

## 1.2 Determinación de Hg y otros metales pesados.

Las concentraciones de Hg total en las muestras de aguas analizadas, se encontraron por debajo del nivel de detección (<LOD) (0,43µg/l) (Tabla 5). Por otra parte, de los 16 metales pesados analizados solo el Al, el Fe, el Mn y el Ca fueron detectados en las muestras de estudio. En las muestras (5 y 7) los elementos Al, Ca y Fe se presentaron en concentraciones que estaban por encima de los límites permitidos para aguas de consumo humano (Barrientos y col., 2000).

El Ca estuvo presente a altas concentraciones en todas las muestras analizadas. La presencia de este elemento facilita la formación de minerales como los carbonatos, los cuales tienen la capacidad de interactuar con metales pesados.

La detección de metales pesados en aguas subterráneas depende de dos parámetros: a) las condiciones químicas bajo las cuales los elementos se mantienen en solución y, por lo tanto, pueden ser transportados, y b) las interacciones químicas del agua subterránea en el acuífero, ya sea con minerales o materia orgánica sólida o con otros fluidos (mezcla de aguas). De hecho, de todos los procesos que participan en el transporte de solutos, la disolución y la precipitación son los más importantes en términos de su influencia en la química de las aguas subterráneas (Oyarzún, 2007). Por otra parte, la movilización de los metales depende de varias condiciones como las variaciones de pH, del potencial redox, del contenido de materia orgánica y de la composición mineral del lugar de estudio (concentración de  $\text{Ca}^{+2}$ ), por ejemplo.

Se sabe que los metales presentes en aguas subterráneas son más móviles en ambientes ácidos, bajo la forma de iones metálicos. Sin embargo, existen condiciones de pH bajo las cuales los metales se presentan en solución o precipitan, lo que condiciona evidentemente, la posibilidad de ser transportados (Oyarzún, 2007). En condiciones alcalinas la solubilidad de los metales desciende significativamente, por tanto, aumenta su capacidad de acomplejarse con los sedimentos (Singh y col., 1999).

Algunos metales como el Hg, alcanzan su menor solubilidad a valores de pH entre 7,0 y 7,30; mientras que elementos como el Cu, el Cr y el Pb pueden precipitar a pHs que oscilen entre 5,3 y 6. Al aumentar el pH del agua se produce la precipitación de la mayoría de los metales pesados y estos quedan retenidos en la superficie del suelo (Rosas, H.; 2001).

Como se mencionó anteriormente, los valores de pH de los diferentes sitios estudiados estaban comprendidos entre 7,11 y 8,00. Al tratarse de pHs neutros a básicos, estos podrían tener influencia sobre la solubilidad y la especie en la que se encuentran los iones metálicos presentes en las aguas estudiadas. Esta condición neutra ó básica pudo ser la causa por la cual muchos de los metales analizados no pudieran ser detectados, ya que a pHs elevados los compuestos metálicos se convierten en insolubles y son precipitados en la solución (Arribas y col., 1995).

Por otra parte, la composición mineralógica de la mina también pudo influir en la presencia de los metales en solución o en su precipitación, ya que los metales pesados tienden a formar asociaciones con sustancias minerales (carbonatos, sulfatos) mediante fenómenos de intercambio iónico, adsorción, quelación, combinaciones químicas, etc., por lo que se acumulan en el medio ambiente, especialmente en los sedimentos de los cuerpos acuáticos (Forstner y Wittmann, 1981).

En este sentido, la mina Colombia está formada, principalmente, por rocas ígneas conformadas mayormente por carbonatos, silicatos y feldespato de Fe, Mg, Ca, Mg y Mn (Informe CVG-MINERVEN, 2007). La presencia de estos minerales puede alterar la movilidad y la biodisponibilidad de los metales pesados, los cuales son fuertemente adsorbidos por estos minerales. Además, en muchos casos, en ausencia de compuestos orgánicos, los metales pesados pueden precipitar al formar complejos con iones OH y  $\text{CO}_3^{-2}$  (Wauchope y McDowell, 1986).

Un metal muy conocido por su elevada tendencia a ser adsorbido por el sedimento es el ión  $\text{Hg}^{+2}$ . El sedimento puede llegar a tener un contenido hasta 25 veces mayor de Hg que las

soluciones acuosas y, en algas y otras plantas acuáticas hasta 104 veces más de lo que existe en el agua (Doménech, 1995; Hall y Pelchat; 1997).

El análisis de los resultados fisicoquímicos, permite sugerir que la ausencia de Hg en las muestras de aguas subterráneas analizadas puede ser atribuida a la composición mineralógica de la mina (adsorción del Hg en el material mineralógico) y al pH elevado de las aguas (precipitación y posterior paso a los sedimentos), lo cual podría interferir en su detección mediante las técnicas empleadas.

Por las razones mencionadas anteriormente se sugiere que para estimar el nivel de contaminación de ambientes acuáticos por metales pesados, y en especial por Hg, el análisis de los sedimentos es fundamental (Forstner; 1989).

En efecto, el estudio de los sedimentos es de gran importancia ya que permite determinar la concentración total de metales, la cual proporciona una evaluación del nivel de contaminación y, la especiación o estudio de las diferentes formas químicas en las que se encuentra el metal. Ésta última proporciona información respecto a su disponibilidad en determinadas condiciones ambientales. Las diferentes especies de metales tienen un comportamiento distinto con respecto a la removilización y a la disponibilidad del mismo. La fracción de metal más móvil es la “absorbida como ión intercambiable”, lo que representa un riesgo de contaminación debido a su liberación, bajo condiciones naturales (Forstner; 1989).

Durante ciertas épocas del año, El Callao sufre grandes inundaciones lo cual puede traer como consecuencia que aguas altamente contaminadas con Hg puedan entrar en contacto con otros cuerpos de agua, como las aguas subterráneas. En ese sentido, Larceda y col. (1991) al estudiar la dinámica del agua de drenaje de los depósitos de molinos de oro, encontraron que el transporte de este metal estaba controlado por la erosión y transferencia de partículas finas producida durante las lluvias.

Sin embargo, en otros estudios, Larceda y Solomons (1992) señalaron que el Hg presenta una movilidad muy baja con tendencia a acumularse en los lugares donde los residuos contaminados son descargados.

Carrasquero y Adams (2002), al analizar la contaminación con Hg en suelos de El Callao, encontraron que a pesar de que el Hg presentaba baja movilidad, había una proporción de este metal (15%) que formaba complejos mercuriales con los ácidos fúlvicos (ÁF) y los ácidos húmicos (ÁH) más solubles y de bajo peso molecular, los cuales podrían proporcionar una vía de movilización y bioacumulación del metal. Igualmente, Wang y col. (1997) trabajando con columnas de suelos, encontraron que los ácidos fúlvico (ÁF) son los responsables del transporte del Hg al formar complejos orgánicos solubles con el mismo. Se podría sugerir que el transporte de estos compuestos mercuriales solubles podría intervenir en la movilización del Hg durante las épocas de inundación, desde aguas superficiales de El Callao, altamente contaminadas, a las aguas subterráneas.

## **2.- Análisis microbiológico de las aguas subterráneas de la mina Colombia.**

Los resultados del análisis microbiológico revelaron que el número total de heterótrofos cultivables en cada uno de los sitios analizados varió de  $1 \times 10^2$  a  $9,8 \times 10^3$  UFC/ml (Tabla 6). Se esperaba que la densidad celular en los sitios estudiados fuera baja, debido a que las aguas subterráneas son ambientes de escasos nutrientes; esta escasez podría ocasionar que el metabolismo de los organismos que las colonizan sea más lento y el crecimiento menor (Chapelle, 2000).

Al realizar el aislamiento inicial en medio LB agarizado se obtuvo un número muy bajo aislados, sin embargo, al realizar los ensayos en medio LB diluido 1:3 (por recomendaciones reportadas en la bibliografía (Chapelle, 2000)), el número de estos heterótrofos cultivable aumentó significativamente. Esto puede deberse a que los organismos allí presentes son oligotrófos, y por tanto tienen ciertas características fisiológicas que les permiten adaptarse a la vida subterránea. Al ser cultivados en medios ricos, estas características fisiológicas hacen que su crecimiento sea inhibido totalmente

cuando la concentración de nutrientes es elevada; en estas condiciones se ve afectado el metabolismo y la permeabilidad de la membrana y las paredes, las cuales son incapaces de proteger a la célula del choque osmótico, resultando en la lisis celular (Chapelle, 2000). Por esta razón se trató cultivar a los microorganismos provenientes de las aguas subterráneas en condiciones más semejantes a las condiciones naturales de las cuales fueron aislados.

Uno de los objetivos iniciales de este trabajo era el estudio del impacto de la contaminación mercurial sobre las comunidades microbianas que colonizan aguas subterráneas en la región de El Callao, y especialmente, sobre la selección de cepas resistentes al Hg ( $\text{Hg}^{\text{R}}$ ). Se tiene conocimiento que, en respuesta a la presencia de metales tóxicos, como los metales pesados, las comunidades microbianas que colonizan ecosistemas terrestres o acuáticos contaminados desarrollan una serie de mecanismos de adaptación que les permiten sobrellevar la presión selectiva causada por la presencia del metal. Esta adaptación puede manifestarse mediante la expresión de genes de resistencia o por la adquisición de los mismos a través de la transferencia horizontal de genes (BarKay y col., 1995; Silver y Phung, 2005; Malik y col., 2002).

A pesar de que en los análisis fisicoquímicos realizados a las muestras de aguas subterráneas no se detectó Hg, sorprendentemente se encontraron aislados  $\text{Hg}^{\text{R}}$  en todos los niveles de la mina estudiados, con una frecuencia de 25% a 60%, en relación al número de heterótrofos totales. Estos aislados eran resistentes también a 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de  $\text{HgCl}_2$  en medio sólido (Tabla 7). También se observó la presencia de aislados resistentes a  $\text{MeHg}$  ( $\text{MeHg}^{\text{R}}$ ) en todos los niveles estudiados con una frecuencia de 16% a 100%. Estos resultados sugieren que las aguas subterráneas están colonizadas por microorganismos  $\text{Hg}^{\text{R}}$  tanto de espectro reducido (resistentes solamente a compuestos inorgánicos de Hg), como de amplio espectro, es decir, resistentes a ambos tipos de compuestos mercuriales (orgánicos e inorgánicos).

### 3. Caracterización de bacterias Hg<sup>R</sup> provenientes de aguas subterráneas de los diferentes niveles estudiados.

#### 3.1 Estimación de los niveles de resistencia de los aislados Hg<sup>R</sup> y MeHg<sup>R</sup>.

Al realizar los ensayos para estimar el número de aislados Hg<sup>R</sup> y MeHg<sup>R</sup> presentes en los diferentes niveles de la mina analizados y evaluar los niveles de resistencia de los mismos, se observó que en todos los niveles colonizaban microorganismos resistentes a diferentes concentraciones de HgCl<sub>2</sub> (hasta 80 µg/ml) y de MeHg (hasta 10 µg/ml) y que la mayor parte de ellos eran resistentes a 10µg/ml de HgCl<sub>2</sub> (Figura 10).

En todos los niveles se encontró que más del 50% de los aislados eran resistentes a 20µg/ml de HgCl<sub>2</sub>.

En los niveles 4 y 6 se encontró una mayor frecuencia de aislados Hg<sup>R</sup>: el 90% y el 83% de los aislados eran resistentes a 10µg/ml de HgCl<sub>2</sub>, respectivamente; además, los aislados provenientes del nivel 4 eran resistentes a todas las concentraciones de MeHg evaluadas. Aunque en el nivel 1 también se encontró una proporción significativa (75%) de aislados resistentes a 10µg/ml de HgCl<sub>2</sub>, el 21% de los aislados fue resistente únicamente a 3µg/ml de MeHg.

La presencia de una mayor frecuencia de aislados Hg<sup>R</sup> en los niveles 4 y 6 puede deberse a la composición mineralógica de los mismos. Estos niveles forman parte de una veta denominada El Bolsón, la cual es un cuerpo rocoso, rico en una gran cantidad de minerales (cuarzo, carbonatos (calcita-ankerita), albita, clorita, ganga, pirita y feidspatos). La presencia de estos minerales podría permitir un mayor desarrollo de microorganismos, los cuales utilizan algunos minerales como fuente de energía durante su crecimiento (Appia-Ayne y col., 1999). Las diferencias químicas y físicas del subsuelo pueden afectar la diversidad bacteriana (Zhou y col., 2004).

Sin embargo, en el nivel 6, la frecuencia de aislados  $Hg^R$  fue menor a la observada en el nivel 4. La composición mineral pudo ser uno de los factores que influyera en la frecuencia de aislados  $Hg^R$ , ya que el nivel 6, por estar dentro de la veta mineralógica, presenta una mayor diversidad de compuestos minerales en comparación con el nivel 4, cercano a la veta. La presencia de una mayor variedad de minerales en el nivel 6 favorece el desarrollo de una mayor diversidad de bacterias heterótrofas, pero puede afectar la presencia de aislados  $Hg^R$ , ya que metales como el Hg tienden a ser retenidos por algunos minerales presentes en este nivel. En efecto, una de las características del nivel 6 es la abundancia de carbonatos y cuarzos, los cuales como mencionamos anteriormente, causan la precipitación de metales como el Hg.

Al comparar los resultados de este estudio con los obtenidos por Ball y col. (2007) y Gómez (2007), se puede observar que la concentración mínima inhibitoria de Hg de los aislados bacterianos de comunidades subterráneas es mucho menor que las de bacterias provenientes de aguas superficiales (“lagunas de cola”); en efecto, las cepas aisladas presentaban resistencia a elevadas concentraciones de  $HgCl_2$  (100  $\mu g/ml$  a 400 $\mu g/ml$ ).

La posible explicación de la diferencia de los niveles de resistencia al Hg entre las comunidades bacterianas de aguas superficiales y las comunidades bacterianas de aguas subterráneas es la concentración de Hg presente en los dos ecosistemas. Las “lagunas de cola” presentaron una alta contaminación con  $Hg^{+2}$ ; en efecto, los niveles de este metal resultaron significativamente elevados (entre 10 y > 600  $\mu g/ml$ ). Los valores Hg en estas lagunas eran hasta 100 veces mayores a los niveles aceptados en aguas no contaminadas (< 0,2  $\mu g/L$ ) (Palheta y Taylor 1995). Por su parte, a las muestras de aguas subterráneas no se les detectó Hg.

Se podría sugerir que los microorganismos que colonizan las “lagunas de colas” están sometidos a una presión selectiva mucho mayor que los que habitan en las aguas subterráneas, ya que el nivel de contaminación de estas fue más bajo. Algunos estudios sugieren que cuando se observa la presencia de bacterias resistentes a bajas concentraciones

de Hg, puede ser un indicio de que la contaminación por este metal en estas aguas puede ser baja (De Souza y col., 2006).

Por otra parte, la resistencia al Hg exhibida por los aislados de las aguas subterráneas puede deberse a la presencia de Hg en el sedimento o en el material rocoso mineral que está en contacto con las aguas. Se sabe que el sedimento tiene una gran importancia para la ecología de las bacterias; éste no solo le proporciona superficie para adherirse sino también puede facilitarle nutrientes (como materia orgánica particulada hidrolizada) y estimular su desarrollo (Paerl y Goldman, 1972). Los microorganismos que colonizan las aguas subterráneas pueden entrar en contacto con los metales atrapados en los sedimentos, ya que las bacterias suelen adherirse a las partículas de sedimento y arcilla, por acción electrostática. A pesar que la concentración de metales (especialmente el Hg) fue muy baja, esto no implica que los niveles de estos metales en los sedimentos no sean suficientemente altos como para ejercer una presión selectiva sobre las bacterias que entran en contacto con los sedimentos. Como se mencionó anteriormente, la concentración de Hg en los sedimentos tiende a ser hasta 25 veces mayor que la que existe en el agua.

#### **4. Resistencia a antibióticos de los aislados Hg<sup>R</sup>.**

Se ha reportado en numerosos trabajos que los genes que confieren resistencia a los metales pesados, se encuentran generalmente ligados a genes que confieren resistencia a antibióticos y a otros metales pesados, y que dicha resistencia puede transferirse de una bacteria a otra a través de elementos móviles (plásmidos y transposones) (Barkay y col., 2003). La asociación del operón *mer* con genes que confieren resistencia a antibióticos ha sido observada en numerosos trabajos; es por esto que las bacterias que contienen el operón *mer*, tienen una elevada probabilidad de presentar múltiples resistencias a antibióticos y a otros metales pesados (McArthur y Tuckfield, 2000; Summmer y col., 1993). Por esta razón, como parte del presente estudio, se evaluó la resistencia de los aislados Hg<sup>R</sup> a distintos antibióticos.

La elevada frecuencia de aislados Hg<sup>R</sup> resistentes a múltiples antibióticos puede deberse a la relación genética que existe entre ambas resistencias; en efecto, generalmente el operón

*mer* se encuentra en transposones que confieren resistencia a un determinado antibiótico (Pearson y col., 1996).

Los resultados obtenidos mostraron que los aislados Hg<sup>R</sup> eran resistentes a múltiples antibióticos y que las resistencias al cloranfenicol, a la ampicilina y a la tetraciclina fueron las más frecuentes, en una proporción de 83,33%, 69,75% y 67,56%, respectivamente (Figura 13). También se encontró que los porcentajes de aislados resistentes a la estreptomicina y a la kanamicina eran de 50,98% y 49,02% respectivamente.

Por otra parte, el porcentaje de aislados resistentes a todos los antibióticos fue cercano o mayor al 50%; esto representa un elevado porcentaje de aislados Hg<sup>R</sup> resistentes a antibióticos.

Los resultados obtenidos en estos ensayos coinciden con los obtenidos por Ball y col. (2007) y Gómez (2007), en el cual la población de bacterias Hg<sup>R</sup> aisladas de “lagunas de cola” de la región de El Callao, presentó elevados porcentajes de cepas resistentes a múltiples antibióticos, principalmente al cloranfenicol y a la ampicilina. Nuestros resultados también son comparables con los obtenidos por Muldryk (2002). Las bacterias aisladas de ambientes acuáticos subterráneos presentaron resistencia a diferentes antibióticos y las resistencias a la ampicilina y al cloranfenicol fueron las más frecuentes.

Al discriminar los porcentajes de aislados Hg<sup>R</sup> resistentes a los antibióticos, de acuerdo a su procedencia, se encontró que en todos los niveles de la mina estudiados colonizaban microorganismos resistentes a diversos antibióticos y que además, en el nivel 4, la frecuencia de estos microorganismos era mayor (Figura 14). Además, este fue el nivel en el cual se encontró un mayor porcentaje de bacterias resistentes a todas las concentraciones de HgCl<sub>2</sub> y MeHg ensayadas (Figura 10).

Un resultado muy importante y sorprendente fue que el 27,45% de los aislados presentó resistencia a cuatro antibióticos simultáneamente y el 26,47 % a cinco antibióticos. Por otra parte, la resistencia a 1 y a 2 antibióticos se presentó con una frecuencia de un 6,86% y un

12,75% respectivamente. El 9,6 % de estos aislados fueron sensibles a todos los antibióticos probados (Figura 15). En este ensayo también se pudo observar que el nivel 4 tenía una mayor frecuencia de aislados resistentes a cuatro (33%) y cinco (37,04%) antibióticos simultáneamente, en comparación con los otros niveles (Figura 16).

La frecuencia de patrones de resistencia de los aislados Hg<sup>R</sup> observados en estos ensayos se asemeja a los resultados obtenidos por Ball y col. (2007) y Gómez (2007), en los cuales un elevado porcentaje (20%) de las bacterias que colonizan las “lagunas de cola” eran resistentes a cuatro antibióticos simultáneamente.

Al evaluar la resistencia de los 102 aislados Hg<sup>R</sup> a los diferentes antibióticos en medio líquido y determinar para cada aislado la CMI de cada antibiótico, se encontró que las resistencias al cloranfenicol y a la ampicilina fueron las más frecuentes. Estos resultados coincidieron con los obtenidos en medio LB agarizado, suplementado con cada antibiótico (Figura 17). En el caso del cloranfenicol, más del 85% de los aislados presentó resistencia a las cuatro concentraciones ensayadas, mientras que en el caso de la ampicilina, más del 54,9% de los aislados fueron resistentes a las cuatro concentraciones probadas.

Estudios realizados por Jones y col. (1991) en el Lago de Michigan y por Mudryk (2005) a lo largo de la costa del Mar Báltico, pusieron en evidencia que las bacterias que habitaban ambientes superficiales presentaban una mayor resistencia a los antibióticos que los aislados provenientes de aguas subterráneas. Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos en el presente trabajo con los resultados encontrados por Ball y col. (2007) y Gómez (2007), no se observan grandes diferencias en las frecuencias de aislados resistentes a antibióticos entre bacterias que colonizan las aguas superficiales y los aislados de las aguas subterráneas.

Es interesante destacar que un elevado porcentaje (95,14%) de los aislados pigmentados presentaron resistencia a antibióticos (Figura 18). Estos resultados son comparables con los encontrados por Chandy (1999) y De Souza (2006), en los cuales se observó una sensibilidad diferencial entre bacterias pigmentadas y no pigmentadas. Igualmente, Nair y col. (1992), al estudiar la respuesta de bacterias marinas pigmentadas y no pigmentadas a

los metales y a los antibióticos, encontraron que las bacterias pigmentadas resultaron más resistentes a los metales y a los diferentes antibióticos, especialmente a elevadas concentraciones.

Se ha reportado que en la mayoría de los casos, los pigmentos protegen a las bacterias de los antibióticos y de la fotooxidación, también actúan como antibióticos y cuando hay limitación de algún metal (como en el caso de los ambientes oligotróficos), actúan como sideróforos que sirven para captar y transportar el metal al interior de la célula ().

En nuestro ensayo se observaron 18 patrones de resistencia en la muestra de 102 aislados  $Hg^R$ . Los patrones que presentaron una mayor frecuencia fueron kanamicina-cloranfenicol-estreptomicina-ampicilina (KCSTA) (26,47%), kanamicina-cloranfenicol-tetraciclina-ampicilina (KCTA) (15,69%) y cloranfenicol-estreptomicina-ampicilina (CSA) y cloranfenicol-tetraciclina-ampicilina (CTA) con 5,88% cada uno (Figura 19).

Con los resultados obtenidos en la prueba de resistencia a antibióticos se realizó un análisis de conglomerados y un dendograma (Figura 20). Mediante este análisis se buscaba obtener grupos de aislados que tuvieran características (patrones de resistencia) semejantes. Los aislados  $Hg^R$  fueron agrupados en 18 grupos. En el análisis se encontró que había 4 grupos que contenían un mayor número de aislados. El grupo 7 estuvo constituido por un mayor número de aislados (26), en el grupo 8 se aglomeraron 16 aislados. En el grupo 9 y 12 se agruparon 8 aislados. Los resultados obtenidos en este análisis coinciden con los resultados de los patrones de resistencia de los aislados  $Hg^R$ , en el cual también se observaron elevadas frecuencias de 4 patrones de resistencia (Figura 18).

##### **5. Resistencia de los aislados $Hg^R$ a otros metales pesados.**

En este trabajo se evaluó si los aislados  $Hg^R$  también presentaban resistencia a otros metales. Los resultados obtenidos revelaron que los aislados  $Hg^R$  fueron resistentes a los cuatro metales ensayados y que las resistencias al zinc y al níquel (2 mM) fueron las más frecuentes, con un 99,00% y 91,50% respectivamente (Figura 21).

En el caso del cobre y el plomo (2 mM), se observó que los porcentajes de aislados resistentes eran de un 76,60% y 73,40%, respectivamente. Se encontró además, que la frecuencia de aislados resistentes para todos los metales a 2 mM fue muy cercana ó mayor al 70%; esto representa un elevado porcentaje aislados Hg<sup>R</sup> resistentes a otros metales pesados.

Los resultados encontrados en este estudio son comparables a los obtenidos por Ball y col. (2007) y Gómez (2007). En este estudio, los investigadores encontraron que las bacterias Hg<sup>R</sup> que colonizaban “lagunas de cola” de la región de El Callao, además de ser resistentes a diferentes antibióticos, también eran resistentes a otros metales como el zinc, cobre y plata.

Reyes y col. (1999) al estudiar la resistencia al Hg en comunidades de sedimentos acuáticos, encontraron altas frecuencias de aislados Hg<sup>R</sup> resistentes a otros metales como Cd y Zn.

Las aguas subterráneas estudiadas en este trabajo presentaron un número significativo de aislados resistentes a distintas concentraciones de diferentes metales, a pesar de que estos se encontraban en muy baja concentración. Algunos autores (Díaz-Raviña y col., 1994; Konopka y col.1999) han aislado bacterias resistentes a metales pesados en suelos con escasa contaminación. Estos investigadores sugieren que generalmente, la contaminación por un metal específico incrementa la resistencia a otros metales, especialmente cuando los niveles de contaminación son elevados. Además, esta resistencia múltiple ocurría hacia metales que tenían mecanismos de toxicidad similares.

La multiresistencia observada en los aislados Hg<sup>R</sup>, se puede deber a que los genes que confieren resistencia al Hg, no sólo están ligados a genes que proporcionan resistencia a antibióticos, sino también a genes que confieren resistencia a otros metales pesados; y que dicha resistencia puede transferirse de una bacteria a otra a través de plásmidos y transposones (Barkay y col., 2003).

## 6. Presencia del gen *merA* en los aislados Hg<sup>R</sup>.

Como parte de la caracterización de los aislados Hg<sup>R</sup>, se realizó la amplificación por PCR del gen *merA*, el cual codifica para la enzima mercurio reductasa, encargada de reducir el Hg<sup>+2</sup> a Hg<sup>0</sup>, menos tóxico para las bacterias. En el 78% de los aislados se obtuvo el fragmento esperado de 285 pb; por lo se puede sugerir que los aislados analizados poseían el gen *merA* (Figura 24). Sin embargo, para corroborarlo, se debe realizar el secuenciamiento del fragmento amplificado.

En el 22% de los aislados Hg<sup>R</sup> no se amplificó el gen *merA* (Figura 25). Esto pudo deberse a tres factores: a) los cebadores utilizados eran específicos para Gram negativas, b) la temperatura de hibridización pudo influir en el proceso de amplificación o c) estos aislados tienen un mecanismo de resistencia diferente al conferido por el operón *mer*.

Al relacionar la naturaleza Gram de los aislados con Hg<sup>R</sup> con la presencia del gen *merA* en los mismos (Figura 26) se encontró que el 83,3% de los aislados, en los cuales se amplificó el gen *merA*, resultaron ser Gram negativos, mientras que un 75% de los aislados en los cuales no se amplificó *mer A* fueron Gram positivos.

Esto sugiere que la especificidad de los cebadores utilizados pudo influir en la amplificación del gen *merA*. Para los aislados Gram negativos en los que no se amplificó el gen *merA*, se recomienda realizar una PCR en gradiente para descartar el efecto de la temperatura de hibridización en el proceso de amplificación y así proponer otros posibles mecanismos de resistencia (Barkay y Wagner-Döbler, 2005; Reyes y col., 1999).

Para estudios posteriores (perfil plasmídico, pruebas bioquímicas, RISA, identificación molecular y ensayos de conjugación) se escogieron 20 aislados Hg<sup>R</sup>, en base a su morfología, resistencia al Hg, resistencia a antibióticos y resistencia a otros metales pesados.

## 7. Estudio del perfil plasmídico de los aislados Hg<sup>R</sup>.

Como parte de la caracterización genética de los aislados Hg<sup>R</sup>, se determinó la presencia de plásmidos en los 20 aislados seleccionados. En este estudio se evidenció la presencia de plásmidos en once aislados (55%); además se encontró que los aislados Hg<sup>R</sup> presentaban de 1 a 4 plásmidos y que estos podían ser de bajo y alto peso molecular (Figura 27).

Por otra parte, el 45% de los aislados Hg<sup>R</sup> tenía dos plásmidos (Figura 28). El 27,27% tenía un solo plásmido, el 18% presentó 3 plásmidos y el 9,09% de los aislados contenía cuatro plásmidos.

Fredrickson y col. (1981), al estudiar comunidades bacterianas de ambientes subterráneos no contaminados, también encontraron plásmidos de altos pesos moleculares en los aislados estudiados, con frecuencias cercanas al 33%. Ellos sugieren que la presencia de plásmidos en bacterias que colonizan ambientes subterráneos oligotróficos es favorable para la supervivencia de las mismas, ya que la mayoría de los mismos pueden contener genes necesarios para funciones catabólicas y de transferencia o pueden ser necesarios para la degradación y metabolización de compuestos abundantes en las aguas subterráneas (compuestos aromáticos orgánicos, ácidos fúlvico, taninos y ligninas).

Resultados similares también han sido reportados en estudios realizados con aislados Hg<sup>R</sup> provenientes de “lagunas de cola” de la región de El Callao (Ball y col., 2007; Gómez, 2007). Al igual que nosotros, los autores encontraron que una elevada proporción de los aislados Hg<sup>R</sup> contenían por lo menos un plásmido, y que estos plásmidos (conjugativos) podían ser de mediano y alto peso molecular.

Al comparar los resultados de resistencia a antibióticos, metales pesados y perfil plasmídico obtenidos en este trabajo y los reportados por otros autores (Ball y col., 2007; Gómez y col., 2007), se podría sugerir que existe un fenómeno de transferencia horizontal de genes entre bacterias que colonizan ambientes acuáticos superficiales y bacterias de aguas subterráneas. Esto implicaría una contaminación entre las aguas superficiales (“lagunas de cola”) y aguas subterráneas durante las inundaciones periódicas que ocurren en la región.

## 8. Caracterización morfológica de los aislados Hg<sup>R</sup>.

La caracterización morfológica de los aislados Hg<sup>R</sup> reveló que una elevada proporción de los mismos (70%) eran bacilos Gram negativos (Tabla 8). Se encontraron cocos Gram positivos y cocos Gram negativos con una frecuencia de un 15% cada uno.

Nuestros resultados son muy similares a los obtenidos en estudios morfológicos de aislados Hg<sup>R</sup> de “lagunas de cola”, realizados por Gómez y col. (2007), en los cuales el 100% de los aislados eran bacilos Gram negativos.

Resultados semejantes fueron obtenidos por Balkwill y Ghiorse (1985), al estudiar la microflora bacteriana de aguas subterráneas. Los investigadores encontraron una elevada frecuencia de bacterias Gram negativas y Gram positivas con formas de cocos y de bastones cortos, y la proporción de bacilos Gram negativos era mayor a la de bacilos Gram positivos. Asimismo, se observó que la población microbiana de los dos ambientes subterráneos estaba conformada por una amplia diversidad de bacterias aeróbicas, nutricionalmente versátiles, que podían subsistir a bajas concentraciones de compuestos orgánicos sin formación de células quiescentes.

## 9. Caracterización bioquímica de los aislados Hg<sup>R</sup>.

Con el fin de obtener una identificación preliminar de los aislados Hg<sup>R</sup>, estos fueron sometidos a una serie de pruebas bioquímicas (Tabla 9). Los aislados 33, 46 y 57 fueron identificados como organismos pertenecientes a la familia *Micrococcaceae* (Tabla 11) por sus características morfológicas y la presencia de la enzima catalasa; los organismos pertenecientes a esta familia se caracterizan por ser cocos Gram positivos catalasa-positivos (Koneman, 1999). El color de la colonia y la correlación entre la prueba de oxidasa (negativa) y la prueba de citrato de Simmos (negativa), permitieron incluir a estos aislados bajo el género *Staphylococcus* y diferenciarlos del género *Micrococcus*, ya que este último, además de poder utilizar el citrato como fuente de carbono, posee la citocromo oxidasa c. No obstante, la ausencia de un metabolismo anaeróbico facultativo en la prueba de oxidación/fermentación hace que la identificación, a nivel de género, sea dudosa; *Micrococcus* es un aeróbico estricto (produce ácido a partir de la glucosa sólo en

condiciones aeróbicas) y *Staphylococcus* es anaeróbico facultativo (produce ácido a partir de la glucosa tanto en aerobiosis como anaerobiosis).

Los aislados 5, 10, 15, 18, 19, 21, 41, 44, 64, 92, 97 y 98 estos fueron identificados como organismos pertenecientes al grupo de los Bacilos Gram negativos no fermentativos (BGNNF). La prueba de agar triple azúcar hierro fue negativa, lo cual indica la falta de producción de ácidos por la incapacidad de fermentar los azúcares presentes en el medio. Además, la observación de un mecanismo oxidativo y no fermentativo en el medio Hugh Leifson y una reacción negativa en el caldo Rojo Metilo Voges-Proskauer permitió incluir estos aislados dentro del grupo de BGNNF.

Según Koneman y col. (1999), a diferencia de las *Enterobacteriaceae*, los BGNNF no se pueden clasificar en una única familia, ya que la ubicación taxonómica correcta de muchos organismos pertenecientes a este grupo aún permanece sin resolverse. Por tal motivo, la identificación de microorganismos no fermentadores es frecuentemente dudosa. Debido a esto, los principales géneros de bacilos Gram negativos no fermentadores han sido clasificados dentro de cinco familias: *Alcaliginaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Methylococcaceae*, *Pseudomonadaceae* y *Rhizobiaceae*. Los otros géneros restantes pertenecientes a este grupo aun no han sido asignados a una familia específica y se agrupan bajo el título de “Microorganismos cuya posición taxonómica es dudosa”.

Dentro de la familia de las *Pseudomonadaceae*, el género *Pseudomonas* es uno de los más importantes. Dentro de este género, fueron incluidos los aislados 10, 15, 18, 19, 21 y 44 (Tabla 11). Algunas características como la ausencia de gas producido a partir de la glucosa, la reacción negativa en caldo Rojo de Metilo Voges-Proskauer y la presencia de las enzimas citocromo oxidasa y catalasa, permitieron incluir a estos organismos dentro de esta familia, ya que estas son características claves para la identificación de este grupo de organismo, muy útiles para diferenciarlas de las *Enterobacteriaceae* y las *Aeromonas* (Madigan y col., 2004). Unido a esto, la producción aeróbica de ácidos en medio para oxidación-fermentación con glucosa, permitió diferenciar las *Pseudomonas* de las

*Enterobacterias*, ya que estas últimas tienen la capacidad de producir ácido en condiciones anaeróbicas.

El aislado 41 presentó características fenotípicas según las cuales podría ser agrupado dentro de la familia de las *Pseudomonadaceae*. Sin embargo, la observación de un mecanismo fermentativo en el medio Hugh Leifson impide que sea agrupado dentro de esta familia. Los resultados de algunas pruebas bioquímicas fueron ambiguos.

El aislado 5 fue difícil de identificar por métodos bioquímicos. Este aislado presentaba características muy semejantes al género *Pseudomonas*, por lo que sugerimos que podría estar muy relacionado este género. Sin embargo, la reacción negativa a la prueba catalasa hace que este organismo sea excluido de este grupo; ya que la presencia de esta enzima es muy característica de este género (Tabla 11).

El aislado 32 también fue incluido dentro del grupo de los BGNNF. En este caso, pertenece a la familia *Alcaliginaceae*, género *Alcaligenes* (Tabla 11). Al comparar los resultados bioquímicos con los fenotipos reportados en la bibliografía para las cepas de referencia, se obtuvo una coincidencia en todas las pruebas (Kerstens y De Ley en Bergeys y col., 1983).

Por otra parte, los aislados 24, 64, 79, 92, 97 y 98 fueron agrupados dentro del género *Acinetobacter* (Tabla 11). La reacción negativa a la prueba oxidasa (ausencia de la citocromo oxidasa C) es una de las características que permite distinguir a este género de los otros bacilos Gram negativos no fermentadores (Elliot Juni en Bergeys y col., 1983).

Es de hacer notar que la morfología de los aislados era cocal. Los géneros *Acinetobacter* son de forma bacilares, pero sus células tienden a ser esféricas en condiciones de senectud, en la fase estacionaria o cuando las condiciones ambientales no son favorables (Madigan y col., 2004). Quizás, esta es la razón por la cual, al analizar en el microscopio los aislados 24 y 64, se observaron cocos.

Por su parte, el aislado 84 se identificó como un organismo perteneciente a la familia *Moraxellaceae*, género *Moraxella* (Tabla 11), gracias a presencia de las enzimas citrocromo oxidasa C y catalasa (Rossau y col., 1991). Al comparar los resultados bioquímicos con los reportados en la bibliografía para las cepas de referencia, se obtuvo una coincidencia en la mayoría de las las pruebas.

En las pruebas realizadas al aislado 101 se observaron una serie de resultados que no coincidían con alguna familia o género en especial. Además, las características morfológicas de este organismo eran confusas; por estas razones no pudo ser identificado.

**Tabla 11. Identificación bioquímica de aislados Hg<sup>R</sup>.**

Aislado	Familia o género más cercano
5	<i>Pseudomonas</i> (?)
10	<i>Pseudomonas</i>
15	<i>Pseudomonas</i>
18	<i>Pseudomonas</i>
19	<i>Pseudomonas</i>
21	<i>Pseudomonas</i>
32	<i>Alcaligenes</i>
41	<i>Pseudomonadaceae</i> (?)
44	<i>Pseudomonas</i>
24	<i>Acinetobacter</i>
64	<i>Acinetobacter</i>
79	<i>Acinetobacter</i>
92	<i>Acinetobacter</i>
97	<i>Acinetobacter</i>
98	<i>Acinetobacter</i>
84	<i>Moraxella</i>
33	<i>Sthaphylococcus</i>
46	<i>Sthaphylococcus</i>
57	<i>Sthaphylococcus</i>

Con los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas (presencia de enzimas), se realizó un análisis de conglomerados y un dendograma (Figura 30). En este caso, los aislados Hg<sup>R</sup> se agruparon en 12 conglomerados diferentes. Los resultados obtenidos en este análisis coincidieron con en gran parte los obtenidos en la identificación bioquímica. Los aislados 24, 79, 84, 92, 97 y 98 fueron agrupados dentro de un mismo clonglomerado; esto se debe a que estos organismos, a pesar de pertenecer a géneros diferentes, forman parte de la familia *Moxarellaceae*; por tanto, es de esperar que tengan características fisiológicas muy similares que les permitan ser agrupados dentro de un mismo grupo.

Los aislados identificados como organismos pertenecientes al género *Pseudomonas* (18, 44, 10, 15, 19, 21), aparecen muy relacionados entre sí en este análisis. Sin embargo, dos de los aislados identificados como posibles *Pseudomonas* (41 y 5) aparecen más relacionados con el aislado perteneciente al género *Alcaligenes* (32). Esta relación quizás se debe a que el género *Alcaligenes* y el género *Pseudomonas* forman parte del grupo de los bacilos no fermentadores; esta condición permite que los resultados obtenidos en las pruebas los agrupen como organismos muy cercanos. En algunos casos, por tener características muy similares con otros géneros, el género *Alcaligenes* tiende a ser confundido con *Pseudomonas* y *Agrobacterium* (Kersters en Bergeys y col., 1983).

Los aislados 33 y 46 pertenecen a un mismo grupo. Este resultado coincide con la identificación bioquímica, ambos aislados fueron incluidos dentro de la misma familia (*Micrococaceae*) y género (*Staphylococcus*). El aislado 101 se observa sólo en un conglomerado; esto quizás se deba a que este presentó características muy diferentes en relación al resto de los aislados.

A pesar de ser géneros muy diferentes, extrañamente los aislados 64 y 57 aparecen dentro de un mismo grupo. Quizás ambos comparten enzimas que pueden ser comunes en organismos muy distantes.

## 10. Análisis de espacios intergénicos ribosomales (RISA).

Para estudiar la diversidad de las comunidades de las aguas subterráneas, se utilizó la técnica de análisis de espacios intergénicos ribosomales (RISA). Este análisis es de gran ayuda para el estudio de diversidad de las comunidades bacterianas, debido a que estas secuencias son extremadamente variables y permiten relacionar taxonómicamente distintos grupos de organismos (Ciesielski y col., 2007).

Al realizar la amplificación y el análisis de los resultados se encontraron diferentes patrones conformados por una ó más bandas (Figura 32). La presencia de bandas de igual peso molecular en los diferentes aislados no solo permitió saber cuales cepas pertenecían a una misma especie, sino también discernir sobre la posible relación filogenética existente entre las mismas. Los aislados 97 y 98 (líneas 7 y 8), al presentar patrones de bandas muy parecidos, fueron considerados organismos muy cercanos filogenéticamente. Igualmente, los aislados 5, 15, 18, 21 y 32 (líneas 2, 4, 5 6 y 11) fueron relacionados filogenéticamente debido a que sus patrones de amplificación presentaban bandas en común. Al comparar estos resultados con la identificación bioquímica, se encontró que los aislados 5, 15, 21 y 18 fueron identificados como organismos pertenecientes al género *Pseudomonas* y el aislado 32 al género *Alcaligenes* (género muy cercano a las *Pseudomonas*). Por su parte, los aislados 97 y 98 fueron incluidos o relacionados con el género *Acinetobacter*. Era de esperar que aislados pertenecientes al mismo género presentaran ciertas homologías en los patrones de amplificación.

Los patrones de bandas de los aislados 24 y 79 fueron muy similares entre sí. La similitud observada en los productos de amplificación confirmó la relación filogenética que se había establecido entre ellos mediante las pruebas bioquímicas, en las cuales ambos fueron incluidos dentro del género *Acinetobacter*. Si se observan los patrones de bandas de estos aislados (Figura 32), se podrá notar que los mismos son muy parecidos a los perfiles de amplificación de los aislados 97 y 98, los cuales también fueron incluidos dentro del género *Acinetobacter*.

Al realizar la comparación de los patrones de bandas de los 20 aislados Hg<sup>R</sup> (datos no mostrados) se observó que los aislados 10 y 18 eran idénticos, al igual que los aislados 33 y 46.

En el dendograma obtenido a partir del patrón de bandas del ensayo de RISA (Figura 33) se puede observar que los aislados fueron aglomerados en 18 grupos. Casi todos los aislados que fueron incluidos dentro del grupo de los bacilos no fermentadores y de la familia *Moxarellaceae*, aparecen muy relacionados filogenéticamente. Sin embargo, los aislados 5 y 44, a pesar de ser identificados dentro la familia *Pseudomonaceae*, están más alejados del resto de los de los aislados identificados dentro de esta misma familia.

El aislado 44 es el más distante, ya que es el último (mayor distancia) en incorporarse al conglomerado final.

#### **11. Identificación molecular de los aislados Hg<sup>R</sup>.**

A los 18 aislados Hg<sup>R</sup> analizados mediante la técnica de RISA se les realizó la identificación molecular mediante la amplificación y secuenciamiento del gen que codifica para el ARNr 16S (Figura 34). No obstante, sólo en 14 de ellos se logró obtener el gen amplificado. Al realizar la comparación de las secuencias obtenidas con las secuencias almacenadas en el Genbank, sólo pudieron ser identificados 11 de los 14 aislados, debido a la calidad de las secuencias reportadas. Mediante este análisis se identificaron organismos relacionados con *Pseudomonas sp*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter junii*, *Acinetobacter sp*, *Caulobacter sp*, *Brevundimonas diminuta*, *Petrobacter* y *Micrococcus sp*. (Tabla 10). De los 11 aislados identificados, 4/11 pertenecen al género *Pseudomonas*, 3/11 al género *Acinetobacter*, 1/11 al género *Micrococcus*, 1/11 al género *Petrobacter*, 1/11 al género *Brevundimonas* y 1/11 al género *Caulobacter*.

La mayoría de los resultados obtenidos en la identificación molecular coinciden con la identificación preliminar realizada a través de las pruebas bioquímicas. En efecto, tanto en

las pruebas bioquímicas como en la identificación molecular los aislados 15, 18, 21 y 41 fueron incluidos dentro del género *Pseudomonas*. El aislado 5, en la identificación molecular fue relacionado con el género *Brevundimonas*; esto coincide con los resultados obtenidos en los estudios bioquímicos, en los cuales no se le asignó un género específico, pero se sugirió se trataba de un organismo muy cercano filogenéticamente a las *Pseudomonaceae*. El género *Brevundimonas*, tiene características fisiológicas muy parecidas a las *Pseudomonas*, lo cual dificulta su identificación por medio de pruebas bioquímicas convencionales. Por otra parte, al igual que la identificación preliminar de los aislados 92, 97 y 98, la identificación molecular reveló que estos aislados pertenecían al género *Acinetobacter*.

La identificación molecular del aislado 101 reveló que este pertenecía al género *Caulobacter*. Este género está conformado por organismos aeróbicos quimiorganótrofos, que forman parte de los llamados organismos pedunculados o con protosca rellena de citoplasma con ventosas al final, la cual le permite fijarse a pequeñas partículas, a plantas y especialmente a otras bacterias en los medios acuáticos. La morfología poco habitual de estos organismos hace que al ser observados al microscopio tiendan a confundirse (Madigan y col, 2004). Quizás por esta razón no se logró una identificación preliminar a nivel de género, ya que al realizar la observación al microscopio, se observaron organismos con una estructura parecida a proyecciones que sobresalían de las células y que eran difíciles de explicar.

La identificación bioquímica de los aislados 44 y 84 no coincide con la identificación molecular. Según la identificación preliminar el aislado 44 pertenecía al grupo de los bacilos no fermentadores; sin embargo, a nivel molecular este fue identificado como un organismo perteneciente al género *Micrococcus*. La dificultad estuvo en las características morfológicas, muy difíciles de diferenciar. En el caso del aislado 84, las pruebas bioquímicas lo relacionaron con el género *Moraxella*, mientras que en las pruebas moleculares fue relacionado con el género *Petrobacter*. El escaso conocimiento del género *Petrobacter* dificultó que se realizara una identificación correcta de este aislado. Sin

embargo el género *Petrobacter*, está relacionado filogenéticamente con la familia *Moraxellaceae*.

A partir de las secuencias obtenidas se construyó un árbol filogenético, mediante su comparación con secuencias almacenadas en la base de datos EMBL. Los resultados obtenidos a partir de este análisis permitieron correlacionar la identificación preliminar mediante pruebas bioquímicas con la identificación molecular (Figura 35). En efecto los aislados Hg<sup>R</sup> 15, 18, 21 y 41 están relacionados con especies pertenecientes al género *Pseudomonas*, y particularmente a *Pseudomonas sp.* (15), *Pseudomonas alcaligenes* (18) *Pseudomonas stutzeri* (21) y *Pseudomonas putida* (41).

El aislado 5 se encuentra muy relacionado con la especie *Brevudimonas diminuta*. Por otra parte, el aislado 44 se relacionó con la especie *Micrococcus sp.* y el 101 se encuentra muy relacionado filogenéticamente *Caulobacter sp.*

Finalmente el aislado 84 mostró una relación filogenética con microorganismos pertenecientes al género *Petrobacter* y particularmente a la especie *Petrobacter succinimandens*.

Es interesante resaltar que Gómez y col. (2007) al realizar la identificación bioquímica y molecular de aislados Hg<sup>R</sup> provenientes de “lagunas de cola”; también encontraron organismos pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Acinetobacter*. Esto indica que algunas especies como *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter junii* y *Acinetobacter sp.* fueron encontradas tanto en “lagunas de cola” como en las aguas subterráneas. Debemos recalcar que los patrones de resistencia a antibióticos y metales de los aislados Hg<sup>R</sup> fueron muy parecidos en ambos estudios.

Los resultados de los estudios moleculares indican que en las aguas subterráneas de la mina Colombia existe una elevada biodiversidad, a pesar de que muchas bacterias son resistentes al Hg. En este sentido, Rasmussen y col. (2008), encontraron que el Hg afecta

negativamente la diversidad de las comunidades microbianas, para luego aumentar y mantenerse estable en el tiempo.

La presencia de bacterias del mismo género en ambos cuerpos de agua sugiere una posible contaminación de las aguas subterráneas por las aguas provenientes de las “lagunas de colas” altamente contaminadas con Hg, lo cual ocurriría durante las inundaciones que sufre la región de El Callao en la estación de invierno. Además, las comunidades bacterianas presentes en estas “lagunas de cola” podrían entrar en contacto con comunidades bacterianas que colonizan las aguas subterráneas, transfiriéndoles, por conjugación, marcadores de resistencia al Hg, antibióticos y otros metales pesados.

## **12. Ensayos de conjugación *in vitro* entre aislados Hg<sup>R</sup> y cepas potencialmente patógenas para el hombre.**

En muchos estudios se ha demostrado la gran importancia que tiene la transferencia horizontal de genes (THG) en la evolución y diversificación de las comunidades bacterianas (Osborn y col., (1997); Top y col. (1996). En este proceso la transferencia de elementos móviles como plásmidos y transposones juega un papel muy importante, ya que éstos portan genes de resistencia a antibióticos y metales pesados. Por tal razón, la THG ha jugado un papel fundamental en la adaptación de comunidades bacterianas a ambientes contaminados y a la diseminación de genes que confieren resistencia a múltiples antibióticos (Coombs y Barkay, 2003).

Se tiene un amplio conocimiento sobre la THG en comunidades bacterianas del suelo y en los cuerpos de aguas superficiales, pero se sabe muy poco sobre la frecuencia con la que ocurre este fenómeno en ambientes subterráneos.

En estudios realizados en ambientes subterráneos, se ha observado que factores como la escasez de nutrientes, la biodisponibilidad del agua, la separación espacial, un metabolismo lento de los organismos, la dominancia de un metabolismo quimiolitotrófico y la densidad celular pueden afectar negativamente la THG. Unido a esto, otras evidencias

indican que la THG es afectada también por la diversidad metabólica y genética de las comunidades bacterianas subterráneas (Coombos y Barkay, 2003, Hohnstock y col., 2000).

En este sentido, en nuestro estudio se realizaron ensayos de conjugación *in vitro* con la finalidad de determinar: a) si el fenómeno de conjugación podía llevarse a cabo entre bacterias Hg<sup>R</sup> provenientes de aguas subterráneas y otras cepas bacterianas, especialmente cepas patógenas para el hombre y, b) la frecuencia con la cual podía ocurrir la transferencia horizontal de marcadores de resistencia al Hg. Para esta experiencia se utilizaron como cepas receptoras *Escherichia coli* (OEG15) Rif<sup>R</sup> y *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13.525) Rif<sup>R</sup>. Estas cepas pueden ser utilizadas como un modelo biológico de bacterias potencialmente patógenas, ya que muchas especies de *E. coli* y *Pseudomonas* son patógenas en el hombre. Como bacterias donantes se utilizaron aislados Hg<sup>R</sup> (35, 49, 97 y 98) provenientes de aguas subterráneas.

A pesar de que este ensayo de conjugación se repitió tres veces, no se observaron exconjugantes. Esto sugiere que este fenómeno podría ocurrir en frecuencias muy bajas. Solo en uno de los tres ensayos se obtuvo un clon Hg<sup>R</sup>Rif<sup>R</sup> (aislado 97 *Acinetobacter junii* x *E. coli*).

En vista de que no se logró cuantificar la frecuencia de conjugación, se realizó un aislamiento plasmídico del clon Hg<sup>R</sup>Rif<sup>R</sup> para determinar si la resistencia al Hg adquirida por el transconjugante se debía a la transferencia horizontal de plásmidos de la cepa donadora. Los resultados revelaron que el transconjugante presentaba el mismo perfil plasmídico que la cepa donante (97) (Figura 39). Esto indica que si ocurrió un evento de conjugación entre *Acinetobacter junii* (aislado 97) y *E. coli*, y que el carácter Hg<sup>R</sup> fue adquirido por transferencia horizontal del plásmido conteniendo el operón *mer*. Se podría sugerir que el plásmido presente en la cepa donante podría ser responsable de la transferencia de marcadores de resistencia al Hg y, en consecuencia, a múltiples antibióticos hacia otras cepas potencialmente patógenas para el hombre.

Finalmente, al ocurrir la conjugación entre las especies *Acinetobacter junii* y *E. coli*, se evidenció que la transferencia de marcadores de resistencia al Hg puede ocurrir entre especies poco relacionadas filogenéticamente.

bdigital.ula.ve

## CONCLUSIONES

- Las bacterias Hg<sup>R</sup> se encuentran en las aguas subterráneas de todos los niveles de la mina estudiados (hasta 388m de profundidad).
- Las comunidades bacterianas que colonizan las aguas subterráneas en los diferentes niveles de la mina Colombia ubicada en El Callao, Estado Bolívar, presentan marcadores de resistencia al Hg y MeHg con frecuencias que oscilan de 25% a 60% y 16,28% a 100% respectivamente.
- Las aguas subterráneas de la mina Colombia poseen densidades bacterianas inferiores a las reportadas en aguas superficiales.
- Los microorganismos que colonizan aguas subterráneas de la mina Colombia, además de portar genes de resistencia al Hg, poseen genes de resistencia a múltiples antibióticos y a otros metales pesados.
- Las resistencias al cloranfenicol, a la ampicilina y a la tetraciclina fueron las más frecuentes en los aislados Hg<sup>R</sup>.
- Un elevado porcentaje de aislados Hg<sup>R</sup> fueron resistentes a múltiples antibióticos (> 50%), observándose resistencia a cuatro y hasta 5 antibióticos simultáneamente.
- Un elevado porcentaje de los aislados Hg<sup>R</sup> presentaron resistencia a metales, especialmente al zinc y al níquel.
- Los aislados Hg<sup>R</sup> que colonizan las aguas subterráneas, poseen plásmidos de bajo y alto peso molecular, posiblemente de tipo conjugativo.
- En relación con lo anterior, algunos plásmidos median procesos de THG.

- Los análisis de conglomerados y los experimentos de RISA demostraron la existencia de una elevada diversidad de las comunidades bacterianas que colonizan de las aguas subterráneas de la mina Colombia.
- En las aguas subterráneas estudiadas se encuentran especies relacionadas con *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Acinetobacter sp.*, *Acinetobacter junii*, *Caulobacter sp.*, *Petrobacter succinimandens*, *Brevundimonas diminuta* y *Micrococcus sp.*
- Se propone que la presencia de bacterias Hg<sup>R</sup> 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 como consecuencia de las inundaciones anuales y filtraciones.
- Las comunidades bacterianas de ambos cuerpos de agua podrían entrar en contacto, favoreciendo la transferencia y la diseminación de marcadores de resistencia.
- En este sentido se evidenció la transferencia horizontal de los genes de resistencia al Hg entre *Acinetobacter junii* y *E. coli*, dos especies poco relacionadas filogenéticamente.

## PERSPECTIVAS

- Realizar estudios más profundos sobre los niveles de contaminación mercurial y evaluar la presencia de bacterias Hg<sup>R</sup> en los cuerpos acuáticos de la región de El Callao, con la finalidad de poner en evidencia el impacto ambiental originado por la minería artesanal del oro.
- Estudiar el efecto de la contaminación con Hg sobre la estructura y diversidad de las comunidades microbianas que colonizan los cuerpos de agua en la región de El Callao.
- Realizar ensayos de conjugación “*in situ*” para determinar la frecuencia de transferencia de los marcadores de resistencia al Hg y antibióticos en las aguas subterráneas naturales.
- Estudiar las posibles aplicaciones biotecnológicas de algunos organismos que colonizan las aguas subterráneas de la mina Colombia, en procesos de bioremediación y biolixiviación de minerales.

## BIBLIOGRAFÍA

Adobowaje A. (2004) Bioremediación of Arsenic, Chromium, Lead, and Mercury. USEPA. Office of Solid Waste and Emergency Response Technology Innovation Office.

Atlas R. Y R. Bartha. 2002. Ecología Microbiana y Microbiología ambiental. Cuarta Edición. Editorial Pearson Educación, SA. Madrid

Álvarez, L., Rojas, L. y Fuentes, N. (2001) Contribución al estudio de la contaminación mercurial en aguas de poblaciones ribereñas del Lago Guri, Estado Bolívar. Resúmenes de la LI convención de ASOVAC, p.91.

Appia-Ayne C., Guilian, N., Ratouchniak J. and Bonnefoy, V. 1999. Characterization of an operon encoding two *c*-Type cytochromes, an *aa3*- Type cytochrome oxidase, and rusticyanin in *Thioabacillus ferrooxidans* ATCC 33020. Appl. Environ. Microbiol. 65:4781-4787.

Arribas, A., Cunniggham, C.G., Tosdal, R.M. (1995) Geology, geochronology fluid inclusions and isotope geochemistry of the Rodalquilar Gold Alunide deposit, Spain. Economic Geology and the bulletin of the society 90(4), 795-822.

Balkwill, D. L., and W. C. Ghiorse. (1985) Characterization of Subsurface Bacteria Associated with Two Shallow Aquifers in Oklahoma. Appl. Environ. Microbiol. 50: 580-588.

Ball, M.M., Carrero, P., Castro, D. y Yarzabal, L. (2007) Mercury Resistance in Bacterial Strains Isolated from Tailing Ponds in a Gold Mining Area Near El Callao (Bolívar State, Venezuela). Current Microbiology. 54 (2):149-154.

Barkay, T., N. Kroer, L.D. Rasmussen, and S. J. Sorensen. 1995. Conjugal transfer at natural population densities in a microcosm simulating an estuarine environment. *FEMS. Microbiology Ecology*.16:43-54.

Barkay, T., Miller, S., Summer, A.O. (2003) Bacterialmercury resistance from atoms to ecosystems.*FEMNS Microbiology*. 27:355-384.

Barkay, T., Tripp, C.S.and Olson, B.H (1985) Effect of metal rich sewage sludge application on the bacterial communities of grassland. *Applied and Environmental Microbiology*.49: 333-337.

Barrientos Ch.Y., González, D. y Urbani, F. (2000) Estudio hidroquímico de los manantiales: Cumbotico y Cumbote, colonia Tovar, Estado Aragua, Venezuela. *Ecotropicos*.13 (2):81-89.

Barkay T. and Wagner-Do Bler, I. (2005) Microbial Transformations of Mercurial Potential, Challenges, and Achievements in Controlling Mercury Toxicity in the Environment.*Advances in Applied Microbiology*. 57: 1-52.

Berroterán, J.L., Castillo A., Lira A., Morales L., Quijada O., Rashev, B. (2003) La minería: potenciales, impactos ambientales. En reserva forestal de Imataca. *Ecol. Bas. Tecn. Ordenan. Territ*. 109-122.

Bermudez, R.D. y Milano, S.R. (2002) La minería de pequeña escala en el Estado Bolívar, Venezuela. Centro de Investigaciones de Gestión Ambiental y Desarrollo Sustentable (CIGADS). Universidad Experimental de Guayana (UNEG). Puerto Ordaz, Estado Bolívar, Venezuela.

Bergey's Manual [Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.Classification of bacteria. 1st edition. 4 vols. (1983).

Botto,C., Duarte, C., Perdomo, A., Noya O, Pabón, R., Lander, O., Pacheco, M. (2000) Influencia de la minería de oro en San Juan de Manapiare, estado Amazonas, sobre la

transmisión de la malaria. En: II Conferencia Internacional Amazonía 21: Logros para una agenda sustentable, VI Asamblea UNAMAZ. De Lisio, A. (editor). Caracas: Universidad Central de Venezuela/ Asociación de Universidades Amazónicas; 2000 p 329 (Serie Cooperación Amazónica 23)

Bogdanova, E.S., Bass, I.A., Minakhin, LS, Petrova, M.A., Mindlin, S.Z, Volodin A.A., Kalyaeva, E.S., Tiedje M, Hobman JL, Brown NL. and Nikiforov VG (1998) Horizontal spread of *mer* operons among Gram-positive bacteria in natural environments. *Microbiol.* 144: 609- 620.

Borneman, J. and Triplett, E. (1997) Molecular microbial diversity in soils from eastern amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Applied and Environmental Microbiology.* 63 (7): 2647-2653.

Buck, J.D., (1982). Nonstaining (KOH) method for determination of gram reactions of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 44(4): 992-993.

Brierley, C.L. and J.A. Brierley. (1997). *Microbiology for the Metal Mining Industry. Manual of Environmental Microbiology.* (Ed.) C.J. Hurst. ASM Press, Washington D.C.

Carrasqueo, D.A., y Adams, M. (2002) Comparación de métodos para el análisis de mercurio en suelos procedentes de El callao, Estado Bolívar, Venezuela. 27: 191-194.

Cavalca, L., Dell'Amico, E., Andreoni, V. (2005) Intrinsic bioremediability of an aromatic hydrocarbon-polluted groundwater: diversity of bacterial population and toluene monooxygenase genes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 64 (4): 576-87.

Chapelle FH (2000) *Ground-Water Microbiology and Geochemistry.* (2<sup>da</sup> ed.) New York, USA.

Cervantes, C. and Vaca, S. (1990) Resistencia bacteriana a los metales pesados tóxicos. *Ciencia y Desarrollo* 17: 86-96.

Ciesielski, S., Cydzik-Kwiatkowska, A., and Turek, A. (2007) Molecular Analysis of Bacterial Community Diversity in Sequencing Batch Reactor (SBR) Operating in Autotrophic Conditions. *Polish Journal of Microbiology*. 56 (1), 45-51.

Coombs, J.M., and T. Barkay. 2004. Molecular evidence for the evolution of metal homeostasis genes by lateral gene transfer in bacteria from the deep terrestrial subsurface. *Applied and Environmental Microbiology* 70:1698-1707.

Chandy, J.P. (1999) Heavy metal tolerance in chromogenic and non-chromogenic marine bacteria from Arabian Gulf. *Environmental Monitoring and assessment* 59, 321-330.

CVG- MINERVEN. Mina Colombia. 2007.

De Souza, M., Nair, S., bharathi, L. and. Chandramohan D. (2006) Metal and antibiotic-resistance in psychrotrophic bacteria from Antarctic Marine waters. *National Institute of Oceanography*.

Doadrio, V.A. (2004) *Ecotoxicología y acción toxicológica del mercurio*. *Anales. Real Academia Nacional de Farmacia*. (70): 933-959.

Domenech, X. (1995). *Química de la hidrosfera*. Miraguano. Madrid.

Durán F., Carrero, P., Rondón, C., Petit de Peña, Y., Burguera, J.L., Burguera, M., y Malavé, A. (2005) Desarrollo de una nueva metodología para la especiación del mercurio en aguas de ríos del Estado Bolívar (Venezuela) mediante la generación de vapor frío y detección por espectroscopia de absorción atómica. VII Congreso Venezolano de Química, Facultad de Ciencias, ULA, 6-10 de Noviembre.

Ehrlich, H.L., 1997. Microbes and metals. *Applied Microbiology Biotechnology* 48:687-692.

Ellis, R.J., Morgan, P., Weightman, A.J., and Fry, J.C. 2003. Cultivation dependent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 69,3223- 3230.

Emiliani, F. (1989). Oligotrophic bacteria: Seasonal fluctuations and correlations with environmental variables (Middle Paraná River, Argentina). *Hidrobiología.* 111(1):31-36.

Essa, A.M., Julian D.J., Kidd, S.P, Brown, N.L, and Hobman, J.L. (2003) Mercury resistance determinants related to Tn21, Tn1696, and Tn5053 in enterobacteria from the preantibiotic era. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 1115-1119

Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution.*39:783-791.

Ferrer A. (2003) Intoxicación por metales. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra.* 26: 141 -153.

Ferrer, A. and Cabral R.(1993) Collective poisoning by pesticides: mechanism of production-mechanism of prevention. *Reviews of Environmental Contamination* 5: 161-201.

Förstner, U., Wittmann, T.W. (1981). Heavy metal pollution in the aquatic environment (2 Ed). *Spring-Verlag. Berlin. Heidelberg New York,* pp 486.

Förster, U., Ahlf, W., Calmano, W. (1993) Sediment quality objectives and criteria development in Germany . *Water Science Technology* 28 (8-9): 307-316.

Förstner, U. (1989) Contaminated Sediments. In *Lecture Notes in Earth Sciences*, S. Bhattacharij et al (eds) Vol. 21, *Spring-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany,* pp. 1-157.

Furukawa, K. and Tonomura C. (1972) Metallic mercury releasing enzyme in mercury-resistant *Pseudomonas*. *Agric. Biol. Chem.* 36: 217- 226.

Furukawa, K. and Tonomura, K. (1972). Metallic mercury releasing enzyme in mercury-resistant *Pseudomonas*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 36: 217-226.

Fredrickson, J.K., Hicks, R.J., Li, S.W. and Brockman, F.J. (1988) Plasmid Incidence in Bacteria from Deep Subsurface Sediments. *Appl Environ Microbiol*. 1988 December; 54(12): 2916-2923.

Gebauer, K. and Connor, B. (1991) Cutaneous mercury granuloma. *Australasian Journal Dermatology*. 32: 129 - 132.

REPÚBLICA DE VENEZUELA. MINISTERIO DEL AMBIENTE Y DE LOS RECURSOS NATURALES RENOVABLES (1.995). Gaceta Oficial Extraordinario N° 5021. Normas para la Clasificación y el Control de la Calidad de los Cuerpos de Agua y Vertidos o Efluentes Líquidos.

Gómez, C.W. (2007) Estudio de la transferencia de marcadores de resistencia al mercurio entre poblaciones bacterianas que colonizan aguas contaminadas en la región de El Callao (Estado Bolívar) Director María Ball. Universidad de Los Andes. Departamento de Biología.

Hall, E.M. and Pelchat, P (1997) Evaluation of a direct solid sampling atomic absorption spectrometer for the trace determination of mercury in geological samples. *Royal Society of Chemistry, Cambridge*. ROYAUME-UNI. 22(9) 1-23.

Harder, W. and Dijkhuizen, I. (1983). *Physiological Responses to Nutrient Limitation*. *Ann Rev Microbiol* :37: 1-23.

Harada, M. (1995). Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Critical Reviews in Toxicology* 25(1) :1-24.

Hendrickx, B., Dejonghe, W., Boëne, W., Brennerova, M., Cernik, M., Lederer, T., Bucheli-Witschel, M., Bastiaens, I., Verstraete, W., M Top, E., Diels, I., Springael, D.

(2005) Dynamics of an Oligotrophic Bacterial Aquifer Community during Contact with a Ground water Plume Contaminated with Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylenes: an In Situ Mesocosm Study. *Appl Environ Microbiology*. 71 (7): 3815-25 .

Herrero, N.J., Montes M.E., Penna, S., Suárez, C.E., Rivas, C.M., Herrero, Z.R., Farías, I. (2001) Diagnóstico de contaminación mercurial en la comunidad de Santa María del Vapor, Municipio Sifontes, Estado Bolívar. Conicit Descriptor: Alejandría BE 6.0.2.0r

Higueras, P. y Oryazun, R. Contaminación, reales decretos y el legado minero de España. Departamento de Ingeniería Geológica y Minera, EUP de Almadén, Universidad de Castilla-La Mancha. Departamento de Cristalografía y Mineralogía, Universidad Complutense de Madrid. 2005.

Hohnstock, A., Stuart-Keil, K.G., Kull, E.E., and Madsen E.L. (2000) Naphthalene and Donor Cell Density Influence Field Conjugation of Naphthalene Catabolism Plasmids. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (7): 3088-3092.

Huang, C.C., Narita, M., Yamagat, T. and Endo, G. (1999) Identification of three merB genes and characterization of a broad- spectrum mercury resistance module encoded by a class II transposon of *Bacillus megaterium* strain MB1. *Gene*. 239: 361-366.

Ishida, Y., Imai, Y., Miyagai T, and Kadota, H. (1982) Growth and uptake Kinetics of a facultative oligotrophic bacterium at low nutrient concentrations. *Microb. Ecol.* 8:23:32.

Ishida, Y. and Kadota, H. (1989). Growth patterns and substrate requirements of naturally occurring obligate oligotrophs. *Microbiol. Ecol.* 7:123

Kassan, H. (1993) The role of waste activated sludge and bacterial in metal -ion removal from solution. *Cryst. Review Environmet Sci. Technol.* 23: 79:117.

Koneman, E., Allen, S., Janda, W., Scherkenberger, P., Winn, W. (1999). *Diagnostico Microbiológico. Texto y Atlas a color. Quinta Edición-Editorial Panamericana*

Konopka, A., Zakharova, T., Bischoff, M., Oliver, L., Nakatsu, C. and Turco, R.F. 1999. Microbial biomass and activity in lead-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2256-2259.

Kotchoni SO, Gachomo EW, Betiku and Shonukana O (2003). A home made kit for plasmid DNA mini-preparation. *Afric J. Biotechnol.* 2 (4): 88-90.

Larceda, L.R., Marins, M., Souza, S., Rodrigues S, Pfeiffer, W and Bastos, R. (1991) Mercury dispersal in water, sediments and aquatic biota of a gold mining tailings drainage in Poconé, Brazil. *Water, Air and Soil Pollution.* 55:283-294.

Lacerda, L.D. and Salomons, W., 1992. Mercurio na amazonia. Rio de Janeiro. Brasil. *Serie Tecnologica ambiental*). p 78.

Liebert C.A., Hall, R.M. and Summer, O. (1999) Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol. Mol. Biol.* 63: 507- 522

Liebert, C.A, Wireman J, Smith, T. and Summers A. (1997). Phylogeny of mercury resistance (*mer*) operons of gram-negative bacteria isolated from the fecal flora of primates. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1066-1076.

Lindsay, J. and Riley, T. (1994) Staphylococcal iron requirements, siderophore production, and iron-regulated protein expression *Infection and Immunity.* 62: 2309-2314.

Lovley, D. (1991) Dissimilatory Fe (III) AND Mn (IV) Reduction. *Review Microbiology* 55: 259- 287.

Lucas, S., Broennimann, O., Febbraro, I., Heeb, P. (2002) High Diversity among feather-degrading bacteria from a Dry Meadow Soil. *Microbial Ecology.* 45: 282-290

Narváez, E., Álvarez, M., Guíñez, J., y Atencio L., (2005) susceptibilidad a antibióticos y metales pesados y perfil plasmídico en *Escherichia coli*. Boletín del Centro de investigaciones Biológicas. 39 (1): 55-66.

Nascimento, A. and Chartone-Souza, E. (2003) Operon mer: bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. Genetic and Molecular Reseach. (2): 92-101.

Nakatsu, C.H., Carmosini, N., Baldwin, B., Beasley, B., Kourtev, P. and Allan Konopka, A. (2005) Soil Microbial Community Responses to Additions of Organic Carbon Substrates and Heavy Metals (Pb and Cr). Applied and Environmental Microbiology. 71: 7679-7689.

Nissen, M., Garay V., Aguilera M. y Valenzuela E. (2000) Calidad de aguas subterráneas de la decima región de Chile. Agro sur. 28(1):25-39

Ní Chadhain, S., Schaefer, J., Crane, S., Zylstra, G., and Barkay, T. (2006) Analysis of mercuric reductase (*merA*) gene diversity in anaerobic mercury-contaminated sediment enrichment. Environmental Microbiology. 8(10):1746-1752.

Madigan, M.T., Martinko, J.M. y Parker, J. 2004. Brock Microbiología de los Microorganismos. 10ª ed. Prentice Hall International.

Malik, A., Khan, I.F and Aleem, A. (2002). Plasmid incidence in bacteria from agricultural and industrial soils. World Journal. of Microbiology. and Biotechnology. 18: 827- 833.

Mendioroz, S. Mercurio. En: Eliminación de Residuos. Cantoblanco. España, CYTEC, 1998.

Misra, T.K. (1992) Bacterial resistance to inorganic mercury salts and organomercurials. Plasmid. 27: 4-16.

McArthur JV and Tuckfield, RC(2000). Spatial patterns in antibiotic resistance among stream bacteria: effects of industrial pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3722-3726.

Mclauchlan, G.A. (1991) Acute mercury poisoning. *Anaesthesia.* 46: 110-112.

Moalla, S.M., Awadallah, R.M., Rashed, M.N., Soltan, M.N., (1998). Distribution and chemical fraction of some heavy metals in bottom sediments of Laker Nasse. *Hydrobiología.* 364, 31-40.

Moraga, R., Merino, C. y Mondaca, M.A. (2003) Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique. *Investigaciones Marinas.* 31 (1):91-95.

Moraga M, Rubén, Santander P, Edgardo, Arias C. (2007) Integrons and their relationship with resistance phenotype in Gram negative bacilli isolated in the Hospital Torres Galdames, Iquique, Chile. *Rev. chil. infectol.*, Oct. 2007. 24, (5), p.384-390.

Morby, A.P., Hobman, J.L. and Brown, N.L. (1995) The role of cysteine residues in the transport of mercuric ions by the Tn501 MerT and MerP mercury-resistance proteins. *Molec. Microbiol.* 17: 25-35.

Montuelle, B., Latour X., Volat, B. and Gounet A (1994) Toxicity of heavy metals to bacteria in sediments. *Environmental Contamination and Toxicology.* 53: 753-758.

Mudryk, Z. (2002) Antibiotic Resistance among Bacteria Inhabiting Surface and Subsurface Water Layers in Estuarine Lake Gardno. *Polish Journal of Environmental Studies.* 11 (4) :401-406.

Murray, K.S., (1996) Statical comparisons of heavy metal concentrations in River sediments. *Environmental Geology* 27, 54-58.

ONUUDI (UNITED NATIONS INDUSTRIAL DEVELOPMENT ORGANIZATION) (2004) mercury pollution from artisanal gold mining in block b, El Callao, Bolivar State, Venezuela: health and technological assessment (Project XP/VEN/03/C04).

Organización Mundial de la Salud. (OMS) (1978) Mercurio (Criterios de Salud Ambiental - I). Ginebra.

Ortega, J.A., Ferrís T.J., López, J.A, Marco M.A., Garcia, C.J., Cánovas, C.A., Ortí M.A, Ibiza P.E, Molina G.F., Lorente O.D. (2003) Hospitales Sostenibles (parte II). Mercurio: Exposición pediátrica. Efectos Adversos en la Salud Humana y Medidas preventivas. Revista Española Pediatría (59): 274-291.

Osborn, A., Bruce, K., Strike P., Ritchie D.A. 1997 Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (*mer*) operon. FEMS microbiology reviews. 19 (4):239-262.

Oyarzun, R., Oyarzún, R., Lillo, J., Maturana, H., Higuera, P. (2007). Mineral deposits and Cu-Zn-As dispersion-Strong metal dispersion KAA: El Indio type scenario contamination in stream sediments from the semiarid Coquimbo Region, Chile. Environmental Geology. DOI.

Palheta, D., Taylor, A. (1995) Mercury in environmental and biological samples from a gold mining area in the Amazon region of Brazil. Biotropica. 21 (1):91-93.

Paniagua, G.L., Monroy, P.E., Vaca P.S., González S.E. (2003) Resistencia a antibióticos y metales pesados en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*. Rev Med Hosp Gen Mex. 66 (1): 13-21.

Pearson, A.J, Bruce, K.D, Osborn, A.M, Ritchie, D.A. and Strike P (1996). Distribution of Class II Transposase and Resolvase Genes in Soil Bacteria and Their Association with *mer* Genes. Appl. And Environ. Microbiol, 62: 2961-2965.

Paerl, H.W. & Goldman, C.R. (1972) Stimulation of heterotrophic and autotrophic activities of a planktonic microbial community by siltation at Lake Tahoe, California. Mem. Inst. Idrobiol., 29 Suppl.: 129-147.

PNUMA. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. Evaluación mundial sobre el mercurio. Publicado por PNUMA Productos Químicos (2002) Productos químicos Ginebra, Suiza.

Portoles, A., Espinosa M. and Hidalgo, A. (1971) Penicillin and polymyxin effects on the chromogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* strains. The Journal Antibiotic. 23 (4): 266-269.

Pucillino VN, Talor, DN, Patrick, JD (1985) Multiple metallic mercury emboli. British Journal of Radiology. 58: 470 – 473.

Ralston, D., Halloran T. (1990) Ultrasensitivity and heavy-metal selectivity of the allosterically modulated MerR transcription complex. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87: 3846-3850.

Roszak, D.B. and Colwell, R.R. (1987) Survival strategies of bacteria in the natural environment. Microbiology Molecular. Biology. Reviews. 51(3): 365-379.

Rasmussen, L.D.; Turner, R.R.; Barkay, T. (1997) Cell-density-dependent sensitivity of a *mer-lux* bioassay. Appl. Environ. Microbiol., 63, 3291-3293.

Rasmussen, L.D., Zawadsky, C., Binnerup, S.J., Øregaard, G., Sørensen, S.J., and Kroer, N. (2008) Cultivation of Hard-To-Culture Subsurface Mercury-Resistant Bacteria and Discovery of New *merA* Gene Sequences. Applied and Environmental Microbiology. 74 (12): 3795-3803

Díaz-Raviña, M., Bååth, E., and Frostegård, A., 1994. Multiple heavy metal tolerance of soil bacterial communities and its measurement by a thymidine incorporation technique. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 :2238-2247.

Reyes, N.S., M.E. Frischer, And P.A. Sobecky. (1999). Characterization of mercury resistance mechanisms in marine sediment microbial communities. *FEMS Microbial Ecology.* 30:273-284.

Roane, T.M. and Kellogg, S.T. (1996) Characterization of bacterial communities in heavy metal contaminated soils. *Canadian Journal of Microbiology* .42: 593–603.

Rosas Rodríguez, Hermógenes (2001) Estudio de la contaminación por metales pesados en la cuenca del Llobregat. Director Casas Sabata, Josep María, Lao i Luque, Conxita. Universidad Politécnica de Cataluña. Departamento de Minería y Recursos Naturales. España.

Ruth Mirian Loewy 2000 Plaguicidas en aguas subterráneas del Alto Valle de Río Negro y Nciquen. Director Ana Pechen. Facultad de Ingeniería. Yniversidad Nacional de Comahue.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual* (2<sup>da</sup> ed.) New York, USA. Cold Spring Harbor.

Sepúlveda G.L, Agudelo, G.L., y Arengas C.A. (2006) El mercurio, sus implicaciones en la salud y en el ambiente. *Luna Azul.* (04): 23–31.

Silver S, Phung LT (2005) Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Appliednd Environmental Microbiology* 71: 599-608

Silver, S. and Misra, T. (1988) Plasmid-mediated heavy metal resistances. *Annual Review of Microbiology.* 53: 2725 -2732.

Silver, S., and Walderharg, M. (1992) Gene regulation of plasmid and chromosome determined inorganic ion transport in bacteria. *Review Microbiology*.56: 195-228.

Singh, I.B., Tobschall, H.J. (1999) Status of anthropogenically induced metal pollution in the Kanpur-Unnao industrial region of the Ganga Plain, India. *Environmental Geology* 38(1), 25-33.

Schut, F., Prins, R. and Gottschal, J.(1997).Oligotrophic and pelagic marine bacterial: factors and function. *Aquatic Microbial Ecology*.12:177-202.

Schut, F., Vries, E., Gottschal, J., Robertson, B., Harder, W., prins, R., button, D. (1993) Isolation of typical marine bacteria by dilution culture: growth, maintenance, and characteristics of isolates under laboratory conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 7: 2150-2106.

Schaefer, J., Yagi, I., Reinfelder, J., Cardona, T., Kellickson, K., Shoshanatel - Or and Barkay, T. (2004). Role of the Bacterial Organomercury Lyase (MerB) in Controlling Methylmercury Accumulation in Mercury-Contaminated Natural Waters. *Environ. Sci. Technol.* 38: 4304 -4311.

Summers, A.O. (1972). Mercury resistance in a plasmid-bearing strain of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 112: 1228-1236.

Summer, A.O., Wireman, J., Lorschider, F.L., Marshall, S.B., Bennett, S.B. and Billard, L. (1993) Mercury released from dental "silver" fillings provokes an increase in mercury- and antibiotic- resistance bacterial in oral and intestinal flora of primates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:825-834.

Summer, A.O. (2002) Generally overlooked fundamental of bacterial genetics and ecology. *Clinical infectious diseases.* 34:S85-S92.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software versión 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 10.1093/molbev/msm092.

Top, E., Mergeay, D., Springael, and Verstraete, W. 1990. Gene escape model transfer of heavy metal resistance genes from *Escherichia coli* to *Alcaligenes eutrophus* on agar plates and soil samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2471-2479.

US EPA. Environmental Protection Agency (1997) Mercury Study Report to Congress. US Environmental Protection Agency, Office of Air Quality Planning and Standards and Office of Research and Development. Washington, DC, USEPA.

Vetriani, C., Chew, Y.S., Miller S.M, Yagi, J., Coombs J., Lutz, R.A., and Barkay T. (2005) Mercury adaptation among bacteria from a deep-sea hydrothermal vent. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 220- 226.

Wang D.T., Quing C.L., Gou, Y. and Y. J. Guo.J (1997). Effects of humic acid on transport and transformation of mercury in soil - plant system. *Water, air and soil pollution* 95:35-43.

Wang, Y., Moore, M., Levinson, H.S., Silver, S., Whash, C., and Mahler. I. (1989) Nucleotide sequence of a chromosomal mercury resistance from a *Bacillus* sp. with broad-spectrum mercury resistance. *Journal Bacteriology.* 171: 83-92.

Wagner-Döber, I., von Canstein, H.F, Li Y, Timmis K.N. and W.-D. Deckwer (2000) Removal of mercury from chemical wastewater by microorganisms in technical scale. *Environ. Sci. Technol.* 34: 4628-4634.

Wauchope, R.D. y McDowell, L.L. 1984. "Adsorption of phosphate, arsenate, methanearsonate, and cacodylate by lake and stream sediments: comparisons with soils". *J. Environ. Qual.* 13, 3: 499-504.

Wawkinsw, W.G. and Freedmanw, R.B. (1976) Thiol-protein disulphide oxidoreductases. *Biochemical Journal*. 159:385-393.

Weisburg S, Barnes SM, Palletier, DA and Lane DJ (1991) 16s ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol* 173: 697- 703.

Wiatrowski HA and Barkay T. (2005) Monitoring of microbial metal transformations in the environment. *Current Opinion in Biotechnology*. 16: 261–268.

Wireman, J., Liebert, C., Smith, T., and Summers, A.O. 1997. Association of mercury resistance with antibiotic resistance in the Gram negative fecal bacteria of primates. *Applied Environmental Microbiology*. 63:4494-4503

Wuertz, S. and Mergeay, M. (1997) Impact of heavy metals on soil microbial communities and their activities. in: *Modern Soil Microbiology*. 607-642. Marcel Dekker, New York.

Zhou, J., Xia, B., Huang, H., Palumbo, A. and Tiedje, J., (2004) Microbial Diversity and Heterogeneity in Sandy Subsurface Soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 70 (3):1723.

**Secuencia del gen ADNr 16s de los aislados Hg<sup>R</sup>.**

**mer5**

TTTCCGCGCACATCCTAGACTTGATCCTGGCGCAGGACTACGAGCCTGGA  
 TCACACTCCTTGAGAGTTTGACTCCTGCGCTCACGGATGCCGTGATGGTA  
 CCTCACTCCCTTAAGAGTTGTGATCGCTGGTATCAGCGATAGGCGCCCCG  
 TCTCTTAGAAGAATTAATTCTATGCGCCCTTGAGCAGCAGGCCCGCGTC  
 CTGATTACTCATACTGGGGAAGGGAAAGCGCTTCCACCAAGGCCGACAT  
 ATCAGTTATCTAGGTCCTGAGAGGATGGATCCCCCCCCCATTTGGGGACTG  
 AAAACACGCGCCCAAACCTTCTACGTGGGAGGCAGCCGCTGGGGTAATCT  
 TTGCGCAATTGGGCAGAAAGCCTTGACCCACCCCTCGCCGCGTGAAATG  
 ATGAAGGTCTTTATGATTTGTAATAATTCCTTTCACCCGGGCGACAATAA  
 TATGATCGCTCCCCTGGAGAAAAAAACCCCGTGCTAACTTTCCTTGGTC  
 ACCCCCCCGCGGTTAATAACAAAAGGGGGGCCTGGCGGATTGCCCTGA  
 AATTTCTGTGCCCTTAAAAGGGGAGACGGCAGCGGTGGACATTTTTTTC  
 TAAGGGTGTTGAAAAATCCCGGGGGGCTCTACCCCTCAAAAAATACGCC  
 CTTTTTATTAACCTATTATTTCTCTGTGATTGCGGTAATAAAGATCAAT  
 TTGGCGCAACCCACCCCAATTCATGTTAGAGCTCCACATAATCCTTAG  
 TATATCCTCGTGCAAAGAACAACCCCTCTTCCCCTACCAGCCGACACACC  
 TTCTACCGTCCTTCTATTTTCACCCACCCAAGACCTTCCTATCAGCCT  
 GGGGGGGGTAAATAAAATAAACTTAAATAAAATCCTCGCTCTTATCGTTCC  
 CACCCCACTATACACAAGAAATTTACTATATTACCGCTATATCGTCCG  
 TTCTCTTTTTTGATTACATGCAACTAATCCCAATTTTATT

**mer15**

NTTCCGCGCACGCTTAAGTTGATCTGGCTCAGGATTGGGCCGTGCCTCCT  
 GCTTAGACTTTGATCCGGGGACTAGTGCCAGGAGTCTGTCTGGTTTAGG  
 GGTAGATCCTGTCTAAAGGAACGCTAATACCTCTAACGTTCTACGGGAGA  
 AAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATT  
 AGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTC  
 TGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTAC  
 GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGC  
 CATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTG  
 GGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGA  
 ATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGC  
 AAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTCGTTA  
 ATTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCTCAAACCTG  
 GCGAGTTAAAATATGGCAAAGGGGGGTGGAATTTCTGTGTTGCGGTGAA  
 ATGCGTAAATTTAGGAAGGAACACCCCTGGCGAAGGCGACCCCTGGGCT  
 AATACTGCCCTTAGGTGCGAAAGCGGGGGGAGCAACCAGGATTAATTTCC  
 TGGGTGTTCCACCCCGTAAAAGAAGTCGAATAAACCTTTGGGATTCCTT  
 GAAATCTTATTGGGCGCCCTAAACCCTTTAAATCCCACCCCTCCGGGGGGG

TATGGCCCCAGGTTTAAACTCAAAAATAATTTATCGGGGGCCCCCCAA  
CCCGTGGGGCAGGGG

**mer18**

NCCGAGCGCTGCTAAGTTGATCCGGCTCAGATGGGGCCGGGCCCCCTGCT  
TAAAGGTTGATCCGGGCTCTAGAGCCCAGCAGTCTCCCCGGCTTAGGGGT  
AGATCCTTTCTAAGGGAACGCTAATACCCAAAACCTTATACGGGGGAAAG  
CGGGGAACCTTCGGGCCTTGC GTTATCAAATAAGCCTAGGTCGGATTACC  
TAGTTGGGGGGGAAATGGCTCCCCAAGGCGACAATCCGTAACCTGGTTCTG  
AAAGGATAATCATTCCCTCGGGACCTGAAACACGGCCCAAACCTCTATCTG  
GGGGGACAATTGGGGGAATTTGGTATACGGGGAAAACCCCTGATCTCCCCC  
TCGCCCTTTGTTGTAAAAAAGCTTTCTTTATTAAAAAAACTTACTTTC  
GGGAGGAGAGGGCCTAATCCTAAACCCCTTGGTGTTTTTGCTGCTCCCCT  
AACAAATATAAACTCTGCGATACTTATTTGACIGTAAACTTGGTTGATT  
AACAAAAGGGGTGACCATGCCGTATACTCTAAATATATCTGACTGTATAA  
AACCGCCCCACAGGTTGTGCGCTTATAAAGTTCTATATAAGAATACTCCC  
CCTCGCGCTTTAAAATTGGCGATAATGCGATCTTATACTACACAATGTTG  
TATTAATCATAACCATTTATCAGACGGTTTCGGGTCGATTTTTCTCTGC  
TTATACGCTTAAATATGTGCACTATTCTTATACTTAACATGAACTAGACT  
CGCTGTCACCAATCACCCACACTTTCATTTGCACATATTATATA

**mer21**

NCCGAGCAGGCCTAAGTTGATCCTGGCTCAGATACGGCTGTATTACCTCC  
TTAGAGTTTGATCCGGGCTCAAGTGCCTAGGAGTCTCTACTCCTTAGAGG  
TAGATCCTGGCTAAGGGAACCGTAACACCTTATAACATTAAACGGGGGACA  
GTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAC  
CTGTTTGGTGAGGTAAAGGCTCCCCAAGGCGACTATCCCTAACTGGTCTG  
AGAAGATGATCCCTCACCTGGAGCTGAGACCCGGTCCAAACTCCTACGG  
GAGGGTGCAGTGGGGAAATTTTGC ACTCTGGGTGAATGCCCTGATCCCCCT  
TGCTCGTGTGTGTGAAAAAGGTCTCCGGATTGTAAAGAACTCCTCGTTGG  
GAGGAAGGGCATTAAATTTATCCCTGCTGTTTTTAATTTTATCAACGA  
AAATATTCTCCGGCTTATTTTCTGGTCCAATAGCCTGTTGTTAATACCT  
AAGGGTTTCGTTCCTTTTATCTTTAATTTATCGGGACTTTATACCTTACC  
CAAACCTGTTGGTTTCTCTTACCATTTTTTATATGTAAATACTCCCCGTT  
TTCTTCTTCTCTTGGATATTGATCTTTTACTATTTTAGGTGTTATATTT  
TATTTTTTCGCTTAAATAACATTTGGGGTCGGAATTTCCCTCTGTATC  
TTGCTTCAATATTATTGTACATCCTTATCGATCTTTTAAACCCTGTGTGG  
TTAATAACAACCTCACTCCCCATCTTCACTATTTTACTCCCCCTCAGTA  
TGTCACGTAACCTATTTTGTATTTCTATCACGGGTGTATTATTTACCCTC  
GTTAGCTTACTCCT

**mer24**

CGGAGCGCTTGTCTACACAGGATTCGCCCCCCCCGGATTTTTCTCTCCTTT  
ACCATGCGCAGCACGACAAGTGATCTTTACCTGCCTCTCCTCAGGGCTGG

GCACTTATCTCTCAGCGCGTATAATCGTTTACAAGTTAAGATTTGTACGG  
GGGGAGAGTTATTCTCTCTCTCCTTCCCTCGCTCTNGACACTTATGTGATG  
CGTTGGTTGTATTCTGACACCCTGCTTATGCTTATTGAGTGCGCCTGGTT  
GGAGTAGTAATATTATCTCATGTCCACTGAAAGAGGAGCGTAAGGTTAC  
CAACACCGCCCCTATTTCTGTGACGCGTTCGTTACGCTTCCGTGTGT  
TCCTGTATACCTTACATAAATACCTCTGGCTCCGTATACGGCGTCATAACT  
CATCATATACGTTTGTTCGCCATTTGACCCCTCCCACACGCGCTAGTA  
TCCCTCCGTATTGATAAATTGTGCTCTTCTCATCACTGGACTCTACTTGC  
TCTCATGTATCTGGTGGAGTACATGGGACGACCATCTCATTAGTGTCGG  
TTCTCTATCGCGGAGTCCCTCGCCCCTACGATATCATACTTCTTGCTGCAC  
GAGATACTGTGGCCTGTAGAAGCTGTATCACCGTGCACCGCTGTGACAGT  
GTTAACATGTCCCGGCCTCTCTATGGCTACATCATCTTAGCGCACTGACT  
TGCTTTGTGCGGCTGCGCATTGTACGCTGGTAGTTGCCATCTCGAATATT  
CGCCCGTACCGTCAGATGTCTTCCCTCGTCACTCGACATCTTCTCTGCGTG  
GTATTATATGTCAACAGACTTCCACTGAGCTGGTAGTGTGTTTGAGACA  
TGCTTGCAACAAGATTAGTTGTCCTCGTCCCTAGAAAGAGTATAGTGTGT  
CCTCCCTTCCCTACTGCTGGACCTAGACGCCAGCTCCATTCTCTAGACTC  
TTGTACTTGAACCTTTTCGCGCGCTTGAATTACTCCTTACACGCCAAGCGAC  
CTTGTGGATCGTGG

**mer32**

GCGTCCTCTAGAGTTGATCTGGCTCGGCTGCGGCTGGCTCAACTCCTTAG  
AGCTGGATCCTGGCATCGGATGGCAGCAGGCCCCACTCCTTAAAGCTGGA  
TCCGGGTGCAGGCTCGCAGCCGTCTAAAACCTTTAAACCTGGCTCCGGG  
CCCCCGCTTGGCCTCACGGCTTAATCTATAAAACCTGTACCCCGCTGAAA  
CAATTAATAATCCTTTAAAACCTTTTCTTATTATTCTGTTCTAATATCT  
CACTATACCCCTCATTACCTATATCGCTCCACCTCCACCCCCCCCCCA  
CACCTTAATATTTTTCGTCTTTTCTCCTAATTACTCATTCCCTACCACCA  
TCACACTCTGCTTACCGATTCCCTGACTCTAACTACTCATCCTCTTCTCT  
CAACTCTCGATACTCGTCTCTGTCACAATCTCTCTACAATTTTACTTCTC  
ATACTACTCCTTACCTTACATGTCATACGTCGTCTTCTTCTTCGCCTCCC  
TTCCCCCTCCGCTCCTATCACTTCGCCCTACCCTTTTCCCTTCCATCTCAC  
TCTCCTTCTTTTATGTCTATCTCTCATATATTCGCTCTCTCCTCTCACT  
TACCTCAACGTTCTCCCCATTCCCTAACCTAAACCCACCTCCTCAATCGTT  
TATTAACCTCTCTTCTCTCCTATGGTCCATTCTGTACATCTCTACCCTC  
CTTCCCTAATCGCCTTCTCTCCT

**mer41**

CCGCGCTCTCTTAGATTGATCCGGCTCAGGATACGGCCTGGATCTCT  
CCTTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGACAGCAGTCTCTCCGGCTTAGA  
GGTGGATCCTGGCTCAGGGTACCCTAATGCCTCTATATCCTCTAACGGGA  
GACAGCGGGGGACGCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCCG  
ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTG  
GTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCC  
TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCC

AGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAG  
TTGGGAGGAAGGGCATTAACTAATACGTTAGTGTTTTGACGTTACCGAC  
AGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGG  
TGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTG  
TTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAA  
CTGGCAAGCTTGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGT  
GAAATGCGTAGATTTAGGAAGGAACACCCTGGGCGAAGCGACCCCCGGG  
ACTGATCCTGACACTGAGGGGCGAAAACCTTGGGGAGCAAACGGGATTAA  
AATACCCTGGTAGTCCCCGCCCTTAACAAATGTCCACTAACCCGTTGGGA  
TCCCTTAAAATTTATTGGGGCCAGCCAACCCCATAAATTTTACCCCCCGG  
GGGAGTCCGGCCCCCGGGGTAAACCCAATTTATTTGTCCGTGCGCCC  
CCCCACCCGGGTGAAGATTT

**mer44**

GCGCTCTCTTAGGTGATCTGGCTCGGATACGGCTGGATCCCTCCTTAGA  
GTTTGAACCGGCCCTTTGGAGTACGGCCTGGATCCCCTCCTTAGAGGGA  
CAACCTTGTGAGCAGGGAACCCTTTATCCTTAAAATCTCTAGAGGGGGGA  
AGGGGTGGAGACCCTCTCGGGTGTGCTTATATAAAAATGATACTAGAGG  
TCGAGATTTCTTATGGTGGGGTGATTTAATCCCCTCCACAACGGTGTG  
ATTATCTCTTTTGACTTGAATAAGATACTTCTTCTTCCCTTCGTCTACC  
TAACATTTTTATTCATATACCTTTCTCGAAGATAGCCGTGTCTTAGTGC  
ATTCATCGTTTTCTTTATTGTACGATACCCTCCTCCACCCCTCTCTTCTA  
TTTGTGTGTTAATAAATGGTATCTCCTCTCCGTCCCTCTAAATGTCCTT  
TTGGCGATCCCTTTTCTTTTATTTCTCCCTCATATGTTCTTGCCTTTGTT  
TAGTCTAATATTCCTCTTTATTTAATATTTCCCTACTTGATTTATTTT  
TTTTTCACGCCTCCTCTCTGATTTTATTATAACTCAATCGTTCATACATA  
TCCCTCTAACTCTACACGGAATTTATGAACTGTATTCCGCAATCTTACTC  
GAGTCTGTCCTTTATCTAACTCATTGTGTATCTGTGTGATACCTTCTTA  
TCCTCACCAGCATGTTAGAAAATATTCTTATATCCTACTTTTATCTTTT  
TACTCTAATTATTTTCTTTCATTACATTTG

**mer79**

AGGGAGACGTCCCCTTTGCGAGATATGGATACCGGGTGA CTCCAGCCGCC  
CCAACGGGGGAATAGTACACAATCACTTCTCCATTGTAGGAAGGAGTGCT  
GTATTACAATAGCGCCTTCTTATGTGTGACGTGTCTGATGGCGGGCGGAT  
CCTCAGAGCCGTCTTGTNCA TAGGCGATGTTGGAAGATGTGTATATTGT  
TCGCTCCTCTAGCCGTCTAGGAATACTTTCCTCACAAAAAAGATATCGC  
TACACCTCGCCGTGTCAGGCACACTCGCCTCACACAGGNTGCCGCCACTT  
ACACATGGCTCGTGCTAGTCAAATGTTGATAATGTAACCTTCCCTATACAT  
GTGTTTATAAATTGAATGAGAATGTGTCGCTGCCATTATAAGCTACTATG  
TACTATTAATAGTAAGTTGAGTCTCCTATGAAATGGTGTGTATATATG  
TTANATCAGTGATGCGACTGTCACGTA AAAATTCATTCTTCCGCATTT  
ATAGCATAGTACCTTAATATGTACGCAATCTGAAGTGAGCATGATAACTG  
ACAATAGTATGATCTTATACTCACACTGAAGGCAACTGATAGCCTTACTA  
GCTATAGTTTCCACCCGATAGACAAATGGTATTCCTGAATATTACTGATG

ACGGTATAATAATGTGGATGACGTCAACTATATGCGTCTATCTTATCTCTA  
ACTATTACTTAAGAAGATGGTATACAGTACTACATATCTATTATTCTGGA  
ATACTCATATTGTACTAGCGGTACGACCACTATTATTACATAGCATGCGC  
CATTAGGATCGCTCTCAACTATTTTTTGGGACACAAATGCTCGATAATCG  
GAATAATATCATATGTTGCATACATCCTTCAATTANCAGTATAAACATCT  
CGTGTCTACATTAACGTACTCTATCAGGCTGTGTATAATTGACATATGTA  
CGCATTATTATCGTACTACAATGTAGTAGCAAATTGATACCATAGGCGTG  
CACACACCTGTCATCCTTCCTTAGCTACAATAAATTTGCATGCCTATCTA  
TATAACATAACACCTACATATCGCATGTGATATACTCTGATACTCACAGC  
TTATTGTATTGTTGTTTATATACACGGATATAAGATAACAGCGACTCTCC  
ATTACAGTGTCGCCTA

mer84

CCGCTGACTCTTAAGTIGATCTGGCTCGGATGACGGCCGGCCCTCACTC  
CTTAAACCTGGATCCGGGCTCAGGATGGCAGAAGGCCCTACACCTTAGAG  
CTGGATCCTGGCGAAGGGTGGCCCAAGACCTTAATCCTTGAACCGGGAAC  
AGGGGGGATCCTTCGCGCCCAGGCCTTAAAGCTTGAACCCGGCTCCGGTT  
AGACTATTTGGGTGGGGTAAATGCCCTCCAAGGCGGCTATCTGTTACGGT  
GTATTGATATAAAGACTCCCCCCCCCTGGCGGCCGATCATACCGCCCCC  
ACTTCTTAAAGGGGGGCGAGCTGTGTGATAATACTTGGATATAGGGGGTG  
GCAACCCAGCACCTACCCCTTGTCTGGTGGGATTTAAATACTAGCCCTTT  
CTGGTCTCTAAATCCCCTTAATAACAAAGGTGTCGTCTTTCACAAATACA  
TATTTCCTTCTGAAAAATGGATGCGTTCACTTCCCCGTGCAAATGCTCC  
CCCACTCAATATTCTTGTTCATTCTTTACCTGCGGTACATTATATACAG  
TGTGCCAATGCGTCATCTCCACCCCGTTTCTTCCCCTTAAACAATACG  
GTGCTCCATTGTACCTATTTGTCTACCTATTCGGTAAAAATTAACGCTC  
CCCTACCTTAAACCGTATGCGTGGTGTGTTGTCTCTACCGCATACTCTCTAT  
ACATGGTCCCCTACCCGCTGTCATCCTCCTCATGGACAGACTATACCCAC  
CGTCTTTAGCTATAATCGCTAGCCCGATCCACCTCTCTCGCTGGAGGAAT  
A

mer92

NCCGCGCACTCTTAAGTTGATCCTGGCTCAGGATGACGGCCGGGCTCCCT  
CCTTAAACTTTGATCCGGGCTCAGGAGGTGAGCAGTCTCTACACCTTAGA  
GGTGGATCCTGGCTAAGGGTAGGCGAAGACCCATAACCTTAAACGGGGAA  
AAGCGGGGGATCTTCGGACCTTGCCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATT  
AGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACTATCTGTAGCGGGTC  
TGAAAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACCCGGCCCAAACCTCCTAC  
GGGAGGCGGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGGAACCCCTGATCCACC  
CTTGCCGCGTGTGTGAAAAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCCCTTAAAGCGA  
GGAGGAGGCTACCGAGACTATTACTCTTGTGAGGTGGACGTTACTCCCAA  
AATAAGCCACCGGCTATCTTCTTTGCCCCACCACGGTATTAATAAAGG  
GGGGGGAGCGTTAATCGGTATTTTCTGGGGGGTAAAGGCTGCGGTAGGG  
CGGTTTTTTTTTATTCGGAATGTGAAATACCCCCAGCTAATAATTGGTGG  
AATTGAAATTCATATCTTTGACAACCTCGAATTATGTGTAGGAAGGATA  
GGTGAGAAATCTCCTGAGCGGTATCGCCTTTATATCGCCTGTCCATATTT

TTGGCAGGGAAATACACATTGTGCGAAAGAGGGACTCCACCATGTTCTAC  
ATTTTAGGATGCCCTGAAGTTTTAAAAAGCAATCGGTGGGGGGAACGAAC  
GAATTATATAACCTTGTGTATTTTCCTTTACCGCTAAATAAATTCTATAAT  
TTAAACACTTAGGGGCCTTTTGCTGGTTATTTTGGGGGGTA

mer97

CCCGACGGCATCTTAAGTTGATCCGGCTCAGATGACGTGTGGGCTCC  
CTCCTTAGACTTTGATCCTGGCATCTGAGTGTGAGGAGTCTCTCCACTTT  
AGAGGTAGATCCTGCCTAAGGGTATGCTAATACCGCTATACCTTATACGG  
GAGACAGCGGGGGATCTTCGGACCTTGCCTAATAGATGAGCCTAAGTCG  
GATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCG  
GGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC  
CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGGAACCCTGATC  
CAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAA  
GCGAGGAGGAGGCTACTGAGACTAATACTCTTGGATAGTGGACGTTACTC  
GCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAG  
GGTGCAGCGTTAATCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGCGGCT  
TTTTAAGTTCGGATGTGAAATCCCCGAGCTTAACTTGGGAATTGCATTGCA  
TACTGGGAAGCTAGAGTATGGGAGAGGATGGTAGAATTCCAGGTGTAGCG  
GTGAAATGCGTAAAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCATCT  
GGCCTAACTGACGCTGAGGTACGAAAGCATGGGGAGCAAACCGGATTA  
GATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACAATGTTACTAACCTTGGGGCC  
TTTTAAGCTTTTTTGGCGCCCCTTACCCCGATAAAGTAAACCCCCGGGG  
GAAGACCGGCCGCCAGACTTAAACTCAAATTAATTTTCCGGGGGCCCCC  
CCCACCCGGGGGAACAN

mer98

CCGCGCACGCTTAGATTGATCCGGCTCAGATGACGGGTGGGCCCCCTCC  
TTAGACTTGGATCCGGGCTCATGAGGTCAGGAGTCTCCACACCTTAGGGG  
GAGATCCTGCCGAAGGGAATGCTAATACCGCTATACGCTATAGGGAGAA  
AGGAGGGGATCTTCGGACCTTGCCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTA  
GCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCT  
GAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACG  
GGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGGAACCCTGATCCAGCC  
TTGCCGGGTGTGTGAAAAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAG  
GAGGAGGCTACTGAGACTAATACTCTTGGATAGTGGACGTTCCCTCCCAA  
AATAAGCACCGGCTTATTTCTGTGCTCAGCGCCCGCGGTAATTACAAAAG  
GGGGGCGGAGCGTTAATCCGGTATTTTCTGGGGCGCTAAAAGCGGGCGTT  
AGGGCCGGCTTTTTTTTTTCCGGTTGTGGAAATCCCCCAGCCTTAACT  
TTGGGAAATATGTATTTCCCTAATACCGTTCGGAATCTTTGGTTTATTGGGA  
GAAGAGATGGGTTAAAATTTTCCCTGGGTCCCTGCTGGTTGAAAAATGGCA  
TAACAAAATCTGTGATGAGAAATTTCCCTTTGGGGGGAAGGGTGACCTCT  
CTGGGTCCATATCTGTACCACTGGTTTGTCTAAAATACTGTGGGTCCG  
CCGACAACGATTTAATAATCACTGTGTAGTCCCTTGCCTGTAAAAACAT  
GTTTTACTACACCCGTTGTGGGGTCTTTCA

mer101

~~CGTCATCTTGAGTTGATCTGGCTCGGATGACGCCTGGATCTCCTCCT~~  
TAGAGTTGGATCCCGGCTCAGGATGAGGGCAGGCTCTACACCTTAGAGTT  
GGATCCGGGTGAAGGGTAGGCCCTTGGTCTTAAATTTTAAAGTGGGGG  
GGGGGGCGTCCTCCCCCTGGCCTAAAACCTGTGGCGCTCTATTTGGTATT  
CTGTAGTGGGGGAGATAAATGCTCATAAGCGGAACATTTTTTCTCTTGGC  
TGTCTAATATTCCGCCCTCTTGTGGTTCGGACCTTGTTTTATGCTCTT  
TGTTGGTTATATCCTTGGTGTTTTATTTATGTTCTGCTCCTTACGCCGTTA  
TCTCTCCTTTGTTTTTCTTCCCCTTCCCTGTCCTTTCTCTTTGTTCTCTCT  
CCTTCTACTTATTCCGCTTATTTTGTTCGTATCTCCCTCACGTTGTTGT  
TTCAGATTTTTTCATACTTCGGTTACCTCCTAGTTCTTTTCTTGCTCCCCT  
TCGTGTTCTATTCTCATCATTAGTTTAACTGTTGTAACCTCATATTGTTTT  
CTCGTTCGCTGAGCTTTTTATTTACTATCACTTAGACTATCATTTTGGCG  
TGCTTAATCAATTGTTATACGAATTCAATTGAGTGTAGTGCAGCATATAC  
TCATGTGTGCTAGTGTAACTACCTCTTTGCTTTATCCTCTCTGGGCATTT  
TTAGTGCTTTTTAGTCTTTTGTTCGTCCCATC

bdigital.ula.ve