

Universidad de los Andes
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología

QH545

M426

e.2

**ESTUDIO DE COMUNIDADES BACTERIANAS RESISTENTES AL MERCURIO
QUE COLONIZAN AGUAS SUBTERRÁNEAS EN EL CALLAO, ESTADO
BOLÍVAR**

Trabajo Especial de Grado Presentado Ante
La Ilustre Universidad de Los Andes por la Br.
**MAURA LINA ROJAS PIRELA; Para Optar
Al Título de Licenciado en Biología**

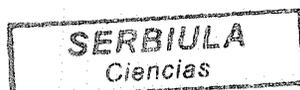
Dirigido por

Tutor: María Ball

Co-tutor: Andrés Yarzabal

Mérida -Venezuela

Universidad de Los Andes





**UNIVERSIDAD
DE LOS ANDES**

**Facultad de Ciencias
Departamento de Biología**

bdigital.ula.ve

**ESTUDIO DE COMUNIDADES BACTERIANAS RESISTENTES AL MERCURIO
QUE COLONIZAN AGUAS SUBTERRÁNEAS EN EL CALLAO, ESTADO
BOLÍVAR**

Autor: Maura Lina Rojas Pirela

Tutor: María Ball

Co-tutor: Andrés Yarzabal

Mérida-Venezuela

Dedicatoria

A mis padres **Mauro y Aura**, por su confianza, por su ayuda y consejos durante todo el camino recorrido en mi vida. Gracias por estar a mi lado en cada uno de los momentos más importante de mi vida, por haberme dado ánimo en los momentos que lo necesité, por haberme tenido confianza y apoyo en cada una de las decisiones que he tomado en mi recorrido. Les agradezco haberme tenido paciencia en muchos momentos. De ustedes aprendí que las cosas hay que ganárselas y que cuando se quiere algo hay que desearlo con todas las fuerzas. Gracias por su amor y cariño incondicional.

A **Cristóbal**, por haber llegado a mi vida en el momento más oportuno. Gracias por estar a mi lado y quererme, por apoyarme en todo momento; por sus palabras de ánimo y su comprensión. De ti aprendí que nunca hay que darse por vencido y siempre hay que luchar hasta el final.

A mis hermanos **Maureen, Mauricio, Marian, Maurina y Mauro**, por su amistad y su apoyo incondicional. Gracias por estar a mi lado en todos los momentos importantes.

A mis sobrinos **María José, María Fernanda, Alejandro, Sandra, Maurelis y Greismary** por darme la alegría que en muchos momentos me hizo falta.

A mi abuela **Ana**, a quien llevo en mi mente.

Agradecimiento

A **Dios**, por haberme guiado durante el recorrido realizado en mi vida. Por haberme ayudado en todos los momentos difíciles.

A la **Dra. María Ball**, por brindarme su confianza para la realización de este proyecto, por su enseñanza y por sus conocimientos aportados durante la realización de este proyecto. Gracias por su exigencia, por su comprensión, por su amistad y su ayuda incondicional en todo momento. En realidad le agradezco por todas las cosas buenas que recibí de usted en este tiempo.

Al **Dr. Andrés Yarzábal**, por su amistad, asesoramiento científico. Por su generosidad al darme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica durante la realización de este trabajo

A mi compañero de laboratorio **Wilmar** por su amistad y ayuda incondicional durante la realización de este proyecto. Gracias por enseñarme tantas cosas.

A mis otros compañeros de laboratorio, **Fernando, Elizabeth, Lisett, Wileidy y Claudia** de los cuales aprendí muchas cosas.

Al profesor **Zarack** por aceptar la evaluación de este trabajo, por su amistad, por consejos y conocimientos contribuidos durante este tiempo.

Al profesor **Jhon Cruz** por aceptar la evaluación de este trabajo, por brindarme sus conocimientos y amistad a lo largo de la carrera.

Al profesor **Otoniel Rojas** por colaborar y facilitarme algunos reactivos y cepas que utilicé en mi trabajo. Gracias por brindarme sus conocimientos a lo largo de la carrera.

Al profesor **Néstor González** por su confianza, por estar pendiente de mi trabajo y brindarme sus conocimientos durante la carrera.

Al profesor **Wilfredo Quiñones** por su brindarme su amista, por sus consejos y ayuda en varias circunstancias. Gracias por los conocimientos aportados a lo largo de la carrera.

A mis amigos y compañeros de estudios, **Mary Carmen, Darío, Doranda y Miguel** con los cuales compartí gratos momentos y de los cuales aprendí muchísimo Gracias por su apoyo y ayuda incondicional durante la carrera.

A mis amigas y primas rumberas **Adalys, Maxioly, Karina, Deicy, Candy, Yari**, por su amistad y apoyo incondicional durante toda la carrera. Gracias por estar pendiente de mí siempre.

Al técnico **Alexander Piña**, por su amista, por colaborar y facilitarme reactivos para la realización de las pruebas bioquímicas en este trabajo.

A cada un de los profesores que contribuyeron en mi formación académica. Gracias por sus consejos, amistad y conocimientos aportados.

A **Zioly** por haberme brindado su ayuda y su orientación las veces que la necesité.

A la empresa **CVG. MINERVEN** por haber permitido realizar parte de de esta investigación en sus instalación y por el apoyo logístico brindado.

A la Ing **Ana Moreno** y al resto del personal trabajador de **CVG.- MINERVEN**, por su colaboración durante la estadía en El Callao.

Al **C.D.C.H.T.** (ULA) por el financiamiento de este trabajo (Proyecto *C-1428-06-03-B*).

ÍNDICE DE FIGURAS.

Nº Título	Pág
1 Mercurio metálico en su forma líquida	3
2 Algunas fuentes de contaminación con Hg	4
3 Ciclo del mercurio. Durante su ciclo el Hg	6
4 Representación esquemática de un operón <i>mer</i> de resistencia de amplio espectro al Hg en bacterias Gram negativas	12
5 Destoxificación del Hg por bacterias resistentes.	13
6 Diversidad del operón <i>mer</i> en distintas especies bacterianas Gram negativas y Gram positivas.	15
7 Genes que han sido observados en el operón <i>mer</i>	16
8 Calentamiento de la amalgama con un soplete para la recuperación del Au	18
9 Mina Colombia. Niveles utilizados para el estudio de comunidades bacterianas subterráneas.	28
10 Porcentaje de aislados Hg ^R y MeHg ^R en los diferentes niveles de la Mina Colombia.	46
11 Aislados Hg ^R seleccionados para los estudios de resistencia a antibióticos y otros metales pesados.	47
12 Resistencia a antibióticos de los aislados Hg ^R en medio LB agarizado.	48
13 Porcentaje de aislados Hg ^R resistentes a antibióticos.	48
14 Porcentaje de aislados Hg ^R resistentes a antibióticos provenientes de los diferentes niveles de la Mina Colombia.	49
15 Porcentaje de resistencia de los de aislados Hg ^R a múltiples antibióticos.	50

16	Patrones de resistencia a múltiples antibióticos de los de aislados Hg ^R , provenientes de los diferentes niveles analizados.	51
17	Resistencia a diferentes antibióticos de aislados Hg ^R en medio líquido.	52
18	Patrones de resistencia a antibióticos de los aislados Hg ^R .	52
19	Porcentaje de aislados pigmentados resistentes a diferentes antibióticos	53
20	Dendograma generado a partir de estudios de resistencias a antibióticos de aislados Hg ^R utilizando distancia Euclideana	54
21	Porcentaje de aislados Hg ^R resistentes a otros metales pesados.	55
22	Prueba de resistencia a diferentes metales de aislados Hg ^R en medio líquido.	56
23	Prueba de Gram de los aislados Hg ^R por el método de KOH.	57
24	Amplificación por la técnica de PCR del gen <i>merA</i> .	57
25	Frecuencia de amplificados <i>merA</i> en aislados Hg ^R	58
26	Correlación entre la presencia del gen <i>merA</i> y la naturaleza Gram de los aislados Hg ^R .	58
27	Perfil plasmídico de los aislados Hg ^R de aguas subterráneas.	59
28	Frecuencia de plásmidos presentes en los aislados Hg ^R .	60
29	Pruebas bioquímicas realizadas a los aislados Hg ^R .	61
30	Dendograma generado a partir de estudios bioquímicos (presencia de enzimas) de aislados Hg ^R utilizando distancia Euclideana.	63
31	Extracción de ADN cromosomal de los aislados Hg ^R .	64
32	Análisis de espacios intergénicos ribosomales (RISA) de aislados Hg ^R .	64
33	Dendograma generado a partir del análisis de espacios intergénicos ribosomales (RISA) de aislados Hg ^R utilizando distancia Euclidiana.	65
34	Amplificación por PCR del ADNr 16S.	66

35 A. Árbol Filogenético de los aislados Hg ^R .	68
35 B. Árbol Filogenético de los aislados Hg ^R .	69
36 Conjugación en parche en medio LB (dilución 1/3).	70
37 Control de ensayo de transferencia de marcadores de resistencia al Hg por conjugación.	70
38 Aislamiento de plásmidos del transconjugante Hg ^R Rif ^R .	71

bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS.

Nº Título	Pág.
1 Programa de PCR utilizado para la amplificación del gen <i>mera</i> .	33
2 Programa de PCR utilizado para la amplificación de genes que codifican para la subunidad pequeña del ARNr.	38
3 Programa de PCR utilizado para la amplificación de genes que codifican para el ADNr 16S.	40
4 Valores de pH y temperatura en las muestras de aguas subterráneas.	42
5 Determinación de Hg y otros metales pesados en muestras de aguas subterráneas.	44
6 Densidad bacteriana (UFC/ml) de las muestras de aguas subterráneas.	45
7 Porcentaje de aislados Hg ^R y MeHg ^R en muestras de aguas subterráneas.	45
8 Caracterización morfológica de los aislados Hg ^R .	60
9 Ensayos bioquímicos realizados a los aislados Hg ^R .	61
10 Identificación molecular de aislados Hg ^R .	67
11 Identificación bioquímica de aislados Hg ^R .	91

ÍNDICE GENERAL.

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

El mercurio	2
Ciclo del mercurio	4
Toxicidad del mercurio	6
Resistencia microbiana a metales	9
Resistencia bacteriana al Hg	11
Contaminación mercurial en El Callao, Edo Bolívar	17
Estudio de las comunidades microbianas en aguas subterráneas	21
Contaminación de aguas subterráneas por metales pesados	24
Hipótesis del trabajo	26
Objetivo General	27
Objetivos Específicos	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
1 Recolección de muestras.	29

2	Aislamiento y cuantificación de bacterias Hg ^R provenientes de aguas subterráneas De la región de El Callao.	29
3	Caracterización de bacterias Hg ^R provenientes de aguas subterráneas de los diferentes niveles estudiados	
3.1	Estimación de los niveles de resistencia de los aislados Hg ^R Y MeHg ^R	30
4	Cuantificación de Hg y otros elementos en las muestras de agua subterráneas recolectadas en la región de El Callao.	30
5	Determinación de los patrones de resistencia a antibióticos y otros metales pesados en medio LB agarizado.	31
6	Determinación de los patrones de resistencia a antibióticos y otros metales pesados en medio LB líquido.	31
7	Prueba de Gram por el método KOH	32
8	Amplificación del gen merA.	32
9	Estudio del perfil plasmídico de los aislados Hg ^R .	34
10	Identificación morfológica de aislados Hg ^R .	35
11	Pruebas Bioquímicas.	36
12	Extracción de ADN genómico.	36
13	Estudio de la diversidad microbiana de las aguas subterráneas.	
13.1.	Análisis de espacios intergénicos del ARNr.	38
14.	Identificación molecular de los aislados Hg ^R .	39
14	Ensayos de conjugación in vitro entre aislados Hg ^R y cepas potencialmente patógenas para el hombre.	
	Conjugación en parche.	40

RESULTADOS

42

1. Análisis fisicoquímico de muestras de aguas subterráneas de la Mina Colombia, El Callao (Estado Bolívar).	
1.1 Determinación de pH y temperatura de muestras de aguas subterráneas.	43
1.2 Determinación de Hg y otros metales pesados.	43
2.- Análisis microbiológico de las aguas subterráneas de la mina Colombia.	44
3. Caracterización de bacterias Hg ^R provenientes de aguas subterráneas de los diferentes niveles estudiados.	
3.1 Estimación de los niveles de resistencia de los aislados Hg ^R y MeHg ^R .	46
4. Resistencia a antibióticos de los aislados Hg ^R .	47
5. Resistencia de los aislados Hg ^R a otros metales pesados.	54
6. Prueba de Gram de los aislados Hg ^R por el método de KOH.	56
7. Determinación de la presencia del gen merA en los aislados Hg ^R .	57
8. Estudio del perfil plasmídico de los aislados Hg ^R .	59
9. Caracterización morfológica de los aislados Hg ^R .	60
10. Caracterización bioquímica de los aislados Hg ^R .	60
11. Extracción de ADN cromosomal de los aislados Hg ^R .	63
12. Análisis de espacios intergénicos ribosomales (RISA).	64
13. Identificación molecular de los aislados Hg ^R .	65
14. Ensayos de conjugación in vitro entre aislados Hg ^R y cepas potencialmente patógenas para el hombre.	69

DISCUSIÓN	72
1. Análisis fisicoquímico de muestras de aguas subterráneas de la Mina Colombia, El Callao (Estado Bolívar).	
1.1 Determinación de pH y temperatura de muestras de aguas subterráneas.	72
1.2 Determinación de Hg y otros metales pesados.	73
2.- Análisis microbiológico de las aguas subterráneas de la mina Colombia	76
3. Caracterización de bacterias Hg ^R provenientes de aguas subterráneas de los diferentes niveles estudiados.	
3.1 Estimación de los niveles de resistencia de los aislados Hg ^R y MeHg ^R .	78
4. Resistencia a antibióticos de los aislados Hg ^R .	80
5. Resistencia de los aislados Hg ^R a otros metales pesados.	83
6. Presencia del gen merA en los aislados Hg ^R .	85
7. Estudio del perfil plasmídico de los aislados Hg ^R	86
8. Caracterización morfológica de los aislados Hg ^R .	87
9. Caracterización bioquímica de los aislados Hg ^R .	87
10. Análisis de espacios intergénicos ribosomales (RISA).	92
11. Identificación molecular de los aislados Hg ^R .	93
12. Ensayos de conjugación in vitro entre aislados Hg ^R y cepas potencialmente patógenas para el hombre.	96
CONCLUSIONES	99
PERSPECTIVAS	101

BIBLIOGRAFIA

102

ANEXOS

118

Secuencia del gen ADNr 16s de los aislados Hg^R.

bdigital.ula.ve

ESTUDIO DE COMUNIDADES BACTERIANAS RESISTENTES AL MERCURIO QUE COLONIZAN AGUAS SUBTERRÁNEAS EN EL CALLAO, ESTADO BOLÍVAR

Autor: Maura Lina Rojas Pirela

Resumen

El sur de Venezuela presenta elevados niveles de contaminación por mercurio debido a la actividad de mineros artesanales del oro. En estudios anteriores, nuestro grupo evaluó el efecto de la contaminación mercurial sobre comunidades bacterianas que colonizan aguas superficiales. Sin embargo no se ha estudiado el efecto de esta contaminación sobre bacterias que colonizan aguas subterráneas. Con este fin se recolectaron muestras de aguas subterráneas profundas (134, 288 y 388m) provenientes de una mina de oro en la región de El Callao, Estado Bolívar. Los aislados bacterianos obtenidos se estudiaron en función de su resistencia al mercurio, metil-mercurio y a otros metales pesados (Cu^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} y Pb^{+2}). Se evaluó igualmente la resistencia a varios antibióticos. Además se determinó la presencia del gen *merA* (que codifica para una mercurio reductasa, responsable de la resistencia a Hg) por PCR. Finalmente los aislados resistentes al mercurio se identificaron mediante técnicas bioquímicas y moleculares (análisis de la secuencia del gen ADNr 16S). A pesar de que en las muestras de aguas no se detectó la presencia de mercurio, se obtuvieron aislados Hg^R con una frecuencia entre 25% y 60% del total de los aislados obtenidos. Los resultados de las pruebas de resistencia a otros metales y a varios antibióticos revelaron que los aislados Hg^R presentan altos porcentajes de resistencia a los metales y antibióticos ensayados. El gen *merA* se pudo amplificar a partir del 78% de estos aislados. Las técnicas empleadas permitieron detectar la presencia de bacterias pertenecientes a los géneros, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Micrococcus*, *Petrobacter*, *Caulobacter* y *Brevudimonas*. Los resultados mostraron la existencia de una elevada diversidad de las comunidades bacterianas que colonizan de las aguas subterráneas de la mina Colombia. Finalmente, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la presencia de bacterias Hg^R en aguas subterráneas es producto de una contaminación de estos cuerpos de agua por aguas provenientes de las “lagunas de cola”, altamente contaminadas con Hg, con una alta diversidad de bacterias resistentes al Hg, a diversos antibióticos y a otros metales. Esto ocurriría gracias a las inundaciones anuales y filtraciones.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se estima que más de un millón de sustancias diferentes son introducidas en las aguas naturales a través de los vertidos antropogénicos; aunque muchas de éstas sustancias no son calificadas como tóxicas, tienen la capacidad de alterar las características físico-químicas del agua, los ecosistemas acuáticos y/o ser nocivas para el hombre (Föstners y col., 1993).

La presencia de contaminantes orgánicos e inorgánicos ha ocasionado, en la mayoría de los casos, la transformación de los cuerpos de agua en los cuales el equilibrio natural se ha visto severamente perturbado y en muchos casos totalmente destruido. Los componentes químicos potencialmente tóxicos, que suelen estar presentes en los cuerpos acuáticos son los metales pesados entre ellos se encuentran el mercurio (Hg), el antimonio (Sb), el Cadmio (Cd), el cobre (Cu), el cromo (Cr), el níquel (Ni), el plomo (Pb), el selenio (Se) y el zinc (Zn). La incorporación de estos metales al ciclo hidrológico se debe principalmente, a las fuentes de origen litogénico y de origen antropogénico (Föstners y Wittman, 1993).

A diferencia de los contaminantes orgánicos, los metales pesados generalmente no se eliminan de los ecosistemas acuáticos por procesos naturales debido a que no son biodegradables. Por el contrario, estos metales son muy contaminantes y experimentan diversos cambios y transformaciones eco-biológicas que hacen que los cuerpos de agua sean su principal camino de entrada al medio ambiente (Murray, 1996). Hoy en día se sabe que los metales pesados son utilizados como indicadores de la calidad ecológica de las aguas debido a su toxicidad y muy especialmente, a su comportamiento bioacumulativo. El efecto tóxico, la alta persistencia y la rápida acumulación por los organismos vivos, son características que le confieren una gran importancia al estudio de los metales pesados en ambientes acuáticos (Moalla, 1998).

Todos los metales pesados son considerados altamente tóxicos para los organismos. Uno de los más estudiados ha sido el mercurio (Hg), considerado como uno de los metales pesados más tóxicos, razón por la que ocupa la sexta posición en la lista de los compuestos más

peligrosos y tóxicos en el universo, de un total de 6 millones de sustancias que existen en la naturaleza (Nascimento y Chartone-Souza, 2003; Larceda y col., 1991).

El **mercurio** (Hg) es un metal pesado que se genera de manera natural en el medio ambiente (PNUMA, 2002). Se caracteriza por encontrarse en estado líquido, ser de color plata brillante, conductor de la electricidad y relativamente inerte ante el oxígeno y los ácidos. En forma líquida es volátil entre los 20 y 25 °C y es soluble en líquidos polares y no polares. El Hg es poco abundante en la corteza terrestre, su concentración natural es de 0,08 ppm (Sepúlveda y col., 2006).

En la naturaleza, el Hg se encuentra y se extrae como sulfuro de mercurio (mineral de cinabrio) el cual ha sido utilizado como fuente mineral para la extracción comercial de Hg metálico (PNUMA, 2002).

El Hg se presenta en las cadenas tróficas y ecosistemas gracias a la influencia de un gran número de procesos, incluyendo físicos, químicos y biológicos (Morel y col., 1998). A partir de este metal se pueden formar muchos compuestos orgánicos e inorgánicos, los cuales poseen características biológicas y toxicológicas diferentes (Doadrio, 2004; PNUMA, 2002).

Las especies inorgánicas presentes dentro de las cadenas tróficas están constituidas por el propio Hg metálico, el óxido de mercurio (HgO) y dos especies iónicas: el catión mercuríco Hg^{+2} y el mercurioso Hg_2^{+2} . Tanto el Hg metálico como el HgO se encuentran en la atmósfera, y son fuentes continuas de contaminación (Doadrio, 2004).

Cuando el Hg se combina con el carbono, se forman compuestos conocidos como compuestos “orgánicos” de Hg u organomercuriales. Existe una gran cantidad de compuestos orgánicos de Hg (dimetilmercurio $((\text{CH}_3)_2\text{Hg})$, fenilmercurio $(\text{C}_6\text{H}_5\text{Hg})$, etilmercurio (CH_2Hg)) pero el de mayor interés es el metilmercurio (CH_3Hg) . Este tiene la capacidad de acumularse en los animales marinos; por lo tanto su incorporación en las cadenas tróficas es mucho más fácil (PNUMA, 2002). De igual manera las sales de

metilmercurio y de fenilmercurio son de gran interés por su utilización en la agricultura (Doadrio, 2004; Adobowale, 2004).

Con el inicio de la era industrial los niveles de Hg en el medio ambiente se han elevado drásticamente, ya que gracias a las actividades antropogénicas se ha producido una mayor exposición humana, animal y vegetal a este metal a través de emisiones y vertidos de origen industrial o por medio de productos químicos que lo contienen, como fungicidas y pesticidas (PNUMA, 2002).

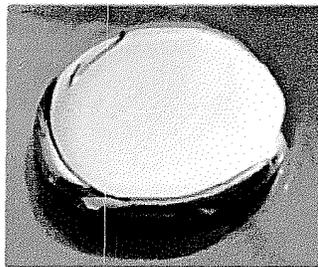


Figura 1. Mercurio metálico en su forma líquida. El Hg metálico representa la forma más pura del Hg. Este se caracteriza por ser un líquido brillante, inodoro y de color plata brillante con una densidad mayor que la del agua (Higueras y Oyarzum, 2005).

En efecto, este tóxico tan potente contamina nuestro medio ambiente a través de:

- 1.- Emisiones naturales: erupciones volcánicas, a través de los movimientos de rocas.
- 2.- Emisiones antropogénicas: combustión de combustibles fósiles, procesos de incineración, cementeras, industrias cloro-alcálicas, minería, etc.
- 3.- Depósitos creados por las emisiones naturales y antropogénicas, que nuevamente se evaporan pasando a la atmósfera e introduciéndose en los ciclos biológicos (PNUMA, 2002; Doadrio, 2004).

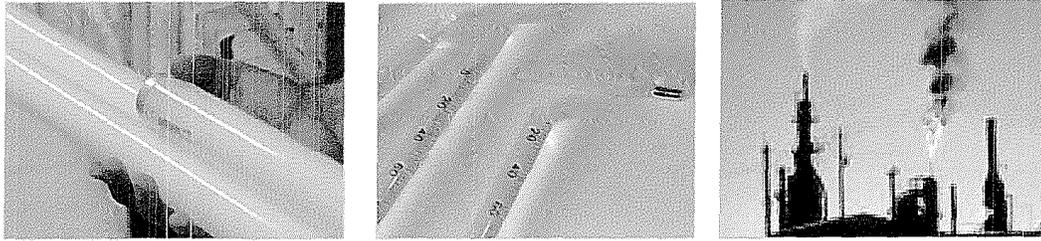


Figura 2. Algunas fuentes de contaminación con Hg. Gran parte del Hg encontrado en la atmósfera y en los ecosistemas hídricos proviene de actividades realizadas por el hombre. A. Lámparas fluorescentes. B. Termómetros. C. Las industrias cloro alcalina son una fuente muy importante de contaminación de Hg

Por tratarse de un elemento, el Hg no puede descomponerse ni degradarse a sustancias más inofensivas. Durante su ciclo, el Hg puede cambiar de estado y especie. Una vez liberado a partir de los minerales o depósitos de combustibles fósiles y material mineralógico yacente en la corteza terrestre, es emitido a la biosfera. El Hg puede tener gran movilidad y circular entre la superficie terrestre y la atmósfera. Los suelos superficiales de la corteza, las aguas y los sedimentos de fondo se consideran los principales depósitos biosféricos de Hg (PNUMA, 2002).

Ciclo del mercurio

El ciclo del Hg en el medio ambiente involucra una serie de transformaciones químicas, físicas y biológicas que se presentan en el aire, suelo y cuerpos acuáticos (Rosas, 2001) (Figura 3).

A diferencia de la mayoría de los metales, el Hg tiene un ciclo con una fase atmosférica dominante, donde las principales fuentes de incorporación a la atmósfera son: el vulcanismo, el proceso de desgasificación del Hg metálico (Hg^0), la sublimación, los procesos físicos en la corteza terrestre, la fotoreducción y la actividad microbiana en la biosfera.

El Hg también puede entrar al ciclo atmosférico por medio de actividades antropogénicas a través de vertidos industriales atmosféricos, actividades mineras relacionadas con la

extracción de oro, producción de cemento, actividades metalúrgicas, incineración de basura y procesos de combustión (PNUMA, 2002 ; Doadrio, 2004).

La mayor parte del Hg elemental se evapora y permanece en la atmósfera, a veces hasta un año, donde reacciona con el ozono y otros oxidantes para formar compuestos iónicos, sumamente solubles (como Hg^{+2}) que se depositan en la tierra, introduciéndose en las cadenas tróficas por el ciclo del agua o por inhalación directa (Ortega y col., 2003, Barkay y col., 2003). En el suelo, el Hg también se hace presente, debido a su utilización en la agricultura como fertilizantes y fungicidas alquilmecuriales para el tratamiento de semillas (Adebowale, 2004; US EPA, 1997).

En ecosistemas de agua dulce la mayor parte del Hg se asocia con la materia orgánica formada por los organismos vivos, partículas de detritus y sustancias húmicas disueltas (Ortega y col., 2003; PNUMA, 2002).

Durante su ciclo, el Hg puede sufrir dos tipos de biotransformaciones por parte de microorganismos presentes en la tierra y en el agua, e incorporarse en las cadenas tróficas en forma de CH_3Hg (MeHg). La primera es la reducción de Hg^{+2} a Hg metálico en condiciones reductoras apropiadas; la segunda consiste en la transformación a compuestos metilados y las interconversiones de dichos compuestos, las cuales se pueden producir en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Sepúlveda y col., 2006). El cambio de especies inorgánicas a especies orgánicas como el MeHg constituye el primer paso en el proceso de bioacumulación en las especies acuáticas, mediante la entrada a las cadenas alimenticias acuáticas, afectando finalmente la salud de las poblaciones humanas que consumen estos peces contaminados (Mendioroz, 1998; Barkay y col., 2003). Casi el 100% del Hg presente en los peces depredadores se encuentra en forma de MeHg (PNUMA, 2002). A su vez, el MeHg puede transformarse en Hg_2^{+2} , el cual se oxida fácilmente a Hg^{+2} , siguiendo su ciclo de biotransformación en Hg metálico, el cual se deposita en los sedimentos (Doadrio, 2004).

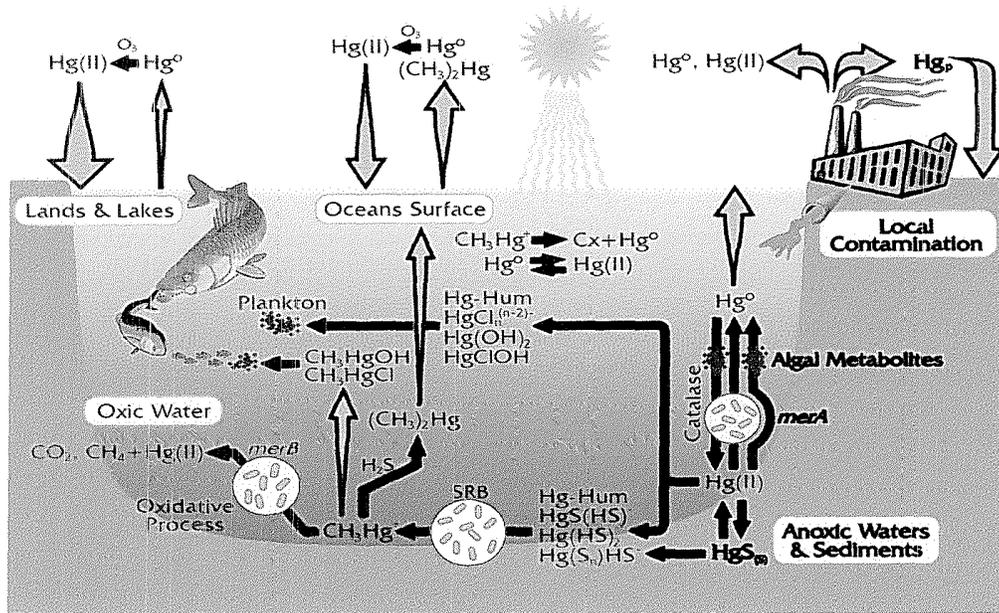
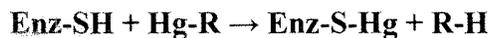


Figura 3. Ciclo del mercurio. Durante su ciclo el Hg puede sufrir diversas transformaciones. Por acción de microorganismos puede ser transformado a especies altamente tóxicas como el MeHg (Barkay y col., 2005).

bdigital.ula.ve

Toxicidad del mercurio

La toxicidad del Hg se origina de la inhibición que este ejerce sobre algunas enzimas esenciales para el organismo (Barkay y Wagner-Döbler, 2005). La intoxicación por este metal da como resultado un deterioro de las funciones biológicas de ciertas enzimas con grupos tioles, debido a la fijación de los alquil-mercurio sobre ellos para formar mercaptanos .



S: Ión de azufre que conforma el grupo sulfidrilo

H: Hidrógeno del grupo sulfidrilo desplazado por el Hg

R: Radical orgánico o inorgánico asociado a Hg (según la especie)

Esta fijación es muy estable inhibiendo la acción de la enzima correspondiente dando origen a “las lesiones metabólicas del Hg” (Mendioroz, 1998).

La toxicidad del Hg va a depender de su forma química; por lo tanto los síntomas y signos van a variar según la especie y la forma a la cual ha estado expuesto el organismo, ya sea el Hg^0 , los compuestos inorgánicos del Hg o los compuestos orgánicos de Hg (como el MeHg y EtHg) (PNUMA, 2002).

Adicionalmente, dependiendo de la especie química del Hg, la absorción se produce preferentemente por vía gastrointestinal, respiratoria o cutánea. Sin embargo, una diferencia bastante notoria entre los compuestos inorgánicos y orgánicos del Hg, es que los compuestos inorgánicos son absorbidos de manera más eficaz por el organismo mediante el sistema digestivo, mientras que las formas orgánicas pueden ser absorbidas por el organismo a través de varias vías (Ferrer, 2003).

Los daños ocasionados por las diferentes formas del Hg varían en su calidad y cantidad. La calidad depende de su localización en el organismo, mientras que la cantidad depende del organismo expuesto y de su capacidad de metabolización (es decir, su capacidad para eliminarlo). Por estas dos características, los derivados alquil-mercurios son muy dañinos ya que su estabilidad en el organismo hace que su eliminación sea muy lenta y que su acumulación ocurra de manera muy rápida en el sistema nervioso central, riñones y hematíes (Harada, 1995; Wiatrowski y Barkay, 2005).

En casos graves de intoxicación por compuestos orgánicos como el MeHg, altamente neurotóxico, los efectos son irreversibles, provocando la destrucción de neuronas. Estas especies mercuriales producen efectos perjudiciales en el cerebro en formación debido a su gran afinidad por el sistema nervioso y a la capacidad que tienen para atravesar la barrera placentaria y la hematoencefálica. También se ha sugerido que el MeHg pudiera ser un compuesto carcinógeno para los seres humanos y perjudicial para el sistema cardiovascular (PNUMA, 2002).

Los compuestos mercuriales son liposolubles. Esta característica le confiere la capacidad de atravesar las membranas celulares y llegar al interior celular e inactivar proteínas y enzimas citoplasmáticas con grupos sulfidrilos, amidas, carboxilos y fosforilos. Además de afectar

las enzimas y proteínas, los compuestos mercuriales también pueden perjudicar orgánulos celulares como mitocondrias, lisosomas, y microtúbulos (Ferrer, 2003).

El Hg en su forma elemental también puede producir serios problemas en el organismo. La vía principal de exposición al Hg elemental es por medio de la inhalación de sus vapores, los cuales son absorbidos por los tejidos pulmonares. Estos vapores también pueden atravesar con gran facilidad la barrera de sangre del cerebro. La inhalación de vapores de Hg causa trastornos neurológicos y de comportamiento (PNUMA, 2002) además de vómitos, temblores, labilidad emocional, insomnio, pérdida de memoria, cambios en el sistema neuromuscular y dolores de cabeza. En el caso de intoxicaciones crónicas, puede causar el síndrome vegetativo asténico (Gebauer y Connor, 1991). La forma elemental es poco absorbida por el intestino y puede oxidarse en los tejidos corporales a la forma divalente inorgánica (Pullicino y col., 1985, Mclauchlan, 1991).

En la historia de la humanidad han ocurrido varias tragedias por el uso indiscriminado del Hg. Entre algunas de las epidemias tóxicas alimentarias más graves que han implicado el Hg se encuentran: la enfermedad de Minamata, en la década de los 50, causada por el consumo de peces contaminados con MeHg; y el envenenamiento en Irak, en la década de los 60, por la utilización de compuestos organomercuriales para el tratamiento de semillas de trigo utilizadas en la elaboración del pan (Ferrer y Cabral, 1993; Mendioroz, 1998).

El Hg no solo produce alteraciones en el hombre, animales y ecosistemas, sino también su utilización industrial puede afectar la economía de los países que dependen de la pesca como actividad importante; además puede influir en la producción agrícola y en el uso de las tierras y las aguas. Por tanto, la contaminación con Hg es un problema mundial (PNUMA, 2002).

A pesar de que en los últimos años se ha tenido un mayor conocimiento de los riesgos que implica la utilización del Hg, este metal sigue siendo objeto de uso y comercio en el mercado internacional. Es utilizado en plaguicidas (sobre todo en tratamientos de semillas) y biocidas, pinturas, productos farmacéuticos, cosméticos, en la minería, interruptores eléctricos, lámpara fluorescentes, amalgamas dentales, baterías (como dióxido), en

reactivos para análisis de laboratorio, pigmentos y colorantes, detergentes, explosivos, jabones, nanómetros y termómetros, soluciones para lentes de contacto y como catalizador en la industria cloro-alcaldina (PNUMA, 2002; Doadrio, 2004).

Resistencia microbiana a metales

La presencia de elevados niveles de metales pesados en ambientes contaminados ejerce una fuerte presión selectiva sobre los organismos que colonizan estos sitios (Cervantes y Vaca, 1990; Silver y Misra, 1988). La contaminación por metales puede alterar cualitativa y cuantitativamente la composición y la estructura de las comunidades microbianas, ya que afecta el crecimiento, la morfología, la bioquímica y la actividad de los microorganismos, disminuyendo su biomasa y su diversidad (Barkay y col., 1985; Malik y col., 2002; Nakatsu y col., 2005). Si la descarga del contaminante es de carácter permanente, como sucede habitualmente con los metales pesados, se produce una selección de aquellos genotipos que pueden sobrellevar dicho estrés (Silver y Walderharg, 1992).

La supervivencia de las bacterias en suelos contaminados con metales pesados depende de sus propiedades bioquímicas, estructurales, fisiológicas y/o de la adaptación genética (que incluye cambios morfológicos de las células así como modificaciones del metal presente en el entorno) de los microorganismos (Ehrlich, 1997; Wuertz y Mergeay, 1997). La presencia de metales tóxicos en el medio ambiente va a dar origen a una relación contaminante-microorganismo, la cual va generar una serie de procesos adaptativos que finalmente se expresan como mecanismos de adaptación al contaminante los cuales permiten sobrellevar el estrés y posterior supervivencia de los microorganismos (Montuelle y col., 1994; Silver y Phung, 2005). Estos mecanismos de resistencia a los metales pesados incluyen sistemas de volatilización, precipitación, reducción, desmetilación, exclusión y secuestro intracelular, los cuales se harán presentes según el tipo de interacción que ocurra entre la bacteria y el metal (Roane y Kellog, 1996, Nascimento y Chartone-Souza, 2003).

Se sabe que las interacciones entre bacterias y metales pueden ocurrir a nivel extracelular, en la superficie o intracelularmente. A nivel extracelular se ha observado que existen organismos capaces de movilizar e inmovilizar metales, que además secretan compuestos

orgánicos de bajo peso molecular con elevada afinidad por estos compuestos (sideróforos) (Lindsay y Riley, 1994). Por otra parte, las interacciones del metal en la superficie celular dependen del tipo de bacteria, ya que el metal puede interactuar específicamente con grupos cargados negativamente presentes en la superficie de cada célula (Brierley y Brierley, 1997). Finalmente, a nivel intracelular la interacción se puede dar como consecuencia de la acumulación del metal, de transformaciones enzimáticas y/o de la síntesis de proteínas específicas conocidas como metalotioninas (Silver y Misra, 1988 Kasan, 1993).

Sin embargo, en la relación bacteria-metal puede ocurrir otro tipo de interacción muy particular en la que algunas bacterias tienen la capacidad de utilizar el metal como fuente de energía o como aceptor final de electrones en su metabolismo. Uno o más de estos mecanismos de resistencia permiten que muchos microorganismos puedan colonizar ambientes muy contaminados por metales (Lovley, 1991).

Estos mecanismos de resistencia pueden hacerse presentes gracias a que algunas bacterias son fisiológicamente adaptables a elevadas concentraciones de metales mediante la expresión de genes de resistencia. Estos genes también pueden ser adquiridos través de transferencia horizontal, por medio de elementos móviles como plásmidos, transposones e integrones. Estos elementos son capaces de diseminarse entre la comunidad de manera muy rápida, permitiendo la supervivencia de los microorganismos que lo reciben y la colonización del medio ambiente contaminado (Barkay y col., 1985, Barkay y col., 1995; Moraga y col., 2003).

La transferencia horizontal de genes es un mecanismo muy importante para la diversidad y evolución de las bacterias, ya que promueve la diseminación de un gran número de genes ocasionando un aumento de la diversidad genética y el enriquecimiento de los repertorios metabólicos con nuevas funciones fenotípicas de las comunidades bacterianas. La transferencia puede producirse entre células de especies y/o géneros diferentes y capacita a la célula receptora de funciones que inicialmente no estaban presentes, tales como la resistencia a antibióticos, la resistencia a metales pesados, la producción de bacteriocinas, entre otros (Bogdanova y col., 1998; Coombs and T. Barkay, 2003; Cervantes y Vaca, 1990; Narváez y col., 2005).

Debido al gran interés que ha suscitado el estudio de la interacción entre las bacterias y los metales, este tema ha sido estudiado mediante diferentes disciplinas como biogeoquímica, geomicrobiología, toxicología y biotecnología. Esta última abarca el estudio de la deposición mineral, la contaminación biológica en la industria, la biocorrosión, la biomineralización, la lixiviación de metales y la biorremediación de contaminación por metales (Huang y col, 2002).

Resistencia bacteriana al Hg

En respuesta a la presencia de compuestos mercuriales en el ambiente, ciertos microorganismos han desarrollado diversos mecanismos de resistencia y detoxificación, que resultan de diversos tipos de transformaciones enzimáticas del Hg. Estos mecanismos de resistencia al Hg pueden ser observados en un gran espectro de bacterias Gram positivas y Gram negativas, aisladas de diferentes entornos naturales y clínicos (Nascimento y col, 2003).

Los principales mecanismos de resistencia al Hg implican:

- Metilación
- Oxidación de Hg^0 a Hg^{+2}
- Hidrólisis de compuestos organometálicos (como el MeHg)
- Formación de HgS insoluble
- Reducción de Hg^{+2} a Hg^0 (Barkay y Wagner-Döbler, 2005)

Uno de los mecanismos más estudiados en la resistencia al Hg es la reducción enzimática de los iones divalentes del mercurio (Hg^{+2}) a la forma elemental (Hg^0) menos tóxica para las bacterias, a través de una flavoenzima denominada mercurio reductasa (Nascimento y col., 2003).

Esta enzima es codificada por un gen que forma parte del operón *mer*; el cual es uno de los sistemas biológicos más importante en la detoxificación de compuestos orgánicos e inorgánicos del Hg. Este operón se puede encontrar en plásmidos, aunque también puede estar presente en transposones, cromosomas e integrones (Liebert y col., 1999; Nascimento y col., 2003). El operón *mer* está constituido por genes que codifican proteínas que tienen

diferentes funciones: proteínas reguladoras (*merR* y *D*), proteínas transportadoras de Hg (*merT*, *merP*, y/o *merC*, *merF*) y de reducción (*merA*); y en algunos casos la liasa organomercurial (*merB*) (Misra, 1992; Silver y Walderhaug, 1992). La enzima *merB* rara vez se encuentra en bacterias Gram negativas (Wang y col.; 1989) (Figura 4).



Figura 4. Representación esquemática de un operón *mer* de resistencia de amplio espectro al Hg en bacterias Gram negativas. El gen *merA* codifica para la enzima mercurio reductasa; *merB* para la liasa organomercurial; *merR* y *D* para reguladores transcripcionales; *merTP* codifican para las proteínas transportadoras del ión Hg^{2+} (Liebert y col., 1996).

La resistencia bacteriana al Hg mediada por el operón *mer* implica la reducción de la forma catiónica altamente reactiva del mercurio (Hg^{+2}) al vapor monoatómico de mercurio (Hg^0), relativamente inerte (Barkay y col., 2003). La enzima clave para esta reducción es la mercurio reductasa (MR), una flavoenzima citosólica que utiliza en su reacción el NADPH como agente reductor (Nascimento y col., 2003; Vetriani y col., 2005). Su inducción o represión depende de la concentración de Hg (Summer, 1972; Furukawa y Tonomura, 1972).

En la resistencia al Hg se han determinado dos espectros: la resistencia de espectro reducido, la cual confiere resistencia sólo al Hg inorgánico gracias a la enzima mercurio reductasa (*merA*); mientras que las bacterias de amplio espectro presentan, adicionalmente, resistencia a organomercuriales, ya que además de poseer el gen *merA* contienen el gen *merB*, el cual codifica la enzima liasa organomercurial, que corta los enlaces carbono-Hg del metilmercurio para formar CH_4 y Hg^{+2} , siendo este último reducido a Hg^0 por la enzima mercurio reductasa (Nascimento y col., 2003) (Figura 4).

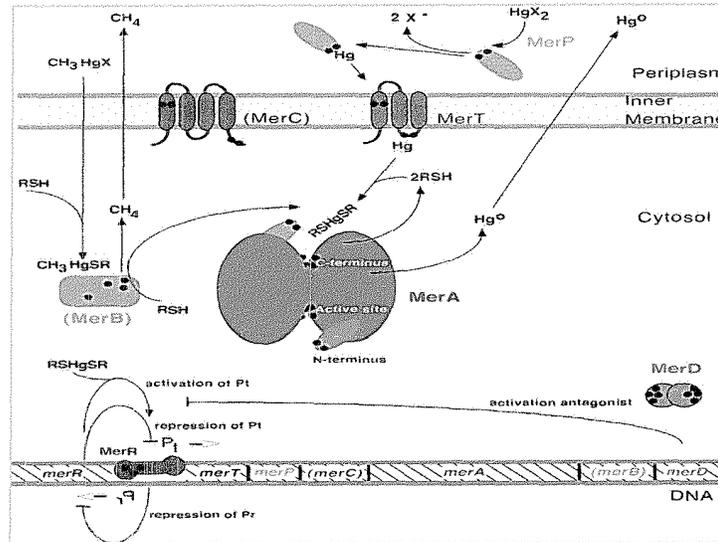


Figura 5. Destoxificación del Hg por bacterias resistentes. El Hg^{+2} difunde libremente hacia el periplasma, la proteínas de transporte lo transportan de manera específica al interior de la célula, donde es reducido a la especie Hg^0 por la mercurio reductasa (merA) (Barkay y col., 2003).

Se ha propuesto que el Hg^{+2} del medio difunde libremente a través de porinas de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, hacia el periplasma. Una vez localizado en ese lugar, la maquinaria enzimática codificada por el operón *mer* proporciona las proteínas que lo transportaran de manera específica al citoplasma, evitando así el daño celular (Barkay y Wagner-Döbler, 2005) (Figura 5).

Una vez en el periplasma, el Hg^{+2} es atrapado por merP, una proteína pequeña periplasmática. Esta proteína es un monómero que une Hg por medio de dos residuos de cisteínas, las cuales juegan un papel fundamental en la unión del metal. merP es la primera proteína específica que interactúa con el Hg^{+2} durante su entrada a la célula (Nascimento y col., 2003; Barkay y col., 2003).

merP transfiere el metal a la proteína membranar merT, por medio de dos residuos de cisteínas situadas en la primera de la tres hélices transmembranales. No se tiene muy claro como merT transfiere el Hg^{+2} al citosol; pero se cree que lo hace con ayuda de un segundo par de cisteínas presentes entre la segunda y la tercera hélice situadas de lado citoplasmático, las cuales se unen de manera di-coordinada al Hg^{+2} y lo transfieren al

citoplasma. Una vez el Hg en el citoplasma, las cisteínas citosólicas de merT, transfieren directamente el Hg^{+2} al dominio N-terminal de merA, la cual lo reduce a la forma volátil Hg^0 (Barkay y col., 2005; Morby y col., 1995). Finalmente, por ser soluble en lípidos, el Hg^0 difunde a través de la membrana de la célula sin necesidad o ayuda de un sistema de eflujo (Nascimento y col., 2003; Wagner-Do y col., 2000).

Las proteínas merP y merT son requeridas para la expresión de la resistencia al Hg; mutaciones en los genes que las codifican producen un menor nivel resistencia (Nascimento y col., 2003).

Además del sistema de transporte y reducción, el operón *mer* codifica proteínas reguladoras de la expresión de los genes estructurales. Estas funciones de regulación son realizadas por merR y merD. merR es una proteína metalo-reguladora, perteneciente a una familia de represores-activadores transcripcionales, que regula la expresión de los otros genes del operón *mer*. Cuando incrementa la concentración de Hg, este se une a merR y produce un cambio alostérico en la proteína que permite el inicio de la transcripción de los genes estructurales (Barkay y col., 2003; Barkay y col., 2005; Schaefer y col., 2004). La transcripción del operón *mer* es inducible y de manera proporcional a la concentración de Hg^{+2} presente en el medio (Ralston y O'Halloran, 1990; Rasmussen y col., 1997).

Por su parte, merD parece ser un antagonista de la función de merR. La función antagónica de merD es importante ya que, en ausencia de Hg^{+2} , la expresión de merA debe ser rápidamente reprimida, porque como otras flavinreductasas, merA en ausencia de su sustrato, tiene una actividad oxidasa que lleva a la producción compuestos tóxicos de peróxido de hidrógeno (Hawkins y Freedman, 1976). Esta proteína es muy común en bacterias Gram negativas (Barkay y col., 2003).

Se han encontrado diferencias en la organización de los genes que confieren resistencia al Hg. Sin embargo, la posición de ciertos genes dentro del operón *mer* es muy conservada entre las diferentes especies (Barkay y Wagner-Döbler, 2005) (Figura 6).

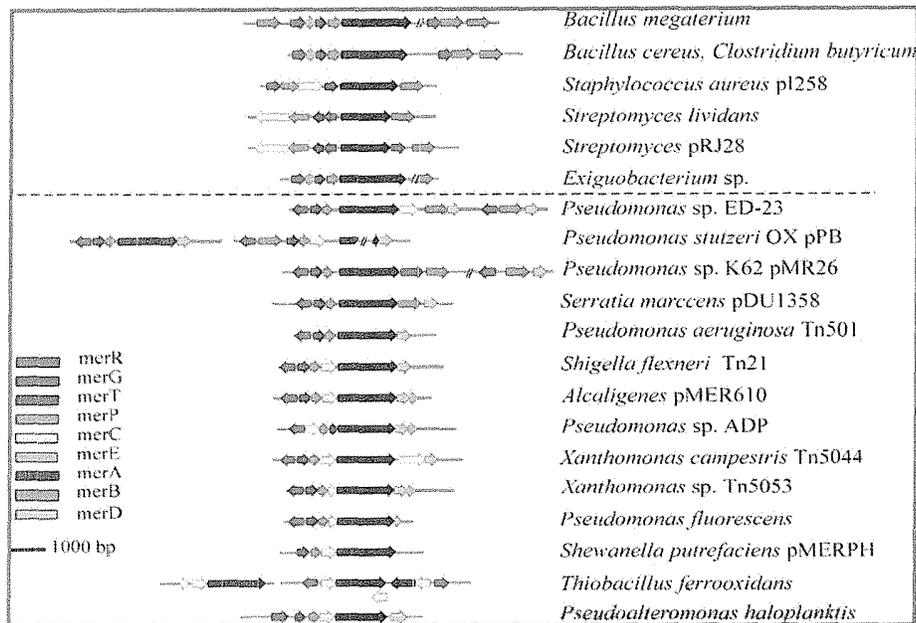


Figura 6. Diversidad del operón *mer* en distintas especies bacterianas Gram negativas y Gram positivas.

El considerable polimorfismo que posee el operón *mer* se debe a la presencia de una zona de ADN, objeto de amplios cambios intra e inter-genéticos, lo cual origina diversas combinaciones en su organización estructural (Figura 7). Las secuencias que flanquean a *merA* son muy importantes para la inserción de algunos genes accesorios (Liebert, 1997). Se ha observado una clara evolución en este operón por la adquisición, delección y recombinación de genes; lo cual puede explicar la fuerte selección del operón *mer* en microorganismos que han evolucionado en ambientes contaminados con Hg (Essa y col., 2003; Pearson y col., 1996).

Además, este polimorfismo hace que el operón *mer* sea considerado un mosaico genético, en el que su estructura básica consiste de genes reguladores (*merR* y *merD*), genes de transporte (*merT* y *merP*) y *merA* (Barkay y col., 2005).

A las funciones básicas, se añaden otras que facilitan la resistencia y degradación de compuestos organomercuriales (*merB* y *merG*), y amplificación de las funciones de transporte (*merC*, *merF* y *merE*) (Barkay y col., 2005). Los genes *merC*, *merF* y *merB*,

merG y merE suelen designarse como genes accesorios ya que se hacen presente sólo en algunos operones *mer* (Schaefer y col., 2004) (Figura 7).

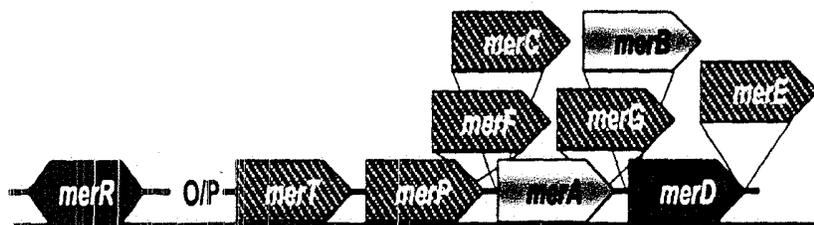


Figura 7. Genes que han sido observados en el operón *mer*. Además de los genes básicos (*merATPRD*) también se han observado genes accesorios (*merFGCEB*), que amplifican las funciones de transporte y resistencia (Barkay y col., 2003).

La presencia del operón *mer* en elementos móviles permite que su diseminación sea más rápida en las comunidades de bacterias, pudiendo inclusive pasar de unas especies a otras poco relacionadas filogenéticamente (Barkay y col., 2005). Se ha observado que la mayoría de los transposones en los cuales se encuentra el operón *mer*, pertenecen a la familia de Clase II (Pearson y cols., 1996).

También se ha puesto en evidencia que las bacterias que contienen el operón *mer*, tienen una elevada probabilidad de presentar múltiples resistencias a otros metales pesados y/o antibióticos. Esto se debe a que estas bacterias pueden adquirir adicionalmente, factores de resistencia antibióticos y a otros metales pesados, que se encuentran ligados genéticamente al operón *mer*, en elementos genéticos móviles, como los plásmidos de tipo conjugativo (Wireman y col., 1997; Barkay y col., 2003).

La asociación del operón *mer* con genes que confieren resistencia a antibióticos es muy frecuente (Barkay y col., 2003; Paniagua y col, 2003). Un ejemplo de esto es el plásmido penicilinase (Pcase) que frecuentemente se encuentra en *S. aureus* el cual posee genes que determinan resistencia a los antibióticos penicilina y macrólidos, así como a los metales pesados mercurio, arsénico, bismuto, plomo, cadmio y zinc (Neville y col, 2000). Esta asociación genética tiene una gran importancia desde el punto de vista epidemiológico, ya

que la transferencia de genes de resistencia a antibióticos promueve la selección de bacterias (muchas veces patógenas) que adquieren la resistencia, lo cual les permite desarrollarse en detrimento de aquellas que no la adquirieron (Paniagua y col., 2003).

Contaminación mercurial en El Callao, Edo Bolívar

El oro constituye una de las riquezas naturales más importantes con las que cuenta Venezuela. Los principales yacimientos se encuentran ubicados en el Estado Bolívar y su explotación data desde la llegada de los colonizadores españoles (Carrasquero y Adams, 2002).

La extracción de este mineral se lleva a cabo en poblaciones como El Callao, ubicado en la parte noroeste del Estado Bolívar; a 150 Km de Ciudad Guayana. Las actividades mineras en esta zona son de muy vieja data, desde finales del siglo XIX, cuando incursionaron compañías inglesas y francesas de pequeña minería a cielo abierto o minería artesanal, esta última aun en práctica (Berroterán y col., 2003).

Sin embargo, en las últimas décadas, ha habido un resurgimiento y aumento de la Minería de Pequeña Escala (MPE), la cual incluye tanto a la minería artesanal como a la pequeña minería (Bermúdez y Milano, 2002). Estas actividades mineras de pequeña escala en su mayor parte están en manos de garimpeiros, indígenas y mineros venidos de otros Estados. Este resurgimiento de la MPE ha generado una gran contaminación de los cuerpos de agua con Hg metálico, proveniente del proceso de extracción del oro (Botto y col., 2000).

A pesar de la elevada toxicidad del Hg, la extracción con este metal es uno de los procedimientos más empleados para obtención del oro en la MPE que se practica en El Callao. Esta técnica es empleada en decenas de centros de procesamiento (''molinos'') que se encuentran en los alrededores de El Callao para la recuperación de las partículas finas de oro. El proceso se basa en la molienda del material rocoso seguida de la formación de una amalgama del oro con el Hg. La diferencia de peso específico entre el Hg y el oro, permite

que durante la formación de la amalgama el oro sea recuperado manualmente (Carrasquero y Adams, 2002).

Posteriormente, la amalgama es colocada en un trípode y calentada con un soplete a fin de separar el Au, mientras que el Hg se volatiliza hacia la atmósfera (Figura 8). Durante todo este proceso de extracción, el exceso del metal pesado es liberado en arroyos, estanques, escombreras y “lagunas de cola”; por lo que este procedimiento constituye una fuente importante de alteración y contaminación de los cuerpos de agua, de los suelos, así como de la flora y de la fauna (Bermúdez y Milano, 2002; Carrasquero y Adams, 2002).

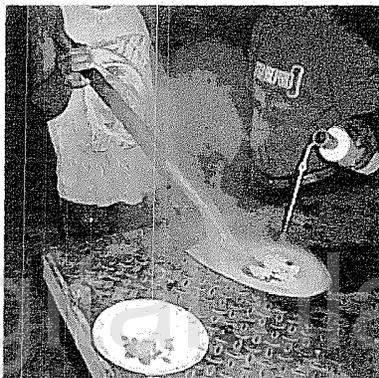


Figura 8. Calentamiento de la amalgama con un soplete para la recuperación del Au. Durante este proceso el Hg se escapa hacia la atmósfera por volatilización.

Debido al uso indiscriminado del Hg, en los últimos años se han realizados varios estudios en la zona de El Callao. Entre ellos se encuentra el realizado por la Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial (ONUUDI) en el 2004, el cual reveló que las emisiones de Hg en la zona de El Callao podían ser muy cercanas a 12 toneladas/año. Además, se determinó que los niveles de intoxicación con Hg de los mineros y molineros de El Callao se encontraban entre los más altos del mundo. También se pudo evidenciar que aproximadamente el 90% de los trabajadores de centros de procesamientos y el 53% de los niños evaluados tenían niveles de Hg en la orina superiores a los niveles de alertas propuestos por la Organización Mundial para la Salud (OMS).

Los niveles de alerta propuestos por la OMS para la contaminación humana por Hg son los siguientes: nivel de alerta: 5 µg de Hg/g de creatinina en la orina; nivel de acción: 20 µg de Hg/g de creatinina en la orina y nivel máximo: 50 µg de Hg/g de creatinina en la orina.

En este estudio se evidenció que varios síntomas neurológicos, característicos de intoxicación por Hg, se hacían presentes en mujeres, niños, mineros y molineros. Dentro de estos síntomas se observaban: ataxia, temblor (manos y ojos) e incapacidad para ejecutar movimientos alternos en forma rápida.

En el mismo informe también se reportó que a partir de muestras de orina provenientes de 209 personas de la población de El Callao, se obtuvo que el 61,7% de la población analizada presentó niveles de Hg superiores a los niveles de alertas; el 33% presentó niveles superiores al nivel de acción; un 20% presentó niveles superiores al nivel máximo y un 15% de la muestra presentó niveles superiores a los 100 µg Hg/g de creatinina. Los individuos que presentaron más de 100 µg de Hg presentaban síntomas y alteraciones neurológicas (ONUDI, 2004).

Un segundo informe presentado por la ONUDI en Julio del año 2005 señaló que las alteraciones encontradas en los exámenes médicos y las pruebas neuropsicológicas de las personas expuestas indirectamente a los vapores del Hg, llaman a una acción inmediata para reducir las emisiones y la exposición de gente inocente a este agente contaminante.

Herrero y col. (2001) estudiaron la contaminación por Hg en la comunidad de Santa María del Vapor (población cercana a El Callao), mediante el análisis de muestras biológicas (cabello, sangre y orina), de agua, sedimentos del lecho y músculos de peces del río Cuyuní. Los resultados obtenidos los llevaron a concluir que esta población presentaba niveles graves de intoxicación por Hg, y que la actividad minera, la edad y el consumo de peces contaminados eran los principales factores de riesgo.

En el año 2002, Álvarez y col. realizaron un estudio sobre la contaminación por Hg de suelos y sedimentos de ríos del Estado Bolívar. Este estudio reveló que los niveles de Hg en los sedimentos de las áreas de estudios analizadas eran de 129 µg/g. Estos niveles eran 200

veces mayores que los valores encontrados en las áreas no contaminadas, en las cuales el contenido de Hg era de 0,06 $\mu\text{g/g}$.

Durán y col. (2005) realizaron un estudio de la contaminación por Hg en diferentes ríos de la región de El Callao por medio de la técnica de espectroscopia de absorción atómica por generación de vapor frío. Los resultados obtenidos revelaron una alta contaminación por Hg en las muestras de aguas colectadas, en las cuales los niveles de Hg y MeHg eran de 34,80 $\mu\text{g/ml}$ y 22,40 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

Por otra parte, Carrasquero y Adams (2002) realizaron un análisis de muestras de suelos mineros y no mineros procedentes de El Callao, en donde se obtuvo que el contenido total del metal pesado se ubicó en el intervalo de 0,20 mg Hg/g suelo hasta 20,1 mg Hg/g suelo. Estos resultados también revelaron que los valores más altos de Hg correspondían a depósitos de colas de molino contaminadas, y que el contenido de Hg en diferentes suelos muestreados presentaba variaciones significativas. Por medio de un estudio de fraccionamiento también pudieron evidenciar que alrededor del 80% del Hg total estaba fuertemente retenido por la materia orgánica y los sulfuros del suelo, lo que sugería una baja movilidad del metal pesado. Las fracciones de mayor solubilidad eran minoritarias, a excepción de algunas muestras en las que alcanzaban entre el 10% y el 20% del Hg total.

En este mismo estudio, las diferencias significativas del contenido de Hg encontradas entre muestras separadas a menos de 100 m sugirieron que el metal pesado presenta una movilidad muy baja con tendencia a acumularse en los lugares en donde es descargado. En este sentido, estudios realizados por Larceda y col. (1991) y Larceda y Solomons (1992) revelaron que el Hg de los depósitos contaminados de garimpos de Brasil exhibía una baja movilidad y que los procesos de transporte de este metal estaban asociados principalmente a la transferencia física de las partículas resuspendidas en el agua y a la erosión producida durante las lluvias.

Trabajos recientes en los cuales se estudió el efecto de la contaminación mercurial sobre comunidades bacterianas en aguas superficiales de El Callao, demostraron la existencia de bacterias indígenas resistentes al Hg y al MeHg en “lagunas de cola” de ésta región, las

cuales fueron también resistentes a diversos antibióticos y a otros metales pesados. Estas bacterias transferían por conjugación (*in vitro* e *in situ*) los genes de resistencia al Hg, antibióticos y otros metales a bacterias potencialmente patógenas para el hombre, con frecuencias del orden de 10^{-3} a 10^{-6} . Los marcadores de resistencia al Hg, antibióticos y otros metales pesados podían diseminarse entre especies poco relacionadas filogenéticamente, aunque con baja frecuencia (Ball y col, 2007; Gómez, 2007). Esto representa un problema de salud pública, ya se está seleccionando en estos cuerpos de agua el desarrollo de bacterias potencialmente patógenas para el hombre resistentes al Hg y con múltiples resistencias a antibióticos y otros metales pesados.

Estudio de las comunidades microbianas en aguas subterráneas

En vista de que lagunas altamente contaminadas con Hg (“lagunas de colas”) pueden causar una grave contaminación de los principales cuerpos de agua de la región y que existen más de 80 centros de procesamiento del oro cerca de El Callao, no se puede excluir la posible contaminación de aguas subterráneas a través de las lluvias o filtraciones.

El estudio de las comunidades microbianas que colonizan aguas subterráneas a grandes profundidades es un campo relativamente nuevo en la biología. Hasta hace 20 años se pensaba que por debajo de 50 m de profundidad las aguas eran relativamente estériles, debido a la ausencia de fuentes de energía clásicas (luz, sustancias orgánicas) capaces de sostener el crecimiento y el desarrollo de los microorganismos. Con el descubrimiento de fuentes alternas de energía para los seres vivos y con el estudio de los microorganismos extremófilos, esta visión cambió radicalmente. Gracias a las nuevas técnicas de Biología Molecular, se ha puesto de manifiesto la enorme diversidad y abundancia de microorganismos capaces de colonizar las grandes profundidades, incluso fosas localizadas a varios kilómetros de profundidad en el fondo de los océanos (Chapelle, 2000; Atlas y Bartha, 2005).

El estudio de los microorganismos que colonizan las aguas subterráneas ha tenido un gran impacto en áreas como la Biotecnología, Arqueobiología y Exobiología. En el caso de la Biotecnología, se han descubierto microorganismos con capacidades metabólicas

insospechadas, de gran utilidad en diferentes procesos industriales, y para la biorremediación de ambientes contaminados por metales pesados o elementos radiactivos. En el área de Arqueobiología, se considera que los organismos que viven a grandes profundidades se han mantenido aislados de la superficie terrestre durante varios miles o millones de años, por lo que podrían tener mucha relación con los primeros organismos que evolucionaron en nuestro planeta (Chapelle, 2000; Atlas y Bartha, 2005)

Finalmente, la Exobiología (llamada anteriormente Astrobiología) desarrolla herramientas para investigar la posible existencia de vida en otros planetas. Con la ayuda de esta disciplina, se ha observado que algunas bacterias que viven en las profundidades pueden obtener energía a partir de minerales (fuentes inorgánicas) bajo condiciones extremas (pH muy bajos, altas o bajas temperaturas, etc). Siendo este tipo de condiciones las que se supone existen en algunos planetas y satélites de nuestro sistema solar, el estudio de los microorganismos que colonizan las profundidades de la tierra podría ayudar a inferir sobre la posibilidad de vida en estos lugares aun desconocidos por el hombre (Chapelle, 2000; Atlas y Bartha, 2005).

La mayor parte de los organismos presentes en las aguas subterráneas son bacterias heterótrofas que habitan en los sedimentos presentes en ellas. Estas bacterias presentan una considerable diversidad y subsisten principalmente de la escasa cantidad de compuestos orgánicos presentes. Algunas especies pueden adaptarse fisiológicamente a la vida en aguas subterráneas, a través del bajo consumo de oxígeno y del crecimiento lento, lo cual les permite usar eficazmente los recursos nutritivos limitados (Chapelle, 2000).

Al poder subsistir en condiciones de escasez de nutrientes, estos microorganismos son clasificados como oligótrofos, los cuales poseen características de absorción que permiten que la incorporación de sustratos necesarios para el crecimiento se lleve a cabo en contra del intenso gradiente que existe entre el ambiente colonizado y el espacio interno de célula, sin que se vea afectada la integridad y desarrollo de la misma (Atlas y Bartha, 2005).

Estos organismos son clasificados en dos grupos diferentes: los oligótrofos obligatorios y los facultativos. Los oligótrofos obligatorios pueden crecer sólo a bajas concentraciones de

nutrientes; mientras que los facultativos son aquellos capaces de crecer, tanto a bajas como a altas concentraciones de nutrientes (Ishida y col., 1981; Ishida y col., 1982).

Los organismos oligótrofos desarrollan estrategias para poder colonizar ambientes pobres en nutrientes. Para optimizar la absorción de nutrientes estos microrganismos desarrollan formas de esferas pequeñas, bacilos finos ó a presentar estructuras como apéndices que le proporcionan una mayor superficie y eficacia en el transporte de nutrientes hacia el interior de la célula (Atlas y Bartha, 2005).

Una adaptación fisiológica muy observada en los organismos subterráneos es la disminución de su tamaño, hasta menos de una milésima parte de su volumen normal, dando origen a las llamadas ultramicrobacterias o minicélulas. Esta disminución de tamaño se debe a un metabolismo muy lento lo cual también le confiere más resistencia a situaciones de estrés. Se ha sugerido que estas formas especializadas son células que adoptan un estado de reposo en respuesta a condiciones desfavorables (Roszak y Colwill, 1987; Schut y col., 1997).

Las bacterias oligótrofas, por encontrarse en presencia de pocos nutrientes, además de disminuir su tamaño, también disminuyen el tamaño y contenido de ADN. Por otra parte, el contenido de proteínas en estas bacterias es inversamente proporcional a su tamaño y el tiempo de generación es más largo (Roszak y Colwill, 1987; Ingraham y col., 1983).

Otras estrategias como la reserva de los nutrientes, el aumento de la tasa metabólica o un aumento en la capacidad de absorción de nutrientes, se han observado como adaptaciones fisiológicas de las bacterias en respuesta a la limitación de nutrientes (Schut y col., 1997; Harder y col., 1984).

El aumento de la tasa metabólica implicaría la desrepresión de los genes que codifican enzimas catabólicas y enzimas de elevada afinidad por los sustratos, con las cuales la baja disponibilidad de sustratos pueda ser compensada con un aumento de actividad o mayores concentraciones de las enzimas que intervienen en el metabolismo del nutriente limitante; de esta manera el sustrato puede ser metabolizado a altas tasas a pesar de su condición

limitante. Por último, el aumento de la capacidad de absorción implicaría cambios en el sistema de transporte de la célula, los cuales podrían incluir el aumento de los sitios de unión del sustrato con lo que se buscaría incrementar la interacción entre la molécula transportadora y el sustrato (Harder y col., 1983; Schut y col., 1997, Chapelle, 2000).

El cultivo *in vitro* de organismos subterráneos se dificulta, debido a que las adaptaciones que necesitan los oligótrofos para desarrollarse con éxito en su ambiente natural, hacen que su crecimiento sea inhibido totalmente cuando la concentración de nutrientes es elevada. Esta inhibición se debe a que en condiciones de escasez de nutrientes, las paredes y las membranas de las células son muy permeables a los nutrientes; esta condición le resulta ventajosa en condiciones de estrés. Sin embargo, cuando estos microorganismos son cultivados en medios ricos, la alta permeabilidad de la membrana y las paredes son incapaces de proteger a la célula de choque osmótico, lo cual resulta en la lisis y muerte de la célula. Por esto se hace necesario que el cultivo de microorganismos subterráneos oligótrofos se realice en medios muy diluidos, los cuales puedan aproximarse a las condiciones naturales de las cuales fueron aislados (Chapelle, 2000).

Contaminación de aguas subterráneas por metales pesados

La presencia de metales en aguas subterráneas puede tener un gran impacto en la salud pública, en el ambiente y en la estructura y composición de las especies microbianas que allí habitan. Por la conexión que existe con otros cuerpos de agua, las sustancias tóxicas presentes en éstas son arrastradas hacia los ríos y arroyos donde se depositan en los sedimentos o son ingeridas por los organismos acuáticos incorporándose a sus tejidos, quedando así expuesto el hombre que se alimenta de los peces contaminados (Rosas, H; 2001).

La contaminación de aguas subterráneas por metales pesados es un problema muy grave; quizás más grave que la contaminación de las aguas superficiales. La gravedad de este problema se debe a que puede llegar a transcurrir mucho tiempo hasta que la contaminación

sea detectada y los daños ocasionados al hombre, a los ecosistemas y al medio ambiente acuático sean irreversibles (Loewy, 2000).

La vulnerabilidad de las poblaciones de microorganismos a los efectos tóxicos de ciertas sustancias, puede depender del nivel y el tiempo de exposición, de la sensibilidad de los organismos y de la capacidad de las poblaciones para recuperarse. Aunque se sabe muy poco acerca de la sensibilidad a sustancias tóxicas de los organismos que colonizan ambientes oligotróficos y sobre la capacidad de recuperación de estas poblaciones, se considera que la disminución de la flora bacteriana y de su biodiversidad podrían ser consideradas como una señal del estado ecológico del ambiente (Loewy, 2000; Malik y col., 2002).

La adaptación y el desarrollo de mecanismos de resistencia bacterianos a metales pesados han despertado un gran interés en estos últimos años. Aunque la mayor parte de estos estudios se han realizado en suelos y sedimentos acuáticos, se ha sugerido que las comunidades microbianas de los sistemas acuáticos subterráneos se pueden comportar de manera similar a las comunidades de suelos y sedimentos (Chapelle, 2000).

Se ha observado que la estructura de la comunidad microbiana y los índices de diversidad varían con el grado de contaminación con los metales pesados, debido al efecto negativo que presentan estos metales para los organismos (Ellis y col; 2003). Sin embargo, en los últimos estudios realizados en comunidades bacterianas subterráneas expuestas a Hg, se han obtenido resultados que demuestran lo contrario.

En este sentido, Rasmussen y col. (2008) concluyeron que la presencia del Hg disminuye y afecta, por un corto tiempo, la diversidad de las comunidades bacterianas; pero luego de cierto tiempo ésta vuelve a aumentar y se mantiene estable en el tiempo. La explicación que sugieren los autores para este comportamiento es que los genes que confieren resistencia al Hg se encuentran generalmente en plásmidos conjugativos, los cuales pueden ser transferidos y diseminados entre la comunidad de manera muy rápida. Al expresarse la resistencia en un cierto número de microorganismos dentro de la comunidad, éstos pueden transferirla rápidamente a nuevos microorganismos que se integren en la comunidad,

permitiendo que nuevas especies tengan la capacidad de adaptarse y colonizar los ambientes contaminados.

Hendrickx y col. (2005) realizaron un estudio *in situ* de la dinámica microbiana en aguas subterráneas contaminadas, en donde se buscaba examinar el efecto que tenían el benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEX) sobre las comunidades microbianas expuestas a los mismos. Los autores encontraron que en los lugares contaminados estudiados, la comunidad bacteriana evolucionó rápidamente hasta convertirse en una comunidad igualmente estable a la de los acuíferos adyacentes, pero distinta en composición. Los resultados obtenidos en este estudio indicaron que las comunidades de microorganismos que habitaban esos lugares contaminados podían estabilizar su estructura y diversidad a largo plazo y que además, al adaptarse a la contaminación, podían colonizar otros ambientes contaminados.

Por otra parte, la capacidad de degradación de compuestos como el tolueno fue también observada en bacterias de géneros distantes (Carvacal y col., 2005). Los resultados obtenidos por estos autores llevaron a sugerir que la presencia de genes de resistencia en bacterias poco relacionadas filogenéticamente era un indicio de que la transferencia horizontal de genes era un factor clave para la adaptación de especies bacterianas, poco relacionadas, a ambientes subterráneos contaminados.

Hipótesis del trabajo

En vista de la gran contaminación con Hg observada en aguas superficiales de la región de El Callao (Estado Bolívar) y como consecuencia de la posible contaminación de las aguas subterráneas, las bacterias que colonizan estas aguas subterráneas portarán genes de resistencia para el Hg y sus derivados.

Objetivo General

Estudiar algunas comunidades bacterianas que colonizan aguas subterráneas profundas en la región de El Callao (Estado Bolívar) y evaluar el impacto que tiene la contaminación con mercurio sobre las mismas.

Objetivos Específicos

- Determinar los niveles de Hg y otros metales pesados en las aguas subterráneas de la mina Colombia, El Callao, Estado Bolívar.
- Aislar, cuantificar y caracterizar las especies Hg^R que colonizan las aguas subterráneas muestreadas.
- Evaluar los patrones de resistencia de las bacterias aisladas Hg^R frente a diferentes antibióticos y otros metales pesados.
- Detectar por PCR la presencia del gen *merA* en los aislados Hg^R.
- Estudiar el perfil plasmídico de las bacterias Hg^R aisladas a partir de las aguas subterráneas.
- Identificar algunos aislados Hg^R mediante pruebas bioquímicas.
- Estudiar el perfil genético de las comunidades de aguas subterráneas por medio de la técnica de Análisis de Espacios Intergénicos Ribosomales (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA)).
- Identificar molecularmente algunos aislados Hg^R mediante la amplificación del ADN que codifica el ARNr 16S.
- Estudiar la posible transferencia horizontal de genes de resistencia al Hg y diversos antibióticos entre las bacterias indígenas Hg^R provenientes de las aguas subterráneas y otras cepas potencialmente patógenas, por medio de estudios de conjugación *in vitro*.

1- Recolección de muestras.

Las muestras de aguas subterráneas se recolectaron en 5 lugares diferentes en la mina Colombia, perteneciente a CVG – MINERVEN. Esta mina se encuentra ubicada al sureste de El Callao, al Sur del Estado Bolívar (Venezuela) (Latitud: 7 21' 00'', longitud: -61 49' 00).

La mina de oro Colombia consta de siete niveles. Las muestras de aguas utilizadas para este estudio se colectaron en tres niveles diferentes: nivel I (muestras 5, 6 y 7), nivel IV (muestra 3) y nivel VI (muestra 2). El nivel I está ubicado a 134 metros, el nivel IV a 288 m y el nivel VI a 388 m de profundidad (Figura 9).

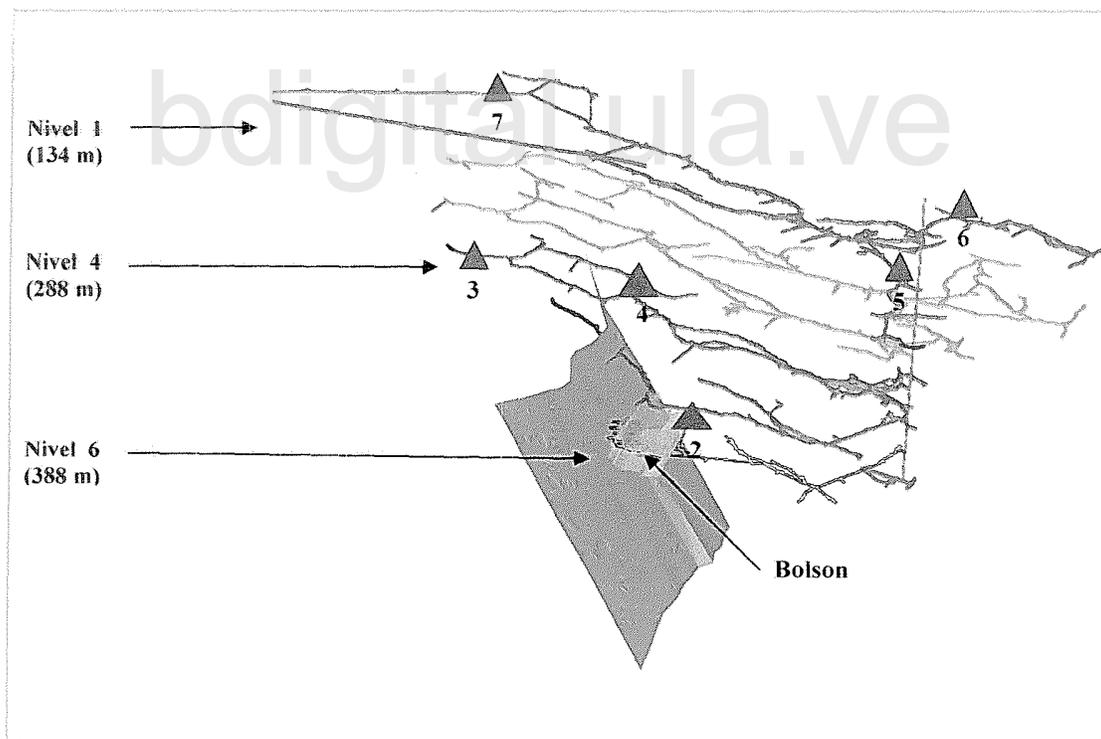


Figura 9. Mina Colombia. Niveles utilizados para el estudio de comunidades bacterianas subterráneas.

La composición geológica de esta mina está conformada principalmente por piedra andesita además de basaltos, riolitas, dacitas, riodacitas y volcanoclasticas (Informe CVG – MINERVEN, 2007).

Para la detección de Hg y otros elementos presentes en las aguas subterráneas, se recolectaron 50 ml de agua de manera aséptica en recipientes plásticos en cada punto de estudio. Estas muestras se filtraron con filtros Millipore (0,2 μm) y se les agregó HCl al 34% (para la conservación y detección de Hg) y HNO_3 1N (para la conservación y detección de otros elementos) y se las muestras preservaron en frío.

2. Aislamiento y cuantificación de bacterias Hg^{R} provenientes de aguas subterráneas de la región de El Callao.

Las muestras de aguas subterráneas recolectadas en los diferentes niveles de la mina fueron diluidas seriadamente en solución salina estéril y cultivadas en placas que contenían medio Luria –Bertani (LB) agarizado. Las placas fueron incubadas a 30°C hasta la aparición de colonias. Estas fueron cuantificadas para la determinación de la población de organismos heterótrofos cultivables en cada muestra.

Este mismo procedimiento se realizó en medio LB agarizado diluido 1/3 para promover el crecimiento de organismos oligótrofos, adaptados a vivir en ambientes pobres en nutrientes (Schut y col., 1993; Schut y col., 1997; Chappelle, 2000).

Por otra parte, para estimar la densidad de aislados Hg^{R} y los niveles de resistencia de los mismos, se sembraron diluciones seriadas de las muestras de aguas en placas con medio LB agarizado suplementado con HgCl_2 (20 y 80 $\mu\text{g/ml}$) y CH_3Hg (5 $\mu\text{g/ml}$) respectivamente. Las placas se incubaron a 30°C hasta la aparición de colonias.

3. Caracterización de bacterias Hg^R provenientes de aguas subterráneas de los diferentes niveles estudiados.

3.1 Estimación de los niveles de resistencia de los aislados Hg^R y MeHg^R.

A partir de los ensayos realizados en LB y LB dilución 1/3 se obtuvieron 132 aislados. A estos 132 aislados se les realizó una caracterización de los niveles de resistencia a HgCl₂ y CH₃Hg. Estos aislados se cultivaron medio LB agarizado suplementado con diferentes concentraciones HgCl₂ (10 hasta 80 µg/ml) y CH₃Hg (3 µg/ml hasta 5 µg/ml) respectivamente. Las placas se incubaron a 30°C hasta la observar crecimiento de los mismos.

Para estudios posteriores, se seleccionaron 102 aislados provenientes de los diferentes puntos estudiados, en base a sus diferencias fenotípicas y a la resistencia al menos a 10 µg/ml de HgCl₂.

4. Cuantificación de Hg y otros elementos en las muestras de agua subterráneas recolectadas en la región de El Callao.

El Hg presente en cada una de las muestras fue detectado y cuantificado por espectroscopia de absorción atómica por generación de vapor frío (Duran y col., 2005). Para la detección de otros elementos (Aluminio (Al), Arsénico (As), Bario (Ba), Calcio (Ca), Cadmio (Cd), Cobalto (Co), Cromo (Cr), Hierro (Fe), Manganeso (Mg), Selenio (Se), Níquel (Ni), Plomo (Pb), Cobre (Cu) y Zinc (Zn)) se utilizó la técnica espectroscopia de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado (ICP-AES).

Los estudios de Hg y metales pesados se realizaron en el Laboratorio de Espectroscopia Molecular y en el Laboratorio Regional de Servicios Analíticos (L.A.R.S.A), respectivamente. Ambos laboratorios pertenecen a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes (ULA).