

“Evaluación Preliminar de la Presencia de Bacterias Sulfato-Reductoras con Capacidad de Metilar Mercurio en la Quebrada La Porquera, de la Localidad de Ciudad Bolívar, Bogotá”.

Vargas Prieto Jenny del Pilar*, Bustos López Martha Cristina♦, Díaz Báez María Consuelo♦.

RESUMEN.

La quebrada La Porquera, ubicada en la vereda de Mochuelo Alto en Bogotá, presentó en el año 2009 concentraciones de mercurio superiores a los límites permisibles. Debido al peligro toxicológico, el propósito de este estudio fue evaluar la presencia de bacterias sulfato-reductoras y la capacidad de estas de metilar mercurio. Como resultados se detectó crecimiento de Bacterias sulfato reductoras del acetato, productoras de esporas; que en cultivo *In-vitro* crecen junto al género *Aeromonas sp.* En dicha quebrada también se encontró un contenido importante de coliformes fecales y totales. En comparación a estudios preliminares en las muestras de agua tomadas a finales del año 2013 y principios de 2014 el agua no presenta valores altos de mercurio, pero si aumento el mercurio total en las muestras de sedimento de la quebrada.

Palabras clave: Bacterias Sulfato-reductoras, Mercurio, Metilación de mercurio.

I. INTRODUCCIÓN.

En el año 2009 la Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca (CAR) [1] [2], en uno de los monitoreos de rutina realizados a la calidad del agua de la quebrada La Porquera, quién provee el agua potable para consumo humano a la vereda de Mochuelo Alto en la Localidad de Ciudad Bolívar, Bogotá, encontró concentraciones de mercurio superiores a los límites permisibles (2 µg/L), de acuerdo con el Decreto 1594 de 1984 del Ministerio de Agricultura.

Este incidente despertó las alarmas sanitarias, debido al peligro toxicológico que

representaba este hecho a la comunidad, ya que el mercurio es uno de los contaminantes más peligrosos que pueden estar presentes en el medio acuático. Adicionalmente, una de las formas más tóxicas es el metilmercurio, una potente neurotoxina que es acumulada fácilmente por la biota acuática y que hace parte de la transformación de mercurio inorgánico a mercurio orgánico por bacterias metiladoras del mercurio, entre ellas las bacterias sulfato reductoras (BSR) [3]. La naturaleza lipofílica del metilmercurio (CH₃Hg) mejora su capacidad de ser bioacumulado en comparación con el mercurio (Hg) inorgánico, y esto se traduce en una mayor biomagnificación de CH₃Hg en la cadena alimenticia [4].

Con el fin de realizar un seguimiento y para localizar la fuente de contaminación para dicha problemática, la CAR estipuló sitios puntuales de toma de muestra y realizó monitoreos cada quince días. Durante dichos monitoreos se presentaron concentraciones altas de forma intermitente, por ejemplo el 7 dic 2009 en el nacimiento 1 de la quebrada La Porquera se encontraron concentraciones de hasta de 172 µg/L, sin embargo el 14 dic 2009 los valores fueron menor de 2 µg/L.

Posteriormente, en muestras tomadas en el año 2011, Hernández y García [9] encontraron en el acueducto de Asoporquera presentó concentraciones altas de mercurio (4.0 a 8.0 µgHg/L) comparadas con otro acueductos cercanos. Así mismo Domínguez y colaboradores [5] en el 2011 realizaron un estudio en la misma quebrada evaluada por la CAR, analizando muestras de agua y sedimento de la quebrada y encontraron

* Vargas Prieto Jenny del Pilar: jpvergasp@unal.edu.co, estudiante de Maestría en Ciencias Microbiología – Facultad de Ciencias, Universidad nacional de Colombia.

♦Bustos López Martha Cristina: mcbustosl@unal.edu.co Profesora asociada, Departamento de Ingeniería Agrícola y Civil, Universidad Nacional de Colombia.

♦Díaz Báez María Consuelo: mcdiazb@unal.edu.co. Profesora – Facultad de Ciencias, Universidad nacional de Colombia.

concentraciones de mercurio y metilmercurio; en agua encontraron entre 0.25 y 1.8 $\mu\text{g/L}$, que aunque no superaron las concentraciones establecidas por el Decreto 1594 de 1984 (2 μL) del Ministerio de Agricultura, si hallaron mercurio en muestras de sedimento en un rango entre 21.5 a 152 ng/g y de metilmercurio entre 0.0020 a 2.5 $\text{mg CH}_3\text{Hg/kg}$. De acuerdo a las actividades desarrolladas en la vereda el Mochuelo y sus alrededores, Domínguez y colaboradores en 2013 refieren como fuentes potenciales de mercurio, las ladrilleras del parque minero El Mochuelo, debido al uso de carbón como combustible, el relleno sanitario de Doña Juana y la depositación regional y global [5].

Debido a estos antecedentes surgió la necesidad de indagar acerca de la presencia de bacterias sulfato-reductoras en esta fuente de agua para consumo humano y en caso de encontrarlas, evaluar la capacidad de metilación de mercurio de los cultivos obtenidos de los sedimentos de la quebrada la Porquera, para dar respuesta a la presencia del metilmercurio hallado en esta fuente.

II. MATERIALES Y MÉTODOS.

Toma de muestras.

Se tomaron muestras de agua y sedimento en la quebrada La Porquera para medir las concentraciones de mercurio y metilmercurio, en los meses mayo de 2013, Octubre de 2013, noviembre de 2013 y febrero de 2014. Los muestreos se realizaron en los mismos puntos de estudio de la CAR [1] y Domínguez y colaboradores [5], para darle continuidad a investigaciones previas. Los puntos fueron: Nacimiento (punto 1), Bocatoma I, Asoporquera II (punto 2), Bocatoma II Asoporquera II (punto 3), Bocatoma Asoporquera I (punto 4). Las muestras de sedimento se tomaron introduciendo un tubo PVC de 10 cm de diámetro en forma rotativa a una profundidad aproximada de 30 cm, posteriormente el tubo fue sacado suavemente y la muestra fue transportada en el mismo recipiente con un sobre de anaerobiosis al laboratorio para el análisis microbiológico el mismo día y para los análisis físico-químico y de mercurio y metilmercurio fueron conservadas a 4°C.

Las muestras de agua fueron tomadas como lo indica la EPA, 1994 [6] en frascos de vidrio que fueron dejados en HCl 4N durante 72 horas previos a la toma de muestra y enjuagados tres veces con agua destilada y desionizada. Posteriormente fueron tomados

1000 ml de muestra de agua para análisis de mercurio y fue conservada la muestra con 1 mL de NHO_3 concentrado (hasta obtener pH 2.0) y almacenada a 4°C. Adicionalmente se tomó muestras de agua en recipiente de 100 ml estéril, para realizar recuento de coliformes totales y fecales.

Cultivo de Bacterias sulfato reductoras.

Luego de 4 horas de tomada las muestras, los sedimentos fueron sembrados según la metodología de Díaz y colaboradores, 2002 [7]. Se homogenizó la muestra de sedimento, se vertió un poco en un matraz y luego de triturar se tomó 1 g de muestra y se adicionó en 9 mL de medio de cultivo. A partir de esta dilución inicial, se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} , en el medio BSR-acetato, para realizar conteo de Número más probable.

Ensayo de metilación de mercurio.

Para los ensayos de metilación, se tuvo en cuenta lo sugerido por Graham y colaboradores [8], por lo que al medio de cultivo se le adicionó L-cisteína, y se trabajó con un cultivo de microorganismos de 24 horas de crecimiento, se tomaron recipientes secos de 50 mL que se sometieron a un lavado previo con HCl 4N durante 72 horas enjuagados con agua destilada y secados a temperatura ambiente [9]. Se adicionó 3g de sedimento correspondiente a cada uno de los cuatro puntos de muestreo, (sedimento secado a temperatura ambiente, macerado, filtrado y esterilizado tres veces), también se adicionó 30 mL de medio de cultivo (BSR-acetato) en ambiente anaeróbico [7], se esterilizó 15 min a 115°C y posteriormente se adicionó 0,3 mL de cultivo bacteriano (pre-inoculo de 24 horas de crecimiento) de microorganismos correspondientes a cada punto de muestreo (es decir al sedimento del punto 1, se adicionaron las bacterias del punto 1 y así sucesivamente) y se adicionó 0,3 mL de solución de HgCl_2 asegurando una concentración final de 1,0 mg/L de Hg en cada frasco [10]. Estas unidades experimentales, se incubaron a 28°C durante 196 horas. Se contó con un control negativo que fue realizado en las mismas condiciones pero el sedimento adicionado fue con concentraciones bajas de mercurio (64 $\mu\text{g/Kg}$) y sin adicionar ningún microorganismo (control abiótico). Para el control positivo se contó con una cepa *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29557 (caracterizada como metiladora de mercurio). Como este microorganismo metaboliza lactato en lugar de acetato, se realizó el ensayo con

30 mL de medio de cultivo recomendado por la ATCC (ATCC *D. Desulfuricans* 766), el sedimento adicionado fue con concentraciones bajas de mercurio (64 µg/Kg) y las mismas condiciones detalladas anteriormente.

Se realizó un ensayo adicional con *Escherichia Coli* (*E coli*) aislada de sedimento de la quebrada La Porquera, las condiciones para el ensayo de metilación con *E coli*, fueron muy similares; se adicionó 3g de sedimento (sedimento de río con concentraciones mínimas de mercurio 64 µg/Kg, esterilizado previamente en tres ocasiones) 30 ml de caldo de cultivo *Luria Bertani*, 0,3 mL de solución HgCl₂ asegurando una concentración final de 1,0 mg/L de Hg en cada frasco y 0,3 ml de cultivo bacteriano fresco (pre-inóculo de 24 horas). Cada frasco se incubó en aerobiosis a 28 °C durante 72 horas.

Cada ensayo se realizó por duplicado, es decir se realizó ensayo de cada punto de muestreo (cuatro puntos), control positivo y control negativo y con la cepa *E. coli*. de carácter destructivo. A medida que transcurrió el tiempo se sacrificaron las unidades experimentales a las 0, 24, 72, 120 y 192 horas para realizar determinaciones de pH y conteo en placa para recuento celular de BSR. Para la destrucción de las unidades se adicionó 1 mL de HCL 6N a cada unidad experimental con el fin de detener la reacción [12], posteriormente se dejó sedimentar durante 24 horas y se separó la fase líquida para determinación de mercurio (almacenado a 4°C) y el sedimento se dejó secar a temperatura ambiente para analizar concentraciones de mercurio total y metilmercurio.

La determinación de mercurio en la fase acuosa, se realizó por Espectrofotometría de absorción atómica (generación de hidruros), en el laboratorio de ingeniería ambiental de la Universidad Nacional de Colombia. El análisis de metilmercurio se realizó por medio de cromatografía de gases con detección de captura de electrones (PNUMA/FAO/OIEA, 1987), en el laboratorio de toxicología de la Universidad de Córdoba.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Durante el cultivo de las muestras de sedimento correspondientes al primer muestreo (16 mayo 2013), luego de incubar entre 8 y 15 días (sembradas en medio BSR-lactato y medio sugerido por la ATCC) se

observó turbidez en los tubos, pero no se observó la presencia de pigmento negro característico del metabolismo realizado por las bacterias sulfato reductoras. El segundo muestreo fue realizado el 8 de octubre de 2013 y las muestras fueron sembradas en medio BSR-acetato. Quince días posteriores a la siembra de las muestras el crecimiento fue abundante; se observó de manera notoria el pigmento negro característico del metabolismo de las bacterias sulfato reductoras (producción de H₂S), tanto en medio sólido como en medio líquido BSR-acetato, mientras que en los otros dos medios de cultivo (BSR lactato y ATCC 766) no se obtuvo crecimiento.

Esto indicó que las bacterias sulfato reductoras encontradas en la quebrada La Porquera son bacterias reductoras del acetato y no del lactato, como se pensó inicialmente y fue quizás por esto que Domínguez y colaboradores 2013 no obtuvieron crecimiento de estos microorganismos en sus ensayos. En este caso se puede hacer referencia a King y colaboradores [4] quienes indicaron que algunas vías metabólicas podrían ser responsables para el acoplamiento del mercurio al metabolismo del acetato durante la sulfato reducción (en *Desulfobacteriaceae*), ellos indicaron entonces que el acetato podría estimular la metilación por la inducción de una transmetilasa en una comunidad diversa de BSR. Teniendo en cuenta esto, es posible que estas bacterias encontradas en la quebrada presenten la capacidad de metilar mercurio.

En cuanto a la morfología, esta fue muy similar en todas las bacterias sembradas en los cuatro puntos de muestreo, bacilos Gram positivos gruesos con presencia de esporas. Cabe resaltar que durante el crecimiento de las colonias de color negro, siempre estuvieron acompañadas de una colonia transparente *Gram* negativa pero de morfología más delgada. Esta colonia transparente fue sembrada de forma aislada en medio de cultivo BSR-acetato y su crecimiento fue favorable, pero no presentó pigmentación negra característica de las bacterias sulfato reductoras. Por lo que en un inicio se consideró un microorganismo contaminante.

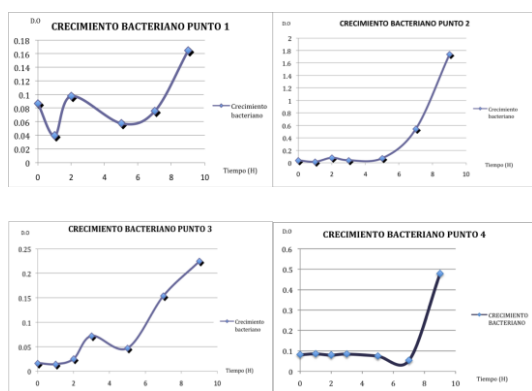
Para realizar el aislamiento de las dos especies que crecieron de forma *In-Vitro* los cultivos se sometieron a proceso de choque térmico, pero luego de sembrar e incubar las resiembras a 28°C entre 10 y 15 días no se observó crecimiento de microorganismos. Al

sembrar las muestras en placa y al tratar de aislar las colonias negras, éstas no mostraron crecimiento, por lo que el microorganismo Gram negativo acompañante no es un microorganismo contaminante, sino que metabolitamente debe generar alguna sustancia o enzima que necesita las bacterias sulfato reductoras de la quebrada para crecer de forma *In-vitro*.

Se realizó la identificación de esta colonia transparente acompañante, que crece junto a la sulfato reductora por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando *primers* universales 27F y 1492R; se realizó secuenciación y para la identificación molecular de los microorganismos se utilizó el sistema RDP (Ribosomal Database Project) y para los cuatro puntos del muestreo, el microorganismo acompañante corresponde al género *Aeromonas sp.*

Las bacterias sulfato reductoras fueron sembradas para evaluar el tiempo y condiciones ideales de crecimiento (medio de cultivo BSR-acetato con Cisteína). En la figura 1, se muestra que las bacterias de los cuatro puntos de muestreo presentaron un pico de crecimiento entre las seis y las diez horas, (la fase exponencial de crecimiento) y fue en este tiempo en que las bacterias comenzaron a producir pigmentación negra.

Figura 1. Crecimiento bacteriano.



Cabe resaltar que las muestras de sedimento y agua (tomadas en recipiente estéril) también fueron sembradas por filtración de membrana y en medio cromocult, con el fin de identificar coliformes totales y fecales. Entre los microorganismos aislados se encontraron: *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter sakazakii*, *Serratia phymuthica*. De estos microorganismos se utilizó *Escherichia coli*, aislada del sedimento de la quebrada, para

realizar el ensayo de metilación de mercurio. En el conteo de coliformes totales y fecales encontrados en la quebrada se encontraron entre 0 y 71.000 UFC/100 mL. Esto indica una contaminación importante por coliformes totales y fecales en la quebrada y concuerda con lo descrito por Hernández y García [11] y con Domínguez y colaboradores [5], quienes encontraron conteos de coliformes de 0-20 UFC/100 mL.

En cuanto a las concentraciones de mercurio y metilmercurio encontradas en la quebrada La Porquera, en la tabla 1 se puede evidenciar que en las muestras tomadas en el presente estudio no se encontraron concentraciones de mercurio en agua superiores a los límites permisibles (2 µg/L), de acuerdo con la resolución 2115 de 2007 del Ministerio de Protección Social, por lo que se puede decir que el agua no presentó contaminación por este metal en el momento de tomar las muestras (mayo, octubre, noviembre 2013 y febrero 2014). Este resultado fue similar al encontrado por Hernández y García [11] y por Domínguez y colaboradores [5]. Sin embargo en cuanto a las concentraciones de mercurio total en sedimento se pudo observar que aumentaron en las muestras procesadas en el presente estudio, comparados con los resultados reportados por Domínguez y colaboradores quienes tomaron las muestras en los meses de septiembre y noviembre 2011.

Tabla 1. Resultados de Mercurio en agua, sedimento y metilmercurio en sedimento de la quebrada La Porquera.

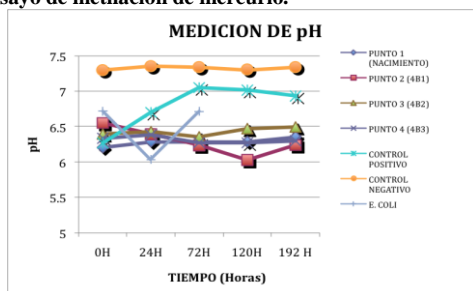
MUESTREO	PUNTO DE TOMA DE MUESTRA	CONCENTRACIÓN DE MERCURIO EN AGUA (µg/L)	CONCENTRACIÓN DE MERCURIO TOTAL EN SEDIMENTO (µg/kg)	CONCENTRACIÓN DE METILMERCURIO EN SEDIMENTO (µg/kg)
PRIMER MUESTREO (16 MAYO 2013)	PUNTO 1	< 0,03	203,323	2,124
	PUNTO 2	0,08	199,6764	2,053
	PUNTO 3	0,04	228,5657	2,742
	PUNTO 4	0,06	205,9356	2,423
SEGUNDO MUESTREO (8 OCTUBRE 2013)	PUNTO 1	< 0,03	200,6765	1,637
	PUNTO 2	0,05	212,5433	1,998
	PUNTO 3	< 0,03	241,4223	2,920
	PUNTO 4	< 0,03	220,4367	2,134
TERCER MUESTREO (17 NOVIEMBRE 2013)	PUNTO 1	< 0,03	205,5897	2,095
	PUNTO 2	0,09	206,811	2,797
	PUNTO 3	< 0,03	238,0769	2,160
	PUNTO 4	< 0,03	205,6743	2,449
CUARTO MUESTREO (23 FEBRERO 2014)	PUNTO 1	< 0,03	222,0617	2,280
	PUNTO 2	< 0,03	210,6278	2,886
	PUNTO 3	< 0,03	240,5465	2,966
	PUNTO 4	< 0,03	228,2571	3,145

Teniendo en cuenta que el mercurio es un metal pesado y se sedimenta en las fuentes de agua, es posible pensar que aunque no se han encontrado concentraciones significativas de mercurio en el agua de la quebrada, es posible que esta haya recibido contaminación intermitente por este metal, debido a que la concentración en sedimento aumentó.

En cuanto a las concentraciones de metilmercurio en sedimento encontradas en el presente estudio los resultados se mantuvieron constantes, con respecto a los reportadas por Domínguez y colaboradores [5], no se observó aumento en la concentración de esta neurotoxina, por lo que se puede interpretar que el proceso de metilación de mercurio no ha aumentado a través de estos dos años en que se realizó seguimiento en la quebrada.

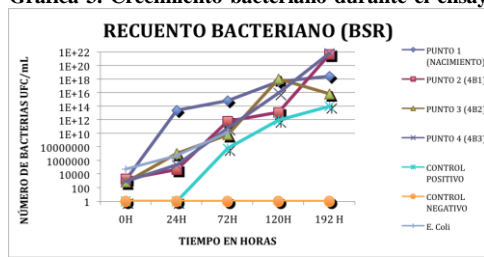
En el ensayo de metilación de mercurio se contempló la medición de recuento celular y pH con el fin de verificar el crecimiento de las bacterias durante el ensayo y su actividad metabólica activa. En la gráfica 2 se muestran los resultados de la variación del pH encontrados durante el ensayo de metilación de mercurio con las bacterias obtenidas de la quebrada de estudio. En esta gráfica se observa que el control negativo mantuvo constante el pH durante el ensayo, mientras que el control positivo (con la cepa *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29557) mostró un aumento significativo durante las primeras 72 horas, así mismo ocurrió para el ensayo realizado con *E. Coli*. Los otros microorganismos no mostraron un cambio muy significativo durante el ensayo, pero se podría pensar que pudo haber sido por su metabolismo lento por ser bacterias anaerobias.

Gráfica 2. Medición de pH durante el ensayo de metilación de mercurio.



En la gráfica 3 se muestra el recuento bacteriano realizado durante el ensayo de metilación de mercurio, se observa que el crecimiento fue positivo para cada uno de los ensayos y se mantuvo en aumento durante las 192 horas a comparación con el control negativo que no obtuvo crecimiento. Esto indica que las concentraciones altas de mercurio a las que fueron sometidas las bacterias no fueron impedimento para su crecimiento y las bacterias mostraron un crecimiento constante durante el ensayo.

Gráfica 3. Crecimiento bacteriano durante el ensayo de



metilación de mercurio.

IV. CONCLUSIONES.

Las bacterias sulfato reductoras encontradas en la quebrada la Porquera son bacterias reductoras del acetato y crecen en compañía de *Aeromonas sp.*, que metabólicamente deben generar alguna sustancia o enzima que necesita las bacterias sulfato reductoras de la quebrada para crecer de forma *In-vitro*.

Se pudo observar que las concentraciones de mercurio total en sedimento aumentaron en las muestras procesadas en el presente estudio, comparados con los resultados de estudios anteriores.

AGRADECIMIENTOS.

Las autoras agradecen el apoyo recibido por el laboratorio de microbiología del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional, el laboratorio de toxicología de la Universidad de Córdoba y el laboratorio de ingeniería ambiental de la Universidad Nacional sede Bogotá, quienes han contribuido con su conocimiento e instalaciones para el desarrollo del presente trabajo.

REFERENCIAS.

- [1] Corporación Autónoma regional (CAR). Expediente 1101-761-17622. Trámite de concesión de aguas superficiales. Junta de acción Comunal Vereda Mochuelo Alto, localidad de Ciudad Bolívar. Bogotá D.C. 2001-2012. Consulta en el centro de documentación de la CAR.
- [2] Corporación Autónoma Regional (CAR). Río Bogotá. 2012. Adecuación hidráulica y recuperación ambiental. Página de Internet [http://www.car.gov.co/recursos_user/Proyectos%20Especiales/RIO%20BOGOTA/Evaluacion%20Ambiental%20Volumen%20L.pdf] Extraído 10 Septiembre de 2012.
- [3] Ullrich, S., Tanton, T., Abdrashitova, S., "Mercury in the aquatic environment: a review of factors affecting methylation. Critical review in environmental science and technology". 31 (3), p. 241-293. 2001.
- [4] King, J., Kostka, J., Frischer, M., Saunders, F. "Sulfate-reducing bacteria methylate mercury at variable rates in pure culture and in marine sediments". Applied and Environmental Microbiology. 66 (6): 2430, 2437. 2000.
- [5] Domínguez, L., Bustos, M., García, H. "Modelo conceptual del comportamiento del mercurio en la cuenca de la quebrada La Porquera, Bogotá, Colombia". Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de magíster en Toxicología. Facultad Medicina, Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Toxicología. 2013.
- [6] Minister of Public Works and Government Services Canada. "Guidance Document on Collection and Preparation of Sediments for Physicochemical Characterization and Biological Testing". Method Development and Applications Section Environmental Technology Centre Environment Canada Ottawa, Canada. Catalogue No. En 49-24/1-29E. 1994.
- [7] Díaz, M., Espitia, S., Molina, F. "Digestión Anaerobia, una aproximación a la tecnología". Primer edición. Universidad Nacional de Colombia; 64, 127-131. Bogotá, 2002.
- [8] Graham A., Bullock A., Maizel A., Elias D., Gilmour C. "Detailed Assessment of the Kinetics of Hg-Cell Association, Hg Methylation, and Methylmercury Degradation in Several *Desulfovibrio* Species". Journal Applied and environmental microbiology Vol 78, p. 7337-7346. 2012.
- [9] Shao D., Kang Y., Wu S., Wong M. "Effects of sulfate reducing bacteria and sulfate concentrations on mercury methylation in freshwater sediment". Journal Science Of The Total Environment 424 p. 331-336. 2012.

[10] Alvis Erasmo, Marrugo Jose. "Influencia de la luz en el proceso de metilación bacteriana del mercurio". Universidad de Cordoba, Trabajo de grado para optar al título de Magíster en Ciencias Ambientales. Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba, Msontería Colombia. 2012.

[11] Hernández Liliana y García Manuel. "Evaluación del riesgo para la salud en una población de la zona rural de Bogotá D.C por la presencia de metales en agua de consumo". Tesis de grado presentada como requisito para optar al título de Magister en Ingeniería de Recursos hidráulicos. 2012.

[12] Elias, D., Kucken, A., Brown S., Palumbo A., Schadt C., Wall J. "Sulfate-Reducing Bacterium *Desulfovibrio desulfuricans* ND132 as a model for understanding bacterial Mercury Methylation". *Journal Applied and environmental Microbiology*. 12; 3938-3951. 2011