

## Evaluación de la eficiencia de un sistema de humedales construidos en la remoción de mercurio de efluentes mineros auríferos

### Assessment of mercury removal efficiency of a constructed wetland system from gold mining

Edwin Sierra-Gaviria<sup>1\*</sup>, Alejandra Campos-Gilón<sup>1</sup>, Andrés Daza-Ordoñez<sup>1</sup>, Paula Coral<sup>2</sup>, Lenny Gómez<sup>2</sup>, César Fernández Morantes<sup>1</sup> y Arnol Arias Hoyos<sup>1</sup>

Recibido: 12 de abril de 2023.

Aceptado: 15 de noviembre de 2023.

Publicado: abril de 2024.

#### RESUMEN

**Antecedentes.** La contaminación por mercurio (Hg) producto del beneficio minero aurífero es un problema de índole ambiental, dada su capacidad de afectar los ecosistemas y la salud humana. Por lo cual, es fundamental proponer alternativas enfocadas en disminuir la contaminación producida principalmente al recurso hídrico, debido a la persistencia y permanencia de este metal pesado en el ambiente. **Objetivo.** Evaluar la remoción de Hg y la carga orgánica del agua residual proveniente de un entable minero mediante un sistema de humedales de flujo subsuperficial horizontal. **Métodos.** Se realizó la caracterización fisicoquímica del agua residual minera, además, se diseñó y operó un sistema de tres humedales a los cuales se les varió el Tiempo de Retención Hidráulica (TRH) y la presencia o ausencia de *Heliconia psittacorum*, se evaluaron parámetros como pH, OD, turbidez, DBO<sub>5</sub>, DQO y Mercurio. Se aplicó una prueba estadística ANOVA con significancia del 95%. **Resultados.** El efluente minero arrojó concentraciones para DQO y Hg de 197 mg O<sub>2</sub>/L y 0,0021 mg/L, respectivamente, valores superiores a los permisibles por la normativa colombiana y de la EPA. Los humedales evaluados mostraron eficiencias de remoción para turbiedad, DBO<sub>5</sub>, DQO y Hg superiores al 98,44%, 93,10%, 71,52% y 91,03%, respectivamente. Las pruebas estadísticas sugieren que no existe diferencia significativa con respecto a la variación del TRH, pues los porcentajes de eficiencia de remoción del Hg para 2 y 4 días son relativamente similares. **Conclusiones.** Los humedales de flujo subsuperficial horizontal y *Heliconia psittacorum*, son altamente eficientes en la remoción de Hg de aguas residuales de minería aurífera, consolidándose como una tecnología prometedora para la biorremediación ambiental.

**Palabras clave:** biorremediación, *Heliconia psittacorum*, humedales construidos, mercurio, minería aurífera.

#### ABSTRACT

**Background.** Mercury (Hg) contamination resulting from gold mining is an environmental problem caused by its ability to affect ecosystems and human health. Therefore, it is essential to propose alternatives focused on reducing the pollution produced mainly to water resources, due to the persistence and permanence of this heavy metal in the environment. **Goals.** This study evaluated the removal of Hg and the organic load of wastewater from a mining plant through a horizontal subsurface wetland flow system. **Methods.** The physicochemical characterization of the mining sewage was carried out, in addition, a system of three wetlands was designed and operated in which the Hydraulic Retention Time (HRT) and the plantation of *Heliconia psittacorum* were varied, then, parameters such as pH, OD, turbidity, BOD<sub>5</sub>, COD and Mercury were studied. An ANOVA statistical test with significance of 95% was applied. **Results.** The mining effluent showed COD and Hg concentrations of 197 mg O<sub>2</sub>/L and 0.0021 mg/L, respectively, values which are higher than those permitted by Colombian and EPA regulations. The wetlands evaluated showed removal efficiencies for turbidity, BOD<sub>5</sub>, COD and Hg higher than 98.44%, 93.10%, 71.52% and 91.03%, respectively. The statistical tests suggest that there is no significant difference in the TRH (p=0.361), therefore it is possible to operate the wetland system with 2 days of treatment. In addition, significant differences were found between the planted wetlands and those composed only by the support bed (p=0.039). **Conclusions.** Horizontal subsurface flow wetlands and *Heliconia psittacorum* are highly efficient in the removal of Hg from gold mining wastewater, consolidating as a promising technology for environmental bioremediation.

**Keywords:** bioremediation, *Heliconia psittacorum*, constructed wetlands, mercury, gold mining.

<sup>1</sup> Grupo de Investigación en Tecnologías y Ambiente, Corporación Universitaria Autónoma del Cauca. Calle 5 No 3-85, Popayán, Cauca, 190003. Colombia.

<sup>2</sup> Corporación Universitaria Autónoma del Cauca. Calle 5 No 3-85, Popayán, Cauca, 190003. Colombia.

**\*Corresponding author:**

Edwin Sierra-Gaviria: e-mail: edwin.sierra.g@uniiautonomo.edu.co

**To quote as:**

Sierra-Gaviria, E., A. Campos-Gilón, A. Daza-Ordoñez, P. Coral, L. Gómez, C. Fernández Morantes & A. Arias Hoyos. 2024. Evaluación de la eficiencia de un sistema de humedales construidos en la remoción de mercurio de efluentes mineros auríferos. *Hidrobiológica* 34 (1): 51-59.

DOI:10.24275/GFNH6732

## INTRODUCCIÓN

La minería aurífera artesanal y de pequeña escala (MAPE) es una actividad económica que ha tomado relevancia en los últimos años, no solo porque se ejercen por comunidades de escasos recursos, sino porque se han asentado en zonas apartadas de centros urbanos, lugares donde no hay desarrollo tecnológico (Ospina-Correa *et al.*, 2021). De los procesos de extracción usados en la MAPE, la amalgamación es el más utilizado, a pesar de su bajo porcentaje de recuperación de oro (30%), debido a la fácil manipulación del mercurio (Hg) y a su bajo costo (Rocha-Román *et al.*, 2018).

La falta de tratamiento de las aguas residuales generadas en el proceso resulta en una contaminación predominante del Hg en diversos cuerpos de agua. Este metal es uno de los elementos más tóxicos, cuya ingesta puede generar deterioro neurológico y renal causado por la inactivación celular debida a la inhibición de los grupos sulfhidrilos (SH) de proteínas y enzimas (Kosai *et al.*, 2023). Cuando se libera Hg al medio ambiente, este es transformado por bacterias a metil-Hg, un compuesto altamente tóxico. Este compuesto orgánico (metil-Hg) es absorbido por los organismos acuáticos y puede biomagnificarse a lo largo de la cadena alimenticia por medio de la bioacumulación (Cruz-Acevedo *et al.*, 2019).

En la práctica, no se tiene en consideración el impacto negativo que genera al ecosistema la MAPE, por esto se ve la necesidad de incrementar y desarrollar diferentes métodos y tecnologías enfocados en la remoción del Hg presente en las aguas residuales. Para la remoción de Hg se han utilizado diferentes métodos que presentan elevada efectividad, fácil operación y bajo costo (Ramos-Espinosa *et al.*, 2017; Chang *et al.*, 2022). Entre éstas, sobresale la fitorremediación, mediante la implementación en humedales artificiales, como una alternativa sostenible para la remoción de metales utilizando diferentes especies vegetales (Zhang *et al.*, 2013; Marrugo-Negrete *et al.*, 2017). La función que cumplen los humedales es importante debido a que permiten no solo el tratamiento de metales, sino también la eliminación de materia orgánica por la adsorción del sustrato y la absorción de las plantas mediante procesos químicos, físicos y biológicos (Wu *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2022). En este estudio se diseñó un humedal de flujo subsuperficial horizontal para evaluar la remoción de Hg y la carga orgánica de un agua residual proveniente de un entable MAPE utilizando *Heliconia psittacorum*, especie vegetal nativa y proveniente de América tropical, conocida por poseer gran resistencia a los cambios climáticos agresivos, enfermedades y el ataque de plagas (Madera-Parra *et al.*, 2015).

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Determinación de mercurio y parámetros fisicoquímicos.** La determinación del mercurio (Hg) total se realizó según el método APHA SM 3112B (American Public Health Association *et al.*, 2017), utilizando un espectrometro de absorción atómica de vapor en frío (SHIMADZU AA-7000). Este proceso involucra la adición de un agente reductor ( $\text{SnCl}_2$  98% 0,1 mg/L) a una matriz previamente digerida ( $\text{HNO}_3$  65%,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  98%, 0,05 mg/L  $\text{KMnO}_4$   $\geq 99,0\%$  a 90 °C durante 2 h) y decolorada (solución al 24% m/v de  $(\text{NH}_3\text{OH})\text{Cl}$  99%). El anterior procedimiento se realizó tanto a las muestras y a los patrones de la curva de calibración.

La curva de calibración empleada para la cuantificación de Hg se llevó a cabo a partir de la medición de soluciones patrón de diferente

concentración, abarcando un rango entre 0,5 – 3,0 mg/L ( $r^2 = 0,9986$ , límite de detección = 0,1284  $\mu\text{g/L}$  y límite de cuantificación = 0,428  $\mu\text{g/L}$ ). Estas soluciones fueron preparadas mediante dilución de diferentes volúmenes de una solución estándar de 1000 mg/L Hg (obtenida a partir de un material estándar de referencia NIST Hg ( $\text{NO}_3$ )<sub>2</sub> 2 M en  $\text{HNO}_3$ ). Todos los reactivos utilizados para la determinación de Hg fueron de grado analítico.

Los parámetros fisicoquímicos *in situ* fueron pH, temperatura y oxígeno disuelto (OD), los cuales se midieron usando un equipo multiparamétrico YSI Pro-Plus, y la turbiedad con un turbidímetro portátil HACH 2100Q. Posteriormente la medición de la Demanda Bioquímica de Oxígeno ( $\text{DBO}_5$ ) se midió según el método APHA SM 5210B mediante un electrodo de membrana (APHA 4500-O.G) y la Demanda Química de Oxígeno (DQO) se basó en APHA SM 5220D, medido por el método colorimétrico de flujo cerrado. (American Public Health Association *et al.*, 2017; Chang *et al.*, 2022).

**Caracterización del agua residual.** Se realizó la caracterización del agua residual proveniente de un entable de MAPE del municipio de Suárez, Cauca, Colombia. Para identificar las condiciones del afluente a tratar, se analizaron los parámetros fisicoquímicos Hg, pH, Temperatura, OD,  $\text{DBO}_5$  y DQO, previo al diseño de los humedales artificiales de flujo subsuperficial plantados con *Heliconia psittacorum*. Se muestrearon dos puntos denominados S1 y S2, ubicados en la conducción a los tanques de sedimentación y en el vertimiento al cuerpo de agua natural, respectivamente.

**Acondicionamiento de macrófitas.** La especie utilizada fue la *Heliconia psittacorum* que, debido a su amplio espectro de tolerancia a cambios ambientales drásticos, es capaz de sobrevivir a temperaturas que oscilan entre 18°C y 34°C. Esto posibilita la adaptación al medio en ecosistemas del trópico, condiciones propias del lugar de estudio (Decezar *et al.*, 2018; Orejuela *et al.*, 2018; Samuel *et al.*, 2022). Las plantas fueron obtenidas en un vivero de la zona de estudio, su acondicionamiento se realizó sobre el lecho del humedal durante 20 días, partiendo con una mezcla entre agua cruda y agua residual proveniente del entable minero en proporciones 1:1 por 5 días. Finalmente, las plantas se mantuvieron por 15 días con agua residual del entable minero para estabilizar el sistema y evitar estrés hídrico (Bedoya *et al.*, 2014; Marrugo-Negrete *et al.*, 2017).

**Diseño experimental del humedal construido.** Se construyó un humedal de flujo subsuperficial horizontal con el propósito de evaluar la eficiencia de remoción de contaminantes presentes en las aguas residuales de origen minero aurífero y el cumplimiento con la normativa vigente colombiana sobre vertimientos, siguiendo los lineamientos de la Agencia de Protección Ambiental (EPA) (EPA, 1993). Para el estudio se utilizaron aguas residuales provenientes del beneficio de oro con concentración promedio  $\sim 0,2$  mg/L de Hg.

El sistema estaba conformado por tres humedales construidos en fibra de vidrio con dimensiones de 0,9 x 0,3 x 0,4 m, una proporción 3:1 (largo: ancho) (Fig. 1). Se utilizó tubería PVC (12 mm de diámetro) para la distribución y recolección del agua con perforaciones espaciadas cada 0,1 m y un tanque de alimentación a los humedales con capacidad de 80 L (Marrugo-Negrete *et al.*, 2017; Prasetya *et al.*, 2020; S. Singh & Chakraborty, 2020).

La altura del lecho de soporte está compuesta por una capa de grava gruesa 25 cm (diámetro >10 mm) y arena 5 cm (diámetro <10mm)

(Marrugo-Negrete et al., 2017; Faisal et al., 2023;). Se plantaron 6 especímenes de *Heliconia psittacorum* en los humedales 1 y 2, mientras que el humedal 3 solo contenía el lecho de soporte. El humedal 3 fue utilizado como blanco para comparar la capacidad de las plantas en la remoción de Hg (Decezar et al., 2018). Adicionalmente, se realizó una variación en los Tiempos de Retención Hidráulica (TRH) para evaluar su influencia en el proceso de remoción de Hg (Marrugo-Negrete et al., 2017). Los TRH fueron de 2 días para el humedal 1, y de 4 días para los humedales 2 y 3 (Mozaffari et al., 2021; Minakshi et al., 2022).

**Monitoreo de calidad del agua.** La operación del sistema del humedal construido de flujo subsuperficial horizontal a escala piloto se implementó en un entable de MAPE de Suárez, Cauca. Se determinaron cuatro (4) puntos de muestreo, uno a la entrada del efluente al sistema (P1), y los restantes H1, H2 y H3 en la descarga del agua tratada de cada una de las peceras del sistema de humedales (Fig. 1).

La toma de muestras se realizó con una periodicidad mínima de 4 días de acuerdo al TRH teórico determinado mediante la ecuación planteada por la EPA (EPA, 1993). Cada muestra fue almacenada en botellas plásticas estériles de 1000 mL y posteriormente, enviadas al laboratorio, atendiendo los lineamientos establecidos por el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM) en el instructivo para la toma de muestras de aguas residuales (IDEAM, 2007).

**Remoción de mercurio.** Se realizó operación y seguimiento al sistema de humedales de flujo subsuperficial horizontal durante un periodo de 52 días (20 días de acondicionamiento y 32 de muestreo). El muestreo de la calidad del agua se desarrolló cada 4 días, considerando el TRH máximo. La eficiencia de remoción de Hg (%R) de los humedales fue calculada con la EC. (1) (Ma et al., 2017; Ventura et al., 2021).

$$\%R = \frac{C_e - C_o}{C_e} \times 100 \quad \text{Ec. 1}$$

Donde  $C_e$  y  $C_o$  son concentraciones (mg/L) de mercurio a la entrada (P1) y salida del sistema (H1, H2 y H3) respectivamente.

**Análisis estadístico.** Los resultados obtenidos fueron presentados como valores promedios de los triplicados. Los datos fueron procesados estadísticamente con el Software R a través de análisis de varianza ANOVA de un factor. Previamente, se realizaron las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk y de homogeneidad de varianzas de Levene, a un nivel de significancia del 95% ( $p < 0.05$ ) (Chen et al., 2021; Mozaffari et al., 2021).

## RESULTADOS

**Caracterización del agua residual.** Los resultados obtenidos de los parámetros fisicoquímicos del efluente minero se pueden observar en la tabla 1. Los datos de desviación estándar para S1 y S2 indican que los valores reportados para cada parámetro no varían significativamente con respecto a la media. Es posible que esto se deba a que las actividades de beneficio minero en el entable son constantes, lo cual evita fluctuaciones en las concentraciones de contaminantes en el efluente.

Para el Hg se encontró que los valores de concentración son mayores en S1 en comparación a S2 (Tabla 1) esto indica que, durante el proceso de sedimentación, el Hg presente podría amalgamarse con metales presente en los sedimentos, lo que generaría la disminución de su concentración en S2. Por otro lado, la turbiedad en el punto S2 se mantuvo por encima de los 1000 NTU, que probablemente se debe a la suspensión de partículas o al exceso de sedimentos presentes en el agua. Además, se observó un aumento en los niveles de la  $DBO_5$  y DQO, lo cual podría estar relacionado con la configuración del canal por el que fluyen las aguas hacia el vertedero, el cual se encontraba expuesto a material biológico externo. Por otro lado, se registró una disminución del OD en el agua residual, posiblemente debido a la degradación de la carga contaminante presente en ella (Horan, 2003).

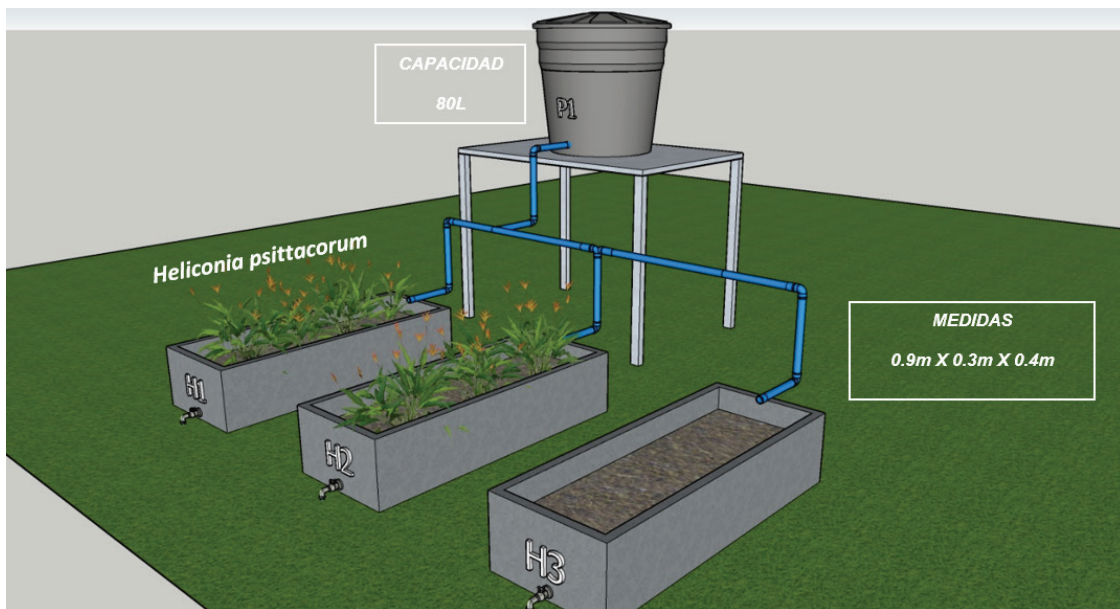


Figura 1. Sistema de humedales de flujo subsuperficial horizontal.

**Monitoreo de la calidad del agua.** Los parámetros fisicoquímicos fueron analizados con temporalidad de 4 días. En la Figura 2A, se evidencia el comportamiento del pH en la entrada y salida del sistema durante los 32 días de muestreo. Los resultados del análisis del blanco permiten identificar un valor máximo de pH de 9,8 en el ingreso del sistema de tratamiento, posiblemente debido al proceso de alcalinización utilizado en el beneficio del oro. Además, se observa un comportamiento similar entre H1 y H2, ya que son humedales que comparten características similares en cuanto a las macrófitas utilizadas. Por otro lado, aunque H3 presenta picos de variación de pH en los días 20 y 24, al igual que los otros dos humedales, tienen la capacidad de neutralizar las sustancias que generan alcalinidad en el agua (Faisal *et al.*, 2023; Mozzaffari *et al.*, 2021). Esto podría estar relacionado con la adsorción de compuestos carbonáceos en el lecho de soporte y la actividad biológica de las macrófitas (Faisal *et al.*, 2023).

En la Figura 2B se muestra el comportamiento del OD para H1, H2, H3, así como para el uso del blanco, que tiene un valor promedio de 5,99 mg O<sub>2</sub>/L. Se puede observar que H1 y H2 presentan valores similares y menores en comparación con H3, esto puede obedecer a que el sistema se encuentra saturado de carga contaminante en el afluente, lo que incrementa la demanda de oxígeno necesaria para la biodegradación de los compuestos por la actividad de la *Heliconia psittacorum*. Por otro lado, H3 presenta concentraciones más altas de OD, posiblemente debido a que no tiene plantación en su estructura, lo que disminuye los requerimientos de oxígeno en la degradación de contaminantes. En el día 16 de operación se redujo la concentración de OD, es posible que se hayan producido reacciones de degradación de contaminantes que disminuyen el oxígeno disponible en el afluente y crearon condiciones anóxicas para los humedales durante este día de operación, pues el día 16 no se llevaron a cabo actividades en el entable minero, por lo tanto, el agua residual que ingreso al sistema estaba almacenada en los tanques de sedimentación (Gu *et al.*, 2019). Posteriormente los siguientes días se retoman actividades en el entable y se observó un aumento en la concentración similar a días anteriores.

En la Figura 2C, se muestra la eficiencia de remoción de la turbiedad en el sistema de humedales. Se observa que H1 y H2 presentaron un comportamiento similar, con porcentajes de remoción de 98,44% y 98,98%, respectivamente, alcanzados después del día 16. Al igual

que el OD, se observó que en el día 16 se registró el valor más bajo de remoción, debido a la suspensión de actividades del entable minero. Sin embargo, en los días siguientes, se observaron porcentajes de remoción superiores al 99% para ambos humedales (H1 y H2). La similitud en el comportamiento entre ambos humedales podría estar relacionado con la presencia de la especie vegetal que desempeña un papel fundamental en la remoción de turbiedad. Además, se evidenció que el TRH no es indispensable en el tratamiento de la turbiedad, ya que no se encontraron diferencia significativa entre H1 y H2. Por lo tanto, es posible reducir los tiempos de retención en el tratamiento de las aguas residuales utilizando el sistema de humedales. Por otro lado, H3 mostró varias fluctuaciones en su comportamiento, presentando el menor porcentaje de remoción de turbiedad durante el estudio (< 92,65%), puesto que, se encuentra compuesto únicamente por el lecho de soporte a diferencia de los primeros dos humedales que cuentan con la presencia de especie vegetal *Heliconia psittacorum*.

La Figura 2D, muestra la remoción de DBO<sub>5</sub> en los humedales construidos, donde H1 y H2 alcanzaron una eficiencia máxima del 93,75% y 93,10%, respectivamente. Estos resultados podrían atribuirse a la actividad biológica que desempeñan las macrófitas en la degradación de compuestos orgánicos (Altonar-Gómez *et al.*, 2021). Por otro lado, H3 no mostró una variabilidad significativa en el porcentaje de remoción de DBO<sub>5</sub> durante el estudio, obteniendo el porcentaje más bajo con un 78,95%.

La Figura 2E, muestra el comportamiento del sistema de humedales en la remoción de la DQO. Al igual que en los parámetros anteriores, se observó un comportamiento similar en H1 y H2, alcanzando remociones máximas del 71,52% y 75,0%, respectivamente. Además, la concentración más baja de DQO en el estudio se presentó en el día 16, debido a las condiciones de producción de la MAPE. Esto permite inferir que, aunque ambos humedales se encuentran plantados con *Heliconia psittacorum*, la variación del TRH influye en la eficiencia de remoción. Por otra parte, H3 mostró un crecimiento paulatino en el porcentaje de remoción durante los primeros 20 días, con una eficiencia máxima del 83,33%. Sin embargo, en los 12 días siguientes la tendencia es decreciente, lo cual podría deberse a que los contaminantes se adhieran a la superficie del lecho de soporte, causando un detrimento en la eficiencia de remoción a partir del pico de saturación (Sharma & Malaviya, 2022).

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos del agua residual minera.

Parámetro	Punto		Valores límites	
	S1	S2	Resolución 0631/2015 <sup>2</sup>	EPA <sup>3</sup>
Hg (mg/L)	0,0037 ±0,0001	0,0021 ±0,0001	0,002	0,0002
pH	8,04±0,2	7,68±0,2	6,0-9,0	N/A <sup>1</sup>
°T (°C)	22,2±0,5	22,2±0,5	N/A	N/A
Turbiedad NTU	>1000	>1000	N/A	N/A
OD (mg/L)	12,5 ±0,8	7,0 ±0,3	N/A	N/A
DBO <sub>5</sub> (mg O <sub>2</sub> /L)	9,7 ±0,9	31,9 ±0,9	50,0	N/A
DQO (mg O <sub>2</sub> /L)	161 ±2	197 ±2	150,0	N/A

<sup>1</sup> N/A – No aplica para la norma (Resolución 0631, 2015)

<sup>2</sup> Norma colombiana de vertimientos (Resolución 0631, 2015)

<sup>3</sup> 40 CFR Part 440 Subpart D



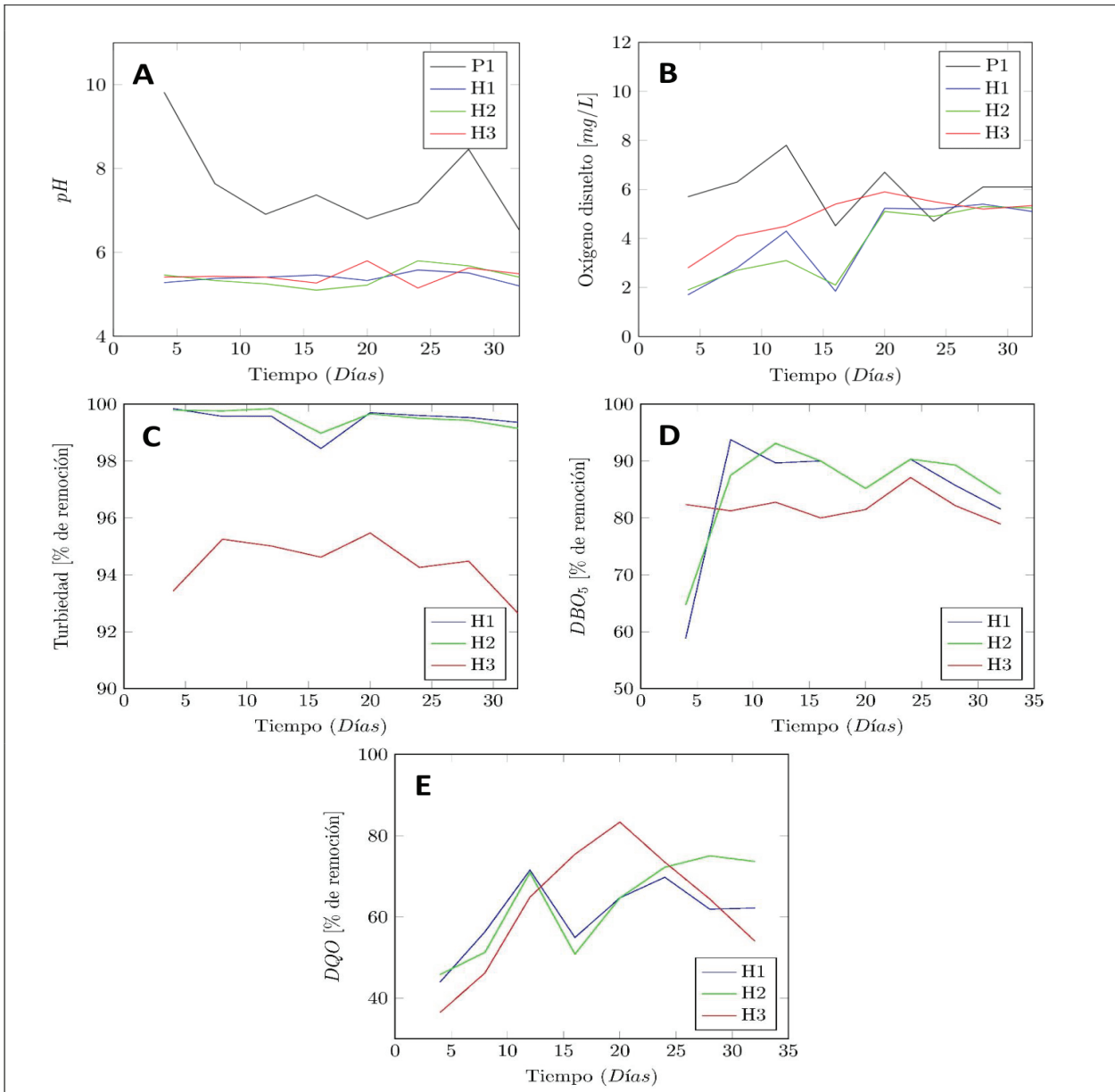


Figura 2. Resultados del sistema de humedales construidos con relación al A) comportamiento del pH, B) comportamiento del OD, C) remoción de turbiedad, D) remoción de la DBO<sub>5</sub> y E) remoción de la DQO. P1 indica el punto de muestreo a la entrada del efluente al sistema, mientras que H1 (*Heliconia psittacorum*-TRH 2 días), H2 (*Heliconia psittacorum*-TRH 4 días), y H3 (lecho de soporte-TRH 4 días) son los puntos de muestreo en la descarga del agua tratada de cada una de las peceras del sistema de humedales.

**Remoción de Hg.** Se realizaron estudios de eficiencia de remoción de Hg en el sistema de humedales, variando el TRH, 2 y 4 días, para H1 y H2, respectivamente (Fig. 3). Se realizaron estudios de eficiencia de remoción de Hg soluble en agua en el sistema de humedales, variando el TRH, 2 y 4 días, para H1 y H2, respectivamente (Fig. 3). Se observó un aumento en la eficiencia de remoción de Hg durante los primeros 12 días de tratamiento (posterior al tiempo de adaptación del sistema), con un porcentaje del 99%. Sin embargo, al final del periodo de estudio,

aunque la eficiencia es relativamente alta (> 96%), se encuentran diferencias de aproximadamente ~ 2% entre los humedales. Esto sugiere que es posible reducir el TRH teórico en el tratamiento de las aguas residuales de minería aurífera en estos sistemas.

El papel de la *Heliconia psittacorum* se estudió en plantaciones en los humedales H1 y H2, mientras que H3 solo se compuso del lecho de soporte. Aunque todos los humedales mostraron picos máximos de

remoción superiores al 99%, hubo una discrepancia ya que aquellos que contenían las macrófitas mantuvieron una eficiencia por encima del 96%, mientras que el humedal sin macrófitas mostró disminución hasta el 91,03% (Fig. 3). Esto sugiere que la función biológica de *Heliconia psittacorum* desempeña un papel fundamental en la remoción de Hg de las aguas residuales de la MAPE.

## DISCUSIÓN

**Caracterización del agua residual.** Los resultados de la caracterización de las aguas residuales del entable de MAPE, revelaron concentraciones máximas para DQO y Hg de 197 mg O<sub>2</sub>/L y 0,0037 mg/L, respectivamente, superando los límites permisibles establecidos por la normativa colombiana y la EPA para vertimientos de aguas residuales (40 CFR Part 440 Subpart D; Resolución 0631, 2015). Esto evidencia claramente el impacto negativo de actividad minera en el recurso hídrico. Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por (Madera-Parra et al., 2015; Brousett-Minaya et al., 2021), en los cuales se encontraron concentraciones elevadas de Hg y DQO, lo que evidencia la magnitud de la contaminación a nivel de trazas de contaminantes que son liberados en el medio ambiente. Especialmente el Hg que es un metal pesado de preocupación mundial debido a su capacidad de persistir, bioacumularse y biomagnificarse, lo que puede tener efectos negativos en la salud ecosistémica y del medio ambiente en general (La Colla et al., 2019).

**Monitoreo de la calidad del agua.** Durante el periodo de operación del sistema, los valores de pH estuvieron entre 5 y 5.9, dichos valores concuerdan con los datos reportados por (Allen et al., 2023). Estos

resultados evidencian una disminución significativa del pH, debido a las diversas reacciones químicas que ocurren en el proceso de degradación de contaminantes en el sistema de humedales, incluyendo procesos de oxidación y generación de acidez (Balciunas et al., 2020; Guzman et al., 2022; Sharma & Malaviya, 2022).

El comportamiento de la concentración de OD en los humedales plantados con *Heliconia psittacorum* concuerdan con los hallazgos de la investigación realizada por (Altonar-Gómez et al., 2021; Guzman et al., 2022), según los autores, los procesos de degradación de MO tienen una mayor demanda de OD ya que el sistema radicular de las macrófitas tiende a reducir el oxígeno disponible durante su actividad biológica, consumiendo el oxígeno disponible en el afluente (Faisal et al., 2023). Por otro lado, aunque el afluente del humedal sin plantación presentó mayor concentración de OD en comparación con los humedales plantados, también presentó una reducción en comparación con el agua residual de entrada al sistema, debido a los procesos metabólicos que demandan consumo de oxígeno en los espacios porosos del lecho de soporte, sin embargo, esta reducción es menor respecto a los humedales plantados con *Heliconia psittacorum* (Sharma & Malaviya, 2022).

Se obtuvieron porcentajes de remoción de la turbiedad superiores al 90%. Sin embargo, para el humedal sin plantación, la eficiencia fue menor con respecto a los otros dos humedales, debido a la saturación del lecho de soporte, evitándose así la retención de partículas de menor tamaño. En contraste de los sistemas que usan especies vegetales en el tratamiento de las aguas residuales, sus complejos radicales facilitan la adsorción de partículas coloidales y de menor tamaño, lo que potencia la eliminación de compuestos que contribuyen con el aumento de la turbidez del agua (Torres et al., 2018).

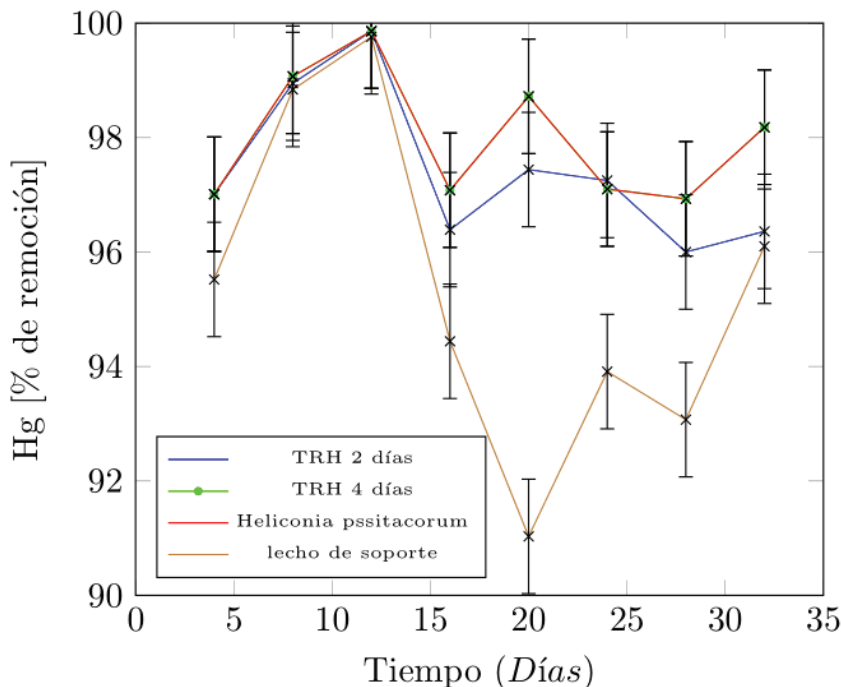


Figura 3. Remoción de Hg en el sistema de humedales en función de la variación del TRH, y de macrófitas y lechos de soporte.

La alta eficiencia de remoción de  $\text{DBO}_5$  en los humedales plantados, en comparación con el que solo posee el lecho de soporte, puede deberse a la entrada continua del agua residual y al cultivo de *Heliconia psittacorum* en los humedales, lo cual mejora la actividad biológica de los microorganismos presentes. Además, las comunidades bacterianas que se encuentran adheridas al medio de soporte y a las raíces de las plantas son capaces de degradar la materia orgánica contenida en el afluente de ingreso al sistema (Ramírez et al., 2020). Estos resultados que concuerdan con estudios previos que reportan una alta degradación de compuestos orgánicos, como lo mencionado por (Kasak et al., 2018), que resaltan el papel del lecho de soporte en relación en la retención de metales pesados presentes en las aguas residuales.

En el caso de la DQO, se observó una disminución en el humedal sin lecho de soporte, lo cual fue atribuido a la rápida saturación de los espacios porosos, como fue previamente reportado (Sharma & Malaviya, 2022). Sin embargo, en los humedales plantados con *Heliconia psittacorum*, al finalizar el periodo de estudio se observó una estabilización gradual, resultados similares a los estudios de (Huang et al., 2022) y (Chang et al., 2022) quienes encontraron eficiencias de remoción de DQO superiores al 80%. Puesto que una vez que el sistema es normalizado, las plantas absorben nutrientes disueltos en el cuerpo de agua con mayor facilidad y logran retener el material particulado y compuestos, promoviendo la eliminación de contaminantes del agua residual.

**Remoción de Hg.** La eficiencia de remoción para los TRH estudiados fue superior al 90%, con una diferencia promedio de 0,6% entre ellos. Los resultados de las pruebas estadísticas de supuestos sugieren una distribución normal de los datos ( $p=0,060$ ) y homogeneidad en las varianzas ( $p=0,895$ ). Además según el ANOVA no se encontraron diferencias significativas en los dos TRH estudiados ( $p=0,361$ ; intervalos de confianza -0,745 - 1,910). Esto indica que es posible operar un sistema de humedales con un TRH de 2 días, aprovechando las condiciones ecosistémicas y ambientales del trópico, lo cual reduce los costos de operación y funcionamiento, sin comprometer la eficiencia en el tratamiento del agua residual (Prasetya et al., 2020).

Por otro lado, se observó que la presencia/ausencia de *Heliconia psittacorum* en los humedales presentó un efecto significativo en la remoción de contaminantes. En el caso de los humedales que contaban con la especie vegetal mostraron una remoción máxima del 99%, mientras que aquel que no la tenía disminuyó al 91%. Los análisis estadísticos de las pruebas de supuestos indicaron que los datos seguían una distribución normal y que tenían homogeneidad en las varianzas, con valores  $p$  de 0,605 y 0,059, respectivamente. Además, el ANOVA evidenció que existen diferencias significativas en el tratamiento de las aguas residuales entre  $H1$ ,  $H2$  (Humedales con plantación) y  $H3$  (Humedal con lecho de soporte) ( $p=0,039$ ; intervalos de confianza 0,300 - 5,023), lo cual indicó la importancia del papel de las macrófitas en el tratamiento de aguas residuales de minería. Según lo indica (Prasetya et al., 2020), el sistema radicular de algunas especies vegetales reduce la concentración de Hg en la rizosfera y podrían tener la capacidad de estabilizar el Hg. Por otro lado, (Chang et al., 2022) reporta que la remoción de los humedales constituidos únicamente con lechos de soporte es limitada y podría disminuir, debido a su baja capacidad de adsorción y reacción a los contaminantes como el Hg, lo que ocasiona saturación del sistema. Por lo tanto, el estudio combinado del sistema, tanto fitorremediador, como el lecho de soporte, es importante para obtener sistemas estabilizados y con alta remoción de contaminantes.

Las plantas que están expuestas al Hg pueden experimentar una serie de efectos negativos en su salud y desarrollo, entre estos se encuentra la alteración de la estructura de las proteínas, la inhibición de la fotosíntesis. El Hg interfiere con este proceso dañando las estructuras celulares encargadas de la captación de la luz solar, lo que provoca la reducción de la síntesis de azúcares generando un crecimiento lento en la planta. Asimismo, produce la permeabilidad de la membrana celular, cambios en la morfología, hojas amarillentas y deformes, y en su fisiología, la disminución de la transpiración y de la capacidad de almacenamiento de nutrientes (Singh et al., 2023).

La disposición final del material vegetal o de la biomasa contaminada con metales pesados, debe realizarse de manera controlada, ya que podrían convertirse en una fuente secundaria de contaminación. Varias investigaciones se han enfocado en el tratamiento de este tipo de biorresiduos, entre los cuales se tienen los térmicos, de extracción, microbiano, de compresión y síntesis de nanomateriales (Liu & Tran, 2021). En el caso del Hg, que es un elemento de bajo punto de ebullición, los tratamientos adecuados para la eliminación de biorresiduos se han enfocado en la extracción y síntesis de nanomateriales, debido al bajo riesgo de contaminación secundaria (Liu & Tran, 2021).

Los resultados de este estudio indican que los humedales de flujo subsuperficial horizontal cultivados con la especie *heliconia psittacorum* son altamente efectivos en la eliminación de mercurio (Hg) en aguas residuales generadas en pequeños entables de minería aurífera, logrando una remoción superior al 96%. Además, este sistema de humedales también logra mejorar los diferentes parámetros fisicoquímicos analizados, cumpliendo con los estándares de vertimiento establecidos por la normativa colombiana (Resolución 0631, 2015).

En conclusión, los resultados obtenidos sugieren que los humedales construidos utilizando esta tecnología tienen un gran potencial como una herramienta efectiva en la biorremediación ambiental, particularmente en la remoción de mercurio y la mejora de la calidad del agua en entornos afectados por la minería aurífera. Esto representa un avance significativo en la mitigación de los impactos ambientales de esta actividad y en la protección de los ecosistemas acuáticos.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores reconocen el apoyo del Proyecto de Jóvenes Investigadores e Innovadores en el Departamento del Cauca y a los entables mineros de Don Tierno y Doña Joya ubicados en Suárez, Cauca-Colombia.

## REFERENCIAS

- 40 CFR PART 440 SUBPART D. 2023. Part 440—Ore mining and dressing point source category. Subpart D—Mercury Ore Subcategory. US EPA (Environmental Protection Agency). Code of Federal Regulations. Available online at: <https://www.ecfr.gov/current/title-40/part-440/subpart-D>. (consultado el 10 de marzo de 2023)
- ALLEN, D. J., M. FARRELL, J. HUANG, S. PLUSH, & L. M. MOSLEY. 2023. Artificial aeration of an overloaded constructed wetland improves hypoxia but does not ameliorate high nitrogen loads. *Journal of Environmental Management* 326: 116625. DOI: 10.1016/J.JENVMAN.2022.116625

- ALTONAR-GÓMEZ, X. A., K. XIMENATZINTZUN-PEDRAZA, V. OSUNA-VALLEJO, & R. LINDIG-CISNEROS. 2021. Respuesta de plantas jóvenes de cuatro especies de coníferas a la exposición al mercurio. *Madera y Bosques* 27 (3): 1–12. DOI: 10.21829/myb.2021.2732160
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, & WATER ENVIRONMENT FEDERATION. 2017. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (R. Baird, A. Eaton, & E. Rice (eds.); 23rd ed., Issue 9). American Public Health Association.
- BALCIUNAS, E. M., U. KAPPELMEYER, H. HARMS, & H. J. HEIPIEPER. 2020. Increasing ibuprofen degradation in constructed wetlands by bioaugmentation with gravel containing biofilms of an ibuprofen-degrading *Sphingobium yanoikuyae*. *Engineering in Life Sciences* 20 (5–6): 160–167. DOI: 10.1002/elsc.201900097
- BEDOYA, J. C., A. N. ARDILA, & J. REYES. 2014. Evaluación de un humedal artificial de flujo subsuperficial en el tratamiento de las aguas residuales generadas en la institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, Colombia. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 30 (3): 275–283.
- BROUSETT-MINAYA, M. A., G. G. RONDAN-SABRINA, M. CHIRINOS-MARROQUIN, & I. BIAMONT-ROJAS. 2021. Impacto de la Minería en Aguas Superficiales de la Región Puno-Perú Impact of Mining on Surface Waters of the Region Puno-Perú. *Revista de Difusión Cultural y Científica de La Universidad La Salle En Bolivia* 21 (21): 187–207.
- CHANG, J., D. PENG, S. DENG, J. CHEN, & C. DUAN. 2022. Efficient treatment of mercury(II)-containing wastewater in aerated constructed wetland microcosms packed with biochar. *Chemosphere* 290 (September 2021): 133302. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.133302
- CHEN, J., S. DENG, W. JIA, X. LI, & J. CHANG. 2021. Removal of multiple heavy metals from mining-impacted water by biochar-filled constructed wetlands: Adsorption and biotic removal routes. *Bioresour. Technology* 331 (March): 125061. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.125061
- CRUZ-ACEVEDO, E., M. BETANCOURT-LOZANO, D. I. ARIZMENDI-RODRÍGUEZ, H. AGUIRRE-VILLASEÑOR, D. AGUILERA-MÁRQUEZ, & J. GARCÍA-HERNÁNDEZ. 2019. Mercury bioaccumulation patterns in deep-sea fishes as indicators of pollution scenarios in the northern Pacific of Mexico. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 144: 52–62. DOI: 10.1016/j.dsr.2019.01.002
- DECEZARO, S. T., D. B. WOLFF, R. K. ARAÚJO, H. B. FACCENDA, T. PERONDI, & P. H. SEZERINO. 2018. Vertical flow constructed wetland planted with *Heliconia psittacorum* used as decentralized post-treatment of anaerobic effluent in Southern Brazil. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 53 (13): 1131–1138. DOI: 10.1080/10934529.2018.1530106
- EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). 1993. *Guía para el diseño y construcción de un humedal construido con flujos subsuperficiales* (pp. 1–27). División de Manejo de Aguas Rama de Instalaciones Municipales Sección Técnica.
- FAISAL, A. A. H., D. S. TAHA, W. H. HASSAN, S. K. LAKHERA, S. ANSAR, & S. PRADHAN. 2023. Subsurface flow constructed wetlands for treating of simulated cadmium ions-wastewater with presence of *Canna indica* and *Typha domingensis*. *Chemosphere* 338 (May): 139469. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2023.139469
- GU, S., G. GRUJAU, R. DUPAS, P. PETITJEAN, Q. LI, & G. PINAY. 2019. Respective roles of Fe-oxyhydroxide dissolution, pH changes and sediment inputs in dissolved phosphorus release from wetland soils under anoxic conditions. *Geoderma* 338 (December 2018): 365–374. DOI: 10.1016/j.geoderma.2018.12.034
- GUZMAN, M., M. B. ROMERO ARRIBASPLATA, M. I. FLORES OBISPO, & S. C. BRAVO THAIS. 2022. Removal of heavy metals using a wetland batch system with carrizo (*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.): A laboratory assessment. *Acta Ecologica Sinica* 42 (1): 102–109. DOI: 10.1016/j.chnaes.2021.08.001
- HORAN, N. 2003. Suspended growth processes. In: Mara, D. & Horan, N. (Eds.). *Handbook of Water and Wastewater Microbiology*. Academic Press, pp. 351–360. DOI: 10.1016/B978-012470100-7/50022-4
- HUANG, F., Y. HUANG, J. JIA, Z. LI, J. XU, S. NI, & Y. XIAO. 2022. Research and engineering application of bypass combined artificial wetlands system to improve river water quality. *Journal of Water Process Engineering* 48 (May): 102905. DOI: 10.1016/j.jwpe.2022.102905
- IDEAM (INSTITUTO DE HIDROLOGÍA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES). 2007. *Instructivo para la toma de muestras de aguas residuales*. Disponible en línea: <http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/021172/Protocoloparaelmonitoreoyseguimientodelagua.pdf> (consultado el 20 de noviembre de 2022)
- KASAK, K., J. TRUU, I. OSTONEN, J. SARJAS, K. OOPKAUP, P. PAISTE, M. KÕIV-VAINIK, Ü. MANDER, & M. TRUU. 2018. Biochar enhances plant growth and nutrient removal in horizontal subsurface flow constructed wetlands. *Science of The Total Environment* 639: 67–74. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.05.146
- KOSAI, S., K. NAKAJIMA, & E. YAMASUE. 2023. Mercury mitigation and unintended consequences in artisanal and small-scale gold mining. *Resources, Conservation and Recycling* 188 (October 2022): 106708. DOI: 10.1016/j.resconrec.2022.106708
- LA COLLA, N. S., S. E. BOTTÉ, & J. E. MARCOVECCHIO. 2019. Mercury cycling and bioaccumulation in a changing coastal system: From water to aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin* 140 (June 2018): 40–50. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2018.12.051
- LIU, Z., & K. Q. TRAN. 2021. A review on disposal and utilization of phytoremediation plants containing heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 226: 112821. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2021.112821
- MA, N., W. WANG, J. GAO, & J. CHEN. 2017. Removal of cadmium in subsurface vertical flow constructed wetlands planted with *Iris sibirica* in the low-temperature season. *Ecological Engineering* 109 (September): 48–56. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2017.09.008
- MADERA-PARRA, C. A., E. J. PEÑA-SALAMANCA, M. R. PEÑA, D. P. L. ROUSSEAU, & P. N. L. LENS. 2015. Phytoremediation of Landfill Leachate with *Colocasia esculenta*, *Gynerum sagittatum* and *Heliconia psittacorum* in Constructed Wetlands. *International Journal of Phytoremediation* 17 (1): 16–24. DOI: 10.1080/15226514.2013.828014
- MARRUGO-NEGRETE, J., G. ENAMORADO-MONTES, J. DURANGO-HERNÁNDEZ, J. PINEDO-HERNÁNDEZ, & S. DIEZ. 2017. Removal of mercury from gold mine effluents using *Limncharis flava* in constructed wetlands. *Chemosphere* 167: 188–192. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.09.130



- MINAKSHI, D., P. K. SHARMA, A. RANI, P. MALAVIYA, V. SRIVASTAVA, & M. KUMAR. 2022. Performance evaluation of vertical constructed wetland units with hydraulic retention time as a variable operating factor. *Groundwater for Sustainable Development* 19 (August): 100834. DOI: 10.1016/j.gsd.2022.100834
- MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE. 2015. Resolución 0631 de 2015. Disponible en: <https://fenavi.org/wp-content/uploads/2018/05/Resolucion-631-2015.pdf> (consultado el 20 de noviembre de 2022)
- MOZZAFFARI, M. H., E. SHAFIEPOUR, S. A. MIRBAGHERI, G. RAKHSHANDEHROO, S. WALLACE, & A. I. STEFANAKIS. 2021. Hydraulic characterization and removal of metals and nutrients in an aerated horizontal subsurface flow “racetrack” wetland treating primary-treated oil industry effluent. *Water Research* 200: 117220. DOI: 10.1016/j.watres.2021.117220
- MOZZAFFARI, M., E. SHAFIEPOUR, S. AHMAD, G. RAKHSHANDEHROO, S. WALLACE, & A. STEFANAKIS. 2021. Hydraulic characterization and removal of metals and nutrients in an aerated horizontal subsurface flow “racetrack” wetland treating primary-treated oil industry effluent. *Bioresource Technology* 200 (March): 125061. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.125061
- OREJUELA, J., J. C. GONZÁLEZ, V. LINDAO, L. SANTILLÁN, & S. GODOY. 2018. Evaluation of the efficacy of *Heliconia psittacorum* (heliconiaceae) cultivated hydroponically for phytoremediation of water with chromium (VI) presence. *AIP Conference Proceedings* 2003 (Vi): DOI: 10.1063/1.5050361
- OSPINA-CORREA, J. D., J. G. OSORIO-CACHAYA, Á. M. HENAO-ARROYAVE, D. A. PALACIO-ACEVEDO, & J. GIRALDO-BUILES. 2021. Retos y oportunidades para la industria minera como potencial impulsor del desarrollo en Colombia. *Tecnológicas* 24 (50): e1683–e1683. DOI: 10.22430/22565337.1683
- PRASETYA, A., P. PRIHUTAMI, A. D. WARISAURA, M. FAHRURROZI, & H. T. B. MURTI PETRUS. 2020. Characteristic of Hg removal using zeolite adsorption and *Echinodorus palaefolius* phytoremediation in subsurface flow constructed wetland (SSF-CW) model. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 8 (3): 103781. DOI: 10.1016/j.jece.2020.103781
- RAMÍREZ, J. S., D. C. R. LOAIZA, & W. J. ASPRILLA. 2020. Humedales artificiales subsuperficiales: comparación de metodologías de diseño para el cálculo del área superficial basado en la remoción de la materia orgánica. *Ingenierías USBMed* 11 (1): 65–73. DOI: 10.21500/20275846.4558
- RAMOS-ESPINOSA, M. G., L. M. RODRIGUEZ-SANCHEZ, & P. MARTINEZ-CRUZ. 2017. Uso de macrofitas acuáticas en el tratamiento de aguas para el cultivo de maíz y sorgo. *Hidrobiológica* 17 (1): 7–15. DOI: <https://hidrobiologica.izt.uam.mx/index.php/revHidro/article/view/972>
- ROCHA-ROMÁN, L., J. OLIVERO-VERBEL, & K. CABALLERO-GALLARDO. 2018. Impacto de la minería del oro asociado con la contaminación por mercurio en suelo superficial de San Martín de Loba, sur de Bolívar (Colombia). *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 34 (1): 93–102. DOI: 10.20937/RICA.2018.34.01.08
- SAMUEL, W., B. RICHARD, & J. A. NYANTAKYI. 2022. Phytoremediation of heavy metals contaminated water and soils from artisanal mining enclave using *Heliconia psittacorum*. *Modeling Earth Systems and Environment* 8 (1): 591–600. DOI: 10.1007/s40808-020-01076-2
- SHARMA, R., & P. MALAVIYA. 2022. Constructed wetlands for textile wastewater remediation: A review on concept, pollutant removal mechanisms, and integrated technologies for efficiency enhancement. *Chemosphere* 290: 133358. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.133358
- SINGH, A. D., K. KHANNA, J. KOUR, S. DHIMAN, T. BHARDWAJ, K. DEVI, N. SHARMA, P. KUMAR, N. KAPOOR, P. SHARMA, P. ARORA, A. SHARMA, & R. BHARDWAJ. 2023. Critical review on biogeochemical dynamics of mercury (Hg) and its abatement strategies. *Chemosphere* 319 (December 2022): 137917. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2023.137917
- SINGH, S., & S. CHAKRABORTY. 2020. Performance of organic substrate amended constructed wetland treating acid mine drainage (AMD) of North-Eastern India. *Journal of Hazardous Materials* 397 (February): 122719. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.122719
- TORRES, J. D., J. S. MAGNO, R. R. PINEDA AGUIRRE, & M. A. CRUZ. 2018. Evaluación de la eficiencia en el tratamiento de aguas residuales para riego mediante humedales Artificiales de flujo libre superficial (FLS) con las especies *Cyperus Papyrus* y *Phragmites Australis*, en Carapongo-Lurigancho. *Revista de Investigación Ciencia, Tecnología y Desarrollo* 3 (2): DOI: 10.17162/rictd.v3i2.657
- VENTURA, D., M. FERRANTE, C. COPAT, A. GRASSO, M. MILANI, A. SACCO, F. LICCIARDELLO, & G. L. CIRELLI. 2021. Metal removal processes in a pilot hybrid constructed wetland for the treatment of semi-synthetic stormwater. *Science of the Total Environment* 754: 142221. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.142221
- WU, S., L. GAO, J. GU, W. ZHOU, C. FAN, S. HE, J. HUANG, X. ZHANG, Y. CHENG, Z. WU, & Z. WANG. 2018. Enhancement of nitrogen removal via addition of cattail litter in surface flow constructed wetland. *Journal of Cleaner Production* 204: 205–211. DOI: 10.1016/j.jclepro.2018.09.036
- ZHANG, Y., J. LIU, Y. ZHOU, T. GONG, J. WANG, & Y. GE. 2013. Enhanced phytoremediation of mixed heavy metal (mercury)-organic pollutants (trichloroethylene) with transgenic alfalfa co-expressing glutathione S-transferase and human P450 2E1. *Journal of Hazardous Materials* 260: 1100–1107. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2013.06.065