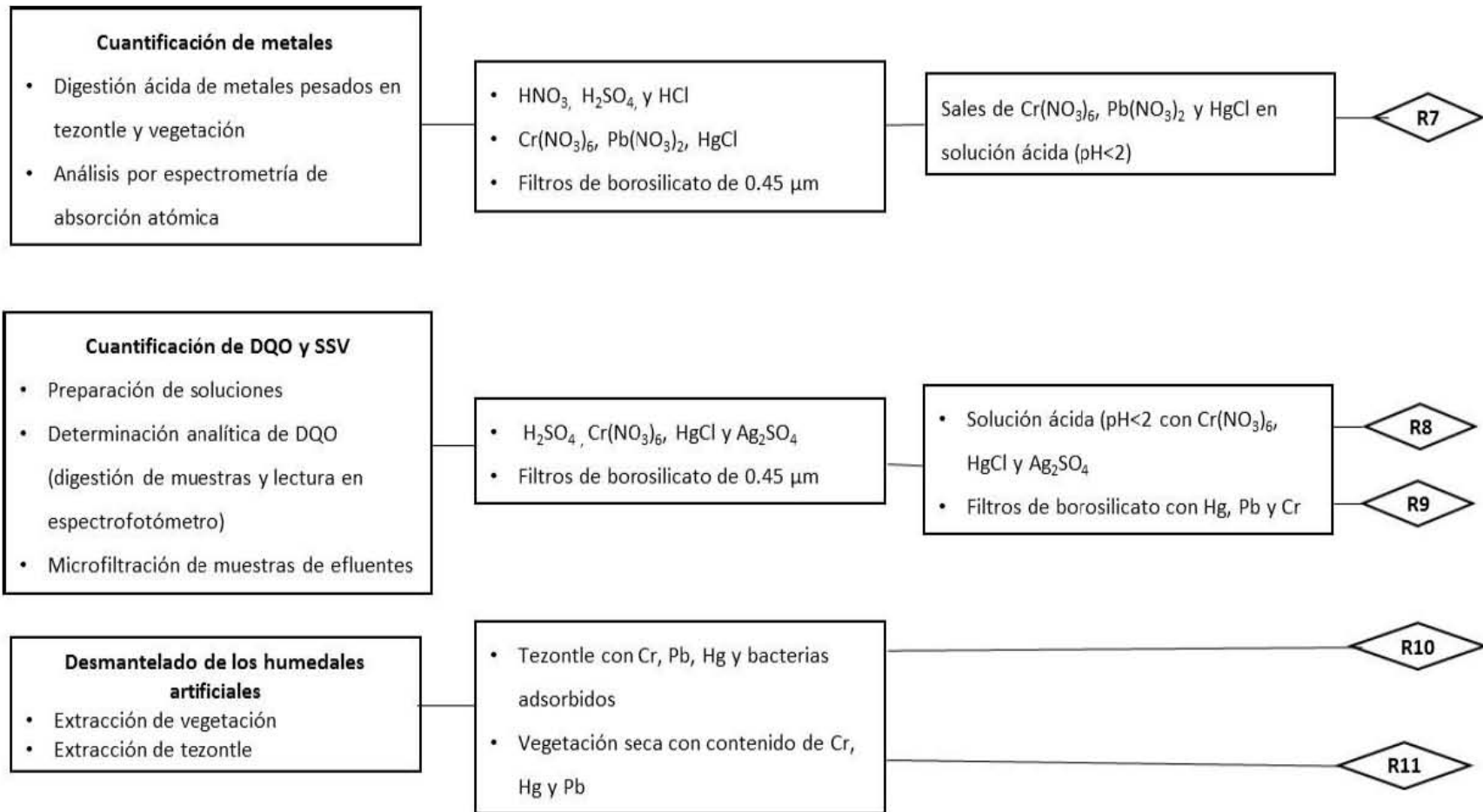


## ANEXO 4

### DISPOSICIÓN CONTROLADA DE LOS RESIDUOS PRODUCIDOS EN ESTA INVESTIGACIÓN

#### DIAGRAMA DE FLUJO DE LA GENERACIÓN DE RESIDUOS





## MANEJO Y DISPOSICIÓN FINAL DE RESIDUOS

**R1.** Todo el material y las soluciones fueron esterilizados a 115 °C durante 30 min para su posterior disposición como residuos orgánicos.

**R2.** Debido a la combinación de material orgánico con metales pesados, la solución fue almacenada y etiquetada bajo los lineamientos de la Unidad de Gestión Ambiental de la Facultad de Química de la UNAM, para que dicha dependencia los recolectara en un plazo no mayor a tres meses.

**R3.** Las semillas se separaron del algodón para que las primeras fueran dispuestas como residuos sólidos orgánicos y el segundo como residuo sólido inorgánico.

**R4 y R5.** Todos los restos de vegetación fueron dispuestos como residuos sólidos orgánicos y la solución nutritiva fue vertida en los maceteros y árboles del Conjunto E de la Facultad de Química.

**R6, R7 y R8.** La solución fue almacenada y etiquetada bajo los lineamientos de la Unidad de Gestión Ambiental de la Facultad de Química de la UNAM, para que dicha dependencia los recolectara en un plazo no mayor a tres meses.

**R9 y R10.** Los filtros fueron deshumidificados para liberarlos del exceso de humedad y posteriormente almacenarlos en bolsas naranjas (color asignado a residuos peligrosos) etiquetadas bajo los lineamientos de la Unidad de Gestión Ambiental de la Facultad de Química de la UNAM, para que dicha dependencia los recolectara en un plazo no mayor a tres meses.

**R11.** La vegetación fue incinerada para que sólo se obtuviera como producto final las cenizas con Cr, Hg y Pb, las cuales fueron dispuestas en bolsas naranjas (color asignado a residuos peligrosos) etiquetadas bajo los lineamientos de la Unidad de Gestión Ambiental de la Facultad de Química de la UNAM, para que dicha dependencia los recolectara en un plazo no mayor a tres meses.

## BIBLIOGRAFÍA

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. ***Bioresource Technology* 101**(19): 7271-7277.

Akratos C.S., Papaspyros J.N.E. y Tsihrintzis V.A., 2008. An artificial network model and design equation for BOD and COD removal prediction in horizontal subsurface flow constructed wetlands. ***Chemical Engineering Journal* 143**(1-3): 96-110.

Álvarez M.T., Crespo C. y Mattiasson B., 2007. Precipitation of Zn(II), Cu(II) and Pb (II) at bench scale using biogenic hydrogen sulfide from the utilization of volatile fatty acids. ***Chemosphere* 66**(9): 1667-1683.

Alyüz B. y Veli S., 2009. Kinetics and equilibrium studies for the removal of nickel and zinc from aqueous solutions by ion Exchange resins. ***Journal of Hazardous Materials* 167**(13), 482-488.

Amuda O.S., Giwa A.A. y Bello I.A., 2007. Removal of heavy metal from industrial wastewater using modified activated coconut Shell carbon. ***Biochemical Engineering Journal* 36**(2): 174-181.

Aquiahuatl M.A. y Pérez M.L., 2004. ***Manual de prácticas del laboratorio de microbiología general***. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F. ISBN: 970310141-0.

Ascuntar D., Vélez A.F., Peña M. y Madera C.A., 2006. Influencia del crecimiento biológico en la hidrodinámica y en la remoción de materia orgánica en un humedal de flujo superficial sin vegetación (HAFSSV), para el tratamiento de aguas residuales domésticas en regiones tropicales. ***Conferencia Latinoamericana de Saneamiento-LATINOSAN 2007. Seminario Manejo Integral de Aguas Residuales Domésticas. Universidad del Valle Instituto Cinara, Cali Colombia. 17 Pp.***

Babel S. y Kurniawan T.A., 2004. Cr (VI) removal from synthetic wastewater using coconut Shell charcoal and commercial activated carbon modified with oxidizing agents and/or chitosan. ***Chemosphere* 54**(7): 951-967.

Barakat M.A., 2011. New trends in removing heavy metals from industrial wastewater. ***Arabian Journal of Chemistry* 4**(4): 361-367.

Barrera C.A., 2003. Remoción de Cromo Hexavalente Presente en Aguas Residuales Industriales por Métodos Electroquímicos. ***Tesis de Doctorado en Ciencias e Ingeniería. Universidad Autónoma Metropolitana. México D.F. 15 Pp.***

Bonanno G., 2011. Trace element accumulation and distribution en the organs of *Phragmites australis* (common reed) and biomonitoring applications. ***Ecotoxicology and Environment Safety* 74**(4): 1057-1064.

Brix H. y Arias C.A., 2005. The use of vertical flow constructed wetlands for one-site treatment of domestic wastewater: New Danish Guidelines. ***Ecological Engineering* 25**(5): 491-500.

Brown P.A., Gill S.A. y Allen S.J., 2000. Metal removal from wastewater using peat. **Water Research** **34**(16): 3907-3916.

Buddhawong S., Kuschk P., Mattush J., Wiessner A. y Stottmeister U., 2005. Removal of arsenic and zinc using different laboratory model wetland system. **Engineering Life Science** **5**(3): 247-252.

Cabrera L., 2002. Diccionario de aztequismos. Puesto en orden y revisado por J. I. Dávila-Garibi. L. Reyes-García revisó los términos nahuas y E. Inciarte los que aparecen en latín. Ed. Colofón, S.A. México D.F. México.

Calheiros C.S.C, Rangel A.O.S.S., Castro P.M.L., 2007. Constructed wetlands systems vegetated with different plants applied to the treatment of tannery industries. **Water Research** **41** (8): 1790-1798.

Cañizares Villanueva R., 2000. Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. **Revista Latinoamericana de Microbiología** **42**: 131-143.

Carballo M.E., Martínez A., Salgado I. y Cruz M., 2009. Mejoramiento de la biosorción de Zn y Cd en microorganismos mediante la caracterización de parámetros asociados al proceso. **Memorias del seminario Internacional de Expertos en Tratamiento de Efluentes Industriales y Residuos**.

CEPIS, 2001. **Manual de evaluación y manejo de sustancias tóxicas en aguas superficiales**. Washington, D.C: 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, 24 pp.

Charemtanyarak L., 1999. Heavy metals removal by chemical coagulation and precipitation. **Water Science & Technology**. **39**: 135-138.

Cheng S., Grosse W., Karrenbrock F. y Thoennessen M., 2002. Efficiency of constructed wetlands in descontamination of water polluted by heavy metals” **Ecological Engineering** **18**(3): 317-325.

Chong H.L.H., Ahmad M.N. y Lim P.E., 2009. Growth of *Typha angustifolia* and mediabiofilm formation in constructed wetlands with different media. **Borneo Science** **25**(1): 317-325.

Clemens S., Palmgren G. y Krämer U., 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. **Plant Science** **7**(1): 309-315.

Clemens S., 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposures and mechanisms of tolerance in plants. **Biochimie** **88**: 1707-1719.

Congeevaram S., Dhanaran S., Park J., Dexilin M. y Kaliannan T, 2007. Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates. **Journal of Hazardous Materials** **146** (1-2): 270-277.

Cui L., Ouyang Y., Lou Q., Yang F., Chen Y., Zhu W. y Luo S., 2010. Removal of nutrient from wastewater with *Canna indica* L. under different vertical-flow constructed wetland condition. **Ecological Engineering** **36**(8): 1083-1088.



Crites R. y Tchobanoglous G., 2000. **Tratamiento de Aguas Residuales en Pequeñas Poblaciones**. McGraw-Hill. Bogotá, Colombia. 7 Pp.

Cunningham S.D. y Ow D.W., 1996. Promises and Prospects of Phytoremediation. **Plant Physiology** **110**(3): 715-719.

DeLaune R.D. y Pezeshki S.R., 2001. Plant functions in wetland and aquatic system: influence of intensity and capacity of soil reduction. **The Scientific World Journal** **2**(1): 36-49.

Demirezen D. Aksoy A., 2004. Accumulation of heavy metals in *Typha angustifolia* (L.) and *Potamogeton pectinatus* (L.) Living in Sultan Marsh (Kayseri Turkey). **Chemosphere** **56**(7): 685-696.

Deng H., Ye Z.H. y Wong M.H. 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.

Dhir B. 2010. Use of aquatic plants in removing heavy metals from wastewater. **International Journal of Environment Engineering** **2**(1-3): 185-201.

Domingos S, Dallas S, Germain M y Ho G. 2009. Heavy metals in a constructed wetland treating industrial wastewater: distribution in the sediment and rhizome tissue. **Water Science and Technology** **60**(6): 1425-1432.

De Souza MP, Huang CPA, Che N, Terry N. 1999. Rhizosphere bacteria enhance the accumulation of selenium and mercury in wetland plants. **Planta** **209** (2): 259-263.

**Diccionario Prehispánico de Dudas, 2005**. Real Academia Española, Asociación de Academias de la Lengua Española y Santillana, Madrid España. Ediciones Generales, 8333 pp.

Dickson T. R., 2006. **Química, un Enfoque Ecológico**. Limusa Wiley. México, D.F. 15 Pp.

DOF, 2000. Norma Mexicana NMX-AA-008-SCFI-2000. **Análisis de Agua-Determinación del pH-Método de Prueba**. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.

Di Salvatore M., Carafar A.M. y Carratú, G. Assessment of heavy metal phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: A comparison of two growth substrates. **Chemosphere** **73**, (9): 1461-1464.

Doula M.K., 2009. Simultaneous removal of Cu, Mn and Zn from drinking water with the use of clinoptilolite and its Fe-modified form. **Water Research** **43** (15): 3659-3672.

Eapen S., D'Souza S.F. 2005. Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals. **Biotechnology Advances** **23**(2): 97-114.

EPA, 1996. **Acid Digestion of waters for total recoverable or dissolved metals for analysis by FLAA or ICP spectroscopy**. Environmental Protection Agency. Cincinnati, Ohio, EE.UU.

EPA, 2000. **Manual of constructed wetlands treatment of municipal wastewaters**. Environmental Protection Agency. Cincinnati, Ohio, EE.UU. 19 Pp.

Fu F. y Wang Q., 2011. Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. **Journal of Environmental Management** **92** (3): 407-418.

García M., Soto F., González J.M. y Bécares E., 2008. A comparison of bacterial removal efficiencies in constructed wetlands and algae-based systems. **Ecological Engineering** **32**(3): 238-243.

García T., 2005. **Diseño, construcción y evaluación preliminar de un humedal de flujo subsuperficial**. Tesis doctoral. Universidad de los Andes Bogotá. Colombia. 11 Pp.

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 Ciencias Forestales y de Ambiente** **17**: 19-29.

Gavrilescu M., 2004. Removal of Heavy metals from the environment by biosorption. **Engineering in Life Science** **4**(3): 219-232.

Giraldi D., Vitturi M.M., Zaramella M., Marion A. e Iannelli R., 2009. Hydrodynamics of vertical subsurface flow constructed wetlands: Tracer test with rhodamine WT and numerical modeling. **Ecological Engineering** **35**(2): 265-273.

Guerinot M.L., 2000 *The ZIP family of metal transporters*. **Biochemical et Biophysical Acta (BBA)- Biomembranes** **1465**(1-2): 190-198.

Guido-Zárate A., Soto-Esquivel M.G., Guzmán-Aguirre S., Huanosta T., Rodríguez-Monroy J., Bernal-González M., García-Gómez R.S., Mejía-Chávez A.G., Padrón-López R.M., Mijaylova-Nacheva P., Buitrón-Méndez G. y Durán-de-Bazúa C., 2008. Some behavioral aspects of laboratory and bench scale artificial wetlands model system in Mexico. **Tecnología y Ciencia Ed. (IMIQC)** **23**(1): 15-22.

Hadad H.R., Maine M.A. y Bonetto C.A., 2006. Macrophyte growth in a pilot-scale constructed wetland for industrial wastewater treatment. **Chemosphere** **63** (10): 1744–1753.

Han F.X., Su Y., Monts D.L., Waggoner C.A. y Plodinec M.J., 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.

Healy M.G., Rodgers M. y Mulqueen J., 2007. Treatment of dairy wastewater using constructed wetlands intermittent sand filters. **Bioresource Technology** **98**(12): 2268-2281.

Huang J.W. y Cunningham S.D., 1996. Lead phytoextraction: species variation, lead uptake and translocation. **New Phytologist** **134**(1): 75-84.

Huissman J.L., Schouten G. y Schultz C., 2006. Biologically produced sulphide for purification of process stream, effluent treatment and recovery of metals in the metal and mining industry. **Hydrometallurgy** **83**(1-4): 106-113.

ISO 11466, 1995. **International Organization for Standardization 11466 Soil quality. Extraction of trace elements soluble in aqua regia**.

IWA, 2000. **Constructed wetlands for pollution control: Processes, performance, design and operation**. IWA publishing in scientific and technical report series. London, Inglaterra. 30 Pp.

Jayaweera M.W., Kasturiarachchi J.C., Kularatne R.K.A. y Wijeyekoon S.L.J., 2008. Contribution of water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) grown under different nutrient conditions to Fe-removal mechanisms in constructed wetlands. **Journal of Environmental Management** **87**(3):450–460.

Jin R.C., Yang G.F., Yu J.J. y Zheng P., 2012. The inhibition of the Anammox process: A review. **Chemical Engineering Journal** **197**: 67-79.

Jones B. y Nachtsheim C.J., 2009. Split-Plot designs: What, Why, and How. **Journal of Quality Technology** **41**(4): 340-361.

Jusoh A., Shiung L.S., Ali N. y Noor M.J., 2007. A simulation study of the removal efficiency of granular activated carbon on cadmium and lead. **Desalination** **206**(1-3): 9-16.

Kabatas-Pendias A. y Pendias H., 2011. Trace elements in soils and plants. Tercera edición. Florida, E.E.U.U., CRC Press, 396 PP.

Kadleck R.H. y Knight R.L., 1993. **Hidrological design of free water surface treatment wetlands for water quality improvement**. Lewis Publishers, Chelsea, MI, Pp. 77-86.

Kadlec R.H. y Wallace S., 2009. **Treatment Wetlands**. Segunda edición. ISBN-13:978-1566705264. 15 Pp.

Kang K.C., Kim S.S., Chi J.W. y Kwon S.H., 2008. Sorption of Cu<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> on to acid- and base-pretreated granular activated carbon and activated carbon fiber samples. **Journal. Industrial Engineering Chemical** **14**(1): 131-135.

Kantawanichkul S., Kladprasert S. y Brix H., 2009. Treatment of high-strength wastewater in tropical vertical flow constructed wetlands planted with *Typha angustifolia* and *Cyperus involucreatus*. **Ecological Engineering** **35**(2): 238-247.

Karvelas M., Katsoyiannis A. y Samara C., 2003. Occurrence and fate of heavy metals in the wastewater treatment process. **Chemosphere. Vol. 53**(10): 201-1210.

Khan S., Ahmad I., Shah M.T., Rehman S. y Khaliq A., 2009. Use of constructed wetland for the removal of heavy metals from industrial wastewater. **Journal of Environmental Management** **90**(11): 3451-3457.

King J.K., Harmon M.S., Fu T.T., Gladden J.B., 2002. Mercury removal, methylmercury formation and sulfate-reducing bacteria profiles in wetlands mesocosms. **Chemosphere** **46**(6): 859-870.

Kivaisi A.K., 2001. The potential for constructed wetlands for waste water treatment and reuse in developing countries: a review. **Ecological Engineering** **16**(4): 545–560.

Kosolapov D.B., Kusch P., Vainshtein M.B., Vatsourina A.V., Wießner A., Kästner M., Muller R.A., 2004. Microbial processes of heavy metals removal from carbon-deficient effluents in constructed wetlands. **Engineering in Life and Sciences** 4(5): 403-411.

Langergraber C., Prandtstetten C., Pressi A., 2007. Removal efficiency of subsuperficial vertical flow constructed wetlands for different organic loads. **Water Science & Technology** 56(3): 75-84

Lavado C., Sun M.R. y Bendezu S., 2010. Adsorción de plomo de efluentes industriales usando carbones activados con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. **Revista de la Sociedad Química del Perú** 76(2): 1810-1836.

LeDuc D.L. y Terry N., 2005. Phytoremediation of toxic trace elements in soil and water. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 32: 514-520.

Leung W.C., Wong M.F., Chua H., Lo W., Yu P.H. y Leung C.K., 2000. Removal and recovery of heavy metals by bacteria isolated from activated sludge treating industrial effluents and municipal wastewaters. **Water Science and Technology** 4(12): 233-240.

Lightbody A.F., Nepf H.M. y Bays J.S., 2009. Modelling hydraulic effect transverse deep zones short circuit in constructed wetlands. **Ecological Engineering** 35(5): 754-768.

Liu J., Dong Y., Xu H., Wang D. y Xu J., 2007. Accumulation of Cd, Pb y Zn by 19 wetland plant species in constructed wetland. **Journal of Hazardous Materials** 147(3): 947-953.

Loredo J., Álvarez R. y Ordóñez A., 2003. Release of toxic metals and metalloids from Los Ruedos mercury mine (Asturias, Spain). **Science Total Environmental** 340(1-3):247-260.

Lüderitz V., 2001. Towards sustainable water resources management: A case study from Saxony-Anhalt, Germany. **Management of Environmental Quality: An International Journal** 15(1): 17-24.

Manahan S.E., 2007. **Introducción a la Química Ambiental**. Reverté ediciones, S.A. de C.V. México, D.F. 15 pp.

Marchand L., Mench M., Jacob D.L. y Otte M.L., 2010. Metal and metalloid removal in constructed wetlands, with emphasis on the importance of plants and standardized measurements: A review. **Environmental Pollution** 158(12): 3447–3461.

Masi F. y Martinuzzi N., 2007. Constructed wetlands for the mediterranean countries: hybrid systems for wáter reuse and sustainable sanitation. **Desalination** 215(1): 44-55.

Mason R.P. y Sullivan K.A., 1998. Mercury and methylmercury transport through an urban watershed. **Water Research** 32: 321-330.

Masters G. y Ela W., 2008. **Introduction to Environmental Engineering**. 3ª Edition. Prentice Hall. U.S.A. Pp. 47-49.

Matagi S.V., Swai D. y Mugabe R., 1998. A review of heavy metal removal mechanism in wetlands. **African Journal of Tropical Hydrobiology and Fisheries** 8 (1): 13-25.

Milliken K.L., Rudnicki M. y Awwiller D.N., 2013. Organic matter-hosted pore system, Marcellus formation (Devonian), Pennsylvania. *AAPG bulletin* **97**(2): 177-200.

MINITAB, 2007. *Minitab® Inc. 15.1.20.0. Quality, analysis and results*. Pennsylvania, EE.UU.

Montgomery D., 2012. *Diseño y análisis de experimentos*. 2a Edición. Limusa Wiley. Limusa. México D.F. Pp. 145-555.

Morling S., Nitrogen removal and heavy metals in leachate treatment using SBR technology. *Journal of Hazardous Materials* **174**(1-3):679-686

Motsi T, Rowson N.A. y Simmons M.J.H., 2009. Adsorption of heavy metals from acid mine drainage by natural zeolite. *International Journal of Mineral Processing* **92**(1-2): 42-48.

NAGAJYOTI, P.C., LEE, K.D. y SREEKANTH, T.V.M. *Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: A review*. Environmental Chemical Letters. Vol. 8, 2010, pp. 199-216.

NMX-XX-008-SCFI-2000. *Análisis de agua-Determinación del pH-Método de prueba*. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.

NMX-AA-030-SCFI-2001. *Análisis de agua-Determinación de la demanda química de oxígeno en aguas naturales, residuales y residuales tratadas-Método de prueba*. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.

NMX-AA-034-SCFI-2001. *Análisis de agua-Determinación de sólidos y sales disueltas en aguas naturales, residuales y residuales tratadas-Método de prueba*. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.

Nies D.H., 2003. Efflux-mediated heavy metals resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiological Revision* **27**(2-3): 313-339.

DOF, 2002. Norma Oficial Mexicana. *NOM-004-SEMARNAT-2002 Lodos y biosólidos. Especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final*. México Distrito Federal: Diario Oficial de la Federación, Poder Ejecutivo Federal, Estados Unidos Mexicanos. 1996.

Obarska-Pempkowiak H. y Limkowska K., 1999. Distribution of nutrients and heavy metals in a constructed wetland system. *Chemosphere* **39**(2): 303-312.

Odukuma L.O. y Emedolu S.N., 2005. Bacterial sorbents of heavy metals associated with two Nigerian crude oils. *Global Journal of Pure and Applied Sciences* **11**(3): 343-351.

Olivares E. y Peña E., 2009. Bioconcentración de elementos minerales en *Amaranthus dubius* (bledo, pira) creciendo silvestre en cultivos del estado Miranda, Venezuela y utilizado en alimentación. *Interciencia* **34**(9): 604-611.

Orduña-Bustamante M.A., Vaca-Mier M., Escalante-Estrada J.A. y Durán-Domínguez C., 2011. Nitrogen and potassium variation on contaminant removal for a vertical subsurface flow lab scale constructed wetland. *Bioresource Technology* **102**(17): 7745-7754.

Orellana Jaramillo D.A., 2009. Precipitación de Metales Pesados provenientes de un efluente de una planta de beneficio, del Río Guanache y Río Siete del distrito minero mediante bacterias sulfato reductoras. *Tesis Doctoral de la Universidad de Loja, Ecuador*.

Özverdi A. y Erdem M., 2006.  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  adsorption from aqueous solution by pyrite and synthetic iron sulphide. *Journal of Hazardous Materials* **137**(1): 626-632.

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. *Geochimical Brasiliensis* **18**(1): 28-37.

Patra M. y Sharma A., 2000. Mercury toxicity in plants. *The Botanical Review* **66**(3): 379-422.

Peruzzi E., Macci C., Doni S., Maciandaro G., Peruzzi P., Aiello M. y Ceccanti B., 2009. Phragmites australis for sludge stabilization. *Desalination* **246**(3): 110-119.

Platzer C. y Mauch K., 1997. Soil Clogging in vertical-flow reed beds-mechanisms, parameters, consequences and... solutions? *Water Science & Technology* **35**(5): 75-181.

Polprasert, C., 1996. *Organic waste recycling. Technology and management*. Ed. Wiley & Sons. Chichester, Inglaterra. 412 Pp.

Prochaska C.A., Zouboulis A.I., 2009. Treatment performance variation at different depths within vertical subsurface-flow experimental wetlands fed with simulated domestic sewage. *Desalination* **237** (1-3): 367-377.

Puigagut A., Caselles-Osorio N., Vaello y García J., 2006. Fractionation biodegradability and particle-size distribution of organic matter in horizontal subsurface-flow constructed wetland. *Water Research* **41**(6): 1388-1398.

Ramírez-Carrillo H.F., Luna-Pabello V.M. y Arredondo-Figueroa J.L., 2009. Evaluación de un humedal artificial de flujo vertical intermitente, para obtener agua de buena calidad para la acuicultura. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* **8**(1): 93-99.

Rathnayake I.V.N., Megharaj M., Bolan N. y Naidu R., 2010. Tolerance of Heavy Metals by Gram Positive Soil Bacteria. *International Journal of Civil and Environmental Engineering* **2**(4): 191-195.

Raskin I., Smith R.D. Salt D.E., 1997. Phytoremediation of metals using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology* **8**(2): 221-226.

Reed S.C., Miledlebrooks J. y Crites R.W., 1995. *Natural system for waste management and treatment*. Primera edición. Mc Graw Hill, Nueva York, EE.UU. 220 p.

Reeves R.D. y Baker A.J.M., 2000. Metal-accumulating plants. In Raskin I., Enseley B.D., eds. ***Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean-up the Environment***. Nueva York, E.E.U.U. John Wiley and Sons. p. 193-230.

Robinson B., Shullin R., Nowack B., Roulier S., Menon M., Clothier B., Green S. y Mills T., 2006 . Phytoremediation for the management of metal flux in contaminated sites. ***Forest Snow Landscape Research*** **80(2)**:221-234.

Ruiz-López V. 2009. ***Remoción de cadmio y zinc de aguas residuales de una industria minera mediante reactores biológicos que simulan un humedal artificial***. Tesis de Maestría en Ingeniería Ambiental. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. México.

Salas J.J., 2010. Experiencia práctica: Planta experimental de Carrión de los Céspedes (Sevilla). ***Congreso sobre Nuevas Tendencias y Retos Tecnológicos en la Depuración de aguas residuales. Junta de Castilla y León***.

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. ***Tecnología y Ciencias del Agua*** **3(3)**: 83-95.

Sheoran A.S. y Sheoran V., 2006. Heavy metal removal mechanism of acid mine drainage in wetlands: A critical review. ***Minerals Engineering*** **19(2)**: 105-116.

Schlüter K., 2000. *Review: evaporation of mercury from soils*. An integration and synthesis of current knowledge. ***Environmental Geology*** **39** (3-4): 249-271.

Silver S. y Phung L.T., 2005. A bacterial view of the periodic table: gene and proteins for toxic inorganic ions. ***Journal of Industrial Microbiology Technology*** **32(11-12)**: 587-605.

Stottmeister U., Wießner A., Kusch P., Kappelmeyer U., Kästner y Bederski O., 2003. Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. ***Biotechnology Advances*** **22(1-2)**: 93-117.

Teitzeln G.M. y Parsek M.R. (2003). Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. ***Applied Environmental Microbiology*** **69(4)**: 2313-2320.

Tietz A., Kirschner A., Langergraber G., Sleytr K. y Haberl R., 2007. Characterisation of microbial biocoenosis in vertical subsurface flow constructed wetlands. *Science of the Total Environment* **380(1)**: 163-172.

Tilley E., Ulrich L., Luethi C., Reymond P. y Zurbruegg C., 2009. ***Compendium of sanitation systems and technologies***. 2a Edición. Dubendorf Suiza. Instituto Federal Suizo de Ciencia y Tecnología Acuática. 176 pp.

Vacca G., Wand H., Nikolausz M., Kusch P. y Kästner M., 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. y 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. y Giovannetti L., 2003. Characterization of Cr(VI)-resistant bacteria isolated for chromium-contaminated soil by tannery activity. *Current Microbiology* **46**: 1-5.

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. *Applied Environmental Microbiology* **65**(12): 5279-5284.

Vymazal J. y Kröpfelová L., 2009. Removal of organics in constructed wetlands with horizontal subsurface flow. A review of the field experience. *The Science of the Total Environment* **407**(13): 3911-3922.

Walker D.J., Hurl S., 2002. The reduction of heavy metals in a stormwater wetland. *Ecological Engineering* **18**(4): 407-414.

Walter I., Martínez F. y Cala V., 2006. Heavy metal speciation and phytotoxicity effects of three representative sewage sludge for agricultural uses. *Environmental Pollution* **139**(3): 507-514.

Webster R. y Payne R.W., 2002. Analysing repeated measurements in soil monitoring and experimentation. *European Journal of Soil Science* **53**(1): 1-13.

White C., Wilkinson S.C. y Gadd G.M., 1995. The role of microorganisms in biosorption of toxic metals and radionuclides. *International Biodeterioration and Biodegradation* **35**:17-40.

Williams L.E., Pittman J.K. y Hall J.L., 2000. Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochimical et Biophysical Acta (BBA)-Biomembranes* **1465**(1-2): 104-126.

Winter K.J. y 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 & Technology* **32**(3): 21-29.

Wood R.B. y McAtamney C.F., 1996. Constructed wetlands for waste water treatment: the use of laterite in the bed medium in phosphorus and heavy metals. *In Management and Ecology of Freshwater Plants*: 340:323-331.

Xie X., Fu J., Wang H. y Liu J., 2010. Heavy metal resistance by two bacteria strains isolated from a copper mine tailing in China. *African Journal of Biotechnology* **9**(26): 4056-4066.

Yalcuk A., Ugurlu A., 2009. Comparison of horizontal and vertical constructed wetland system for landfill leachate treatment. *Biosource Technology* **100**(09): 2521-2526.

Yeh T.Y., Chou C.C. y Pan C.T., 2009. Heavy metal removal within pilot-scale constructed wetlands receiving river water contaminated by confined swine operations. *Desalination* **249**(1): 368-373.



Zhai Y, Wei X., Zeng G., Zhan D. y Chu K., 2004. Study of adsorbent derived from sewage sludge for the removal of Cd<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> in aqueous solutions. ***Separation and Purification Technology*** **38**(2): 191-196

Zhang X.H., Lin A.J., Chen B.D., Wang Y.S., Smith S.E. y Smith F.A., 2006. Effects of *Glomus mosseae* on the toxicity of heavy metals to *Vicia faba*. ***Journal of Environmental Science*** **18**(4): 721-726.

Zhao L.F., Zhu W. y Tong W., 2009. Clogging processes caused by biofilm growth and organic particle accumulation in lab-scale vertical flow constructed wetlands. ***Environmental Science*** **21**: 750-757.