“Caracterización de Bacterias Metalofijadoras de Mercurio, A Través de la Subunidad 16srna, Mediante la Técnica de PCR-DGGE del Rio Gala (Aguas Abajo en el Recinto San Rafael) en la Parroquia Tenguel”

S.A. Llivisaca, J.D. Vargas, F. Burgos.
Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar,
Escuela Superior Politécnica del Litoral, Km. 30.5 vía Perimetral Guayaquil-Ecuador
jefdavar@espol.edu.ec, susalliv@espol.edu.ec,
fburgos@espol.edu.ec.

Resumen

El proyecto sobre el cual tratamos, se refiere el uso de la técnica molecular PCR-DGGE, para la caracterización de bacterias, y su potencial existencia en las aguas del río Gala de la parroquia Tenguel. La selección del sitio se basó al alto grado de contaminación con metales pesados en la que este se encuentra este rio. La probabilidad sobre la presencia de microorganismos con capacidad metalofijadora, es alta dada sus características biológicas y bioquímicas con las que cuenta esta bacteria, lo qué les permiten desarrollarse en entornos con esas características. Para la ejecución de este proyecto hemos plasmado los distintos procedimientos de las técnicas necesarias para ese fin. Por eso se deben de tomar las medidas necesarias para reducir las concentraciones de metales pesados presentes en el medio con la ayuda de microorganismos biorremediadores. Con ayuda de la técnica DGGE, podemos realizar una caracterización de manera más clara y ágil, y así determinar la presencia de bacterias con propiedad metalofijadora proporcionándonos su estructura poblacional y dinámica.

Palabras claves: Bacterias, psudomonas, metales pesados, mercurio, arsénico, DGGE, PCR, rio, minería.

Abstract

This project is about the use of molecular technique called PCR-DGGE for characterization of bacteria and their potential existence in the Gala River in Tenguel. The site selection was based the high level of heavy metal pollution in this river. The probability of the presence of microorganisms with metal fixing capacity is high because *it’s biological and biochemical characteristics this bacteria have allowing them to grow* in environments with these characteristics. For this project we have shaped the various procedures necessary techniques for this purpose. So it should take steps to reduce concentrations of heavy metals in the environment with the help of biorremediator microorganisms. Using the DGGE technique, we can characterize more clearly and agile so we can determine the presence of metallo-fixing bacteria properly giving us their population structure and dynamics.

1. Introducción

El presente trabajo tiene como objetivo la caracterización de bacterias metalofijadoras de mercurio, presentes en las aguas del Río Gala (aguas abajo en el recinto San Rafael) en la parroquia Tenguel, mediante la técnica de PCR-DGGE a través del gen de la subunidad 16s RNA, para efectuar trabajos futuros de caracterización de aguas contaminadas por metales pesados generados por la industria y la minería. La causa es el alto desarrollo de la actividad industrial, la contaminación del medio ambiente y la destrucción de la flora y fauna de los ríos del Ecuador. Para esto es importante la ejecución de proyectos de investigación para establecer técnicas que permitan caracterizar la diversidad bacteriana para diagnosticar y presentar alternativas para remediar el daño ambiental causado durante estas últimas décadas.

La característica principal de esta investigación, es proporcionar la información necesaria para efectuar futuros trabajos relacionados con la búsqueda de microorganismos, con el fin de ser utilizados como maquinaria en procesos de remediación biológica. Dado que los ríos ubicados al Sur del País son los más contaminados por metales pesados y según datos obtenidos del río Gala en sus aguas (REF), ya no se encuentran peces, y la calidad de las mismas no es apta para el consumo humano, debido a las altas concentraciones de metales pesados, entre ellas podemos citar las mas mortales como el plomo y el arsénico que se encuentran disueltas en la columna de agua, y conlleva a consecuencias graves cuando la misma es ingerida [1].

El interés de este proyecto es caracterizar bacterias con capacidad metalofijadoras en el agua, siendo que estas presentan un gran rango de resistencia a metales pesados, entre estos el mercurio, y un grupo pequeño de tienen capacidad metalofijadoras y metaloreductoras (REF). Además, proporcionará una base para la realización de proyectos futuros de similares características, pudiendo aumentar el número de géneros de bacterias metalofijadoras. Esta caracterización de bacterias del río Gala tiene como fin, el otorgar a los pobladores la seguridad, de una rápida recuperación de las condiciones del agua a su estado original, de esta manera reduciremos los impactos de salud allí causados. El beneficio ambiental a contribuir, es proporcionar información necesaria para poner en marcha, declinando los compuestos tóxicos en las agua, utilizando bacterias propias del medio, sin recurrir a la adición de especies extranjeras, que a largo plazo podrían desplazar a las especies bacterianas residentes de la zona.

El marco teórico se lo realizó revisando una serie de libros y publicaciones científicas basadas en el mismo principio que tiene este proyecto, varias de estas investigaciones detallaban la presencia de bacterias del género Pseudomona en el agua, mediante experimentos y pruebas, determinaban la capacidad de las mismas para resistir y fijar metales pesados. Se pudo determinar el uso de una cepa bacteriana, la Pseudomona aeruginosa, organismos que presentan estas características.

Las investigaciones se basaban en la colección de muestras de agua contaminada, que mediante varios métodos detallados más adelante, las bacterias obtenidas serán caracterizadas y aisladas, sometiéndolas a prueba de resistencia al mercurio a distintas concentraciones, mediante la técnica de PCR-DGGE, se extraerá el material genético donde se lo colocará en gel de agarosa seguido de una tinción se podrá establecer la longitud, y distribución de las bandas.

2. Marco Teórico

En la actualidad, existen serios problemas de contaminación ambiental localizados en todos los niveles, como: agua, suelo y aire por consecuencia del desarrollo industrial, además de actividades agrícolas, humanas, etc. que generan una serie de contaminantes alterando las condiciones normales de los sistemas biológicos, llegando en unos casos a ser problemas irreversibles.

Según el EPA, la "contaminación ambiental" significa contaminación debido a la descarga (en cualquier medio medioambiental) o el escape de cualquier sustancia de algún proceso, que sea capaz de causar el daño al hombre o cualquier otro organismo viviente presente en el ambiente”

La recuperación de estos sistemas contaminados puede ser mediante tratamientos de remediación como son los métodos físicos, químicos y biológicos. Siendo los tratamientos físicos y químicos los más costosos mientras que la remediación biológica o la biorremediación se presentarían como una alternativa segura y económica comparada con los anteriores, y en las cuales se implementan microorganismos nativos para realizar la tarea de la depuración de las aguas y suelos contaminados.

En los años 70, el sector industrial creció aceleradamente, situándose en Quito, Guayaquil y en menor escala en Cuenca. Lo que ha incrementado en estas ciudades grandes condiciones de contaminación de los recursos hídricos por compuestos químico y metales, al aire por emisión de gases y los suelos por desechos industrias. Los ríos y esteros que cruzan entre estas ciudades soportan una gran capacidad de compuestos contaminantes, por el descontrol de las aguas negras, al ser vertidas sin tratamiento alguno a los ríos y esteros. [1].

Los estudios realizados por el departamento de gestión ambiental del municipio de Guayaquil, monitoreando el 27 de Diciembre del 2007, las aguas abajo del Río Gala (recinto san Rafael), demostraban que se encontraban contaminadas por mercurio y arsénico. De acuerdo a los criterios de calidad admisibles para la preservación de la flora y fauna en agua dulce, según el Libro VI Anexo I del texto unificado de la legislación ambiental secundaria, determinó, la presencia de contaminantes en los sedimentos como: cromo, mercurio, cobre, arsénico, vanadio, níquel y cobalto. Determinó que las concentraciones de mercurio, arsénico y vanadio superaban en 24.14; 12 y 7.12 veces respectivamente, el límite máximo permisible, determinado por los criterios de calidad del agua [2].

2.1 Ciclo del mercurio.

Los conocimientos acerca del ciclo bio-geoquímico del mercurio a nivel mundial, se han incrementado considerablemente en los últimos años. En la atmósfera está ampliamente distribuido en forma de gas y partículas. Entre el 90-95 % de este elemento es gaseoso. El mercurio existe en cuatro estados de oxidación: Hg0, Hg22+, Hg2+ y Hg4+. Este último estado ha sido descubierto recientemente en el 2007. Las tres primeras especies se considera que coexisten en equilibrio, así todo el mercurio inorgánico disuelto en aguas oceánicas está en forma disociada como ion [HgCl2]-. En las fuentes de agua continentales, sin embargo, donde hay poco cloruro el mercurio puede existir como Hg (OH)2.

La interconversión en medio acuoso entre distintos estados de oxidación del mercurio requiere la presencia de microorganismos. El mercurio es emitido a la atmósfera a partir de fuentes naturales y antropogénicas en forma de vapor elemental (Hg0), posteriormente precipitado por las lluvias que lo depositan en los cuerpos de agua y finalmente en el sedimento desde donde es metilado y luego bio-acumulado (Downs et al., 1998). Las formas más solubles de mercurio (por ejemplo Hg2+), son sintetizadas a través de la conversión de Hg0 a Hg2+ Hg→ Hg2+ + 2e-. Esta reacción de oxidación ocurre en presencia de microorganismos aeróbicos en el que participa la catalasa. Los microorganismos aeróbicos también pueden llevar a cabo la oxidación del mercurio a partir del HgS en el sedimento, oxidando el sulfuro a sulfito y luego a sulfato. El ión mercúrico (Hg2+), puede ser reducido en un proceso de desintoxicación por microorganismo por ejemplo Pseudomonas sp. a Hg0 en presencia de NADH que se oxida a NAD+.

En la actualidad el uso de los microorganismos es implementado como bio-sensores, que producen señales en presencia de contaminantes, como metales pesados e hidrocarburos para tratar equilibrar su sistema biológico [4].

Los microorganismos son capaces de detectar el más mínimo cambio y la presencia de contaminantes, lo que genera un método más eficaz y con costos reducidos, que implementando métodos químicos exhaustivos [5].

Una serie de microorganismos pueden movilizar metales de lixiviados presentes en el agua a través de la quelación por metabolitos y sideroforos y la metilación, da como resultado componentes celulares del organismo, fijación dentro de la célula o la precipitación como sustancias insolubles orgánicas o inorgánicas [6].

La solubilización microbiana de los metales de los lixiviados, se encuentran últimamente usados en esta industria. Este proceso se realiza implementando microorganismo quimiolitotrofos, pertenecientes a un grupo denominado extremophilo, gracias a su gran resistencia a altas condiciones de acidez (pH 1 a 3.0) y a la presencia de metales altamente tóxicos [7].

"La PCR-DGGE, es utilizada para determinar la composición bacteriana y la diversidad presentes en cualquier medio, nos permite determinarla de manera más precisa, con la ayuda de primers específicos, La capacidad del DGGE nos proporciona una imagen visual directa de la diversidad bacteriana en la muestra [8].

3. Principales Impactos

3.1 Sociales

Los pobladores de la zona serán altamente beneficiados si se pone en marcha la ejecución de este proyecto, puesto que la recuperación de las condiciones actas del río, implica una reducción de las enfermedades producidas por los metales pesados suspendidos en las columnas de agua, además de la recuperación de la pesca artesanal de dicha zona.

3.2 Ambientales

El beneficio ambiental que produciría el proyecto, será, el encontrar a un microorganismo capaz de reducir las concentraciones el mercurio o el arsénico disuelto en el agua, contribuyendo enormemente a la recuperación de los ecosistemas iníciales del río.

3.3 Científicos

Mediante la caracterización se determinará la presencia de microorganismos en el río Gala (Parroquia Tenguel), que fijen los principales metales disueltos en el agua como son el mercurio. Estos serían implementados como biorremediadores para futuros proyectos de investigación y de tratamientos de cuerpos de aguas contaminados por metales pesados.

3.4 Económicos

Reducción de los costos de tratamientos de aguas de la industria minera, con la obtención de las bacterias, podrían realizar proceso de tratamiento de efluentes más eficiente y con costo reducido.

4. Metodología

4.1 Área De Estudio

EL área del siguiente estudio se lo realizará en las aguas del Río Gala (aguas abajo en el recinto San Rafael), en la parroquia Tenguel donde el estudio propuesto se llevará a cabo con tres muestras recogidas en el río.

4.2 Protocolo De Trabajo

- Muestras de agua provenientes del río Gala.
- Microbiología, medio selectivo (pseudomona agar Kin A).
- Primer aislamiento de Cepas.
- Ensayo: Cultivo de cepas en la mezcla agar-mercurio.
- Análisis del ensayo (cepa con mayor capacidad metalofijadora.
- Segundo aislamiento (Cepa metalofijadora).
- Extracción de ADN.
- PCR (Chain Reaction Polymerase).
- Amplificado 16S rRNA de toda la población.
- Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE).
- Análisis del patrón de bandas.
- Caracterización bacteriana.

4.3 Toma de muestras.

El eje “X” será la zona central del rio; el eje “Y” se dirige a la derecha e izquierda (anchura); y el eje Z hacia debajo de la superficie (profundidad) respectivamente.

El muestreo será tipo de estratificado, muy utilizado en Ecología, y sirven para confirmar algún tipo de distribución y caracterización de bacterias heterótrofas en el río.

Para dicho efecto se realizará el siguiente procedimiento:

- Se tomaran muestras en tres puntos diferentes con la finalidad de abarcar de manera horizontal el río (x; y; z). Figura 1.

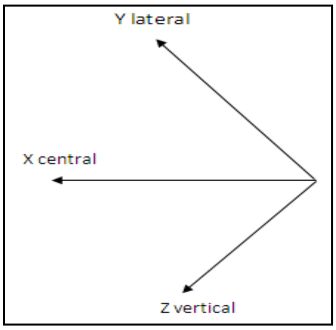

Figura 1. Ejes de coordenadas de muestreo

- Las muestras serán tomadas en la superficie y a un metro máximo de profundidad. Tabla 1.

Tabla 1.

TIEMPO (h:m)	ALTURA (m)
00:30	3.64 P
06:30	0.76 B
12:00	3.61 P
19:30	0.78 B

- Se tomarán las muestras con la botella de Van Dorf.
- Se realizará una colección en cada una de las pleamares y bajamares. Horario de muestreo. Tabla 2. y Figura 2

Tabla 2.

HORA	MAREA	No. DE MUESTRAS	3 PUNTOS A LA HORIZONTAL	REPLICAS
00:30	3.54P	2	6	12
05:30	0.76B	2	6	12
12:30	3.61P	2	6	12
19:30	0.78B	2	6	12
TOTAL		8	24	48

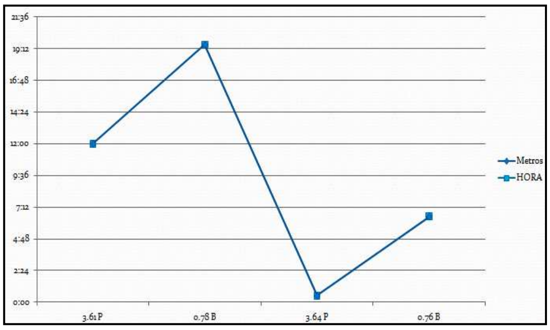

Figura 2.

- Frascos de vidrio de 250 ml de capacidad para las muestras de aguas.
  Frascos de vidrio color ámbar de 250 ml (parte profunda).
- Con esto se obtuvieron las siguientes muestras.
- Las muestras serán conservadas en refrigeración, lo antes posible.

4.4 Filtración

La técnica de filtración de volúmenes conocidos, es el que vamos a usar para retener el mayor número de bacterias, se hace a través de un filtro Millipore de acetato de celulosa 0,45μm de poro [13]. Se colocará la membrana filtrante en el centro del portafiltro, Se filtrarán100 ml de agua a través del portafiltro y proceder a filtrar, para retener las bacterias [14].

4.5 Conteo microbiológico y cultivo de las bacterias

La lectura de los cultivos se la realizará 28H a partir de la siembra, tomando en cuenta únicamente aquellos platos donde el resultado oscilaba entre 25 a 250 unidades formadoras de colonias [15]. (UFC/ml ó UFC/g).

Se realizan cultivos de bacterias en agares en determinadas concentraciones de Hg. sabiendo que el límite máximo permitido de mercurio en ríos es de 0.0002 mg/l en el Rio gala es 24.14 veces más del rango normal aproximadamente 0.0048 mg/l. Cultivaremos las 48 membranas de filtrado en cada una de las cajas petri con pseudomona agar King A. Al término de la incubación contaremos las colonias en sus respectivas membranas. Se expresará los resultados como unidades formadoras de colonias por 100 ml de agua, considerando el volumen filtrado y el factor de dilución. Se seleccionará las colonias desde los 48 agares cultivado, luego se aislarán las colonias sospechosas, especificadas en el agar selectivo, y volveremos a aislar las colonias para cultivar en al agar pseudomona King A, donde crecerán en condiciones de pH de 7 (+/-2).

4.6 Método de DGGE

Para dicho método utilizaremos un equipo para DGGE, para analizar poblaciones microbianas basadas en amplificaciones de fragmentos de genes ribosomales (C.B.S Scientific. Co DGGE – 2001- Rev. B). Figura 3.

Siguiendo el protocolo descrito por (G. Muyzer, E.C. de Waal and A.G. Uitterlinden. 1993.) La utilidad de ésta diferenciación radica en donde hay mezclas de varios fragmentos de ADN con éstas características, es muy común cuando se amplifican fragmentos de genes utilizando la técnica PCR. Entonces para dicho efecto, nos valdremos de un gel de poliacrilamida (6%) con gradiente químico lineal de 40 - 60% desnaturalizante (Urea-formamida). Se lo condicionará a 60ºC de electroforesis 10´20 voltios/5 h 150 voltios. Gracias al gen ribosomal de la subunidad 16S, y las variaciones en éste gen definirán los grupos taxonómicos en las bacterias que se encuentran en una colonia específica de las secuencias de estos genes, las cuales serán utilizadas para poder realizar los respectivos análisis de la composición de comunidades microbianas.

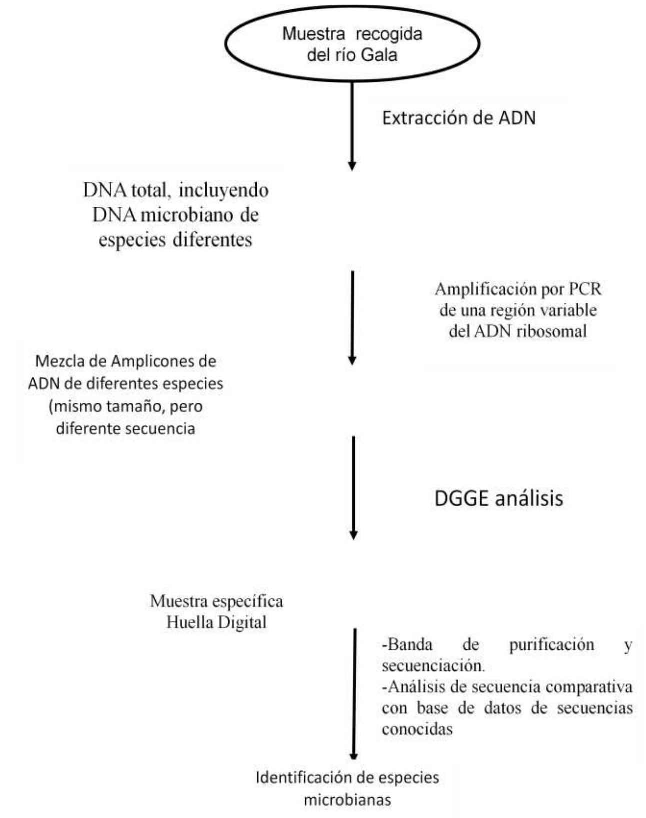

Figura 3. Procedimiento del DGGE

4.7 Extracción del DNA y purificación del DNA

Para obtener el DNA completo aplicaremos el método detallado por Soluciones QPCR Protocolo y Técnicas Cultek 2006; el mismo que utiliza CTAB – Fenol – Cloroformo para la extracción y purificación consecuente, e Isopropanol para lograr un buen precipitado. El DNA será aislado mediante la técnica puntualizada por Smit et al., 1997, durante el cual se usará un Sistema de Purificación fundamentado en filtros (Wizard® PCR Preps DNA Purification System). El Kit comercial "Wizard genomic DNA purificación kit" [16].

4.8 PCR (16srrna) del DNA bacteriano

La amplificación exponencial del DNA por PCR permitirá obtener una cantidad suficiente de muestra para poder llevar a cabo los análisis subsecuentes, lo cual lo realizaremos mediante la técnica ya descrita por Schaefer et al., (2001). Las bacterias serán extraídas a partir de los cultivos líquidos en los cuales se las aisló previamente, estas cadenas de ADN serán amplificadas por PCR - DGGE usando los primers PRBA338F-GC

(5´GCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGG GCACGGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3´) y 518R–1 (5´-ATTACCGCGGCTGCTGG-3´), complementarios de la región conservada 16S RNA, con 35 ciclos termales.

4.9 Tinción y Análisis de Imagen

Se empleará la tinción SYBR Green I, lo que nos permite determinar las muestras de una forma rápida. Lebaron et al. (2001) encuentran que las células teñidas con SYBR Green I tienen mayor fluorescencia y se obtiene mejor discriminación de la fluorescencia del fondo (ruido) en comparación con células teñidas con otros fluorocromos.

La detección de amplicones se realizará mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% teñido con nitrato de plata. Para la tinción de los geles se realizara con el siguiente procedimiento, que comienza con la fijación de los productos mediante una solución etanol-acética, seguida de la tinción con plata, la cual se revela con formaldehído disuelto en solución básica (Vallejo, comunicación personal).

Para el análisis de los fragmentos y genotipado usaremos el programa Gene Profiler y Adobe Photo Shop, para realizar un mejor análisis. ElWindows 1D Gel AnalysisGene Profiler is a complete software package that uses automatic lane and peak finding to detect the presence of bands in a gel or blot, and calibrate them for size and intensity. software es un paquete completo que nos ayuda a detectar la presencia de bandas en un gel, y a calibrar los tamaños e intensidad de los mismos. By using calibration markers in each gel electrophoresis run, Gene Profiler can automatically calculate the molecular weight (Mr), isoelectric point (pI) and concentration values of any DNA fragment or polypeptide band detected.Mediante el uso de marcadores de calibración en cada serie de electroforesis en gel, el Gene Profiler puede calcular automáticamente el peso molecular (Mr), punto isoeléctrico (pI) y los valores de concentración de cualquier fragmento de ADN o banda polipeptídica detectado. Furthermore, the sophisticated software module is capable of correcting and analyzing distorted gel images (lanes that slant, curve or smile), ensuring the highest degree of accuracy possible. Además, el módulo de software es capaz de corregir y analizar las imágenes distorsionadas de gel.

5. Interpretación de resultados

- Se espera que con el aislamiento de bacterias Gram Negativas por medio del agar Selectivo King A, y previo a la técnica DGGE, para la caracterización de las cepas aisladas, se pueda determinar la predominancia de organismos.

- La aislación ulterior de las bacterias, con mayor potencialidad de resistencia y fijación al mercurio, para lograr la obtención, mantenimiento y almacenamiento de cepas puras.

- Utilizar las cepas puras aisladas para estudios posteriores y pruebas bioquímicas sobre su capacidad metalo-fijadora.

- Se establecerá una línea base de la presencia de los microorganismos presentes en el Rio Gala y así contribuir con el desarrollo tecnológico y científico, vinculados con los procesos de remediación ambiental y tratamientos de residuos tóxicos, por parte de la industria minera.

6. Conclusiones y Recomendaciones

- Mediante la caracterización bioquímica, se han implementando medios de cultivos selectivos, pruebas de resistencia y métodos de fijación de mercurio se pudo determinar bibliográficamente que el género Pseudomona predomina en zonas con altas concentraciones de metales pesados.

- Mediante técnicas moleculares (PCR-DGGE), se puede determinar específicamente el número y especie presentes en las muestras.

7. Bibliografía

[1] Informe del país: Ecuador, reunión regional sobre calidad de agua potable, OPS/CEPIS/REULAB, Mayo 1996, pag 3 – 7

[2] La minería provoca una alarmante contaminación en ríos de Tenguel, 25-04-2008, www.Ecoportal.net

[3] De Jaysankar, And N. Ramaiah, Characterization Of Marine Bacteria Highly Resistant To Mercury Exhibiting Multiple Resistances To Toxic Chemicals, National Institute Of Oceanography, Dona Paula, India

[4] Visca Paolo, Colotti Gianni, Serino Laura, Daniela Verzilo, Orsi Nicola y Chiancone Emilia, Metal Regulation of Siderophore Synthesis in Pseudomonas aeruginosa and Functional Effects of Siderophore-Metal Complexes, University “La Sapienza”, Rome, Italy 1992, Publicación Científica

[5] Pool Robert, Environmental Contamination, Biotechnology, and the Law, National Research Council, Washington, August 2000, Summary of a Forum Held at the National Academy of Sciences

[6] Geoffrey M. Gadd., Microbial Metal Transformation, Division of Environmental and

Applied Biology, Biological Sciences Institute, School of Life Sciences, University of Dundee, Dundee DD1 4HN, Scotland, UK, June 2001

[7] Jerez Carlos, Biomining Microorganisms: Molecular Aspects and Applications in Biotechnology and Bioremediation, University of Chile, Santiago 2009, pag 239

[8] Ying Kuang, Kaori Tani, Aidan J. Synnott, Kazuhito Ohshima, Hidetoshi Higuchi, Hajime Nagahata, Yasunori Tanji, Characterization of bacterial population of raw milk from bovine mastitis by culture-independent PCR–DGGE method, Department of Bioengineering, Tokyo Institute of Technology,, Japan Department of Bioscience, Rakuno Gakuen University, Japan 2004

[9] Delgado Martin, Garcia Hernandez, Hormigo Felipe, Hardisson de la Torre, Álvarez Marante, Análisis Microbiológico y Fisicoquímico del agua de piscinas de la isla de Tenerife. Universidad de la Laguna,1992. Publicación Científica

[10] Gómez Yamiris ,González González María Isabel, Chiroles Rubalcaba Sergio y García Crucet Cosset, Calidad microbiológica del agua utilizada en la Unidad de Hemodiálisis del Instituto de Nefrología, Unidad Nacional de Salud Ambiental, Ministerio de Salud Pública, Ciudad de La Habana, Cuba, 2005

[11] Morales Vanegas Sarahi de los Angeles, Predicción de conteos microbiológicos en la leche cruda con base en la prueba de azul de metileno,Zamorano, Honduras, 2005.

[12] López cortes Alejandro, Maya Yolanda, García Maldonado José, Diversidad filogenética de especie de Microcoleus de costras biológicas de suelo de la península de Baja california, Centro de Investigaciones biológicas del noroeste, Mexico, 2009.