

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA
INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT



**DISTRIBUCIÓN DE BACTERIAS SULFATO
REDUCTORAS Y METILMERCURIO EN
SEDIMENTOS DE LAGUNAS DE
INUNDACIÓN DEL RÍO BENI,
AMAZONÍA BOLIVIANA**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS**

POSTULANTE: LIC. SAMANTA RITA SÁNCHEZ ALARCÓN

**TUTORES: DR. MARC ROULET
DRA. VOLGA IÑIGUEZ**

**LA PAZ-BOLIVIA
2005**

I. ABSTRACT

This study characterized the distribution of sub-groups of Sulfate Reducing Bacteria (BSR) in sedimentary profiles of different lagoons (oxbow lakes and inland lakes) from the basin of the Beni River. This study also determined physico-geochemical characteristics (Eh, pH and density), organic carbon, mercury concentrations and distribution (Hg), and methylmercury (MeHg), as well as rates of methylation (Me^{203}Hg) in the sedimentary interphase. The sediments were collected in the middle of the humid, dry season, and later each sample was fractionated each 0.5 cm until a depth of 10 cm per sample core was reached. Nucleic acids were extracted from each fraction and analyzed using Polymerase Chain Reaction (PCR) to determine the presence of sub-groups BSR (using the technique of nested PCR) and of the gene for the enzyme Dissimilatory Sulfite Reductase (DSR). BSR are present in all the analyzed sedimentary profiles. The gene DSR was found in with SRBs in all sedimentary profiles, thus confirming this reduction pathway in these SRBs. The sub-groups *Desulfovibrio* and *Desulfococcus* were the most common sub-groups found, in contrast to the sub-groups *Desulfotomaculum*, *Desulfobacter* and *Desulfobulbus*, all of which showed variation in the different lagoons as well as seasonal variation. In each of the studied lagoons, differences were observed in the physicochemical factors like pH, Eh, and density of sediments, as well as in the concentration and quality of organic matter. The San Juan (inland lake) is characterized by levels of carbon 10 greater times to the found ones in the oxbow lakes (Salina, La Granja and Río Viejo). The rate of Me^{203}Hg found in the interphase corresponds to a increasing order of the age of the oxbow lakes (0.2% in Salina, 0.6% in La Granja and 12.3% in Río Viejo), in contrast to a value of 0.4% in the most organic lagoon (San Juan). Hg and MeHg are found in higher concentrations in the first 3 cm of depth. Hg is present in concentrations of 60 ng/g to 80 ng/g in the studied lagoons. The percentage of MeHg found in the oxbow lakes was of 0.32% (Salina), 1.6% (La Granja) and 0.58% (Río Viejo), and in the inland lakes (San Juan) of 1.42%. There was not any relation found between the rate of methylation, percentage of MeHg and percentage of organic carbon. This is likely due to the different physicochemical conditions that exist in each one of the studied lagoons, since these conditions could affect to the rates of methylation and distribution of MeHg. The diversity of SRBs found in the lagoons suggests the presence of a potentially important source of methylation. Future studies will have to evaluate of quantitative form the distribution of SRBs and its correlation with sulphate reduction and the methylation of the Hg.

Keywords: Sulfate Reducing Bacteria; Dissimilatory Sulfite Reductase; mercury; methylmercury

II. RESUMEN

En este estudio, se caracterizó la distribución de subgrupos de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR) en perfiles sedimentarios de diferentes lagunas (meándricas y de tierra firme) de la cuenca del río Beni, en los cuales también se determinó características fisicoquímicas (Eh, pH y densidad), carbono orgánico, concentraciones y distribución de mercurio (Hg), metilmercurio (MeHg). Así como tasas de metilación (Me^{203}Hg) en la interfase sedimentaria. Los sedimentos fueron colectados de la parte central en la época húmeda y seca, y posteriormente fueron fraccionados cada 0.5 cm. hasta una profundidad de 10 cm. Los ácidos nucleicos fueron extraídos de cada fracción y analizados por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para analizar la presencia de subgrupos de BSR (PCR anidado) y del gen de la enzima Disimilatoria Sulfito Reductasa (DSR). Las BSR están presentes en todos los perfiles sedimentarios analizados. Donde también se encontró al gen DSR confirmando de esta manera a microorganismos sulfato reductores. Los subgrupos *Desulfovibrio* y *Desulfococcus* fueron los mayoritariamente encontrados en contraste a los subgrupos *Desulfotomaculum*, *Desulfobacter* y *Desulfobulbus* los cuales mostraron variación en las diferentes lagunas y en las épocas de estudio analizadas. En cada una de las lagunas estudiadas se observaron diferencias en los factores fisicoquímicos como pH, Eh y densidad de los sedimentos así como en la concentración y calidad de materia orgánica. La laguna San Juan se caracterizó por presentar niveles de carbono 10 veces mayores a los encontrados en las lagunas meándricas (Salina, La Granja y Río Viejo). La tasa de Me^{203}Hg encontrada en la interfase está en orden creciente a la edad de las lagunas meándricas (0.2% en Salina, 0.6% en La Granja y 12.3% en Río Viejo), en contraste a un valor de 0.4% en la laguna más orgánica (San Juan). La mayor concentración de Hg y MeHg se encuentran en los primeros 3 cm. de profundidad. El Hg está presente en concentraciones de 60 ng/g a 80 ng/g en las lagunas estudiadas. El porcentaje de MeHg encontrado en las lagunas meándricas fue de 0.32% (Salina), 1.6% (La Granja) y 0.58% (Río Viejo), y en la laguna de tierra firme (San Juan) de 1.42%. No se encontró ninguna relación entre la tasa de metilación, porcentaje de MeHg y porcentaje de carbono orgánico, por lo que existiría diferentes condiciones fisicoquímicas que afectarían a las tasas de metilación y distribución de MeHg en cada una de las lagunas estudiadas. La diversidad de BSR encontradas en la laguna sugiere la presencia de un potencial importante de metilación por lo que futuros estudios deberán evaluar de forma cuantitativa la distribución de BSR y su correlación con la sulfato reducción y la metilación del Hg.

Palabras claves: Bacterias Sulfato Reductoras; Disimilatoria Sulfito Reductasa; mercurio; metilmercurio

III. ABREVIACIONES

Gen 16S RNAr	gen 16S RNA ribosomal
Gen DSR	gen Disimilatoria Sulfito Reductasa
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
MeHg	metilmercurio
Hg	mercurio
Eh	Potencial de oxido-reducción
BSR	Bacterias Sulfato Reductoras
DSV	<i>Desulfovibrio</i>
DCC	<i>Desulfococcus</i>
DFM	<i>Desulfotomaculum</i>
DBB	<i>Desulfobulbus</i>
DSB	<i>Desulfobacter</i>
DBM	<i>Desulfobacterium</i>

DEDICATORIA

Este trabajo esta dedicado a mis padres
(Rodolfo y Rita) y hermanos (Marcelo y Claudia).
Muchas gracias por estar siempre a mi lado.

AGRADECIMIENTO

Primeramente quiero agradecer a mis tutores la Dra. Volga Iñiguez y Dr. Marc Roulet por brindarme todo su apoyo y colaboración en este trabajo.

Asimismo, agradecer el apoyo de las siguientes instituciones, Instituto de Biología Molecular y Biotecnología (IBMB), Institut de Recherche Scientifique pour le Développement (IRD), Hybam, ATI, ESCD. Asimismo, agradecer al Dr. Jean Remy Guimarães.

También agradecer a todas aquellas personas que forman parte del IBMB, gracias por su apoyo y su amistad. Asimismo, agradecer a mis compañeros de la unidad de microbiología ambiental (Sonia, Daniela, Karina y José).

Agradecer a todos los profesores y compañeros de la Maestría de Ciencias Biológicas y Biomédicas Gestión 2002-2003. A los primeros por impartirme una excelente enseñanza y a los segundos por brindarme su amistad.

Muchas Gracias.

Samanta Rita Sánchez Alarcón

INDICE

1.	INTRODUCCION	5
2.	MARCO TEORICO.....	7
2.1.	Geoquímica del mercurio	7
2.2.	Metilación del mercurio.....	9
2.3.	Efectos tóxicos del mercurio y metilmercurio	11
2.4.	Contaminación del mercurio en suelos y sedimentos de la amazonia	12
2.5.	La Amazonía Boliviana.....	14
2.6.	Contaminación por mercurio en la amazonía boliviana.....	14
2.7.	Bacterias Sulfato Reductoras	15
2.8.	Metabolismo de las Bacterias Sulfato Reductoras	16
2.9.	Clasificación de las Bacterias Sulfato Reductoras	18
2.9.1.	BSR Gram-negativas mesófilicas.....	20
2.9.2.	BSR Gram-positivas formadoras de esporas	23
2.9	Relación ecológica de las bacterias sulfato reductoras.....	23
2.10.	Efecto de pH, temperatura y oxígeno en el desarrollo de las bacterias sulfato reductoras.....	24
2.11.	Actividad sulfato reductora	25
2.11.1.	Activación del sulfato y reducción a bisulfito.....	26
2.11.1.1.	Formación adenilsulfato.....	26
2.11.1.2.	Reducción del adenilsulfato a AMP y Bisulfito.....	26
2.11.1.3.	Reducción del tiosulfato.....	27
2.11.1.4.	Sulfuro de hidrogeno.....	27
2.12.	Detección de microorganismos por métodos moleculares	28
2.13.	Identificación de las bacterias sulfato reductoras por técnicas moleculares.....	28
2.13.1.	La sulfito reductasa disimilatoria.....	29
2.13.2.	El RNAr 16S como un marcador evolutivo.....	29
3.	OBJETIVOS	33
3.1.	Objetivo General	33
3.2.	Objetivos Específicos	33
4.	MATERIALES Y METODOS	34
4.1.	Área de estudio	34
4.2.	Colecta de las muestras	37
4.3.	Medición de pH y potencial redóx	38
4.4.	Medición de mercurio total y metilmercurio	38
4.5.	Análisis de Me ²⁰³ Hg	39
4.6.	Medición del carbono y nitrógeno orgánico.....	39
4.7.	Extracción de DNA de sedimentos.....	39
4.8.	Extracción y purificación de DNA de sedimentos.....	40
4.9.	Amplificación de 16S DNAr y grupos específicos de BSR por PCR y nested-PCR.....	40
4.10.	Amplificación de la sulfito reductasa disimilatoria por PCR.....	41
4.11.	Porcentaje total de los subgrupos de BSR.....	41
4.12.	Cepas de referencia	42

5.	RESULTADOS	43
5.1.	Características físicas de los sedimentos.....	43
5.2.	Potencial de oxido-reducción (Eh).....	44
5.3.	pH.....	45
5.4.	Geoquímica de los sedimentos de las lagunas de inundación	48
5.4.1.	Geoquímica del MeHg en la interfase agua-sedimento de los centros de las lagunas.....	48
5.4.2.	Porcentajes de carbono orgánico, nitrógeno y de materia orgánica.....	50
5.4.3.	Distribución de la concentración de mercurio.....	50
5.4.4.	Distribución del metilmercurio en sedimentos de lagunas.....	51
5.4.5.	Relación entre el MeHg, materia orgánica, porcentaje de agua y Eh.....	52
5.5.	Extracción de DNA de los sedimentos de las lagunas de inundación	57
5.6.	Detección de la bisulfito reductasa disimilatoria (DSR)	57
5.7.	Amplificación del gen 16S DNAr	58
5.8.	Detección de los subgrupos de BSR mediante PCR anidado	58
5.8.1.	Porcentaje total de BSR en las lagunas de inundación.....	62
5.8.2.	Distribución de los subgrupos de BSR en las lagunas de estudio.....	63
5.8.3.	Porcentaje vertical de los subgrupos de BSR en las lagunas de estudio..	67
5.8.4.	Análisis de porcentaje horizontal de BSR en el perfil en profundidad	69
6.	DISCUSIÓN	71
6.1.	Extracción de ácidos nucleicos de las muestras sedimentarias.....	71
6.2.	Consideraciones metodológicas de la identificación de subgrupos BSR	72
6.3.	Distribución de los subgrupos BSR en los sedimentos de las lagunas meándricas y de tierra firme	74
6.3.1.	Detección de la familia Desulfovibrionaceae.....	76
6.3.2.	Detección de la familia Desulfobacteriaceae.....	76
6.4.	Detección de bacterias sulfato reductoras por gen bisulfito reductasa disimilatoria (DSR)	78
6.5.	Geoquímica del Hg y MeHg en los sedimentos. Tasas de metilación y distribución de Bacterias Sulfato Reductoras	78
6.5.1.	Distribución del Hg en los sedimentos	78
6.5.2.	Tasas de metilación en la interfase de los sedimentos	80
6.5.3.	Distribución MeHg en los sedimentos	83
6.5.4.	Hg, MeHg y distribución de las BSR en los sedimentos de las lagunas de inundación	85
7.	CONCLUSIÓN	87
8.	RECOMENDACIONES	89
9.	BIBLIOGRAFIA	90

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Transformaciones del mercurio	8
Figura 2. Ciclo del mercurio en la biosfera	10
Figura 3. Principales vías de interacciones de las bacterias sulfato reductoras	16
Figura 4. Formas celulares de las bacterias sulfato reductoras.....	19
Figura 5. Árbol filogenético de DNAr 16S muestra los linajes de los seis subgrupos de bacterias sulfato reductoras.....	22
Figura 6. A) Mapa de la estructura secundaria del 16S RNAr. B) Modelo de la imagen tridimensional del 16S RNAr en bacterias.....	31
Figura 7. Mapa de la región de estudio y puntos de muestreo de las lagunas de inundación con relación a la población de Rurrenabaque y al río Beni.....	36
Figura 8. Centro y zona litoral de las lagunas Pinky, La Granja y Río Viejo.....	37
Figura 9. Perfiles porcentaje de agua, densidad, potenciales redox y pH en sedimentos de las lagunas de inundación.....	47
Figura 10. Geoquímica del mercurio en la interfaz agua-sedimentos en los centros de las lagunas.....	49
Figura 11. Perfiles de las concentraciones de C orgánico, C/N, Hg y MeHg en los sedimentos del centro de las lagunas.	53
Figura 12. Perfiles de concentración de Hg, MeHg y MeHg/C en sedimentos.....	54
Figura 13. Relación entre la fracción del Hg, MeHg y Corg en los sedimentos de las lagunas de inundación.	55
Figura 14. Relación entre la fracción del Hg, MeHg y porcentaje de agua en sedimentos en las lagunas de inundación.....	56
Figura 15. (A) Extracción de DNA de sedimentos de la laguna La Granja..	59
Figura 16. Amplificación de 16S DNAr, de grupos específicos de BSR de eubacteria y del gen DSR de bacterias sulfato reductoras.....	60
Figura 17. Amplificación de grupos específicos de bacterias sulfato reductoras en muestras de la laguna La Granja.	61
Figura 18. Porcentaje total de BSR en las lagunas del area de estudio.	62
Figura 19. Distribución de los subgrupos de BSR en sedimentos de la lagunas meandricas.....	65
Figura 20. Distribución de los subgrupos de BSR en sedimentos de la laguna Chitiwara y de tierra firme (San Juan y Moa).	66
Figura 21. Porcentaje vertical de los subgrupos de BSR en las laguna del area de estudio.	68
Figura 22. Porcentaje horizontal de los subgrupos de BSR en lagunas de inundación.....	70
Figura 23. Extracción de DNA de sedimentos de diferente estado trofico.....	107
Figura 24. Extracción de DNA de sedimentos de las lagunas en estudio.....	107
Figura 25. Extracción de DNA de sedimentos de la laguna Salina..	108
Figura 26. Extracción de DNA de sedimentos de la laguna Pinky.	108

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características del sistema de las lagunas estudiadas en la región de Rurrenabaque	35
Tabla 2. Secuencias de cebadores utilizados en la reacción de PCR para la caracterización de bacterias sulfato reductoras.....	42
Tabla 3. Cepas de referencia.....	42
Tabla 4. Concentraciones de Hg y MeHg y porcentaje MeHg en.....	80
Tabla 5. Promedios de las concentraciones de Hg, MeHg y del %MeHg integrados sobre los cinco primeros centímetros del perfil sedimentario	84
Tabla 6. Grado de metilación del mercurio por bacterias sulfato reductoras.....	86

1. INTRODUCCION

La contaminación por metilmercurio (MeHg) en los ecosistemas naturales es un tema preocupante por sus efectos inmediatos sobre el medio ambiente (Roulet et al., 1998; Mauro et al., 2002; Bowles et al., 2003; Hammerschmidt et al., 2004) y por sus consecuencias en la salud humana (Allen et al., 2002; Budtz-Jorgensen et al., 2002). Diferentes estudios han demostrado que las bacterias sulfato reductoras son los principales metiladores en sedimentos de agua dulce (Macalady et al., 2000) y marinos (Devereux et al., 1996; Loseto et al., 2004). Entre los factores que influyen en la producción del MeHg estaría la afiliación filogenética de las BSR (King et al., 2001) así como su distribución espacial y temporal (Devereux et al., 1996; Siliciano et al., 2002), la biodisponibilidad del Hg^{+2} (Benoit et al., 2001), biodisponibilidad del carbono orgánico (Pak et al., 1998b; Zhou Yi, 2003) y la abundancia de aceptores de electrones tales como el sulfato (Jay et al., 2002).

El mercurio inorgánico tiene la capacidad de formar compuestos orgánicos e, utilizando como precursor al ion mercúrico (Hg^{+2}). Cuando el Hg^{+2} ingresa al agua se transforma en metilmercurio (MeHg) por una reacción metabólica donde es absorbido, transmitido y bioacumulado por su naturaleza lipofílica, en los niveles tróficos a este fenómeno se lo conoce como biomagnificación. La metilación del mercurio es dependiente de la concentración y la forma en la que se encuentra distribuido este elemento en el medio ambiente (Roulet et al., 2001). El metilmercurio se encuentra en afluentes, sedimentos y tierras de las regiones contaminadas (Schwesig et al., 1999; Rodríguez et al., 2000; Roulet et al., 2001; Matilainen et al., 2001; Loseto et al., 2004).

Investigaciones realizadas en la amazonía brasileña indican que los efectos del metilmercurio en el hombre, aparecen antes de la manifestación de los síntomas de intoxicación, con modificaciones del funcionamiento del sistema nervioso, en particular el sistema motor, visual y sensorial (Lebel et al., 1997; Dolbec et al., 2001). En la amazonía boliviana se han realizado pocos estudios sobre la contaminación por mercurio (Maurice Bourgoïn, 2001) y metilmercurio (Achá, 2004). En el 2001 Maurice Bourgoïn, reporto que existen diferentes concentraciones de mercurio en peces y humanos en la cuenca del río Beni, que reflejarían la contaminación ambiental y de riesgo para la salud humana en la región. La contaminación por Hg se produce de forma natural como por las actividades antropogénicas, como la minería aurífera (originada en 1950) que han liberado más de 300 toneladas de mercurio al medio ambiente, sobre todo en la cabecera del río Beni (Maurice Bourgoïn, 2001).

Las bacterias sulfato reductoras (BSR) son bacterias anaerobias que tienen la habilidad de usar el sulfato (SO_4^{-2}) como último aceptor de electrones con la producción de sulfuro de hidrógeno (H_2S), constituyéndose en un grupo funcional importante en la estructura y actividad del medio ambiente (Wagner et al., 1998; Krekeler et al., 1998; So y Young 1999; Annweiler et al., 2001; Pérez-Jiménez et al., 2001).

Asimismo, son conocidas por su diferenciada habilidad de utilizar dadores de electrones al hidrogeno, ácidos orgánicos pequeños (lactato, acetato y propionato), ácidos orgánicos de cadena larga, hidrocarburos alifáticos y compuestos aromáticos (benzoato, fenol y tolueno) (Barton, 1995). Las BSR actúan en el estadio terminal de la degradación de la materia orgánica, la oxidación de la materia orgánica a CO_2 bajo anaerobiosis y contribuyen significativamente al ciclo global del carbono y azufre. La iniciación del proceso de reducción del sulfato se produce bajo condiciones de un potencial redóx reducido, los cuales estarían presentes en suelos inundados (Krekeler et al., 1998). En sedimentos, la sulfato reducción ayuda a la mineralización de la materia orgánica a CO_2 .

La abundancia, la diversidad y rol de las poblaciones microbianas en los ecosistemas hasta hace algunos años ha estado limitada a la información obtenida a través de los medios de cultivo. El uso de métodos independientes de los medios cultivo, sobre todo de la biología molecular, ha permitido una mejor comprensión del papel de las comunidades microbianas en el medio ambiente (Weisburg et al., 1991; Voordouw et al., 1996; Borneman y Triplett., 1997; Macrae 2000; Cho y Tiedje 2002). Así las BSR clasificadas en géneros y especies en base al análisis filogenético del gen 16S RNAr (Devereux et al., 1990; Voordouw et al., 1996; Devereux et al., 1996, Daly et al., 2000; Loy et al., 2002) han sido caracterizadas por su rol en la metilación en diferentes ecosistemas acuáticos de agua dulce, marinos y lacustres.

Con el objetivo de contribuir al conocimiento de los factores y procesos que intervienen en la metilación del Hg, el presente estudio esta enfocado a caracterizar la distribución de subgrupos de bacterias sulfato reductoras en estratos sedimentarios de diferentes lagunas de la llanura de inundación de la cuenca del río Beni, en los cuales se analizara también las concentraciones de Hg, distribución del Hg, MeHg, carbono orgánico, tasas de metilación y características fisicoquímicas como Eh y pH.

2. MARCO TEORICO

2.1. Geoquímica del mercurio

El mercurio está disperso en concentraciones variables en los ambientes naturales (Rasmussen et al., 1998; Schwesig et al., 1999; Matilainen et al., 2001; EPA, 2004a). Se presenta en tres estados de oxidación, Hg^0 , Hg^+ , y Hg^{+2} y como cinabrio (HgS), mineral poco soluble, que se oxida gracias a la aireación dando lugar a la formación del ión mercurio (Hg^{2+}). El mercurio monovalente generalmente esta presente como dímero, $^+\text{Hg}-\text{Hg}^+$ (Figura 1).

El mercurio liberado a la atmósfera se encuentra principalmente en forma de mercurio metálico (Hg^0), precipitando constantemente como Hg^{+2} en los suelos y cuerpos de agua junto con la lluvia y otras partículas. Cuando precipita pasa a su estado de oxidación en la atmosfera (forma iónica). En el agua, el mercurio ingresa a una muy compleja y aún no del todo comprendida cadena de reacciones y transformaciones químicas de las cuales la metilación es una de las más importantes (National Research Council, 2000). De la misma forma, el metilmercurio podría ser demetilado y pasar a formar mercurio iónico Hg^{+2} o mercurio elemental Hg^0 . Este último vuelve a volatilizar y se reiniciaría el ciclo nuevamente (Figura 2).

El mercurio proviene tanto de fuentes naturales y antropogénicas y su utilización en muchos productos al igual que su emisión en los procesos de combustión, han resultado en casos de intoxicamiento en diferentes poblaciones. En los reportes de Agencia de Protección Ambiental (EPA) de Estados Unidos en 1999, se identificaron, como principales emisores de mercurio, a la combustión de combustibles fósiles en plantas de energía y a la combustión de carbón mineral, liberando aproximadamente 40% de mercurio al ambiente cada año en los Estados Unidos. Otras fuentes de contaminación de mercurio son las calderas industriales con un 10% y la producción de la clorina con un 5%. La basura municipal y la basura médica eran una fuente importante de contaminación de mercurio, pero gracias a las regulaciones de la EPA estas fuentes de contaminación ahora son menos importantes (EPA, 2004a).

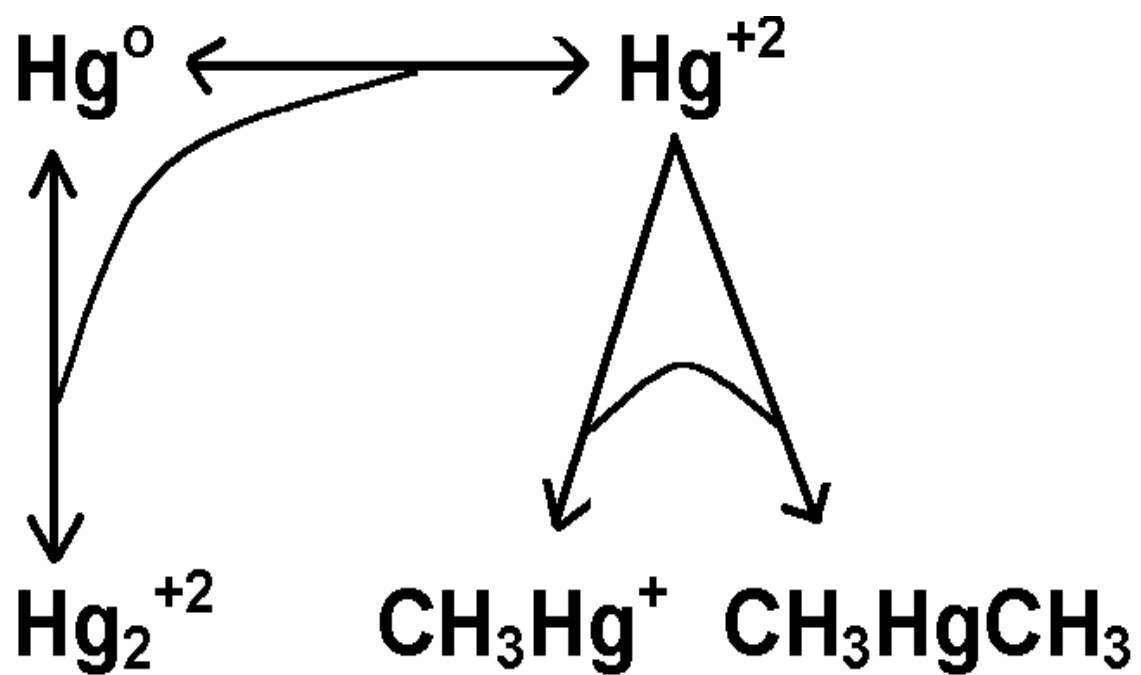


Figura 1. Transformaciones del mercurio

2.2. Metilación del mercurio

Diferentes estudios han demostrado que las Bacterias Sulfato Reductoras son los principales metiladores en sedimentos de agua dulce y marinos (Devereux et al., 1996; Macalady et al., 2000; Loseto et al., 2004). Reportes sobre la metilación del mercurio por las BSR mencionan que esta reacción se realiza en condiciones anaeróbicas estrictas (Pak y Bartha, 1998a). Sin embargo, estudios más recientes han revelado la existencia de BSR tales como *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum* que son aerobias tolerantes. Mas aún, se ha determinado que la mayor actividad de las BSR se da en los primeros milímetros de profundidad en los sedimentos y posiblemente en condiciones aerotolerantes. De todas maneras es posible la existencia de otros grupos importantes en la metilación del mercurio, en especial en regiones y ecosistemas aún poco estudiados (Pak y Bartha, 1998b).

La metilación del mercurio por parte de las BSR es un proceso aún no del todo comprendido. Se tienen algunas pautas sobre como el mercurio inorgánico ingresa dentro de las bacterias y es transformado, existiendo varios posibles mecanismos, así como ciertas condiciones que estimulan o inhiben la producción del metilmercurio. Además, no todas las BSR son capaces de metilar el mercurio en el mismo grado y capacidad. Asimismo, algunas BSR demetilan el metilmercurio a su forma inorgánica (Choi et al., 1994; King et al., 2000).

Un estudio realizado por Benoit y colaboradores el 2001 con *Desulfobulbus propionicus* (1pr3) demostro que la metilación del mercurio es dependiente de la biodisponibilidad del mercurio, y se ve afectada por la cantidad de sulfuro de hidrogeno presente en el medio, además, de requerir de ciertas condiciones de crecimiento (Benoit et al., 2001).

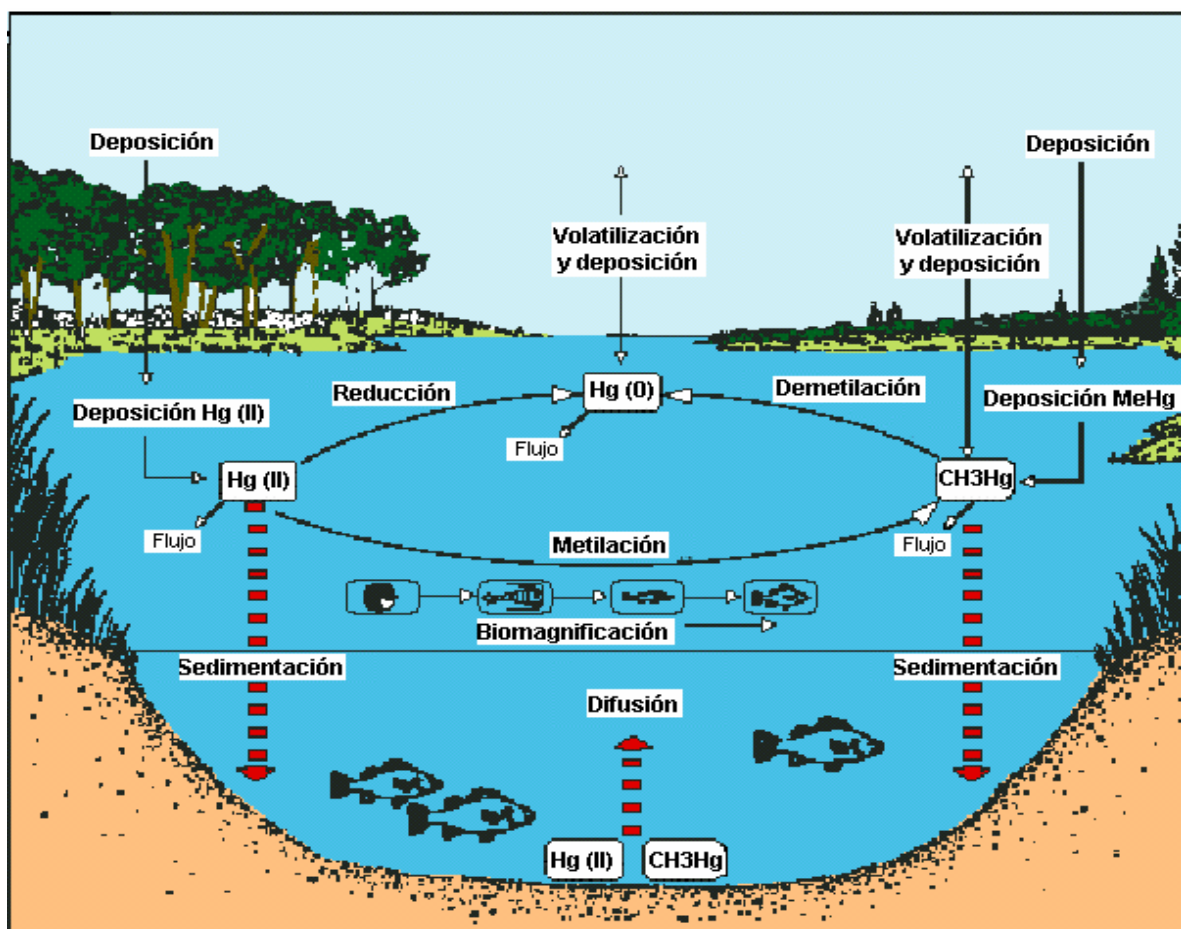


Figura 2. Ciclo del mercurio en la biosfera

La transformación del mercurio en metilmercurio es producida por intermedio de la cobalamina (B_{12}) (Choi y Bartha, 1993), de tal manera que cuando *Desulfovibrio desulfuricans* tiene un crecimiento fermentativo y existe una reducción del sulfato, los rangos de metilmercurio son bajos (Choi et al., 1994). *Desulfovibrio desulfuricans* metila el mercurio en presencia de tetrahidrofolato (THF) y cobalamina. El carbono empleado en esta vía de biometilación pertenece al C-3 del piruvato y es donado al tetrahidrofolato como C-3 a la serina por la serina hidrometiltransferasa. Se cree que el compuesto químico que proporciona el grupo metilo es la metilcobalamina y que los compuestos S-adenosilmetionina y N-5-metiltetrahidrofolato no son capaces de donar el grupo metilo al Hg^{+2} , porque éste en estos dos compuestos se transfiere como CH_3^+ , mientras que metilcobalamina transfiere el grupo metilo como CH_3^- , ocurriendo esta transferencia de forma intracelular (Summers y Silver, 1978). El grupo metilo de la metilcobalamina es transferido a los iones mercurio formándose el metilmercurio (Siciliano et al., 2002). Un trabajo realizado por Ekstrom et al. (2003) muestra que la metilación del mercurio es independiente a la vía de acetil-CoA, encontrando cepas BSR que

oxidan incompletamente acetil-CoA, pero logran metilar el mercurio a metilmercurio (Ekstrom et al., 2003).

Las condiciones que promueven o inhiben la metilación son diversas y están estrechamente relacionadas con la inhibición o estimulación de las BSR (Jin et al., 1997). En ambientes ricos en sulfato la producción de sulfuro de hidrogeno inhibe la metilación del mercurio, al igual que se inhibe el crecimiento de las BSR. En cambio, la metilación del mercurio podría verse favorecida en ambientes sin mucho sulfato, si las BSR continúan metilando el mercurio con la ayuda de las bacterias metanógenicas sin producir H₂S. Así un crecimiento sinérgico entre las BSR y bacterias metanógenicas podría crear condiciones favorables para la metilación del mercurio (Pak y Bartha, 1998).

Aunque se han reportado distintos grupos de organismos capaces de metilar mercurio, se cree que en ambientes acuáticos los principales responsables son las BSR (King et al., 2000; Benoit et al., 2001). Por lo tanto, el conocimiento y funcionamiento de las comunidades de BSR en estos ambientes es importante para comprender el proceso de contaminación en lugares donde los niveles de metilmercurio son elevados.

2.3. Efectos tóxicos del mercurio y metilmercurio

Los efectos tóxicos del mercurio y metilmercurio no están totalmente comprendidos y menos aún las vías precisas de toxicidad. Se cuenta con estudios que evidencian que el metilmercurio tiene fuertes efectos neurotóxicos sobre todo en los fetos y niños en desarrollo afectando al Sistema Nervioso Central (SNC) (Sanfeliu et al., 2001; Allen et al., 2002; Ehrenstein et al., 2002; Limke et al., 2003; Qu et al., 2003), así como a los riñones y al sistema inmunológico (Pheng et al., 2003). Además, se tienen datos sobre alteraciones negativas en el sistema cardiovascular (Stern et al., 2001; Budtz-Jorgensen et al., 2002). Tanto el metilmercurio como el dimetilmercurio (volátil) son sustancias lipofílicas y tienden a concentrarse en los lípidos celulares. El metilmercurio es 100 veces más toxico que el Hg²⁺ (WHO, 1990).

El metilmercurio es rápidamente transferido al cerebro, gracias a que pasa la barrera hematoencefálica en forma de metilmercurio-L-cisteína. Por lo tanto, el órgano crítico afectado por la toxicidad del metilmercurio es el cerebro y en general el Sistema Nervioso Central (SNC) (Yuan et al., 1999). Tanto el cerebro del adulto como del feto se ven severamente afectados, aunque el cerebro de este último es más sensible. Los daños más evidentes son la parálisis, ceguera, retardo mental, problemas motores, reducción del campo visual y otros (Yokoo, et al., 2003). Los efectos tóxicos del metilmercurio también provocan la muerte celular (Sanfeliu, et al., 2001; Allen, et al., 2002; Jørgensen, et al., 2002), pero aún no existen suficientes evidencias sobre este mecanismo. Algunos investigadores también consideran que el principal mecanismo de neurotoxicidad del metilmercurio es la interrupción de la síntesis de proteínas, demostrada *in vivo* en

mamíferos (Yuan y Atchison, 1997; Nishioku et al., 2000). No obstante, en estudios *in vitro* se observó un incremento en la producción de proteínas asociadas a una exposición a bajos niveles de metilmercurio (Miura et al., 1999; Yuan et al., 1999).

La contaminación por el mercurio al ser humano se da fundamentalmente por dos vías; la primera es la ingestión de alimentos contaminados con metilmercurio y la otra es la inhalación de vapores de mercurio (Hg^0). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido como un nivel de 50ug de mercurio por g de cabello como un parámetro que indica un riesgo mínimo de efectos neurotóxicos en adultos y 20 ug de mercurio por gramo de cabello para mujeres embarazadas. No obstante, en el 2003, Yokoo mostró que es posible detectar efectos neurotóxicos en adultos con exposición crónica a niveles de metilmercurio de 0.6ug/g a 14 ug/g (Yokoo et al., 2003).

En la amazonía existe información limitada sobre los niveles de contaminación por mercurio. No obstante, se cuenta con datos de diferentes regiones. Un estudio llevado a cabo por Harada y colaboradores en el 2001, en la región del río Tapajós, encontró que el 32% de la población estudiada sufría de desordenes sensoriales que podían asociarse con la contaminación por metilmercurio. En esta misma región se han reportado niveles de mercurio en cabellos por encima de los recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y niveles en peces piscívoros 4 veces superiores a los permitidos (Harada et al., 2001), los mismos que constituyen la principal fuente de exposición al mercurio en la amazonía. Los estudios sobre el contenido de metilmercurio en peces amazónicos han mostrado niveles que frecuentemente superan los 0.5 ug/g de peso fresco, un valor que es considerado en muchos países como estándar y que no debe ser excedido.

De acuerdo con Harada y colaboradores en 2001, el nivel umbral de mercurio en el cabello es de 10 ppm. No obstante, se ha visto efectos neurotóxicos en niños cuyas madres presentan menos de 10 ppm en el cabello (Harada et al., 2001). Esta concentración de mercurio podría estar por debajo de la asociada con daños neurológicos en adultos, pero es suficiente en el caso de mujeres embarazadas. Estudios realizados por Label et al. (1997) y Dolbec et al. (2001) mostraron que existe contaminación de mercurio en los peces de la amazonia brasileña.

2.4. Contaminación del mercurio en suelos y sedimentos de la amazonia

Estudios realizados por Roulet et al. (1998), encontraron que más del 97% del mercurio acumulado en las superficies del suelo de la cuenca del Tapajós, es de origen preantropogénico. No obstante, existe evidencia de que la acumulación de mercurio en sedimentos y suelos inundables se ha incrementado en los últimos años. Durante mucho tiempo se consideró que la actividad de explotación aurífera era responsable de la contaminación por mercurio. Sin embargo, recientes estudios destacan a la deforestación y a la lixiviación de los suelos como fuentes de contaminación por mercurio mucho más importantes que la minería.

Los suelos del Amazonas tienen entre 500.000 y un millón de años de antigüedad y han acumulado mercurio de la atmósfera a lo largo del tiempo. En las últimas décadas, diferentes zonas de la Amazonía han sido objeto de colonización masiva siendo desmontadas grandes extensiones de bosques para la agricultura. Se estima que a fines de los '90 se deforestaron más de 2.5 millones de hectáreas de la región amazónica. Al quedar expuesto el suelo contaminado con mercurio, las lluvias arrastran a los contaminantes hacia las redes fluviales distribuyendo el mercurio en la cuenca.

Un análisis de sedimentos de la amazonía central (río Tapajós, Estado de Pará, Brazil) mostró la existencia de un alto contenido de mercurio, constituyéndose éste en un importante reservorio natural de mercurio para la región (90-120 ngg⁻¹ en los primeros 20 cm de profundidad) (Roulet et al., 1998a). En el río Tapajós y en otros cursos de agua de la Amazonía, la contaminación de mercurio es causada principalmente por la deforestación de la región. Se observó que a pesar de que la extracción de minerales estaba contribuyendo a la contaminación por mercurio dentro de un radio de 50 Km² de los yacimientos auríferos, ésta no era la principal fuente de contaminación por mercurio (Roulet et al., 1998b).

Un estudio realizado por de Oliveira Santos y colaboradores el 2002 mostró que independientemente de que el mercurio tenga su origen en la minería o en la degradación de los suelos, la contaminación pasa por la introducción de éste metal en la cadena trófica, ya que los niveles en suelos y sedimentos están por debajo de los niveles de referencia, pero en la biota alcanzan 1.734 ug/g, aún en ausencia de actividad minera en la zona (de Oliveira Santos et al., 2002). Investigaciones realizadas en la amazonia, consideran que los principales sitios de metilación del mercurio son las lagunas amazónicas. Asimismo se ha determinado que las partículas de hierro y aluminio cumplen un rol importante en este proceso (Guimarães et al., 2000a; Roulet et al., 2001; Mauro et al., 2002).

Se conoce poco sobre la biogeoquímica del mercurio (Hg) y el metilmercurio (CH₃Hg) en la amazonía y en especial en los sedimentos (Roulet et al., 2001). La metilación del mercurio es dependiente de la concentración disponible y también de la forma en la que se encuentra el mercurio. Sin embargo, repetidas veces se ha demostrado que, incluso con bajas concentraciones en el agua, los niveles de contaminación en la biota son elevados. Por lo tanto, una pregunta central de esta problemática es dónde y por qué ocurre la metilación del mercurio en estos ambientes.

De acuerdo con datos sobre metilación de mercurio en Norte América y Europa la mayor parte de este proceso se daría en los sedimentos gracias a las condiciones reductoras y anaerobias que favorecerían al desarrollo de las BSR, consideradas como las principales responsables de la metilación del mercurio (Loseto et al., 2004). No obstante, estudios realizados en la Amazonía muestran que los mayores niveles de metilación del mercurio se darían en la rizosfera de macrófitas

flotantes, que habitan principalmente las lagunas y las llanuras de inundación de la cuenca Amazónica (Mauro et al., 1999).

Investigaciones realizadas por Guimarães y colaboradores el 2000, mostraron que las plantas acuáticas y la fauna que en ellas habitan, son factores fundamentales en la conversión del mercurio en metilmercurio, mostrando que el potencial de metilación de mercurio, en distintas macrófitas y distintos lugares, es en promedio 28 veces mayor que en sus respectivos sedimentos. En la región del pantanal las raíces de *Eichhornia azurea* presentan un potencial promedio de metilación 59 veces mayor al de los sedimentos subyacentes y un potencial máximo de metilación de 34% (Guimarães et al., 2000a). Otras especies como *Pistia stratiotes* y *Eichhornia crassipe* también mostraron importantes potenciales de metilación del mercurio (Mauro., et al 2002).

2.5. La Amazonía Boliviana

La cuenca amazónica boliviana cubre una superficie de 724000 km², representando un 66% de la superficie total del país. Este ecosistema abarca a los departamentos de Beni, Pando, y parte de Santa Cruz. Está comprendida por 4 subcuencas: ríos Beni, Mamoré, Itenez y Madera. La cuenca del río Beni, está constituida por el río Beni que a su vez tiene conexión con los ríos Madre de Dios, Orthon, Alto Beni, Kaka, Quiquibey, Tuichi, y Madidi. Esta cuenca esta limitada al Sur y al Oeste por los relieves de la Cordillera Oriental de los Andes y los Yungas y al Este por el Escudo Brasileño. En esta región, predominan áreas de climas húmedos hasta pluviales. Los suelos se encuentran sobre áreas de fuertes pendientes que están sometidas a procesos de remoción en masa y de alta erosión.

El río Beni, también conocido como Alto Madera, es el principal afluente del río Madera, el cual es uno de los ríos más grandes del mundo. Recorre gran parte del norte del departamento del Beni, y en sus riveras se han asentado un gran número de poblaciones (Montes, 1997). El carácter meándrico del río forma a su paso lagunas de baja profundidad que rápidamente se convierten en lagunas eutróficas. Con el tiempo estas lagunas van perdiendo su vínculo con el río para posteriormente ser conectadas nuevamente durante la época de lluvias.

2.6. Contaminación por mercurio en la amazonía boliviana

La preocupación por la contaminación por mercurio en la amazonía boliviana, surgió durante el auge de la minería aurífera, que registró un incremento durante la década de los años 80. La actividad aurífera en Bolivia y la contaminación por mercurio provocada por la misma tiene sus orígenes hace alrededor de 50 años atrás. Se estima que en Bolivia, desde los años 50 más de 300 toneladas de mercurio han sido liberadas en el ambiente (Maurice Bourgoïn, 2001).

En la región de Rurrenabaque en general, las especies piscívoras y carnívoras colectadas en el río Beni, aguas debajo de Rurrenabaque, están contaminadas por mercurio con un 72% (Maurice Bourgoïn, 2001). En esta área la población local consume frecuentemente peces contaminados con mercurio, siendo los niveles de mercurio encontrados en el cabello en las poblaciones ribereñas de entre 8 a 10 ppm (Maurice Bourgoïn, 2001).

En un estudio realizado entre 1995 y 1998 se midieron las concentraciones de mercurio en cabello humano en la población de Rurrenabaque encontrándose concentraciones de mercurio de 1.1 a 13.5 ug/g (Maurice Bourgoïn, 2001). Se estableció también que el riesgo de exposición tiende a agravarse, ya que hay un incremento de los niveles de Hg a través de las generaciones y los niveles más elevados se encontraron en los niños que aún estaban siendo alimentados con leche materna (Maurice Bourgoïn, 2001).

Un estudio realizado por Acha en el 2004, determino tasas de metilación del mercurio en la rizósfera de diferentes macrofitas en la región de Rurrenabaque, hallándose potenciales de metilación en *Polygonum densiflorum* de entre 28% a 36% y en *Eichhornia crassipes* menores al 2%.

2.7. Bacterias Sulfato Reductoras

Las Bacterias Sulfato Reductoras (BSR) son un grupo parafilético y fisiológico muy diverso que está distribuido en ambientes anaerobios. Se caracterizan por su capacidad de utilizar a los sulfatos como aceptores finales de electrones en la respiración anaerobia, reduciéndolo sin asimilarlo.

En las últimas décadas, los procesos metabólicos de las BSR han recibido considerable atención, ya que además de ser parte fundamental en el ciclo del azufre, las BSR están involucradas en la precipitación de metales pesados (Fortín et al., 2000), metilación del mercurio (King et al., 2000), reducción del uranio (Chang et al., 2001a), tratamiento de aguas residuales (García et al., 2001), producción y descomposición de hidrocarburos (Rabus et al., 1996; Annweiler et al., 2001; Kleikemper et al., 2002), descomposición de materia orgánica (Jorgensen, 1982) e infecciones en humanos (Zinkevich y Beech, 2000; Loubinoux et al., 2002). Estas características, las señalan como indicadores de contaminación y procesos de bioremediación/descontaminación en el medio ambiente (Maarel et al., 1996). De ello se deduce, que su detección y caracterización en ecosistemas naturales resulte muy importante (Figura 3).

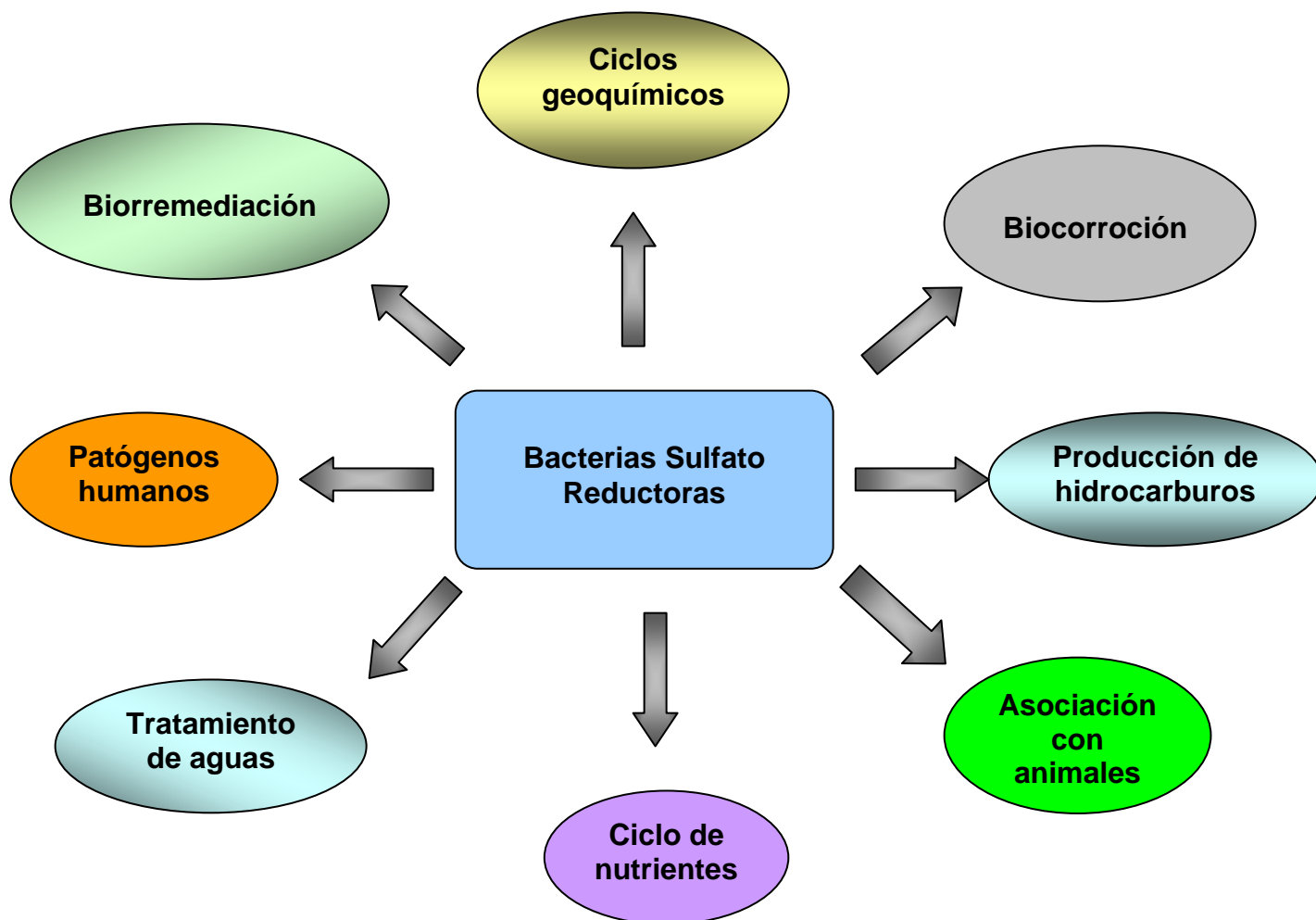


Figura 3. Principales vías de interacciones de las bacterias sulfato reductoras (Barton, 1995).

2.8. Metabolismo de las Bacterias Sulfato Reductoras

Las BSR tienen la capacidad de usar varios compuestos como donadores de electrones. Más aún, ciertas cepas se desarrollan en ausencia de sulfato y son capaces de utilizar una sola fuente de carbono como donador yceptor de electrones por un proceso llamado dismutación. Varias cepas de *Desulfovibrio* se desarrollan con la dismutación de piruvato, malato, glicerol y dihidroxiacetona (Krumholz et al., 1999) y otras crecen con sulfito o tiosulfato por un mecanismo donde el oxianion de azufre sirve como donador yceptor de electrones (Lie et al., 1999b).

Metabólicamente, las BSR están estrechamente unidas por su capacidad de reducir sulfatos a sulfuro de hidrogeno, siendo ésta la principal característica que define la inclusión de diversas bacterias y archeas dentro de este grupo (Koizumi et al., 2003). No obstante, el resto de su metabolismo es muy variado y hasta ahora poco estudiado y comprendido (Alvarez et al., 2000).

Las rutas metabólicas atribuidas a las BSR son muy diversas y van desde la utilización de dadores de electrones simples como el etanol, lactato e hidrogeno hasta compuestos más complejos como los hidrocarburos (Jorgensen, 1982; Rabos et al., 1996; Krekeler et al., 1998; Krumholz et al., 1999; Steger et al., 2004; Kaksonen et al., 2004).

Por otro lado, aunque se sabe de la imposibilidad de las BSR para utilizar carbohidratos, se han encontrado, cepas de *Desulfovibrio* capaces de utilizar poliglucosa y nitrocelulosa como fuente de carbono (Petrova et al., 2002).

Muchas cepas de BSR's fijan N_2 y usan a los aminoácidos como fuente de nitrógeno. Algunas cepas son capaces de crecer con nitrato como aceptor final de electrones. *Desulfovibrio desulfuricans* 27774, por ejemplo, utiliza nitrato. Otras cepas de *Desulfovibrio* reducen nitrato a amonio (Lie et al., 1999a). Muchas especies de BSR han mostrado ser capaces de reducir Fe^{+3} a magnetita (Fe_3O_4) o siderita ($FeCO_2$) y U^{+4} a uranito (UO_2), aunque las BSR no generan energía a partir de estos procesos (Lovley et al., 1992; Chang et al., 2001a).

Asimismo, muchas de las BSR son capaces de crecer con acetato como única fuente de energía; oxidando el acetato a CO_2 y reduciendo el sulfato a sulfuro (Krumholz et al., 1999). Se conoce dos mecanismos para la oxidación del acetato por BSR, un ciclo modificado de ácidos tricarboxílicos y la vía de la acetil-CoA. La mayor parte de las BSR oxidantes de acetato, no utilizan el ciclo modificado de ácidos tricarboxílicos, sino más bien la vía de la acetil-CoA para la oxidación del acetato (Krumholz et al., 1999).

Existen también BSR capaces de utilizar hidrogeno molecular (H_2), como *Desulfovibrio vulgaris* NCIB 8303. Sonne-Hasen y colaboradores en 1999, examinaron la cinética del sulfato e hidrogeno en las BSR termofílicas, encontrando cepas de BSR nuevas capaces de realizar este proceso metabólico (Sonne-Hansen et al., 1999). Steger y colaboradores, el 2002, descubrieron genes de *Desulfovibrio* sp. relacionados con la respiración de sulfato durante el metabolismo de hidrogeno y lactato (Steger et al., 2002).

Asimismo, las BSR están relacionadas con las bacterias sulfito reductasas, produciendo efectos en la inhibición de la sulfidogenesis, mostrando la habilidad del *Desulfitobacterium* spp en utilizar sulfonatos alifáticos como aceptores terminales de electrones para su desarrollo (Lie et al., 1999b). Harms y colaboradores en 1999 observaron la oxidación anaeróbica de o-xileno, m-xileno y homólogos alquilbencenos por BSR (Harms et al., 1999). So y Young en 1999

determinaron que las BSR tienen la capacidad de degradar alcanos anaerobicamente (So y Young, 1999).

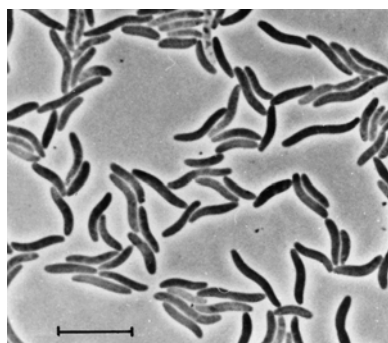
2.9. Clasificación de las Bacterias Sulfato Reductoras

La sistemática de las BSR, desde la descripción de *Spirillum desulfuricans* por Beijerinck en 1895, hasta el establecimiento del género *Desulfovibrio* por Kluver en 1936 y *Desulfotomaculum* por Campbell en 1965, es un reflejo de los problemas que los taxonomistas fueron confrontando en las primeras seis décadas del siglo pasado.

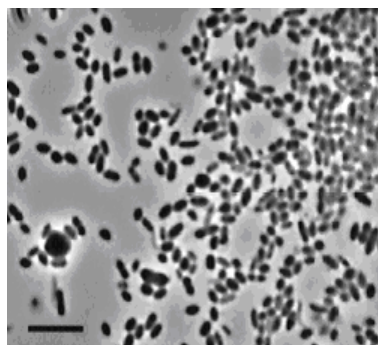
Como se ve en la figura 4, las características celulares de BSR son semejantes a otras bacterias, variando las características morfológicas de las células desde bastoncillos a cocos.

Existen tres grupos básicos celulares de BSR: Eubacterias Gram-negativas, Gram-positivas y Archeas. Las BSR suelen dividirse en BSR Gram-negativas mesofílicas, BSR Gram-positivas formadoras de esporas, BSR bacterias termofílicas y BSR arqueas termofílicas (Barton, 1995).

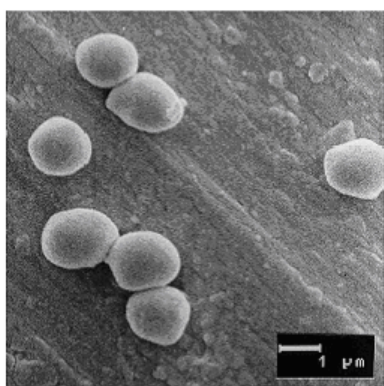
Los principales subgrupos de BSR son: subgrupo 1, *Desulfotomaculum* (DFM); subgrupo 2, *Desulfobulbus* (DBB); subgrupo 3, *Desulfobacterium* (DBM); subgrupo 4, *Desulfobacter* (DSB); subgrupo 5, *Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina* (DCC-DNM-DSS); y subgrupo 6, *Desulfovibrio-Desulfomicrobium* (DSV-DMB) (Daly et al., 2000; Castro et al., 2000).



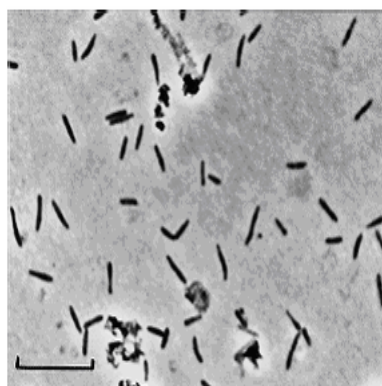
Desulfovibrio (10 μ m)
(Reichenbecher y Schink, 1997)



Desulfo bacter (10 μ m)
(Rabus et al., 1996)



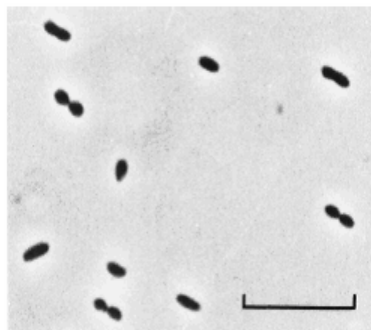
Desulfococcus (1 μ m)
(Drzyzga et al., 1996)



Desulfobulbus (10 μ m)
(Finster et al., 1998)



Desulfotomaculum (1 μ m)
(Newman et al., 1997)



Desulfobacterium (10 μ m)
(Van Der Maarel et al., 1996)

Figura 4. Formas celulares de las bacterias sulfato reductoras.

2.9.1. BSR Gram-negativas mesofílicas

La mayoría de las BSR son Gram-negativas, compuestas por dos líneas filogenéticas lejanamente relacionadas (Manz et al., 1998), la primera de termofílicas y la segunda de mesofílicas. En cada línea se ha encontrado gran diversidad filogenética (Daly et al., 2000). Las mesofílicas, de acuerdo a la comparación de secuencias de RNAr 16S, son representantes de la subdivisión delta de proteobacterias, dentro de la que se han identificado dos familias (Castro et al., 2000). La primera familia es *Desulfovibrionaceae* que incluye a los géneros *Desulfovibrio* y *Desulfomicrobium* (Figura 5), aunque otros dos géneros podrían ser incorporados dentro la misma (*Desulfohalobium* y *Desulfonatronum*). La segunda familia es *Desulfobacteriaceae*, compuesta por *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfonema*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfobulbus* (Figura 5).

2.9.1.1. Desulfovibrionaceae

El género *Desulfovibrio* es el más antiguo y el más diverso, sus células tienen formas más o menos curvadas y frecuentemente presentan motilidad (Reichenbecher y Schink, 1997). Una de las características más importantes es su capacidad para tolerar oxígeno y en algunos casos, incluso consumirlo (Zinkevich y Beech, 2000; Loubinoux et al., 2002). El género se encuentra desde ambientes salinos hasta sedimentos de agua dulce y es selectivamente aislado en medio que contienen H_2 y CO_2 , acetato, lactato o etanol, aunque también crecen con otros substratos orgánicos como el piruvato, malato, lactato y fumarato (Widdel y Bak, 1991; Voordouw, 1995; Luca et al., 2001; Steger et al., 2002).

El género *Desulfomicrobium* considerado también dentro de este grupo es muy similar a *Desulfovibrio*, en cuanto a sus características fisiológicas, tiene forma de bastoncillo y carece de desulfoviridina.

2.9.1.2. Desulfobacteriaceae

La familia *Desulfobacteriaceae* es un grupo que no está del todo definido, ya que se requieren más datos de secuencias y características fisiológicas de cada uno de los grupos que la componen. De hecho, muchos géneros con características diferentes se encuentran en la familia (Widdel y Bak, 1991).

La mayoría de las especies del género *Desulfobulbus*, son de forma ovalada, móvil o no móvil (Finster et al., 1998). El substrato característico de este grupo es el propionato, aunque utiliza otros donadores de electrones como lactato, etanol o H_2 . La oxidación del propionato a acetato es incompleta, lo que abre la posibilidad de una estrecha relación entre este género con otras BSR que utilizan el acetato. Crece en medios de agua dulce, semisalina y salina y se ha reportado que

Desulfobulbus propionicus (1pr3) realiza la metilación del mercurio en cultivos puros (Widdel y Bak, 1991; Benoit et al., 2001).

El género *Desulfobacter* comprende principalmente bacterias de forma ovalada (Rabus et al., 1996), con forma semejante a las de *Desulfovibrio* con y sin movilidad (la motilidad se pierde generalmente después del aislamiento). La característica más sobresaliente de este género es su capacidad para utilizar acetato de forma completa y más efectiva que el resto de las BSR mesofílicas. Aparentemente, este género no tiene la capacidad de desarrollarse en presencia de oxígeno y la mayor parte de sus especies han sido detectadas en ambientes salinos. Se ha identificado al género *Desulfobacter*, como uno de los principales metiladores de mercurio en medios que contienen lactato y acetato (Widdel y Bak, 1991; King et al., 2000).

El género *Desulfobacterium* es un grupo nutricionalmente versátil, con formas semejantes a bastoncillos de forma oval o casi esférica (Van Der Maarel et al., 1996), presenta capacidades especiales en cuanto a degradación de compuestos orgánicos, como la descomposición de hidrocarburos. Las especies de este género son fundamentalmente marinas y requieren elevadas concentraciones de cloruro de sodio. Al igual que *Desulfobacter*, *Desulfobacterium* es potencialmente importante para la metilación del mercurio y no tolera condiciones aerobias (Widdel y Bak, 1991; King et al., 2000).

Los géneros *Desulfococcus* y *Desulfosarcina* están filogenéticamente y nutricionalmente relacionados y presentan formas de bastoncillo a ovaladas. Son conocidos por su versatilidad nutricional (Drzyzga, et al., 1996). Algunas cepas han sido aisladas de medios contaminados por hidrocarburos. *Desulfococcus* ha sido aislado de sedimentos de aguas dulces y también se desarrolla en medios salinos; mientras que *Desulfosarcina* es primordialmente marino. *Desulfococcus* es uno de los géneros más importantes en cuanto a la metilación del mercurio, tercero después de *Desulfomicrobium* y *Desulfobacter* (Widdel y Bak, 1991; King et al., 2000).

Desulfococcus está definido por su característica filamentosa y por su lenta reducción de sulfato. Este género ha sido detectado en la quimioclina, entre el ambiente aerobio y anaerobio, por lo que podría tener la capacidad de tolerar el oxígeno (Widdel y Bak, 1991).

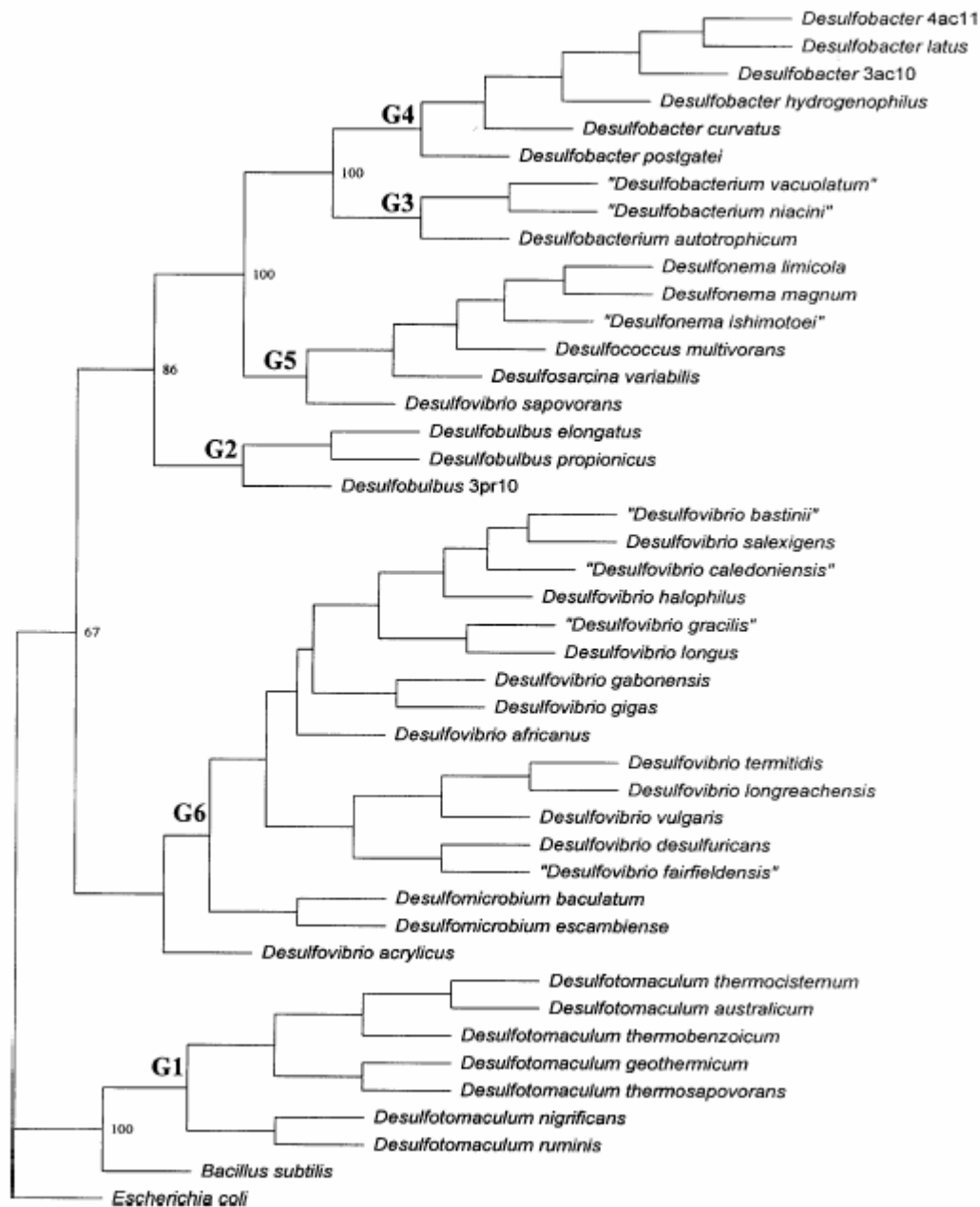


Figura 5. Árbol filogenético de DNAr 16S muestra los linajes de los seis subgrupos de bacterias sulfato reductoras. Los subgrupos de bacterias sulfato reductoras están marcados como G1-G6 (Daly et al., 2000).

2.9.2. BSR Gram-positivas formadoras de esporas

Este grupo está fundamentalmente constituido por el género *Desulfotomaculum* (Figura 5), el cual es aparentemente homogéneo morfológica y metabólicamente (Newman et al., 1997). *Desulfotomaculum* es capaz de utilizar anilina, etanol, nicotinato, fenol, acetato, acetona, esterato, succinato, catecol y indol (Widdel y Bak, 1991). Su capacidad para formar esporas le permite sobrevivir mejor que otras BSR a la desecación y oxidación del medio ambiente y subsistir en una gran variedad de medios. Se han encontrado abundantes miembros de este género en suelos de cultivos de arroz. De hecho, la mayoría de los miembros de este género han sido aislados de ambientes de sedimentos de agua dulce (Stubner y Meuser, 2000; Smit et al., 2001).

2.9 Relación ecológica de las bacterias sulfato reductoras

Los microorganismos juegan un rol en las vías de asimilación-desasimilación y procesos de oxidación-reducción del ciclo del azufre. La reducción desasimilatoria de compuestos de azufre es un paso esencial en la biología del ciclo del azufre y se debe mayormente a la fosforilación del sulfato a sulfuro (Heidelberg et al., 2004). En este contexto, las BSR producen una gran cantidad de sulfuro y la oxidación les permite la generación de energía por fototrópismo y quimiolitotrópismo.

Las relaciones ecológicas de las BSR han sido poco estudiadas y seguramente aún se desconocen la función de la mayor parte de ellas. Quizá los aspectos más estudiados de este grupo son su importancia ecológica dentro del ciclo del azufre y dentro del ciclo de los metales pesados. Un resumen de los procesos que se atribuyen a las BSR se presenta en la figura 3.

Entre las interacciones más importantes de las BSR, en lo referente al presente estudio, está la relación simbiótica con las bacterias metanógenas, que favorecería la metilación del mercurio. *Desulfovibrio desulfuricans* LS y ND-132 oxidan lactato de forma incompleta produciendo CO₂, acetato y reduciendo equivalentemente al SO₄⁻² (Jay et al., 2002). Por su parte, las bacterias metanogénicas remueven H₂ y acetato, permitiendo que *Desulfovibrio desulfuricans* utilice lactato incluso en ausencia de sulfatos (Pak y Bartha, 1998). No obstante, en otros casos, las BSR compiten con las metanógenas, por la fermentación de productos como acetato e hidrógeno con concentraciones de sulfato pequeñas; y las BSR superan a las bacterias metanógenas (Santegoeds et al., 1999; Hoeler et al., 2001; Orphan et al., 2001).

La diversidad de ambientes donde las BSR son detectadas se hace cada vez más grande y las limitantes para el desarrollo de los miembros de este grupo parecen haber sido sobreestimadas (Hoeler et al., 2001). No obstante, algunas limitantes importantes podrían ser el potencial redóx, el oxígeno gaseoso, la temperatura y el pH (Stefanie et al., 1998). Estos factores limitan la disponibilidad de sulfato. A pH

bajo, el ácido acético es un fuerte inhibidor, pero a pH ácido el sulfuro de hidrógeno se mantiene como un inhibidor de consideración.

2.10. Efecto de pH, temperatura y oxígeno en el desarrollo de las bacterias sulfato reductoras

Las BSR crecen mejor bajo condiciones ligeramente alcalinas en un rango de pH de 7.0-7.8 con tolerancia en un rango de pH de 5.5-9.0 (Barton, 1995). La alcalinización y acidificación de las aguas en plantas industriales fue utilizada como método de inhibición de BSR. Sin embargo, la reducción del sulfato fue observada en ambientes altamente ácidos (pH valores alrededor de 2.5 a 4.5) en drenajes de minas ácidas y turberas de aguas ácidas (Fortín et al., 1996; Garcia et al., 2001). Especies como *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum* fueron aisladas en aguas de minas ácidas con valores de pH por debajo de 5.5 (Knoblauch et al., 1999; Fortín et al., 2000).

Por otro lado, la dependencia de la temperatura para la reducción de sulfato en sedimentos es variable (MacGregor et al., 2001). En un estudio realizado en el ártico, se aislaron BSR psicrófilas en muestras de sedimentos (Mai y Barker, 1996; Knoblauch et al., 1999). Mientras que Teske en 1998, determinó que las BSR mesófilas crecen mucho mejor entre los 28 y 38 °C (Teske et al., 1998), las termófilas aisladas de ambientes geotermales tienen una temperatura óptima de crecimiento que está entre 54 a 70°C (Isaksen y Jorgensen, 1996; Sonne-Hansen et al., 1999; Larsen et al., 2001).

En general, las BSR han sido consideradas, en primera instancia, como anaerobias estrictas. No obstante, hay pruebas suficientes para afirmar que al menos gran parte de ellas serían anaerobias tolerantes. A diferencia de otras bacterias anaerobias obligadas, las BSR son capaces de desarrollarse en un limitado metabolismo del oxígeno. Barton y Tomei en 1995, sugieren que la tolerancia podría deberse a la presencia de catalasas y superoxidasas. Ambas enzimas fueron encontradas en *D. vulgaris* por Hatchikian en 1977 (Barton y Tomei, 1995; Sass et al., 2002).

La resistencia al oxígeno también podría deberse a que las BSR crean un ambiente anaerobio a su alrededor gracias a la producción de sulfuro de hidrógeno que atrapa a las moléculas de oxígeno. *Desulfovibrio vulgaris* reduce el oxígeno a agua y la mayor parte de esta reducción se produce en el periplasma. La reducción del oxígeno ocurre con mayor eficiencia que la del sulfato e incluso que en muchas respiraciones aeróbicas por lo que su papel defensivo resulta evidente (Okabe et al., 1999; Bade et al., 2000; Sigalevich y Cohen, 2000; Ito et al., 2002b).

Krekeler et al. (1998) han observado la capacidad de las BSR en asociación a cianobacterias de desarrollarse en presencia de oxígeno tanto en condiciones oxicas en el día, como en condiciones anoxicas por la noche, usando diferentes

sustratos como hidrogeno, lactato y etanol, mostrando también que el sulfato no es metabolizado con el oxígeno.

En ecosistemas aerobios, bacterias heterotróficas producen una completa mineralización de la materia orgánica a CO₂. La degradación anaeróbica de la materia orgánica es más compleja, requiriendo la intervención de diferentes grupos de microorganismos (Maarel et al., 1996). Cada grupo microbiano funciona en la cadena alimentaria donde el metabolismo y producto final de un grupo es sustrato de otro, existiendo cuatro diferentes grupos tróficos de bacterias involucrados en la descomposición activa de la materia orgánica.

2.11. Actividad sulfato reductora

En el mundo microbiano, las BSR son las únicas que tienen la habilidad de utilizar el sulfato inorgánico como un aceptor terminal de electrones. Este proceso de respiración, ocurre bajo condiciones anaerobias, y genera compuestos de alta energía para reacciones biosintéticas implicadas en el desarrollo y mantenimiento de estas bacterias. Las reacciones de reducción del sulfato inorgánico a sulfuro orgánico o inorgánico y la subsiguiente oxidación de sulfuro a sulfato, son conocidas dentro el ciclo biológico del azufre. Este ciclo consiste de una parte asimilatoria y una parte desasimilatoria (Heidelberg et al., 2004). Muchos de nuestros conocimientos del proceso de reducción de sulfato vienen de estudios realizados en especies de los géneros de *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfococcus*, *Desulfobacterium*, *Desulfobacter* y *Desulfobulbus*.

El metabolismo de asimilación y desasimilación difiere marcadamente. En el metabolismo asimilativo, solamente se reduce el compuesto SO₄⁻², para satisfacer las necesidades para el desarrollo. Los átomos reducidos terminan dentro del material celular en forma de macromoléculas (cisteina, cistina, y metionina). En el metabolismo de desasimilación, estos compuestos son utilizados como aceptores de electrones produciendo energía y el producto reducido (H₂S), se elimina al ambiente.

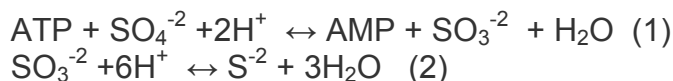
Un mecanismo común de disminución de la toxicidad del sulfuro en el ambiente es su combinación con hierro, que origina la formación del sulfuro ferroso (FeS) el cual es un compuesto insoluble. El color negro de muchos ambientes naturales donde se efectúa la reducción de sulfatos se debe a la acumulación de FeS. La presencia de BSR con alta actividad metabólica es revelada por este color y por el olor característico del H₂S.

La reducción del sulfato es un proceso de degradación terminal en ambientes anaeróbicos. En ambientes con agua dulce, la concentración de sulfatos es usualmente baja, en rangos de alrededor de 10 a 200 nmoles por litro (Li et al., 1999). En agua de mar, la concentración de sulfato tiene un promedio de 28 nmoles por litro.

2.11.1. Activación del sulfato y reducción a bisulfito

2.11.1.1. Formación adenilsulfato

La reducción de SO_4^{-2} a sulfuro de hidrógeno, se produce por la reducción de 8 electrones, que se originan bioquímicamente a través de varias etapas intermedias. El ión sulfato es bastante estable y no es utilizado sin antes ser activado. Su activación se da por medio de una molécula de ATP. La enzima que interviene en este paso es la ATP sulfurilasa que cataliza la fijación del ión sulfato a un fosfato del ATP, llevando a la formación de adenosina fosfosulfato (APS). En la reducción desasimilativa del sulfato, el ión sulfato de APS se reduce directamente a sulfito (SO_3^{-2}), siendo éste el primer producto de la reducción del sulfato (Ecuación 1). Una vez que se forma el sulfito (SO_3^{-2}), la reducción subsiguiente se efectúa más fácilmente, siendo el sulfuro (S^{-2}) el segundo producto de reducción del sulfato (Ecuación 2).

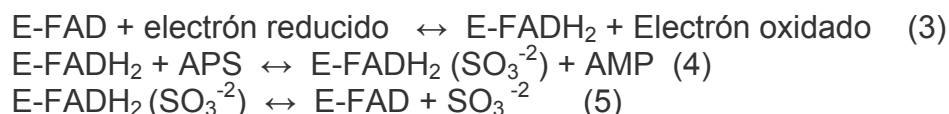


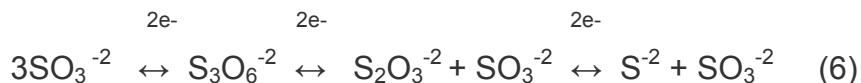
Las Bacterias Sulfato Reductoras llevan a cabo el proceso de transporte de electrones a través de los citocromos. El citocromo de las BSR es de un único tipo llamado citocromo C_3 . Este citocromo, no se encuentra en organismos que utilizan otros aceptores de electrones. Otros portadores de electrones en esta cadena transportadora incluyen ferredoxina y flavodoxina. En este transporte de electrones, el hidrógeno proveniente directamente del ambiente o por medio de electrones donados de compuestos orgánicos, está en estrecha asociación con el citocromo C_3 .

Debido al acomodamiento espacial de los componentes del transporte de electrones en la membrana, cuando los átomos del H_2 se oxidan, los protones (H^+) permanecen fuera de la membrana, en tanto los electrones son transferidos a través de la membrana. De esta forma, se establece una fuerza motriz protónica la cual se utiliza para la síntesis de ATP. En el citoplasma los electrones se utilizan en la reducción del APS (Heidelberg et al., 2004).

2.11.1.2. Reducción del adenilsulfato a AMP y Bisulfito

La reducción de APS a AMP y bisulfito es catalizada por la enzima APS reductasa. Esta enzima tiene un flavín-adenin-dinucleótido (FAD). El mecanismo de reducción de APS ocurre por la formación de un sulfito unido al FAD en la posición 5-N de isoaloxacina (Ecuación 3, 4 y 5).

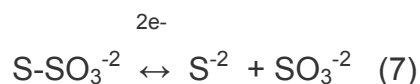




El bisulfito es reducido al producto final H₂S por el sistema sulfito reductasa. Sin embargo, dos posibles vías son propuestas. La primera propone que existe una reducción directa de los seis electrones de sulfito a H₂S y la segunda propone la formación de dos intermediarios: el tritionato (S₃O₆⁻²) y tiosulfato (S₂O₃⁻²) (Ecuación 6). La detección del tritionato y el tiosulfato fue realizada por Kobayashi en 1969 en *V. vulgaris* encontrando dos fracciones, una que reduce el sulfito a tritionato y tiosulfato y la segunda que reduce estos compuestos a sulfuro de hidrogeno. La enzima que interviene en este mecanismo es la bisulfito reductasa (BR) (Barton, 1995; Heidelberg, 2004).

2.11.1.3. Reducción del tiosulfato

En la reducción del tiosulfato a sulfuro esta involucrada la tiosulfato reductasa. Esta enzima fue purificada de *Desulfovibrio vulgaris* 8303, *Desulfovibrio vulgaris* miyazaki, *Desulfovibrio gigas*, *Desulfotomaculum nigrificans*. La tiosulfato reductasa del *Desulfotomaculum nigrificans* contiene FAD como coenzima. Esta enzima reduce el tiosulfato a sulfuro y sulfito y en todos los casos utiliza metilviologen como un donador de electrones (Ecuación 7). Los compuestos que inhiben esta enzima contiene el grupo sulfidrilo, por otra parte los iones férricos estimulan a la actividad de esta enzima en *Desulfovibrio gigas* (Barton, 1995; Heidelberg, 2004).



2.11.1.4. Sulfuro de hidrogeno

El principal gas volátil del azufre es el ácido sulfhídrico. Esta sustancia se forma fundamentalmente por la reducción bacteriana de sulfato. La forma en que el sulfuro esta presente en un ambiente depende del pH, debido al siguiente equilibrio: A pH básico, la forma dominante es el sulfuro (S⁻²), a pH neutro predomina el sulfidrilo (HS⁻) y a pH ácido, la especie más abundante es el sulfuro de hidrogeno (H₂S). Tanto el sulfidrilo (HS⁻) como el sulfuro (S⁻²) son muy hidrosolubles, pero el H₂S no lo es, aunque se volatiliza fácilmente. Como el HS⁻ es una sustancia toxica para muchos organismos, la formación de HS⁻ por reducción de sulfatos es potencialmente perjudicial.

2.12. Detección de microorganismos por métodos moleculares

El avance de técnicas moleculares ha brindado nuevas y mejores alternativas para la detección e identificación de microorganismos de muestras ambientales (Kuske et al., 1997; Hurt et al., 2001; Joulain et al., 2001). A partir de ello, se ha generado gran interés en descubrir la diversidad microbiana de ambientes poco explorados y reevaluarla en otros más conocidos. El interés en este tema está basado en la importancia evolutiva, ecológica y económica de los microorganismos que gracias a las nuevas técnicas moleculares empieza a ser analizada. Observaciones de muchos trabajos, muestran que la mayoría de las bacterias de los ambientes naturales no han podido ser cultivadas mediante las técnicas tradicionales y consiguientemente existiría todo un universo microbiano por descubrir y comprender (Borneman y Triplett 1997; Rooney-Varga et al., 1997).

La aplicación de métodos moleculares para determinar la distribución de las bacterias en el ambiente tiene la ventaja de proporcionar información directa sobre la estructura de la comunidad. La identificación errónea mediante estos métodos es usualmente causada por falta de secuencias de parientes cercanos en la base de datos y es mucho menor que la ocasionada por métodos tradicionales de identificación. Según Martín-Laurent (2001), los métodos moleculares permiten diferenciar los suelos de acuerdo a sus comunidades bacterianas y el monitoreo de diferencias en la comunidad microbiana en respuesta al estrés (Martín-Laurent et al., 2001). De acuerdo a los mismos autores, el uso de métodos estándar de extracción de DNA y PCR podría proporcionar un mayor y más completo entendimiento de la composición y diversidad de las comunidades microbianas distribuidas en el medio ambiente.

Adicionalmente, los estudios moleculares, especialmente aquellos basados en métodos filogenéticos, ofrecen la posibilidad de investigar las dinámicas de poblaciones bacterianas de grupos filogenéticos específicos, que frecuentemente comparten características fisiológicas comunes (Ito et al., 2002; Cho y Tiedje, 2002).

2.13. Identificación de las bacterias sulfato reductoras por técnicas moleculares

La identificación de las BSR sobre la base de sondas y cebadores de DNA o RNA han sido usada en diferentes trabajos, ya sea mediante la amplificación del gen que codifica la enzima sulfito reductasa desasimilatoria (*dsr AB*) o el gen DNAr 16S (Steuber et al., 1995; Wagner et al., 1998; Minz et al., 1999; Larsen et al., 2001).

2.13.1. La sulfito reductasa disimilatoria

La sulfito reductasa disimilatoria (DSR) muestra una estructura terciaria compuesta de dos subunidades proteicas llamadas *dsrA* y *dsrB*, organizadas en dos grupos, formando un tetrámero con un “siroheme” en el dominio *dsrA* y dos grupos prostéticos Fe-S en ambos dominios (Steuber et al., 1995).

Larsen y colaboradores (2001) observaron que el grupo de genes en *Thermodesulforhabdus norvegica* se ordenan en seis marcos de lectura abierta (ORC's): *dsrD-dsrA-dsrB-dsrN-dsrC-fox*. La mayor parte de la proteína ensamblada corresponde a las subunidades *dsrA* y *dsrB*, con pesos de 49kD y 43kD respectivamente, mientras que las subunidades *dsrD*, *dsrC* y *dsrN* son mucho más livianas (aproximadamente entre 13kD) y intervienen en la reducción de sulfito a sulfuro (Larsen et al., 2001).

Se estima que el origen de la enzima DSR data de hace aproximadamente 2800 millones de años y que la divergencia entre dominios ocurrió aproximadamente hace 3100 millones de años. La función metabólica de la DSR en el ciclo global de azufre es muy importante y se conoce la secuencia completa de las subunidades A y B de al menos un género de cada división microbiana donde esta presente la reducción del sulfato (Minz et al., 1999), por lo que fue posible realizar análisis comparativos del ordenamiento filogenético de las BSR, basados en secuencias de RNAr 16S y de la DSR (Joulian et al., 2001). Muchos trabajos muestran que existen suficientes evidencias en el análisis filogenético comparativo de la DSR y el RNAr 16S para suponer que la habilidad de reducir sulfato fue transmitida mediante un proceso de transferencia horizontal antes o durante la divergencia de los dominios Arquea y Bacteria y posteriormente entre grupos bacterianos gram positivos y BSR termofilicas (Wagner et al., 1995; Cottrell y Cary, 1999; Pérez-Jiménez et al., 2001).

2.13.2. El RNAr 16S como un marcador evolutivo

Algunas macromoléculas celulares sirven como marcadores evolutivos. La distancia evolutiva entre dos especies se mide por diferencias en la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos de macromoléculas homologas que se encuentran en ellas. Las diferencias en la secuencia de una molécula en particular es proporcional al número de mutaciones estables fijadas en el DNA de los organismos que divergieron a partir de un ancestro común.

Sin embargo, para determinar interrelaciones evolutivas verdaderas es indispensable seleccionar la molécula correcta para estudios de composición. Esto es importante por diferentes razones. Primero, la molécula debe ser universalmente distribuida entre el grupo seleccionado para el estudio. Segundo, debe ser funcionalmente homóloga en cada organismo, ya que no se comparan las secuencias de aminoácidos o las de nucleótidos de ácidos nucleicos de función diferente, Tercero, debe tener la capacidad de alinear apropiadamente las

dos moléculas a fin de identificar regiones de homología y heterogeneidad finalmente, la secuencia de la molécula escogida debe cambiar a una velocidad conmensurada con la distancia evolutiva a la que se mide. Cuanto más amplia sea la distancia filogenética, más lenta debe ser la velocidad a la cual cambie la secuencia.

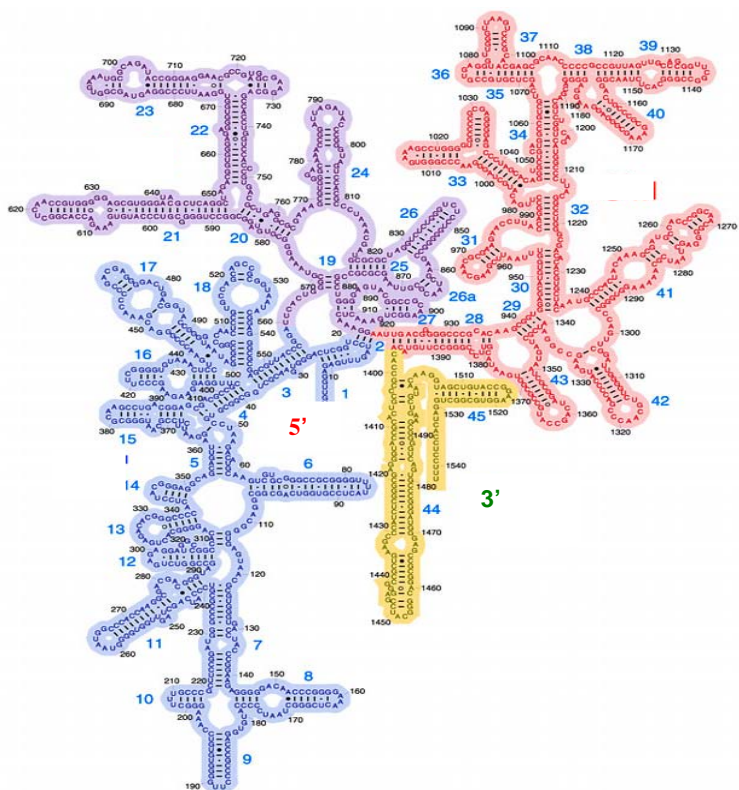
Debido a la antigüedad del proceso de la síntesis de proteínas, los RNA ribosómicos son excelentes moléculas para distinguir las interacciones evolutivas entre las bacterias. Los RNA ribosómicos (RNAr) son moléculas antiguas, funcionalmente constantes, distribuidas en forma universal y moderadamente bien conservadas a través de amplias distancias filogenéticas (Weisburg et al., 1991; Head et al., 1998). Son también fácilmente purificadas a partir de los organismos, aún sin el uso de procedimientos de clonación (Weinbauer, 2002). Existen tres moléculas de RNAr en los procariotas, 5S, 16S y 23S. Los RNA de mayor tamaño 16S y 23S (aproximadamente 1500 y 3000 nucleótidos respectivamente) contienen varias secuencias que están muy bien conservadas, así como regiones variables, las cuales sirven como excelentes marcadores filogenéticos.

El RNA ribosomal (RNAr) está presente en los tres dominios filogénicos y de ahí que se mencione que es universal. Debido a que el RNAr 16S está en todas en todas las bacterias y archeas (Voordouw et al., 1996; Koizumi et al., 2003), esta secuencia ha sido estudiada como marcador molecular (Figura 6) (Devereux et al., 1990; Macrae, 2000) en estudios filogenéticos de procariotes y hoy en día el RNAr 16S es ampliamente utilizado para establecer relaciones filogenéticas. La secuencia del gen de RNAr 16S es muy conservada, pero lo suficientemente grande y variable como para que las diferencias entre secuencias permitan construir la filogenia de los organismos (Ravenschlag et al., 2001; Loy et al., 2002).

Generalmente, los trabajos con RNAr 16S apoyan trabajos previos basados en el cultivo de organismos, a partir de los cuales se crean bases de datos con las que se establecen las relaciones filogenéticas. De hecho, el análisis basado en RNAr es posible gracias a una creciente base de datos Ribosomal Database Project (RPD) y otras como la Oligonucleotide Probe Database (OPD) (Loy et al., 2002). Hoy en día, se cuenta con un gran número de secuencias disponibles, que además están respaldadas por bacterias cultivadas que están bien caracterizadas.

Sin embargo, después de más de una década de su aplicación han surgido críticas en su utilización. Aún así, la secuencia del RNAr 16S sigue siendo una de las más utilizadas para la identificación y caracterización filogenética de los microorganismos. Es así, que estudios basados en esta molécula o su gen permitieron detectar un gran número de microorganismos no cultivados. Más aún, incluso sirvió para establecer su papel ecológico (Rooney-Varga et al., 1997; Küsel et al., 1999).

A



B

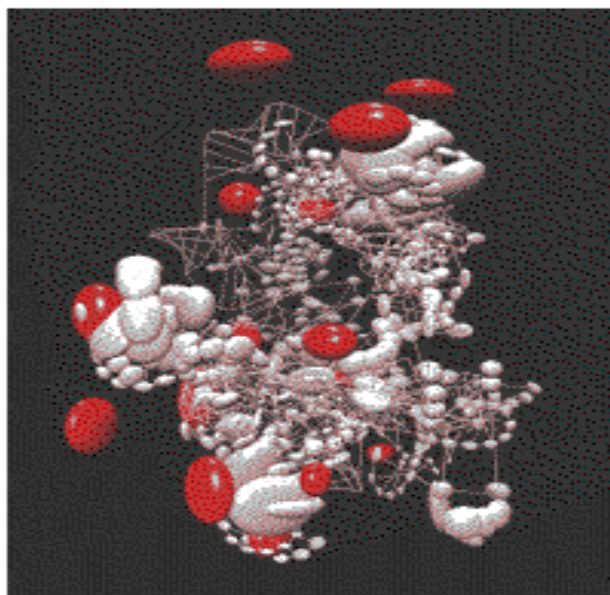


Figura 6. A) Mapa de la estructura secundaria del 16S RNAr. B) Modelo de la imagen tridimensional del 16S RNAr en bacterias.

La clasificación natural de las SRB basada principalmente en la secuenciación comparativa del RNAr 16S ha sido establecida, y ha servido de fundamento para varios estudios (Edgcomb et al., 1999). Muchas de las características más interesantes de las SRB han sido descubiertas a través de estudios filogenéticos, como la reducción de sulfato, metilación del mercurio y uranio o el papel patógeno de las BSR (Devereux et al., 1996; King et al., 2000; Zinkevich y Beech, 2000; Chang et al., 2001a), descubriéndose también la estructura comunitaria y la actividad de las BSR en diferentes ambientes (Daly et al., 2000; Ravenschlag et al., 2000).

Actualmente, las BSR son estudiadas dentro de la ecología microbiana y la biotecnología industrial (Santegoeds et al., 1999; Scheid et al., 2001). No obstante, el desarrollo de estos dos campos se ve restringido por la falta de un sistema de identificación confiable. La identificación de bacterias aisladas de muestras naturales por métodos convencionales de comparación fenotípica por lo general es complicada.

La utilización de las técnicas moleculares en microbiología ambiental es relativamente reciente (Leff et al., 1995; Macrae, 2000; Tonolla et al., 2000; Cho y Tiedje, 2002). Un estudio en suelos de la Amazonía, encontró que todas las secuencias de RNAr 16S encontradas eran nuevas y un 19% de ellas están distantes de las secuencias conocidas, las cuales que podrían formar parte nuevos reinos (Borneman y Triplett, 1997). Tales observaciones permiten suponer la existencia de un alto grado de diversidad microbiana aún por descubrir, en particular en regiones como la Amazonía Boliviana, donde hasta el momento no se han realizado estudios.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

- Caracterizar las lagunas de la cuenca del Río Beni (región de Rurrenabaque) en cuanto a distribución de los subgrupos de Bacterias Sulfato Reductoras, producción de metilmercurio, distribución de mercurio, metilmercurio y materia orgánica en perfiles sedimentarios.

3.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar la diversidad de los subgrupos de Bacterias Sulfato Reductoras a lo largo del perfil sedimentario de las lagunas estudiadas en base a métodos moleculares.
- Determinar la variación estacional y espacial de los subgrupos de Bacterias Sulfato Reductoras a lo largo de los estratos sedimentarios.
- Caracterizar los perfiles sedimentarios en función a los factores fisicoquímicos (pH, Eh, densidad).
- Determinar la producción de metilmercurio en la parte central de las lagunas de la zona de estudio.
- Determinar la distribución de mercurio, metilmercurio y calidad de materia orgánica en las lagunas de estudio.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Área de estudio

Para el estudio se han considerado 7 lagunas; 5 lagunas de origen meándrico (lagunas Oxbow en forma de fríjol) y dos lagunas de tierra firme de origen probablemente tectónico, las cuales fueron seleccionadas por sus características geofísicas, ecológicas y químicas (Figura 7).

Las lagunas meandricas (Pinky, Salina, La Granja, Río Viejo y Chutiwara) tienen edades diferentes. La laguna más “joven” tiene 6 años y la más vieja mucho más de 40 años. La interpretación de los datos satelitales han permitido establecer la secuencia de edad de las 5 lagunas: Pinky<Salina<LaGranja<Río Viejo<Chutiwara. En los meándros antiguos (Río Viejo y Chutiwara) se observa una secuencia temporal de la evolución ecológica con un incremento de la diversidad y densidad de las macrofitas.

Las lagunas más jóvenes (Pinky y Salina) tienen todavía una conexión con el río Beni durante la época de aguas altas. Estas lagunas presentan aguas blancas. Las lagunas más antiguas como La Granja y Río Viejo, reciben las aguas del río solo cuando hay crecidas fuertes que inundan la llanura. La laguna Chutiwara, presenta aguas negras y esta poco influenciada por el río. Las aguas negras provienen del drenaje de la llanura, mientras que las aguas blancas provienen del drenaje de los Andes.

Las dos lagunas de tierra firme (San Juan y Moa) son totalmente diferentes. La laguna San Juan, es una pequeña laguna del interior de la llanura, localizada dentro de la sabana. Tiene aguas negras y no esta influenciada por las aguas blancas del río, sus aguas provienen exclusivamente de la llanura. La laguna Moa, presenta aguas blancas y no tiene contacto con el río. Su drenaje proviene de pequeños tributarios de la cordillera.

Las lagunas mencionadas estan localizadas a 50 Km. de la población de Rurrenabaque de la provincia Ballivián del Departamento del Beni, al noroeste de la población de Reyes, al oeste límite de la provincia Ballivián y hacia el sur de la zona de transición cordillerana de las praderas benianas. Las lagunas se encuentran entre los 14°18'-14°0.7'S y 67°34'-67°26'W sobre 200 msnm.

Tabla 1. Características del sistema de las lagunas estudiadas en la región de Rurrenabaque

Lagunas	Edad	Tipo de aguas	SO ₄ ⁻² mg/L	SPM ^d mg/L	DOC ^e mg/L	Color de sedimento
Meandros						
Pinky ^b	6 años	blancas	3.1-24.9	130	1.8-5.3	café
Salinas ^{ab}	12 años	blancas	2.9-26.7	40-80	2.3-8.0	café
La Granja ^{ab}	> 40 años	blancas	2.5-26.6	35-50	3.8-25.7	café
Río Viejo ^{ab}	>> 40 años	blancas	1.8-11.7	6-10	5.6-11.1	pardo
Chitiwara ^b	>> 40 años	negras	0.04-0.07	8	2.2-11.0	gris
Tierra firme						
San Juan ^{ab}	ND ^c	negras	0.00-0.06	2-5	3.4-16.3	negro
Moa ^b	ND ^c	blancas	1.2-10.9	15-25	2.3-10.1	café

^a Época húmeda, Marzo

^b Época seca, Septiembre

^c No Determinado, ND

^d Partículas en suspensión, SPM

^e Concentración de carbono, DOC

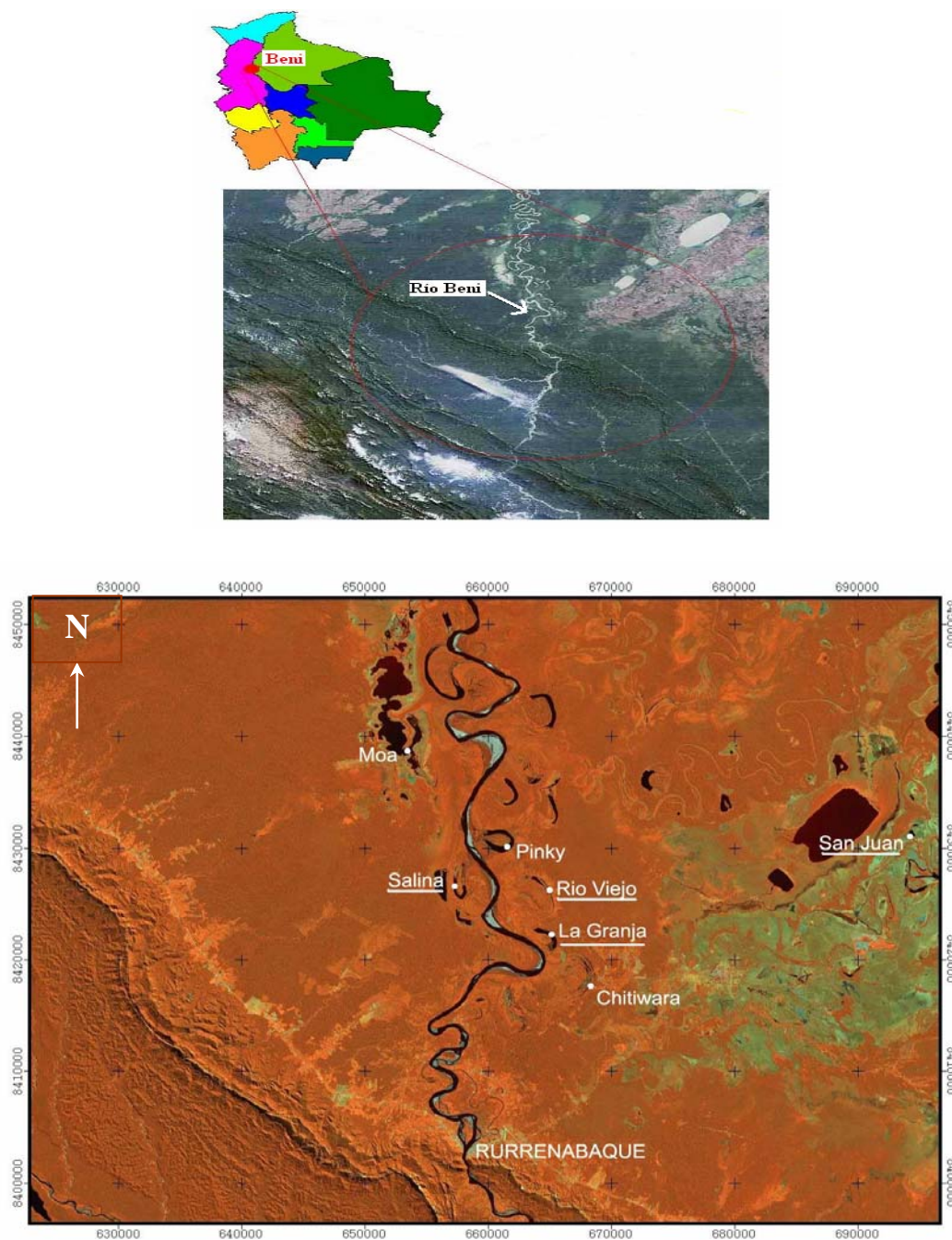


Figura 7. Mapa de la región de estudio y puntos de muestreo de las lagunas de inundación con relación a la población de Rurrenabaque y al río Beni.



Figura 8. Centro y zona litoral de las lagunas Pinky, La Granja y Río Viejo.

Estas lagunas presentan diferentes grados de eutrofización por la colonización de macrófitas situadas en sus contornos.

En las lagunas Salina y Pinky se observa poca presencia de macrófitas en sus alrededores. La laguna Río Viejo presenta mayor cantidad de macrófitas en su superficie (Figura 8), seguida de las lagunas Chitiwara y La Granja.

Las lagunas San Juan y Moa presentaron una distribución diferente de las macrófitas, ocupando una gran extensión en los bordes.

4.2. Colecta de las muestras

Las muestras se obtuvieron de los sedimentos de la parte central de las lagunas en la zona de muestreo para el análisis geoquímico y microbiológico. La colecta de los sedimentos se realizó en dos diferentes épocas del año 2003. En el mes Marzo (época húmeda); los sitios de muestreo se colectaron de cuatro lagunas: Salina, La Granja, Río Viejo y San Juan y en el mes de Septiembre (época seca) se muestrearon siete lagunas: Pinky, Salina, La Granja, Río Viejo, Chitiwara, Moa y San Juan (Figura 7).

Cada punto de muestreo fue tomado manualmente con un saca testigo equipado de (WaterMark) tubos de policarbonato de 7.5 cm. de diámetro por 30 cm. de alto a lo largo de 10 cm. de profundidad. Los estratos de los sedimentos fueron separados cada medio centímetro.

4.3. Medición de pH y potencial redóx

Los perfiles de potencial redóx (Eh) y pH fueron determinados en el mismo lugar de muestreo en un gradiente vertical a intervalos de 0.5 cm. hasta una profundidad de 10 cm. Inicialmente se realizó las mediciones del perfil de Eh de cada cilindro mediante microsondas de platino con una referencia de (Ag/AgCl₂) y un Eh-metro “Consort ®” calibrado con una solución patrón de +220 mV.

Luego los cilindros fueron colocados en una cámara portátil y fueron cortados manualmente. Cada submuestra de 0.5 cm. de espesor fue colectada en tubos de plástico estériles y posteriormente se realizó la medición de pH con un pH-metro “Consort ®” calibrado con soluciones estándar (pH 4 y pH 7). Las submuestras fueron saturadas con nitrógeno y fueron inmediatamente refrigeradas a -15 °C hasta su posterior análisis en el laboratorio.

4.4. Medición de mercurio total y metilmercurio

El análisis del mercurio total (Hg_t) en las muestras de la época húmeda se realizó a partir de un peso seco de 0.1-0.2 g de sedimento, el cual fue digerido con una mezcla de ácido nítrico concentrado y ácido clorhídrico 6 N. El análisis de Hg total fue realizado por espectrofotómetro fluorescente de vapor atómico (CVAFS) usando una modificación del método de Bloom y Fitzgerald (1988) (Roulet et al., 1998).

La medición de metilmercurio en los sedimentos se realizó a partir de 500 mg de sedimentos, los cuales fueron mezclados con una solución de CuSO₄ al 25% en HCl 6 N. La solución ácida de MeHgCl fue removida con tres lavados de 2 mL de tolueno. Los extractos fueron evaporizados a un volumen final de 0.1 a 0.5 mL y 50 µL y los extractos concentrados fueron inyectados en una columna de cromatografía con una mezcla de la fase ácida lipídica libre (FFAP) al 10% (peso/peso) en una malla de 80-100 Supelco Chromosorb W-AW.

El Metilmercurio fue eluido a 140 °C y transportado con gas Argón (60ml min⁻¹) en la columna de cromatografía. Posteriormente, el Metilmercurio fue descompuesto en Hg⁰ y colocado en un tubo de cuarzo a 500 °C y detectado finalmente en un espectrofotómetro atómico fluorescente. Este método fue desarrollado por Gage (1961). Este método tiene una eficiencia de reconocer al MeHg en un 95.5% (Roulet et al., 2000).

Las mediciones se realizaron en el laboratorio Chaire de Recherche en Environnement HQ/CRSNG/UQAM en Montréal, Canada.

4.5. Analisis de Me²⁰³Hg

La Interfase “agua-sedimento” al fondo de cada laguna esta constituido de un sedimento fino en suspensión entre el sedimento y la columna de agua. Este material fue recuperado con una jeringa de la superficie de los testigos colectados y fue incubada, bajo condiciones anaerobias, con cloruro de mercurio radiactivamente marcado (²⁰³HgCl₂). La incubación fue interrumpida con la adición de HCl (4 mol/L, 1 ml) y posterior adición de NaBr (3 mol/L, 4 ml) en 11% de H₂SO₄ y CuSO₄ (0.5 mol/L, 1 ml). Luego, la suspensión fue mezclada y centrifugada 8000 rpm por 1 min. La solución se conservó a -18 °C para la posterior extracción del Me²⁰³Hg en el laboratorio de trazadores, Instituto de Biofísica (Universidad Federal de Río de Janeiro) por el Dr. J. Guimarães. Los resultados son expresados como el porcentaje total del ²⁰³Hg que fue convertido en Me²⁰³Hg.

4.6. Medición del carbono y nitrógeno organico

Se realizo la acidificación de las muestras de sedimentos con ácido clorhídrico (HCl) 2 N, para el análisis del carbono organico (C) y el nitrógeno organico (N) usando el detector elemental de Carlo-Erba (Roulet et al., 2000).

4.7. Extracción de DNA de sedimentos

500 mg de sedimento fueron mezclados con 810 uL de buffer de lisis (100mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM Na₂EDTA (pH 8.0), 100 mM de fosfato de sodio (pH 8.0), 1,5 M de NaCl y 1% de bromuro de hexadecil-trimetil aminio (CTAB) y 6 uL de proteinaza K (10 mg/ml) en tubos de 1,5 mL. La mezcla fue agitada horizontalmente a 225 rpm por 30 min., agregandose luego 180 uL de SDS al 10% con posterior incubación a 65 °C por 2 hrs. con suaves inversiones cada 15 min., luego los tubos se centrifugaron a 6000 rpm. por 10 min., recuperandose el sobrenadante (aprox. 600 uL). Al precipitado residual se agregaron 408 uL de buffer de lisis y 60 uL de SDS (10%), incubandose la mezcla a 65 °C por 10 min. Posteriormente la mezcla se centrifugo a 6000 rpm. por 10 min. y se recupero el sobrenadante. Ambos sobrenadantes fueron mezclados con cloroformo-alcohol isoamilico seguidos de una centrifugación a máxima velocidad (14000 rpm.) por 5 min. Se adiciono al sobrenadante isopropanol (0,8 volumen) y acetato de sodio (0.3 M) dejandolo reposar verticalmente por 1 h. Posteriormente la mezcla se centrifugo a máxima velocidad por 20 min., desechandose por inversión el sobrenadante. Al precipitado se le agrego etanol (70 %), con posterior centrifugación a 10000 rpm. por 10 min. El precipitado obtenido fue disuelto en agua destilada a 4 °C por 24 hrs. (Zhou et al., 1996).

La detección de DNA total se determino por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% en presencia de bromuro de etidio con buffer TBE 0.5X. La visualización del DNA se realizo en un transiluminador de luz ultra violeta. Las

bandas de DNA fueron cuantificadas con el marcador de peso molecular Lambda HindIII.

4.8. Extracción y purificación de DNA de sedimentos

Se probaron dos sistemas para la purificación de los ácidos nucleicos en los sedimentos contaminados (color café a marrón). El primero consiste en un kit de extracción y purificación UltraClean Soil DNA (MoBio Inc.) y el segundo mediante columnas de sefarosa (S-400 HR).

El DNA recuperado y purificado fue evaluado por electroforesis en geles de agarosa al 1% y 0.5 ug/ml de bromuro de etidio con buffer TBE 0.5X y visualizados en un transiluminador de luz ultra violeta y cuantificados con la banda de 23130 pb. del marcador de peso molecular Lambda HindIII.

4.9. Amplificación de 16S DNAr y grupos específicos de BSR por PCR y nested-PCR

Los cebadores de BSR utilizados en la amplificación por PCR del DNAr 16S se muestran en la Tabla 3. La amplificación fue realizada en un termociclador (modelo TD 7500, Hybaid, USA), bajo la siguiente reacción: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 1 min., 30 ciclos de 94 °C por 1 min., 50-65 °C por 1 min. y 72 °C por 1 min., seguida de una extensión final a 94 °C por 5 min. La composición de la reacción de un tubo de 20 ul de amplificación fue la siguiente: 2 uL de cada cebador (5 pmol/uL), 0.4 uL dNTPs (10 mM de cada uno), 1.7 uL de agua tridestilada, 2 uL de tampón PCR 10X (Promega), 0.5 uL (10ug/uL peso/volumen) de BSA, 0.05U/uL (para DNAr 16S) y 0.02 U/uL (para los subgrupos de BSR) de TaqPolimerasa (Promega) y DNA (aprox. 2-20 ng).

La amplificación de los productos esperados se analizó por electroforesis en geles de agarosa 0.7%-1.5% en presencia de bromuro de etidio con buffer TBE 0.5X y posterior visualización en presencia de marcador de peso molecular pGem.

La primera amplificación del fragmento de DNAr 16S se realizó con los cebadores: FD1 y RP2 generando un producto de 1504 pb. La amplificación de los grupos de SRB se realizó con los cebadores específicos de cada grupo: grupo 1, *Desulfotomaculum* (DFM); grupo 2, *Desulfobulbus* (DBB); grupo 3, *Desulfobacterium* (DBM); grupo 4, *Desulfobacter* (DSB); grupo 5, *Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina* (DCC-DNM-DSS); y grupo 6, *Desulfovibrio-Desulfomicrobium* (DSV-DMB) (Tabla 2) (Daly et al., 2000).

4.10. Amplificación de la sulfito reductasa disimilatoria por PCR

El gen sulfito reductasa disimilatoria (*dsrAB*) fue amplificado usando los cebadores DSR1F y DSR4R, amplificándose un producto de aproximadamente 1900 pb. (Tabla 2) (Wagner et al., 1998).

La amplificación fue realizada en un termociclador (modelo 5332, Eppendorff, USA), la reacción fue la siguiente: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min., 32 ciclos de 94 °C por 1 min., 59 °C por 2.25 min. y 72 °C por 2.25 min., seguida de una extensión final 72 °C por 10 min. La composición de la reacción de un tubo de 20 uL de amplificación fue la siguiente: 2 uL de cada solución de cebadores (5uM/uL), 1.7 uL (10X de Tampón PCR), 0.5 uL de BSA (10 ug/uL), 0.4 ul dNTPs (10 mM de cada uno), y 0.05 U/uL de TaqPolimerasa y DNA (aprox. 2-20 ng).

Los productos de PCR fueron visualizados en un transiluminador de luz ultra violeta con un marcador de peso molecular de 1-kb. DNA en un gel de agarosa al 0.8% en presencia de bromuro de etidio.

4.11. Porcentaje total de los subgrupos de BSR

El porcentaje de total de las lagunas fue determinado mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ total de subgrupos de BSR} = (\sum n_1 + n_2 + \dots + n_n / n_T) * 100$$

Los valores asignados para n_1, n_2, \dots, n_n corresponden a la detección positiva de cada punto y n_T es el número total de los puntos estudiados por laguna.

El porcentaje vertical de los subgrupos de BSR fue determinado mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ vertical} = (\sum n_1 + n_2 + \dots + n_n / n_T) * 100$$

Los valores asignados para n_1, n_2, \dots, n_n corresponden a la detección positiva de cada punto y n_T es el número total de los puntos estudiados por muestra (análisis vertical).

El porcentaje horizontal de los subgrupos de BSR fue determinada por la siguiente formula:

$$\% \text{ horizontal} = (\sum n_1 + n_2 + n_3 + n_4 + n_5 / n_T) * 100$$

Los valores asignados para n_1, n_2, \dots, n_5 corresponden a la presencia de los subgrupos de BSR y n_T es el número total de los subgrupos de BSR encontrados (análisis horizontal).

4.12. Cepas de referencia

Las cepas de referencia de bacterias sulfato reductoras comprendieron a seis grupos filogenéticos; las mismas que fueron clasificados como G1-G6 (Tabla 3).

Tabla 2. Secuencias de cebadores utilizados en la reacción de PCR para la caracterización de bacterias sulfato reductoras

Cebador	Región ^a blanco	Secuencias 5'-3' ^c	Especificidad	Temp. Alineamiento	Tamaño esperado
FD1 ^b	1 20	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	DNAr 16S	55°C	1504pb
Rp2 ^b	1480 1504	ACGGCTACCTTGTTACGACTT			
DFM 140	140 158	TAGMCYGGGATAACRSYKG	GRUPO 1	58°C	700pb
DFM 842	842 823	ATACCCSCWWCWCTAGCAC			
DBB 121	121 142	CGCGTAGATAACCTGTCTCATG	GRUPO 2	66°C	1120pb
DBB 1237	1237 1215	GTAGKACGTGTGTAGCCCTGGTC			
DBM 169	169 183	CTAATRCCGGATRAAGTCAG	GRUPO 3	64°C	840pb
DBM1006	1006 986	ATTCTCARGATGTCAAGTCTG			
DSB 127	127 148	GATAATCTGCCTTCAAGCCTGG	GRUPO 4	60°C	1150pb
DSB 1273	1273 1252	CYYYYYGCRRTAGTCGSTGCCCT			
DCC 305	305 327	GATCAGCCACACTGGRACCTGACA	GRUPO 5	65°C	860pb
DCC 1165	1165 1144	GGGCAGTATCTTYAGAGTYC			
DSV 230	230 248	GRGYCYGCGTYTCATTAGC	GRUPO 6	61°C	610pb
DSV 838	838 818	SYCCGRCACTAGYRTYCATC			
DSR1F	420 436	ACSCACTGGAAGCAGC	DSR	59°C	1900pb
DSR4R	2329 2346	GTGTAGCAGTTACCGCA			

a Las posiciones están en función de DNAr 16S de *E.coli* (aprox. 1504 pb)

b Los cebadores obtenidos a partir del trabajo de Weisburg et al. (1991).

El resto de los cebadores del trabajo de Daly et al. (2000).

c ambigüedad: R (G o A); Y (C o T); K (G o T); M (A o C); S (G o C); W (A o T).

Tabla 3. Cepas de referencia

Especie	Grupo ^a
<i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	1
<i>Desulfobulbus propionicus</i>	2
<i>Desulfobacterium autotrophicum</i>	3
<i>Desulfobacter curvatus</i>	4
<i>Desulfococcus multivorans</i>	5
<i>Desulvibrio desulfuricans</i> 27774	6

a. Los subgrupos corresponden a: (1) *Desulfotomaculum*, (2) *Desulfobulbus*, (3) *Desulfobacterium*, (4) *Desulfobacter*, (5) *Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina* y (6) *Desulvibrio-Desulfomicrobium*.

5. RESULTADOS

5.1. Características físicas de los sedimentos

Las muestras sedimentarias obtenidas de la parte central de cada laguna, mostraron superficies levemente irregulares suspendidas en la fase acuosa enturbiada por la suspensión de partículas del sedimento. Las muestras de cada laguna, en general presentaron textura y color diferente. Las lagunas formadas por meandros cercanos al río (aguas blancas), se caracterizaron por presentar una coloración café tanto en la época húmeda como en la seca. En contraste, los meandros alejados del río, como la laguna Río Viejo (aguas blancas) y Chitiwara (aguas negras) presentaron un sedimento de color pardo y gris, respectivamente. Por otro lado, las lagunas de tierra firme presentaron diferentes tipos sedimentarios. San Juan (aguas negras) presentó una coloración negra floclada en los 3 cm de profundidad en la época húmeda y un sedimento negro floclado a lo largo de todo el perfil de profundidad en la época seca mientras que Moa (aguas blancas) presentó un sedimento de color café (Tabla 1).

El contenido de agua (%H₂O) y la densidad (d) que permiten comparar las texturas y compactación de los sedimentos. Muestran una clara influencia de la edad de las lagunas. Estos resultados van en progresión a la edad de cada laguna. Los sedimentos de mayor contenido de agua y menor densidad, corresponden a las lagunas más viejas. En general, se observó una disminución del contenido de agua a lo largo del perfil de profundidad en los sedimentos. Asimismo, existen diferencias en el contenido de agua entre las épocas analizadas así como entre lagunas. En las lagunas Pinky, Salina, La Granja, Río Viejo y Chitiwara (lagunas formadas por meandros) se presentaron porcentajes de agua de 40% a 80%. Mientras que en las lagunas de tierra firme (San Juan y Moa) el contenido de agua es mayor al 80% (Figuras 9a y 9b). En la época húmeda no se observan grandes variaciones en el perfil de profundidad en las lagunas Salinas, La Granja y Río Viejo, presentándose esta tendencia en los primeros 2 cm. de profundidad durante la época seca en estas lagunas y Pinky (Figuras 9a y 9b).

La laguna Pinky presentó un porcentaje de agua mayor entre los 0 a 0.5 cm. de profundidad, el cual disminuye drásticamente a estratos más profundos (hasta un 40%). El porcentaje de agua en lagunas Salina y La Granja es mayor al 40% y 60%, respectivamente, tanto en la época húmeda como en la seca. La laguna Río Viejo presentó un contenido de agua mayor al 60% tanto en la época húmeda como en la seca (Figuras 9a y 9b). La laguna Chitiwara mostró un porcentaje de agua de 40% el cual se mantuvo constante a lo largo del perfil (Figura 9b). En la laguna San Juan (tierra firme) el contenido de agua varía entre épocas, mostrando una reducción hasta los 6 cm de profundidad en la época húmeda y siendo más constante en la época seca (>95%) (Figuras 9a y 9b) y finalmente en la laguna Moa el contenido de agua es de aproximadamente 80% en el perfil vertical (Figura 9b).

Los datos de densidad de los sedimentos en la época húmeda y seca son inversamente proporcionales al porcentaje de agua (Figuras 9c y 9d). Se observó que las lagunas Pinky, Salina y Chitiwara presentaron un sedimento más compacto, muy similar al de las lagunas La Granja y Río Viejo, cuyas densidades son muy similares en la época húmeda (Figura 9a). En la época seca, Río Viejo presenta muy baja densidad en la superficie misma que se incrementa progresivamente desde los 3.5 cm. de profundidad (Figura 9d). Las lagunas San Juan y Moa mostraron menor densidad en sus sedimentos (Figuras 9c y 9d). El sedimento de San Juan se presenta como dos horizontes distintos, uno superficial muy liviano y negro compuesto de material humico floculado y otro profundo de arcilla compacta y gris.

5.2. Potencial de oxido-reducción (Eh)

Los sedimentos de las 7 lagunas investigadas, muestran diferencias en los valores del potencial de oxido-reducción (Eh) en el perfil en profundidad. En general, los valores de Eh en la época húmeda y seca a lo largo del perfil, muestran claramente la transición de un ambiente oxidativo a un ambiente más reductor a lo largo de los 3 cm. de profundidad.

En la época húmeda las lagunas meandricas (La Granja y Río Viejo) y de tierra firme (San Juan) varían de un Eh oxidativo a un Eh reductor. En contraste, el sedimento de la laguna Salina muestra un perfil de Eh que difiere en las épocas húmeda y seca, observándose en el primer caso un ambiente más reductor hasta los primeros 2 cm. de profundidad, para luego darse una transición hacia un ambiente oxidativo entre los 2 y 3 cm. de profundidad (Figura 9e). En la época húmeda se observó un patrón diferente a lo largo del perfil, con una transición de un Eh oxidado a reductor tanto en las lagunas meandricas como las de tierra firme (Figura 9f). La laguna Río Viejo presentó un Eh reductor a lo largo del perfil de profundidad con valores entre -100 mV a -200 mV, observándose un perfil similar en ambas épocas analizadas (Figuras 9e y 9f).

En general, los valores de Eh a lo largo del perfil de profundidad de las lagunas en la época húmeda, varían en un rango de 300 mV hasta -300 mV. Estos valores reflejan el cambio de un ambiente oxidativo a reductor (a excepción de la laguna Salina) (Figura 9e). Por otro lado, los valores de Eh en las muestras de sedimentos en la época seca varían en un rango de 300 mV hasta -400 mV (Figura 9f). A niveles más profundos, los perfiles presentan un comportamiento relativamente estable, observándose a profundidades mayores a los 3 a 4 cm. valores de Eh relativamente constantes en las lagunas Río Viejo y San Juan (época húmeda y seca), Pinky, Salina, Granja y Chitiwara (época seca), mientras que en las lagunas Salina y La Granja (época húmeda) se observaron cambios del Eh hacia ambientes más oxicos (Figura 9e). Asimismo, la laguna Moa presentó cambios hacia un ambiente más reductor (Figura 9f).

5.3. pH

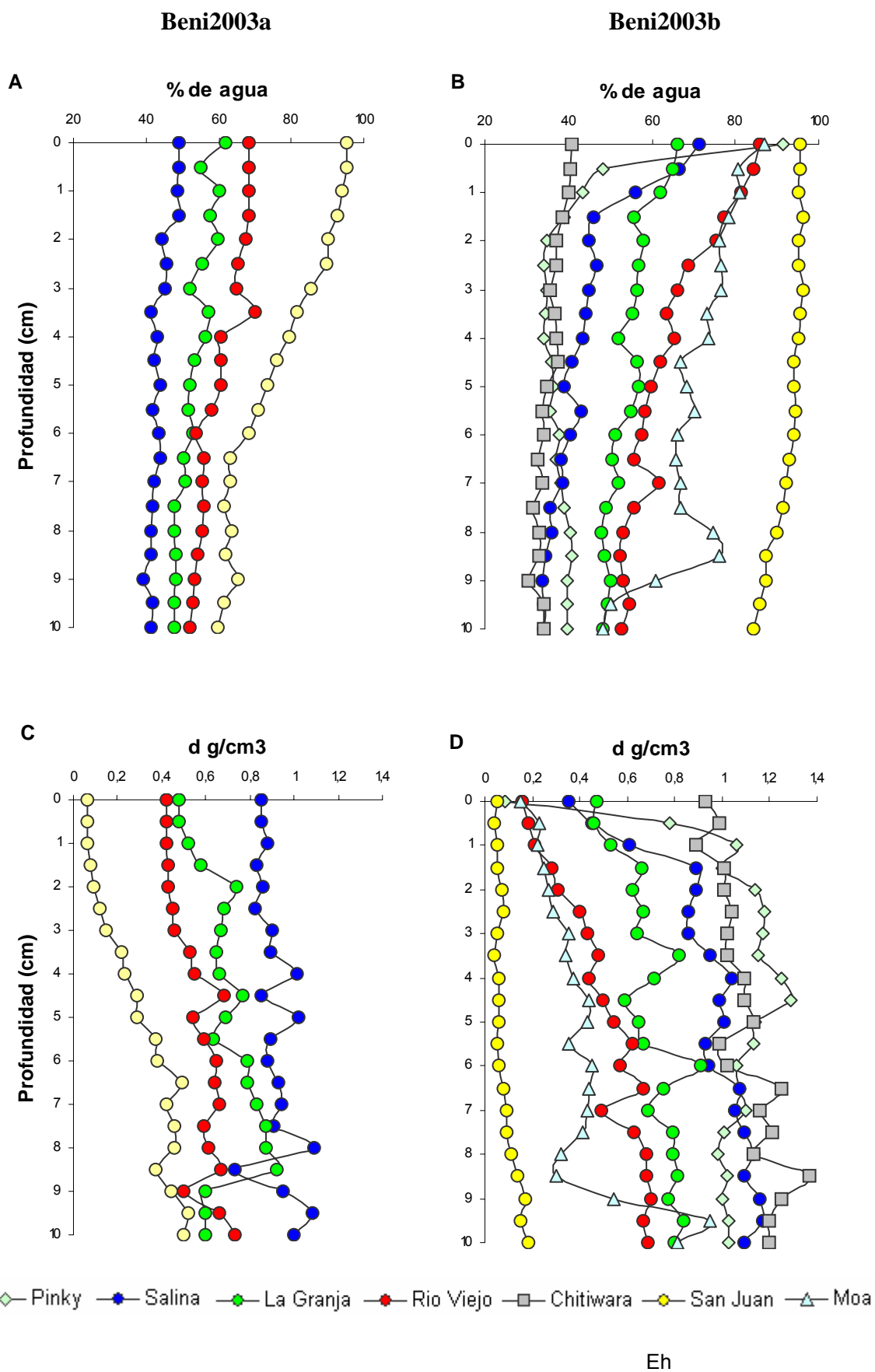
En general, la distribución de los valores de pH a lo largo de los perfiles sedimentarios no mostrarán variaciones significativas (Figuras 9g y 9h).

Al comparar los valores de pH de las lagunas Salina, La Granja, Río Viejo (meandros) y San Juan (tierra firme) en la época húmeda y seca, se observarán condiciones cercanas a la neutralidad, con oscilaciones entre un pH de 6 a 8.

En la época húmeda el pH es ligeramente ácido (pH 6.5) en las lagunas mandricas (Salina, La Granja y Río Viejo) hasta los 2.5 cm. de profundidad. Asimismo, se observó que la laguna San Juan (tierra firme) presentó un pH más ácido (pH<6.1) en la misma profundidad (Figura 9g).

En la época seca, en las lagunas meandricas los perfiles de pH son similares (pH=7) en las lagunas Salinas y Río Viejo, mientras que las lagunas Pinky y La Granja presentan valores de pH ligeramente alcalinos (entre 7.5 a 8) en su perfil de profundidad y la laguna Chitiwara presentó un pH ácido (entre 5.5 a 4) (Figura 9h).

En las lagunas de tierra firme, San Juan presentó un pH neutral (pH=7) y Moa, en comparación a las anteriores lagunas, presentó valores intermedios de pH en un rango de 6 a 7 (Figura 9h).



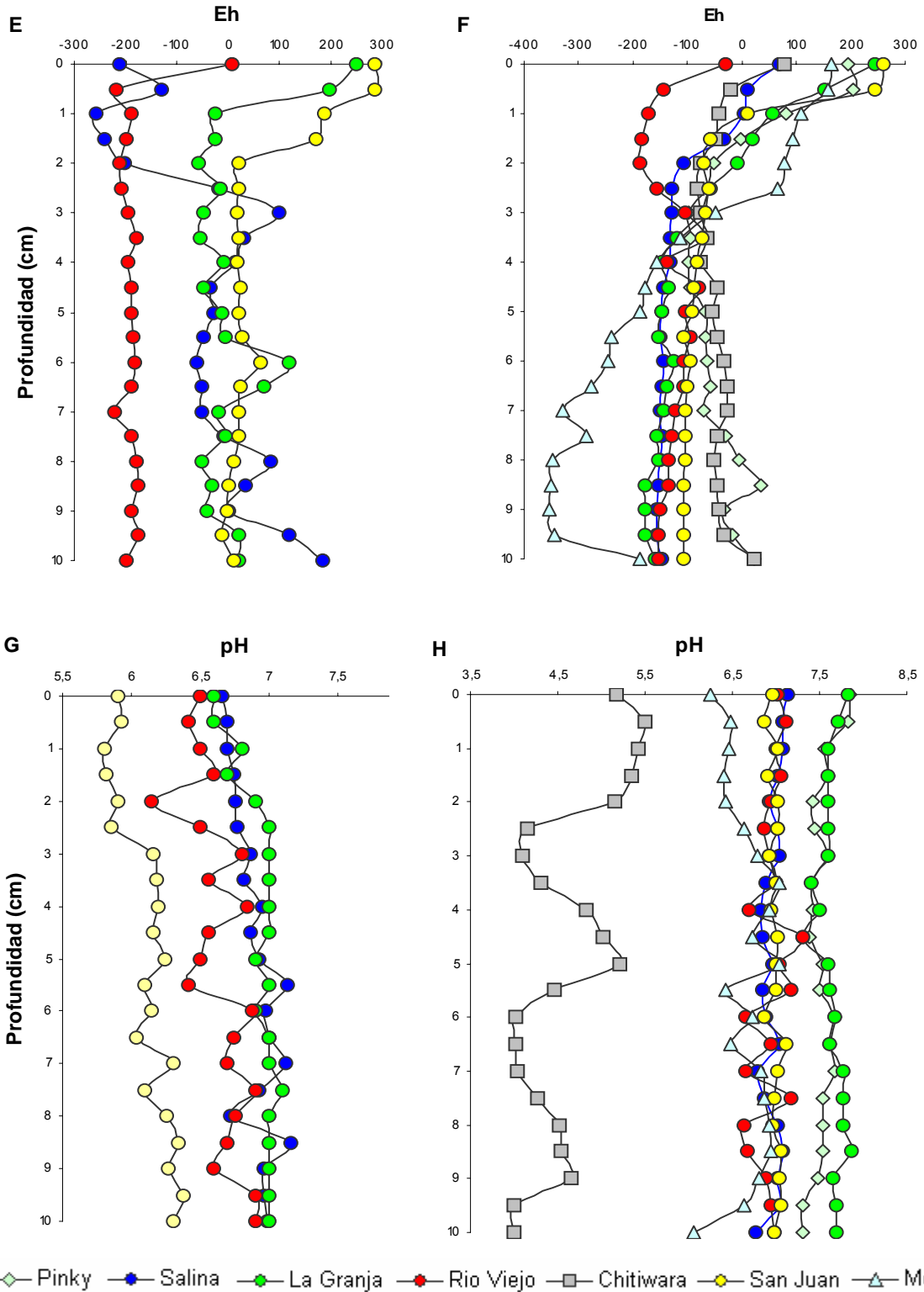


Figura 9. Perfiles porcentaje de agua, densidad, potenciales redox y pH en sedimentos de las lagunas de inundación.

5.4. Geoquímica de los sedimentos de las lagunas de inundación

Se analizaron los perfiles verticales de carbono orgánico (C org.), nitrógeno orgánico (N org.), razón atómica C/N (C/N atom.), mercurio (Hg), porcentaje de metilmercurio (%MeHg), tasa de metilación del Hg (MeHg) y razón MeHg/C en los sedimentos muestreados en la época húmeda en 4 lagunas: Salina, La Granja, Río Viejo y San Juan. La elección de estas lagunas de inundación se realizó en base a sus características geoquímicas, geofísicas y ecológicas.

5.4.1. Geoquímica del MeHg en la interfase agua-sedimento de los centros de las lagunas

En la interfase de las lagunas meandricas la metilación (%Me²⁰³Hg) aumenta en relación a la edad de las lagunas, de la laguna más joven (0.2% en la laguna Salina) a la más vieja (12.5% en la laguna Río Viejo). La laguna La Granja presentó el nivel de MeHg más alto, presentando un %Me²⁰³Hg de 6.4%. Este incremento de metilación con la edad corresponde a un enriquecimiento en carbono orgánico y a un cambio progresivo de la calidad del material orgánico (C/N) (Figura 10).

La interfase de la laguna San Juan contrasta con las lagunas de meandros. Esta laguna tiene hasta 20 veces más carbono orgánico (33% contra 0.5-1.7%) y una calidad de materia orgánica diferente (C/N: 11 contra 5-8). Las concentraciones de MeHg están en el mismo orden que las de La Granja, sin embargo, esta laguna mostró una baja metilación de %Me²⁰³Hg con 0.4% (Figura 10).

Por otro lado, las concentraciones de Hg se mantienen en el un rango de 60 a 80 ng/g en todas las lagunas, siendo los sedimentos de la laguna La Granja las que presentaron mayor concentración de Hg (Figura 10).

Los valores del potencial de metilación del %Me²⁰³Hg, obtenidos de la superficie de los sedimentos de las cuatro lagunas de inundación, fueron, en promedio de 4.8%, aunque el %Me²⁰³Hg de la laguna Río Viejo fue 30 veces más para las lagunas Salina y San Juan y de 2 veces más para laguna La Granja.

La razón Me²⁰³Hg/MeHg nos proporciona una idea del “turnover” del metilmercurio en la interfase, muy importante en la laguna de meandro más vieja y más orgánica. El turn-over aumenta según la evolución temporal de las lagunas. De tal manera a pesar de tener concentraciones similares a laguna La Granja; laguna San Juan tiene el “turnover” mas bajo de las lagunas estudiadas.

El porcentaje de carbono orgánico va en relación a la edad de formación de las lagunas meandricas y el metilmercurio presento esta misma relación, excepto para la laguna La Granja. Para la laguna San Juan la acumulación de MeHg probablemente está relacionada con la cantidad de material orgánico, aunque no se observa una producción activa de metilmercurio (Figura 10).

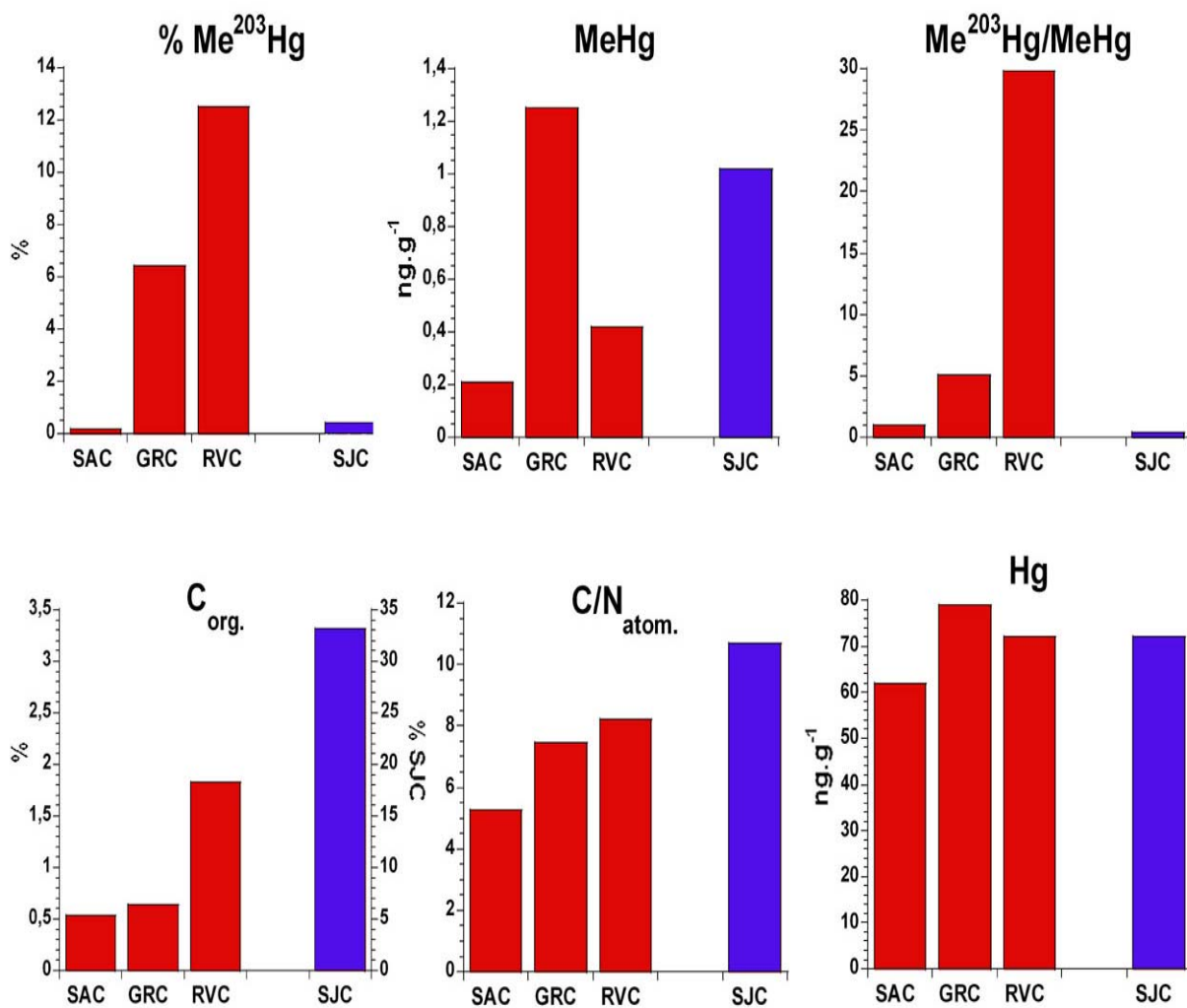


Figura 10. Geoquímica del mercurio en la interfaz agua-sedimentos en los centros de las lagunas (SAC: Salina, GRC: La granja, RVC: rió Viejo, SJC: San Juan).

5.4.2. Porcentajes de carbono orgánico, nitrógeno y calidad de materia orgánica

En las figuras 11a y 11c, se observa el enriquecimiento en carbono orgánico y el cambio de calidad de material orgánico, según la edad de las lagunas de meandros. Las concentraciones de carbono decrecen progresivamente hasta los 10 cm.

En los sedimentos de la laguna San Juan, se observa el efecto del horizonte orgánico superficial, en los 4 primeros cm., donde se tienen concentraciones muy altas de carbono (<10%). A lo largo del perfil, los sedimentos de la laguna San Juan tienen entre 3 hasta 20 veces más carbono orgánico que las lagunas de meandros.

El porcentaje de carbono orgánico en los sedimentos a lo largo de los primeros 1.5 cm. de profundidad, por lo general es mayor y tiende a disminuir a lo largo del perfil. Siendo la laguna San Juan, la más orgánica (% C org. mayor al 30%) en los primeros centímetros de profundidad. En este mismo estrato se observó que las lagunas meandricas presentaron diferentes porcentajes (Salina con 0.51%, La Granja con 0.81% y Río Viejo con 1.88%) (Figura 11a).

En las lagunas Río Viejo y San Juan el decremento de carbono orgánico va de (1.88%-0.86%) y (33.14%-6.92%) respectivamente, mientras que en las lagunas Salina y La Granja no se observaron grandes variaciones a lo largo del perfil de profundidad (0.51%-0.41% y 0.81%-0.55% respectivamente) (Figura 11a).

El porcentaje de nitrógeno presenta una distribución similar al porcentaje de carbono, encontrándose en mayor proporción en los primeros centímetros de profundidad en los sedimentos más orgánicos para luego decrecer drásticamente a mayor profundidad (Figura 11b). La razón atómica C/N en los sedimentos poco orgánicos muestra niveles similares y no hay variación del perfil con la profundidad en las lagunas La Granja y Río Viejo. En la laguna Salina se observaron valores de C/N menores en comparación a las otras lagunas analizadas. En contraste, existe un incremento de la razón atómica C/N en el horizonte orgánico de la laguna San Juan (Figura 11c).

5.4.3. Distribución de la concentración de mercurio

Los perfiles de Hg presentan concentraciones entre 60 y 80 ng/g en la superficie (hasta los 2 cm. de profundidad). A niveles más profundos, las concentraciones de Hg decrecen ligeramente en las tres lagunas meandricas.

En laguna San Juan, el perfil de Hg corresponde al perfil de carbono orgánico y estructuración física del testigo. Las concentraciones más altas (55-75 ng/g) se encontraron en el horizonte húmico decreciendo en profundidad significativamente en el horizonte más arcilloso (10 ng/g) (Figura 12a).

La relación entre la concentración de Hg y el porcentaje de carbono mostró diferencias entre los sedimentos de las lagunas, presentándose una alta correlación en las lagunas Salina, Río Viejo y San Juan ($r^2 > 0.78$), en contraste a la laguna La Granja ($r^2 = 0.49$) (Figura 13a).

La relación entre la concentración del Hg y porcentaje de agua fue mayor en laguna San Juan ($r^2 = 0.94$) a diferencia de las lagunas La Granja y Río Viejo (con una correlación intermedia, $r^2 < 0.64$). Por otro lado, la laguna Salina presentó una correlación menor ($r^2 = 0.45$) (Figura 14a).

5.4.4. Distribución del metilmercurio en sedimentos de lagunas

El perfil de concentración de MeHg en el sedimento de la laguna San Juan, mostró que las concentraciones relativas de MeHg son de aproximadamente 1 ng/g y están limitadas al horizonte orgánico superficial.

En las lagunas de los meandros, las concentraciones de MeHg se encontraron en la superficie decreciendo con la profundidad. En el horizonte arcilloso, se observaron las más bajas concentraciones de MeHg en las lagunas Salinas y Río Viejo (0.4 ng/g). Las concentraciones de MeHg más altas se encuentran en el sedimento de la laguna La Granja (> 1 ng/g) el cual decrece a lo largo del perfil (Figura 12b).

Los porcentajes de MeHg mostraron variaciones en los sedimentos de las lagunas meandricas y de tierra firme (entre 0.24% y 1.85%). Los mayores valores se encontraron en las lagunas La Granja y San Juan con 1.6% y 1.85%, respectivamente (Figura 12c).

El porcentaje de MeHg decrece en el perfil vertical de los sedimentos de las lagunas La Granja y San Juan ($> 1.5\%$) y en las lagunas Salina y Río Viejo este porcentaje se presenta sin grandes variaciones a lo largo del perfil de profundidad ($< 0.5\%$) (Figura 12c). La zona de decremento del porcentaje de MeHg en las lagunas meandricas se encuentra entre el primer centímetro para la laguna Salina a los 1.5 cm. de profundidad para lagunas La Granja y Río Viejo. La laguna San Juan (tierra firme) se encuentra entre los 3.5 cm (Figura 12c). A partir de los 4 cm. de profundidad el porcentaje de MeHg decrece drásticamente en las lagunas La Granja (1% a 0.6%) y San Juan (0.68% a 0.36%) (Figura 12c).

La razón %MeHg/%C, muestra que la laguna con menor razón de %MeHg/%C es San Juan (Figura 12d), seguida de las lagunas Salina y Río Viejo en las cuales no se observaron variaciones a lo largo del perfil de profundidad. En contraste, La Granja presentó una mayor razón de %MeHg/%C hasta los 2 cm. de profundidad, el cual posteriormente fue disminuyendo a lo largo del perfil (Figura 12d).

5.4.5. Relación entre el MeHg, materia orgánica, porcentaje de agua y Eh

La relación entre el porcentaje de MeHg y de carbono fue diferente para los sedimentos de las lagunas estudiadas. Se observó que la laguna San Juan tiene una mayor correlación ($r^2 < 0.83$). La laguna Salina mostró una correlación de $r^2 = 0.69$. En contraste, las lagunas La Granja y Río Viejo tienen una menor correlación ($r^2 < 0.38$) entre estos dos parámetros (Figura 13b).

La relación entre el porcentaje del MeHg y agua fue mayor en las lagunas Río Viejo y San Juan ($r^2 > 0.87$). Por otro lado, las lagunas Salina y La Granja presentaron una correlación de $r^2 > 0.60$ (Figura 14b).

El análisis de relación entre el porcentaje de MeHg y el potencial de oxidoreducción (Eh) mostró, que existe mayor porcentaje de MeHg en lagunas que presentaron un Eh oxidativo, tal es el caso de la laguna La Granja (meandro) y laguna San Juan (tierra firme) en los primeros 2.5 cm. de profundidad. Asimismo, se observó que a mayor profundidad los porcentajes de MeHg van disminuyendo, mientras que los valores de Eh no presentan grandes variaciones. Las lagunas Salina y Río Viejo presentaron un Eh reducido en los primeros 2 cm. de profundidad y se observándose un menor porcentaje de MeHg.

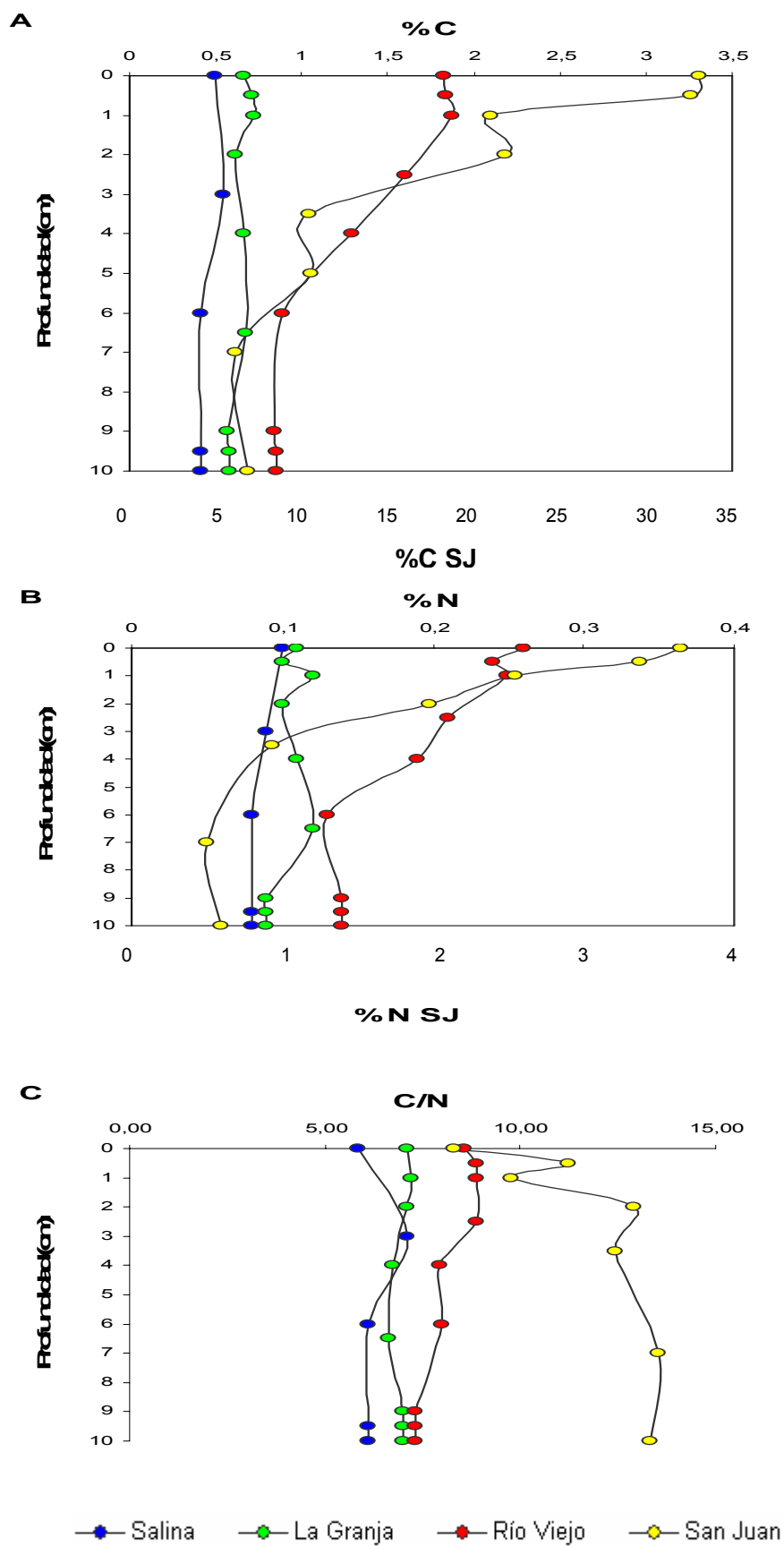


Figura 11. Perfiles de las concentraciones de C orgánico, C/N, Hg y MeHg en los sedimentos del centro de las lagunas.

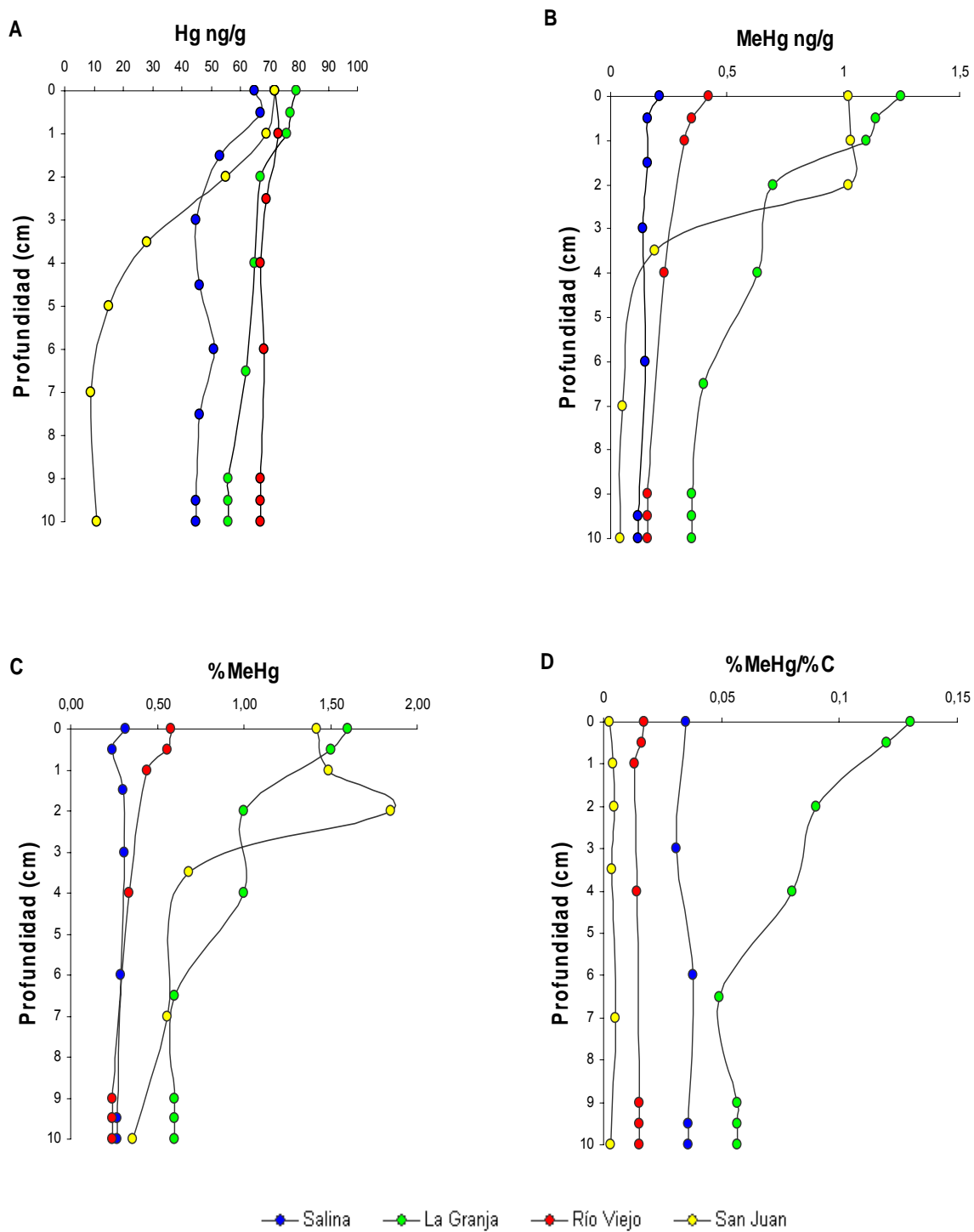


Figura 12. Perfiles de concentración de Hg, MeHg y MeHg/C en sedimentos.

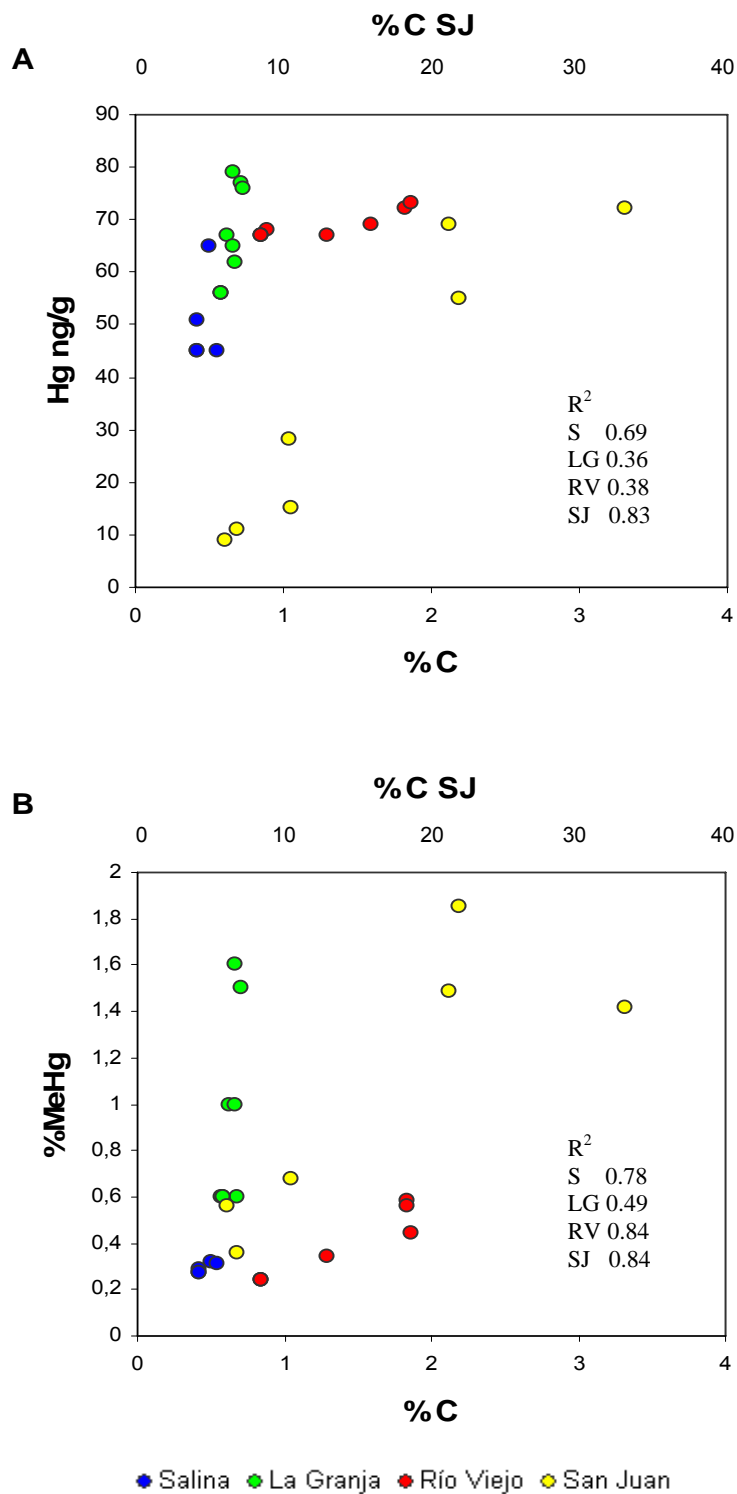


Figura 13. Relación entre la fracción del Hg, MeHg y Corg en los sedimentos de las lagunas de inundación.

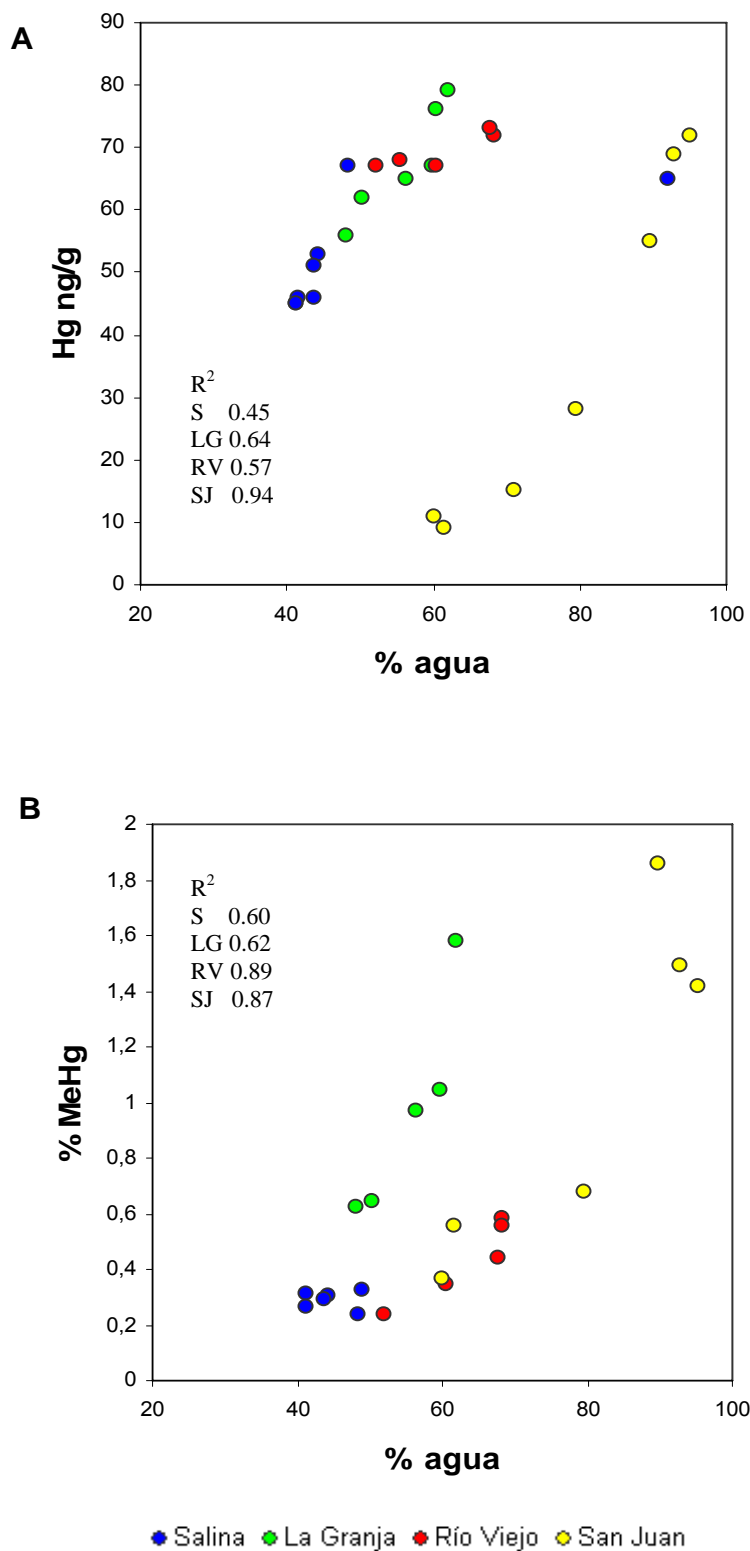


Figura 14. Relación entre la fracción del Hg, MeHg y porcentaje de agua en sedimentos en las lagunas de inundación.

5.5. Extracción de DNA de los sedimentos de las lagunas de inundación

La extracción de DNA de los perfiles sedimentarios, de las muestras de las lagunas Salina, Pinky, La Granja, Chitiwara, San Juan y Moa fue realizada mediante el método de Zhou (Zhou et.al., 1996). El método de extracción y purificación de DNA-MoBio (Kit Comercial) se utilizó en las muestras de la laguna Río Viejo. Con ambos métodos se obtuvo DNA de alto peso molecular (de aproximadamente 23000pb) en los diferentes estratos analizados (Figura 15a).

De acuerdo a la cuantificación comparativa realizada con el marcador de peso molecular lambda HindIII, el método con el que se obtuvo mayor concentración de DNA fue el método de Zhou. Sin embargo, el DNA extraído presentó también ácidos húmicos y otros contaminantes, los cuales fueron eliminados en la reacción de PCR ya sea por dilución o purificación en columnas de sefarosa S-400 HR (Pharmacia Biotech). La reducción de los ácidos húmicos se evidenció por el color transparente de los extractos de DNA obtenidos.

En general, a partir de 500 mg de sedimento, por el método de Zhou se obtuvo DNA en un rango de concentración entre los 200 a 800 ng, mientras que por el método de MoBio se obtuvo entre 100 a 300 ng. Ambas técnicas (con las consideraciones de remoción de ácidos húmicos) permitieron obtener, en general, un extracto de DNA óptimo para las posteriores pruebas de PCR, mediante las cuales se determinó la presencia de los genes 16S DNAr y bisulfito reductasa disimilatoria (DSR) de todas las lagunas y en todos los estratos (a lo largo de 10 cm. de profundidad).

La extracción de DNA en la época húmeda y seca no mostró variaciones de concentración significativa. Sin embargo, se observaron diferencias de concentración de DNA entre sedimentos de las lagunas Salina, Pinky y Chitiwara que en general presentaron menor concentración de DNA en comparación a la concentración de las lagunas La Granja, Río Viejo, San Juan y Moa (Anexos). El DNA obtenido de los sedimentos de las lagunas Río Viejo, La Granja, San Juan y Moa presentó por lo general, mayor contaminación de ácidos húmicos.

5.6. Detección de la bisulfito reductasa disimilatoria (DSR)

La amplificación del gen bisulfito reductasa disimilatoria (DSR) fue estandarizada con diferentes cepas control de BSR (Tabla 3), dando como resultado un producto de amplificación de 1900 pb (Figura 15c y 16). El análisis de este gen mediante PCR en los diferentes perfiles de las lagunas confirmó de manera independiente la presencia de microorganismos sulfato reductores presentes en los sedimentos analizados.

5.7. Amplificación del gen 16S DNAr

El ensayo de PCR del 16S DNAr, mostró un producto específico de amplificación de 1500 pb (Figuras 15b y 16), que corresponde al producto esperado y al observado en las cepas bacterianas control (Figura 16). Este producto fue obtenido en todas las muestras analizadas.

En general, el DNA blanco fue diluido entre 1/50 y 1/800 para los ensayos de amplificación del 16S DNAr obtenido de las muestras de los sedimentos de las lagunas Pinky, Salina, Chitiwara, Moa y San Juan (método de Zhou). Por otro lado, los extractos de DNA de la laguna La Granja, por las impurezas presentes (ácidos húmicos) fueron procesados por el método Zhou seguidos de la purificación con columnas de sefarosa S-400 HR y posterior dilución en un factor de 1/200 para su uso en el ensayo de PCR. Los extractos de DNA que presentaron mayor contaminación fueron los obtenidos en los sedimentos de la laguna Río Viejo. La amplificación del 16S DNAr de esta laguna, solo fue posible cuando se utilizó DNA extraído por el método de MoBio seguido de una dilución en un factor 1/100.

5.8. Detección de los subgrupos de BSR mediante PCR anidado

Los ensayos del PCR anidado para la detección de los subgrupos de bacterias sulfato reductoras (BSR), se realizaron sobre el producto de amplificación del 16S DNAr. En los ensayos de PCR se utilizaron como control, DNA obtenido de diferentes cepas BSR, características de cada subgrupo (Figura 16; Tabla 3). Los cebadores empleados fueron específicos para cada subgrupo analizado (Daly et al., 2000).

De los seis subgrupos de BSR analizados (*Desulfovibrio* (DSV), *Desulfococcus* (DCC), *Desulfotomaculum* (DFM), *Desulfobacter* (DSB), *Desulfobulbus* (DBB) y *Desulfobacterium* (DBM)) en los diferentes perfiles sedimentarios de las lagunas de inundación tanto en la época húmeda y seca, se encontraron solo cinco de ellos (Figura 19). El subgrupo *Desulfobacterium* (DBM) no fue encontrado en ninguna muestra sedimentaria de las lagunas testadas (Figura 17f).

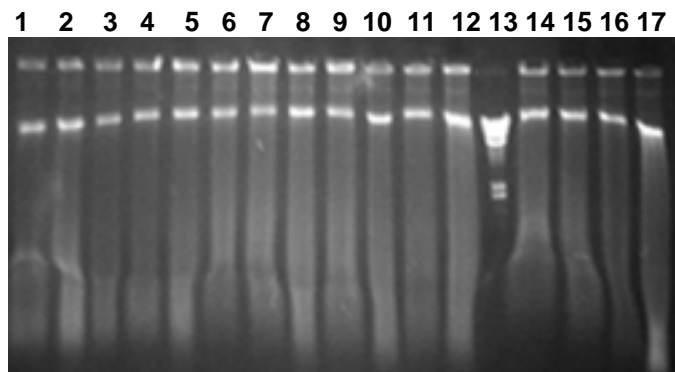
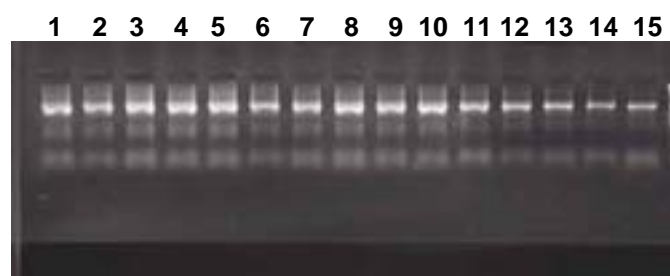
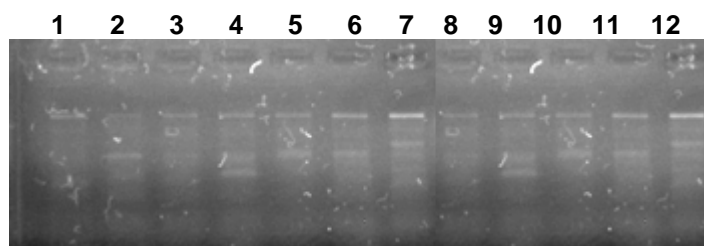
A**B****C**

Figura 15. (A) Extracción de DNA de sedimentos de la laguna La Granja. Carriles: 1 a 12 DNA; 13, marcador de peso molecular λ HindIII; 14 a 17 DNA. (B) Amplificación del DNA r 16S de sedimentos. Carriles 1 a 15. (C) Amplificación de DSR de sedimentos. Carriles 1 a 12.

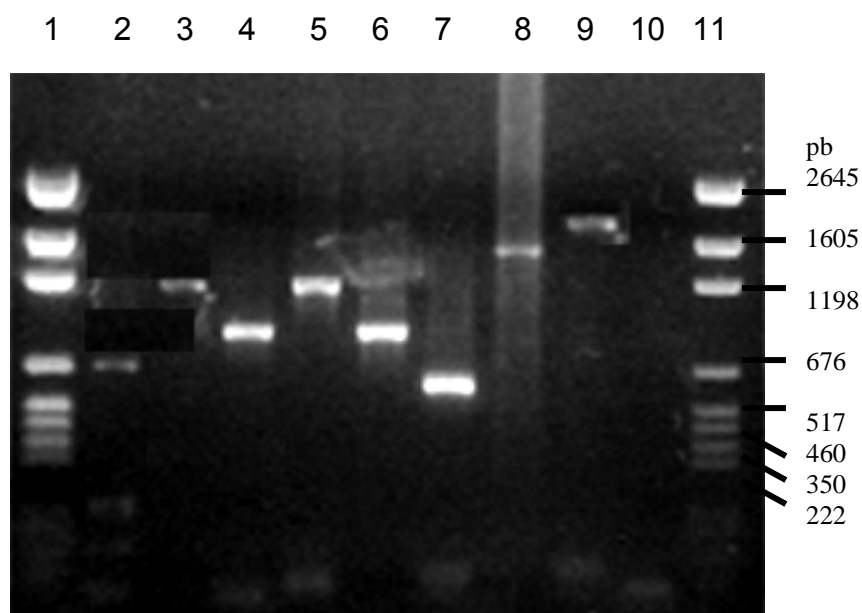


Figura 16. Amplificación de 16S DNAr, de grupos específicos de BSR de eubacteria y del gen DSR de bacterias sulfato reductoras. Carriles: 2, *Desulfotomaculum nigrificans*; 3, *Desulfobulbus propionicus*; 4, *Desulfobacterium autotrophicum*; 5, *Desulfobacter curvatus*; 6, *Desulfococcus multivorans*; 7, *Desulfovibrio desulfuricans* 27774; 8, DNAr 16S eubacteria; 9, DSR; 10, control negativo (H₂O); 1 y 11, marcador de peso molecular (pGem/Promega). Los productos fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% en un transiluminador de luz ultravioleta en presencia de bromuro de etidio.

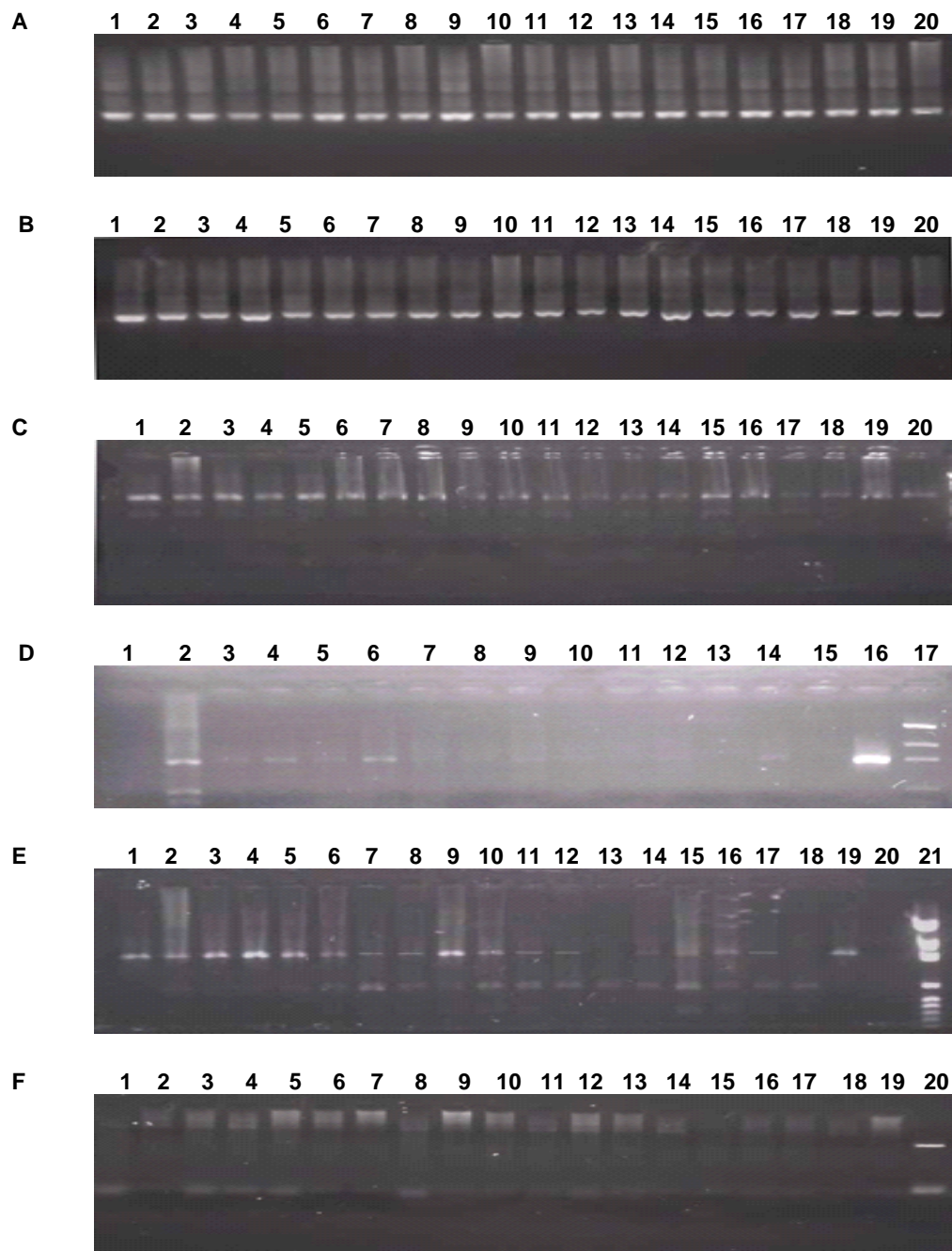


Figura 17. Amplificación de grupos específicos de bacterias sulfato reductoras en muestras de la laguna La Granja. (A) DSV. Carriles: 1 a 19 muestras; 20 control positivo; (B) DCC. Carriles: 1 a 19 muestras; 20, control positivo; (C) DFM. Carriles: 1 a 19 muestras; 20, control positivo; (D) DSB Carriles: 1 a 15 muestras; 16, control positivo; 17, marcador de peso molecular (pGem/Promega); (DBB). Carriles: 1 a 19 muestras; 20, control negativo (H_2O); 21, marcador de peso molecular (pGem/Promega) y (F) DBM. Carriles: 1 a 19 muestras; 20, control positivo. Los productos fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% en un transiluminador de luz ultravioleta en presencia de bromuro de etidio.

5.8.1. Porcentaje total de BSR en las lagunas de inundación

En los sedimentos de las lagunas estudiadas el porcentaje total de BSR alcanzó valores entre 54% y 79% (Figura 18). Las lagunas meandricas más cercanas al río (Pinky, Salina y La Granja) presentaron mayor porcentaje total de BSR ($\geq 70\%$), en comparación a los meandros más alejados del río y más viejos; Río Viejo (54%-64%) y Chitiwara (54%). Se observó también que el porcentaje total es menor en las lagunas de tierra firme San Juan (56%-66%) y Moa (54%) en relación a las lagunas meandricas más jóvenes (Figura 18). Por otra parte, el porcentaje total de BSR no mostró una diferencia significativa entre muestras de una misma laguna en la época húmeda y seca (Figura 18).

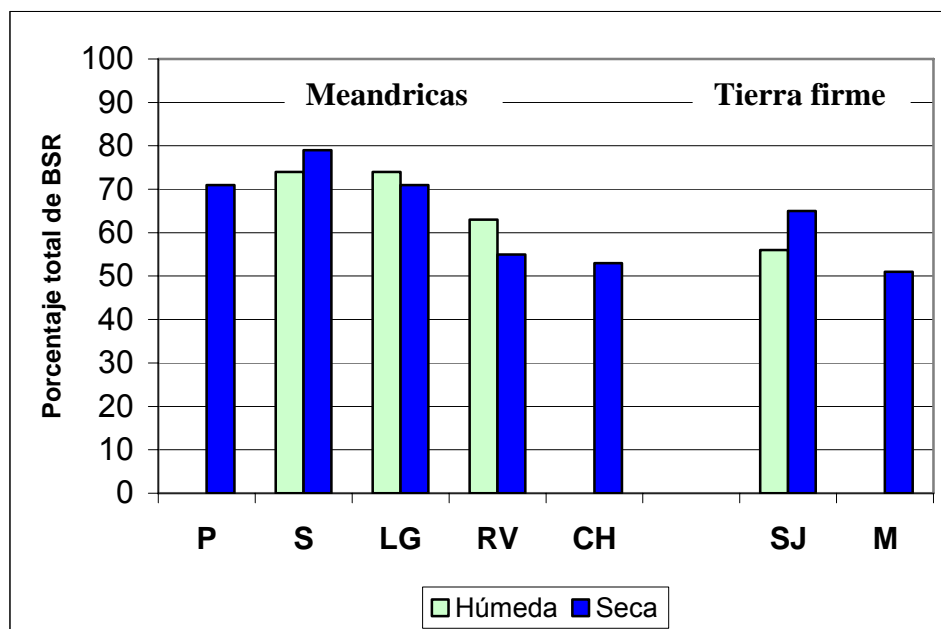


Figura 18. Porcentaje total de BSR en las lagunas del area de estudio. Pinky (P), Salina (S), La Granja (LG), Río Viejo (RV), Chitiwara (CH), San Juan (SJ) y Moa (M).

5.8.2. Distribución de los subgrupos de BSR en las lagunas de estudio

Se observó diferencias en la distribución estratificada de BSR entre las diferentes lagunas analizadas (meándricas cercanas al río, meándricas alejadas del río y lagunas de tierra firme), así como dentro de una misma laguna en la época húmeda y seca, las limitaciones del método utilizado no permite observar mayores diferencias a nivel cuantitativo.

Las lagunas meándricas cercanas al río (Pinky, Salina y La Granja) presentaron la distribución más uniforme, para los subgrupos DSV, DCC y DFM y no así para DSB y DBB (Figura 19). Las lagunas meándricas más alejadas del río: Río Viejo y Chitiwara presentaron una distribución más heterogénea de los subgrupos DFM, DSB y DBB. Las dos lagunas de tierra firme: San Juan y Moa presentaron también diferencias en relación a la presencia o ausencia de los subgrupos DFM, DSB y DBB.

En laguna Pinky se observó una distribución semejante de los subgrupos DSV, DCC y DFM. La presencia del subgrupo DSB fue observada hasta los 7 cm. de profundidad, mientras que el subgrupo DBB presentó una distribución variable a lo largo del perfil de profundidad (Figura 19).

En laguna Salina, en la época húmeda el subgrupo DBB no está presente entre los 4 cm. a 9 cm. de profundidad (Figura 19), en este mismo intervalo se observó valores de Eh más oxidativos (14 mV a 2 mV). En la época seca, en contraste, esta laguna presentó una distribución más homogénea de los subgrupos (Figura 20) y un perfil de Eh más estable. Por debajo de los 2 cm de profundidad, se observó un ambiente reductor (-128 mV a -148mV).

En laguna La Granja, en la época húmeda se observó una distribución más uniforme de los subgrupos de BSR en el perfil de profundidad, con diferencias en la distribución de DSB y DBB en la profundidad analizada. En la época seca, en esta laguna, DBB estuvo ausente por debajo de los 4 cm. de profundidad, donde se observó un Eh reductor (-147<Eh<-159) (Figura 19).

En laguna Río Viejo, en la época húmeda, no se observó al subgrupo DBB por debajo de los 4 cm. hasta 9 cm. de profundidad. El valor de Eh encontrado en este intervalo es reducido y estable (-189 mV a -175 mV). El subgrupo DSB no fue encontrado entre los 4 cm. a 7 cm. de profundidad (Figura 19). En la época seca, en esta laguna se observaron mayores diferencias entre los grupos DFM, DSB y DBB a partir de los 3 cm. de profundidad. La distribución del subgrupo DBB en esta laguna es minoritaria en la época seca encontrándose entre 1.5 cm. a 3 cm. de profundidad (Figura 19).

En laguna Chitiwara se presentaron las mayores diferencias observadas en la distribución de los subgrupos DSB y DBB con respecto a las otras lagunas estudiadas. Se observó la presencia de ambos subgrupos solamente entre los 3.5

cm. hasta los 5 cm. de profundidad (Figura 19), presentándose en este intervalo un Eh levemente reducido ($-56 < E_h < -32$).

En laguna San Juan, se observaron diferencias entre la distribución de los subgrupos DSB y DBB en la época húmeda y seca. En la primera, el subgrupo DSB fue observado solamente en los primeros 5 cm. de profundidad, mientras que el subgrupo DBB se encontró solamente entre los 5.5 cm. a 6.5 cm. de profundidad (Figura 20). En la segunda, se observó una distribución más uniforme del subgrupo DSB y el subgrupo DBB solo fue observado solo hasta los 3.5 cm. (Figura 20).

En laguna Moa, se observaron diferencias en la distribución de cuatro subgrupos: DCC, DFM, DSB y DBB. Hasta los 3.5 cm. de profundidad están presentes todos los subgrupos de BSR (Figura 20). Por otro lado, entre los 7 cm. a 8.5 cm. no se detectaron a los subgrupos de BSR, excepto DSV, sin embargo a los 10 cm. se observó nuevamente la presencia de todos los subgrupos de BSR.

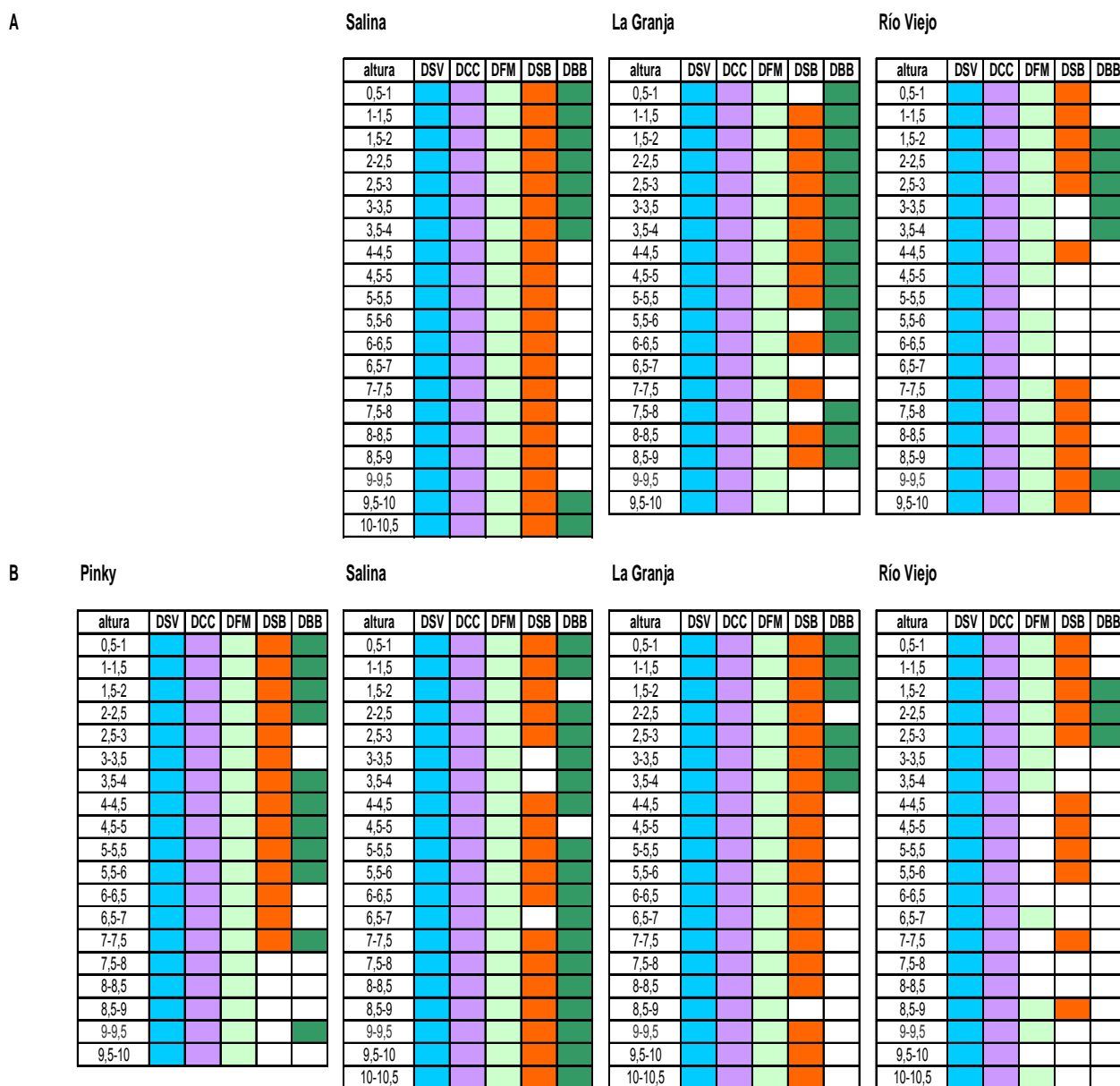


Figura 19. Distribución de los subgrupos de BSR en sedimentos de la lagunas meandricas. A) época húmeda y B) época seca. *Desulfovibrio* (DSV), *Desulfococcus* (DCC), *Desulfotomaculum* (DFM), *Desulfobacter* (DSB), *Desulfobulbus* (DBB).

A

San Juan

altura	DSV	DCC	DFM	DSB	DBB
0,5-1	■	■	■	■	
1-1,5	■	■	■	■	
1,5-2	■	■	■	■	
2-2,5	■	■	■	■	
2,5-3	■	■	■	■	
3-3,5	■	■	■	■	
3,5-4	■	■	■	■	
4-4,5	■	■	■	■	
4,5-5	■	■	■	■	
5-5,5	■	■	■	■	
5,5-6	■	■	■		■
6-6,5	■	■	■		■
6,5-7	■	■	■		
7-7,5	■	■	■		
7,5-8	■	■	■		
8-8,5	■	■	■		
8,5-9	■	■	■		
9-9,5	■	■	■		
9,5-10	■	■	■		
10-10,5	■	■	■		

Chitiwara

San Juan

Moa

B

altura	DSV	DCC	DFM	DSB	DBB
0,5-1	■	■	■		
1-1,5	■	■	■		
1,5-2	■	■	■		
2-2,5	■	■	■		■
2,5-3	■	■	■		
3-3,5	■	■	■		
3,5-4	■	■	■	■	■
4-4,5	■	■	■	■	■
4,5-5	■	■	■	■	■
5-5,5	■	■	■	■	
5,5-6	■	■	■		
6-6,5	■	■	■		
6,5-7	■	■	■		
7-7,5	■	■	■		
7,5-8	■	■	■		
8-8,5	■	■	■		
8,5-9	■	■	■		
9-9,5	■	■	■		
9,5-10	■	■	■	■	

altura	DSV	DCC	DFM	DSB	DBB
0,5-1	■	■	■	■	■
1-1,5	■	■	■	■	■
1,5-2	■	■	■	■	■
2-2,5	■	■	■	■	■
2,5-3	■	■	■	■	■
3-3,5	■	■	■	■	■
3,5-4	■	■	■	■	■
4-4,5	■	■	■	■	
4,5-5	■	■	■	■	
5-5,5	■	■	■	■	
5,5-6	■	■	■		
6-6,5	■	■	■		
6,5-7	■	■	■		
7-7,5	■	■	■	■	
7,5-8	■	■	■	■	
8-8,5	■	■	■	■	
8,5-9	■	■	■	■	
9-9,5	■	■	■	■	
9,5-10	■	■	■	■	
10-10,5	■	■	■	■	

altura	DSV	DCC	DFM	DSB	DBB
0,5-1	■	■	■	■	■
1-1,5	■	■	■	■	■
1,5-2	■	■	■	■	■
2-2,5	■	■	■	■	■
2,5-3	■	■	■	■	■
3-3,5	■	■	■	■	■
3,5-4	■	■	■	■	
4-4,5	■	■	■	■	
4,5-5	■	■	■	■	
5-5,5	■	■	■	■	■
5,5-6	■	■	■	■	■
6-6,5	■	■	■		
6,5-7	■	■	■		
7-7,5	■	■	■		
7,5-8	■	■	■		
8-8,5	■	■	■		
8,5-9	■	■	■	■	
9-9,5	■	■	■	■	
9,5-10	■	■	■	■	
10-10,5	■	■	■	■	■

Figura 20. Distribución de los subgrupos de BSR en sedimentos de la laguna Chitiwara y de tierra firme (San Juan y Moa). A) época húmeda y B) época seca. *Desulfovibrio* (DSV), *Desulfococcus* (DCC), *Desulfotomaculum* (DFM), *Desulfobacter* (DSB), *Desulfobulbus* (DBB).

5.8.3. Porcentaje vertical de los subgrupos de BSR en las lagunas de estudio

El porcentaje de distribución a lo largo del perfil sedimentario (vertical) de los subgrupos de BSR fue diferente en cada laguna, debido principalmente a la presencia o ausencia de los subgrupos DBB, DSB y DFM (Figuras 21a y 21b). Mientras que DSV y DCC estuvieron presentes en todos los estratos sedimentarios de todas las lagunas (Figuras 21a y 21b), excepto en la laguna Moa donde el subgrupo DCC alcanzó solo un 55% (Figura 21b).

En general, se observó que de todos los subgrupos, DBB es el que presentó mayores variaciones en el porcentaje vertical (10%-90%) en todas las lagunas (meandricas y de tierra firme). En las lagunas meandricas (Pinky, Salina, La Granja, Río Viejo y Chitiwara) alcanzó valores entre 31%-79% (época húmeda) (Figura 21a) y entre 15%-90% (época seca) (Figura 21b). Mientras que en las lagunas de tierra firme, los valores alcanzados están entre 10% (época húmeda en San Juan) y 25%-45% (época seca en San Juan y Moa) (Figuras 21a y 21b). El subgrupo DSB presentó porcentajes mayores al 40% tanto en las lagunas meandricas y de tierra firme, excepto en la laguna Chitiwara (26%) (Figura 21b). El subgrupo DFM alcanzó porcentajes mayores al 69% en las lagunas meandricas y de tierra firme (Figuras 21a y 21b), excepto en la laguna Río Viejo (época seca) con un 55% (Figura 21b).

El mayor porcentaje vertical de los subgrupos de BSR se encontró en las lagunas meandricas más jóvenes en relación a las más viejas y de tierra firme. Así, en la época húmeda en las lagunas meandricas (Salina y La Granja), se observó mayor porcentaje vertical para los subgrupos DFM, DSB y DBB en comparación a la laguna San Juan (tierra firme). En la época seca, las lagunas meandricas cercanas al río (Pinky, Salina y La Granja) presentaron mayor porcentaje de los subgrupos de BSR (DSB y DBB) en comparación a las lagunas meandricas alejadas del río (Río Viejo y Chitiwara). Asimismo, en esta época las lagunas de tierra firme (San Juan y Moa) presentaron un porcentaje vertical mayor de subgrupos de BSR (DFM, DSB y DBB en San Juan y DSB y DBB en Moa) en relación a las lagunas meándricas alejadas del río (Río Viejo y Chitiwara) (Figura 19b).

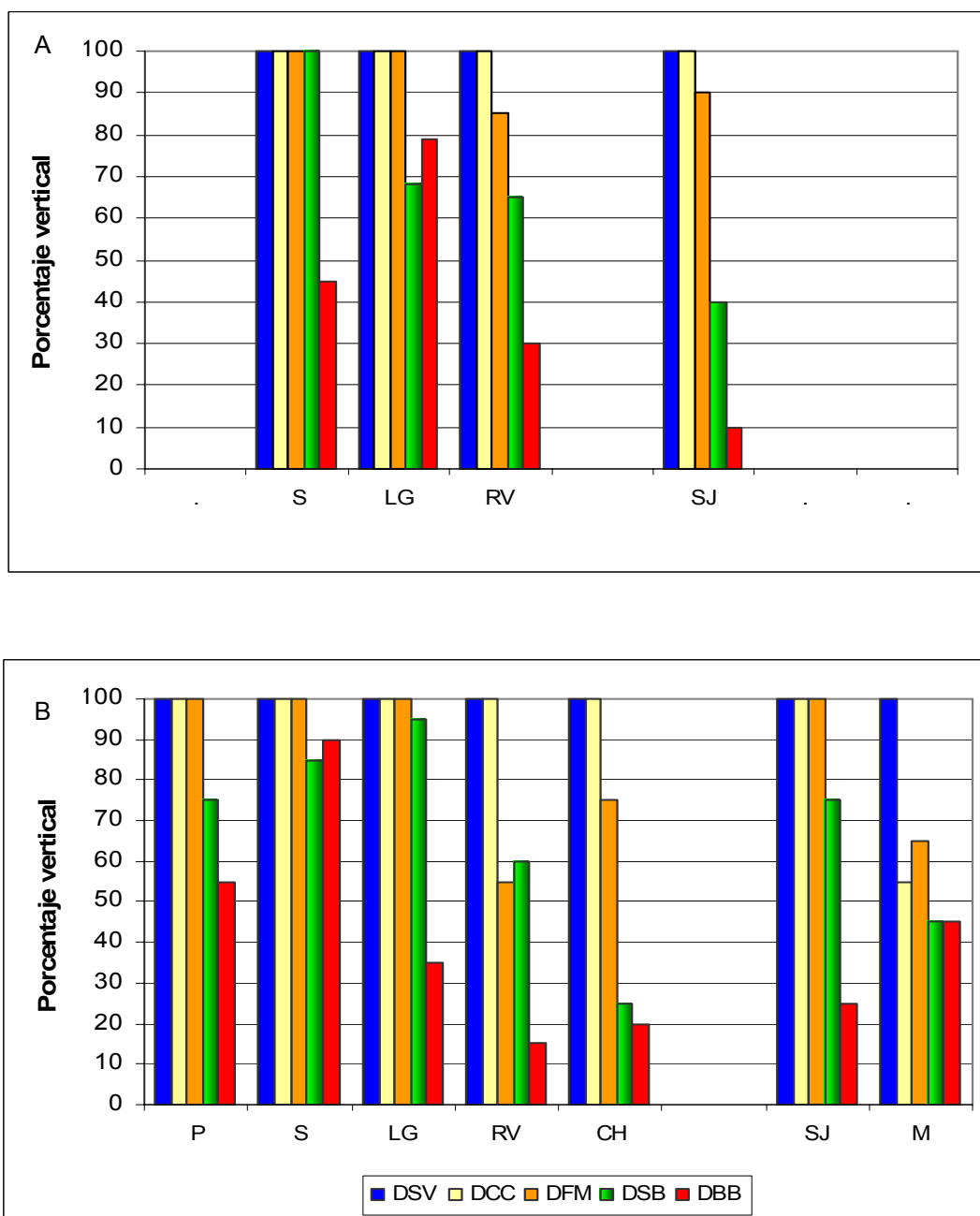


Figura 21. Porcentaje vertical de los subgrupos de BSR en las laguna del area de estudio (A época húmeda y B época seca). *Desulfovibrio* (DSV), *Desulfococcus* (DCC), *Desulfotomaculum* (DFM), *Desulfobacter* (DSB), *Desulfobulbus* (DBB). Pinky (P), Salina (S), La Granja (LG), Río Viejo (RV), Chitiwara (CH), San Juan (SJ) y Moa (M).

5.8.4. Análisis de porcentaje horizontal de BSR en el perfil en profundidad

El porcentaje horizontal de las BSR a lo largo del perfil en profundidad fue mayor en las lagunas meandricas cercanas al río (Pinky, Salina y La Granja) alcanzando entre 80%-100%, en relación a las lagunas meandricas alejadas del río (Río viejo y Chitiwara) donde se observaron porcentajes horizontales de 60% a 100% y también en relación a las lagunas de tierra firme (20%-100%) tanto en la época húmeda y seca (Figura 22a-g).

El porcentaje horizontal decrece en función a la profundidad de los sedimentos (Figura 22). En general, se observó que existe mayor porcentaje horizontal de los subgrupos de BSR en los primeros 2 a 3 cm. de profundidad. El porcentaje horizontal en estos estratos es mayor (80%-100%) en las lagunas meándricas cercanas al río (Pinky, Salina y La Granja).

A estratos más profundos tres subgrupos: DFM, DSB y DBB mostraron, diferencias, siendo DBB el más variable (Figuras 19 y 20). La zona de declive se observó entre los 3.5 cm. a 5.5 cm. de profundidad.

El decremento del porcentaje horizontal de las BSR en profundidad en las lagunas Pinky, Salina y La Granja fue de un 20% a 40% (Figuras 22a, 22b y 22c). En contraste, en las lagunas Río Viejo y Chitiwara, se observó una disminución que alcanza un 60% (Figuras 22d y 22e). Mientras que en las lagunas San Juan y Moa se alcanzó una reducción del porcentaje horizontal entre un 40% y 80%, respectivamente (Figura 22f y 22g).

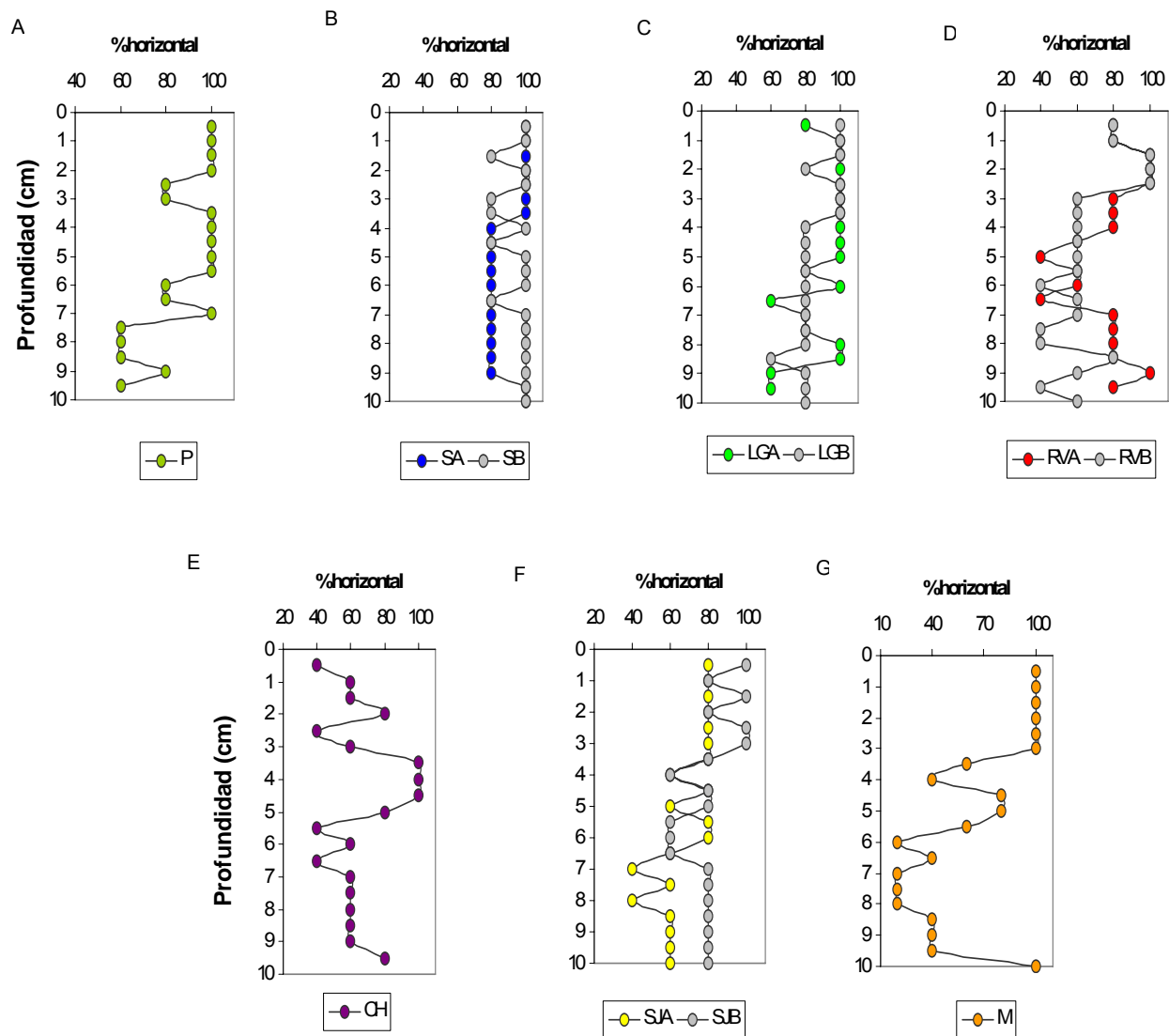


Figura 22. Porcentaje horizontal de los subgrupos de BSR en lagunas de inundación. (A época húmeda y B época seca). Pinky (P), Salina (S), La Granja (LG), Río Viejo (RV), Chitiwara (CH), San Juan (SJ) y Moa (M).

6. DISCUSIÓN

6.1. Extracción de ácidos nucleicos de las muestras sedimentarias

En este trabajo, por el método de Zhou (Zhou et al., 1996) utilizado para la extracción de DNA a partir de sedimentos, se obtuvo cantidades de DNA (200 a 800 ng de DNA/g de sedimento) para las diferentes lagunas y perfiles de profundidad, a pesar de que éstas presentan diferentes características físico-geoquímicas. Asimismo, el DNA extraído con el método de Zhou, proporciona un tratamiento suave en la recuperación de DNA, permitiendo la obtención de un fragmento de DNA no fraccionado, de aproximadamente 23000 pb. Resultados similares fueron obtenidos en los trabajos realizados por Luna (2004) y Arteaga (2004) en sedimentos de la misma región de estudio.

La turbidez y el color de los extractos de DNA obtenido, fueron indicadores generales de la pureza del DNA libre de sustancias húmicas y permitió una comparación cualitativa de los métodos de extracción y purificación del DNA, tanto de las lagunas meándricas como de las de tierra firme. Por otro lado, el extracto de DNA obtenido fue cuantificado comparando la intensidad de brillo por electroforesis en geles de agarosa, en presencia de bromuro de etidio con un estándar de referencia. Si bien, las concentraciones de DNA de los sedimentos de las lagunas meándricas y de tierra firme han sido diferentes, esto podría deberse a diferentes proporciones de comunidades microbianas así como a las diferencias existentes en los tipos de sedimento, encontrándose en estos diferente concentración de carbono orgánico, calidad de materia orgánica, densidad, pH y Eh los cuales podrían haber influido en la recuperación del DNA, como se ha demostrado en otros estudios (Leff et al., 1995; Zhou et al., 1996; Weinbauer et al., 2002). Si se encuentran sustancias húmicas en elevadas concentraciones, éstas pueden interferir con la corrida electroforética del DNA y por tanto con su cuantificación. Asimismo, el DNA fue evaluado en función de los factores de dilución utilizados para la amplificación de los genes 16S RNAr y DSR por PCR. Este método, ha sido utilizado por Weinbauer et al. (2002) para investigar la cantidad de contaminantes que interfieren con el PCR en muestras ambientales.

Sin embargo, el método de extracción utilizado no elimina completamente las sustancias húmicas presentes en las muestras analizadas, lo que podría interferir con las pruebas posteriores. De tal manera, aquellas muestras obtenidas de estratos altamente contaminados con ácidos húmicos, fueron procesadas por un método de extracción y purificación más eficiente, como lo es el UltraClean Soil DNA Isolation Kit de MoBio (www.mobio.com; MoBio Inc.). Este método mostró ser menos efectivo para la lisis que el método de Zhou, pero fue más eficaz para la purificación del DNA obtenido. La calidad de DNA extraído consiguió compensar la cantidad extraída por el método de Zhou, debido a que el factor de dilución del DNA necesario para la reacción de PCR fue entre tres a cuatro veces menor. Se utilizaron también para la purificación del DNA, columnas de purificación de sefarosa (S-400 HR) (www.Pharmacia.com) (Colin et al., 1997), que permitieron utilizar el DNA eluído en los sistemas de PCR a diluciones de 1:50 a 1:200, similar

a las columnas del Kit de MoBio. En este trabajo, no se evaluó la repetibilidad de los resultados de extracción y purificación de DNA de las muestras de sedimentos obtenidas de las diferentes lagunas de inundación.

Es necesario puntualizar que para la extracción de DNA de muestras ambientales, ninguno de los métodos de extracción descritos hasta ahora asegura una eficiencia total de extracción para todos los grupos bacterianos analizados (Zhou et al., 1996; Weinbauer et al., 2002). Leff et al. (1995) observó que el rendimiento del DNA obtenido, varía con el método de extracción. Esto muestra las falencias de los análisis de diversidad bacteriana basados en pruebas moleculares. Por ejemplo, las bacterias gram-positivas forman estructuras difíciles de romper, en comparación a las bacterias gram-negativas (Weinbauer et al., 2002). En el trabajo de Zhou et al. (1996), se evalúa la recuperación de DNA tanto de bacterias gram-negativas como de gram-positivas. Por ejemplo, la recuperación de DNA de bacterias gram-negativas fue de un 92% a 99% y la extracción mostró una eficiencia variable de lisis celular (26% a 92%).

Los métodos tradicionales de cultivo permiten el aislamiento bacteriano de únicamente el 1% del total de la comunidad microbiana a partir de muestras ambientales (Amann et al., 1995; Hurst et al., 1997). El surgimiento de la biología molecular ha permitido una descripción más completa de las comunidades microbianas en el medio ambiente. Las técnicas moleculares incluyen, entre otras, la extracción, hibridización, amplificación o clonación y secuenciación de ácidos nucleicos (Weisburg et al., 1991; Leff et al., 1995; Zhou et al., 1996; Kuske et al. 1997). Muchos estudios documentan la extracción y obtención de ácidos nucleicos de bacterias presentes en sedimentos, en los cuales se realizó la identificación de bacterias que no habían logrado cultivarse (Hurt et al., 2001; Martin-Laurent et al., 2001; Weinbauer et al., 2002). Sin embargo, una serie de limitantes en ambientes naturales hace difícil la estandarización de un método universal de análisis (Leff et al., 1995; Zhou et al., 1996; Kuske et al., 1997; Weinbauer et al., 2002).

6.2. Consideraciones metodológicas de la identificación de subgrupos BSR

El gen 16S RNAr fue detectado en todos los perfiles y estratos de profundidad de las lagunas meándricas y de tierra firme en las dos épocas de estudio, esto era predecible ya que se utilizó cebadores del gen 16S RNAr, que identifican a la mayor cantidad de miembros de eubacteria (Weisburg et al., 1991). La detección y caracterización del gen 16S RNAr en muestras ambientales permite realizar estimaciones de la diversidad microbiana pertenecientes a eubacteria (Voordouw et al., 1996; Werner et al., 1998; Edgcomb et al., 1999) y el análisis filogenético de las comunidades existentes (Weisburg et al., 1991; Macrae et al., 2000; Rosselló-Mora et al., 2001).

La amplificación de DNA por PCR depende de la pureza, integridad y cantidad del extracto obtenido (Hurt et al., 2001). La identificación de la distribución de comunidades bacteriana por el método de PCR presenta limitaciones y sesgos. Por un lado se debe considerar el margen de sensibilidad del método, el cual podría ser interferido por los contaminantes presentes en los ambientes estudiados (como ácidos húmicos y metales) (Jae-Chang Cho et al., 1996; Hurt et al 2001). Por otro lado, es necesario también considerar las limitaciones del método en cuanto a especificidad en ambientes no muy estudiados como la amazonía boliviana donde no se tiene suficiente información sobre la diversidad microbiana existente. Un estudio realizado por Borneman et al. (1997) encontró que el 100% de las secuencias en los suelos de la Amazonía eran nuevas y algunas tan distintas que no lograron ser asociadas a ningún reino bacteriano conocido.

En este estudio, el PCR anidado fue elegido para facilitar la identificación de BSR a partir de la amplificación de regiones del gen de 16S RNAr específicas de subgrupos de BSR. Entre las ventajas de este método se podría mencionar el uso de cebadores específicos los cuales aumentarían la especificidad y sensibilidad permitiendo detectar subgrupos de BSR que pueden estar presentes en proporciones menores.

Las desventajas de utilizar el PCR anidado, podrían estar relacionadas a la amplificación preferencial de un segmento en particular. Este fenómeno generalmente está asociado al tamaño de los fragmentos y al contenido GC de las secuencias produciéndose un sesgo hacia la amplificación preferencial de segmentos de menor tamaño (Suzuki, M. y Giovannoni, S., 1996) y de bajo contenido de GC. Asimismo, los productos primarios amplificados podrían estar presentes en diferentes concentraciones y las secuencias menos abundantes presentarían mayor sesgo en la segunda amplificación (Eichner et al., 1999; Boon et al., 2002). Debido a estas consideraciones, el índice de la diversidad de BSR representativo de la presencia de los subgrupos de BSR se debe interpretar como solamente una medida cualitativa y no como un indicador del grado extensivo de diversidad en una comunidad bacteriana.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican la presencia de cinco subgrupos de BSR (*Desulfovibrio*, *Desulfococcus*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus* y *Desulfobacter*) presentes en los perfiles sedimentarios de lagunas meándricas y de tierra firme, mostrando que estos ambientes sedimentarios son aptos para el desarrollo de esta comunidad bacteriana y donde probablemente cumplen una importante función.

Daly et al. (2000), determino las secuencias de los subgrupos de BSR confrontándolas con las secuencias disponibles en la base de datos "Ribosomal Database Project" (RPD) y una serie de cepas de referencia, que incluía tanto bacterias sulfato reductoras como otros grupos cercanos. Sin embargo, es necesario además considerar, que los resultados obtenidos en la amplificación del 16S DNAr podrían no reflejar estrictamente la composición real cualitativa de

subgrupos de BSR en los sedimentos del estudio, no solo por los sesgos del PCR anidado sino también a que los cebadores utilizados para la amplificación de los subgrupos de BSR no fueron diseñados para secuencias de BSR de la región y podrían presentarse falsos negativos como positivos. Finalmente, la distribución de subgrupos de BSR, podría estar limitada a la cobertura de detección del número de especies de BSR por los cebadores utilizados en el PCR anidado.

6.3. Distribución de los subgrupos BSR en los sedimentos de las lagunas meándricas y de tierra firme

El porcentaje total de los subgrupos de BSR obtenido en este estudio es indicativo de la relativa diversidad de los subgrupos analizados (presencia y/o ausencia), pero no refleja la cantidad de bacterias presentes dentro de cada subgrupo debido a las limitaciones del método utilizado el cual no es de carácter cuantitativo. Diferentes estudios han empleado sondas oligonucleotídicas para la identificación y cuantificación de los subgrupos de BSR, mostrando la distribución de los subgrupos de BSR en sedimentos (Okabe et al., 1999; Purdy et al., 2001; Purdy et al., 2002; Koizumi et al., 2003) por lo que, futuros estudios deberán evaluar la abundancia de los subgrupos de BSR en la zona de estudio por sistemas de hibridización u otros.

El porcentaje de diversidad total de los subgrupos de BSR mostró un perfil diferente para cada laguna, siendo las lagunas más jóvenes y cercanas al río (Pinky, Salina y La Granja), las que presentaron una distribución más uniforme y con gran predominancia de subgrupos de BSR. Si bien estas diferencias no son significativas se podrían deber al flujo de microelementos (como el sulfato) y/o sustratos (como el lactato, acetato y otros) disponibles en las lagunas, por la subida del río en la época de inundación; los cuales podrían servir de nutrientes para el desarrollo bacteriano, en contraste a las lagunas alejadas del río (Río Viejo y Chitiwara) y de tierra firme (San Juan y Moa). Con relación al sulfato, se ha observado que la concentración de éste es mayor en las lagunas más cercanas al río (Salina, La Granja, Río Viejo y San Juan) (comunicación personal, datos sin publicar Alanoca) y por lo tanto este podría ser un factor muy importante que regula la distribución de BSR en estos ecosistemas. Otros estudios corroboran la utilización del sulfato (Orphan et al., 2001) y de lactato, acetato, propionato y butirato (Purdy et al., 2002) en muestras sedimentarias.

La distribución de los subgrupos de BSR en las épocas de muestreo (húmeda y seca) muestra diferencias debidas a los subgrupos DSB y DBB (Salina y La Granja) además de DFM (Río Viejo y San Juan). Esto indicaría que estos subgrupos son más sensibles a los cambios estacionales.

Sin embargo, se enfatiza nuevamente en las limitaciones y sesgos del método de PCR para poder evaluar diferencias en la distribución estratificada en ambas épocas. Varios estudios han mostrado la variación estacional de las BSR en

diferentes ecosistemas (Li Jian-hua, et al., 1999; Smit et al., 2001). Asimismo, un estudio realizado por MacGregor et al. (2001) en sedimentos del lago Michigan determino que la variabilidad estacional y espacial del RNAr en muestras sedimentarias son influenciadas por la subida del agua durante la época de lluvias.

El número de subgrupos de BSR detectados, mostró una disminución a lo largo del perfil en los diferentes estratos sedimentarios tanto de las lagunas meándricas y de tierra firme. Esto podría deberse a que en los primeros centímetros de profundidad existe una concentración mayor de sustratos necesarios para el desarrollo de las comunidades bacterianas y que posiblemente a mayor profundidad, exista mayor competencia entre BSR y otras comunidades microbianas por sustratos limitados para su desarrollo (metanogénicas y acetogénicas) (Raskin et al., 1996; Krumholz et al., 1999; Vidal et al., 1999). Un estudio realizado por Li Jian-hua et al. (1999) observo la variación estacional de las BSR determinando que la mayor abundancia relativa se encuentra entre los 3 primeros centímetros de profundidad y que esta disminuye a mayor profundidad.

La distribución estratificada de los subgrupos de BSR con la profundidad podría en parte reflejar la disponibilidad y utilización de donadores de electrones. Por otro lado, la diversidad de los subgrupos de BSR no sigue un gradiente de oxidoreducción característico encontrándose subgrupos de BSR a diferentes valores de Eh en las diferentes lagunas, si bien la mayor diversidad de BSR en los primeros centímetros de profundidad coinciden en general con valores de Eh oxidativos. Un estudio realizado por Fortín et al. (2000) reportó la distribución de BSR en ambientes oxidados en muestras sedimentarias de minas, observándose la adaptabilidad de las BSR en estos ambientes. Por otro lado, otro estudio realizado por Koizumi et al. (2003) en un sedimento del lago Biwa de agua dulce, mostró que las BSR se desarrollan en un ambiente oxidado y su distribución disminuye en un ambiente reducido.

Asimismo, hay que tomar en cuenta que la estructura de la comunidad de BSR de los puntos centrales de las lagunas podría variar con respecto a otras zonas de las mismas lagunas, como es el caso de la zona litoral, donde se encuentran, por lo general, diferentes especies de macrofitas. Un estudio realizado por Luna (2004) ha determinado una composición diferente de las BSR en tres lugares (parte central de la laguna, debajo de macrofitas y bosque inundado) en la laguna La Granja, obteniendo como resultado una distribución vertical irregular en la parte central y más regular debajo las macrofitas y bosque inundado.

Los subgrupos de BSR están en diferentes ambientes naturales como suelos (Fortin et al., 1996), sedimentos (Werner et al., 1998), ambientes estuarinos y de agua dulce (Li Jian-hua et al., 1999; Ravenschalag et al., 2000). Estos estudios sumados al presente trabajo muestran que las BSR tienen amplia capacidad de desarrollo y adaptación a diferentes condiciones ambientales. Por otra parte, la diversidad de subgrupos de BSR encontrada en las lagunas meándricas y de tierra firme reflejan que los subgrupos de BSR presentan una marcada flexibilidad para adaptarse a diferentes condiciones de pH y Eh en cada uno de los perfiles

sedimentarios, mostrando un panorama general de cada microcosmos sedimentario de las lagunas estudiadas. Fortín et al. (2000) y Purdy et al. (2002) observaron también la distribución de BSR en diferentes condiciones fisicoquímicas usando sondas oligonucleotídicas. En el presente trabajo sin embargo se debe considerar las limitaciones de la información provenientes del PCR anidado, por lo que otras aproximaciones experimentales (hibridización u otros) podrán reflejar asociaciones más precisas con las variantes fisicoquímicas.

6.3.1. Detección de la familia *Desulfovibrionaceae*

El subgrupo de BSR que fue encontrado mayoritariamente y no presenta una dependencia estricta a valores de Eh reducido como se creía anteriormente (Barton, 1995) en todos los sedimentos pertenece a la familia de *Desulfovibrionaceae*, el cual contiene mayor cantidad de especies en relación a otros subgrupos. Asimismo, la cantidad de especies de *Desulfovibrio* detectadas mediante los cebadores utilizados es mayor a las de cualquier otro subgrupo de BSR (Daly et al., 2000). Sin embargo, los cebadores empleados también detectan el 16S DNAr de *Desulfomicrobium* (Daly et al., 2000). Se debe considerar también que los cebadores utilizados para la detección del subgrupo de *Desulfovibrio* son los más degenerados. Esta podría explicar porque se encontró en todos los estratos al subgrupo de *Desulfovibrio* en las muestras de sedimentos de las lagunas estudiadas y probablemente la presencia de falsos positivos como negativos.

Diferentes estudios muestran que *Desulfovibrio* es muy versátil y ha sido localizado en diversos ambientes y con variadas relaciones simbióticas con otras comunidades bacterianas (metanogénicas y acetogénicas) (Purdy et al., 2001; Purdy et al., 2002). Además, existen reportes que destacan la posibilidad de que *Desulfovibrio* podrían resistir condiciones marcadamente aerobias (Sigalevich et al., 2000c; Annweiler et al., 2001). Una característica, de estos microorganismos es que realizan una oxidación incompleta del lactato (Steger et al., 2002) y acetato (Yu et al., 2001). Asimismo, utilizan solamente algunos ácidos orgánicos simples (Qatibi, et al., 1998), el hidrógeno y en algunos casos el etanol como donadores de electrones (Haveman et al., 2003). La familia *Desulfovibrionaceae* detectada en los perfiles de profundidad podría utilizar estos substratos como fuente de energía para su crecimiento.

6.3.2. Detección de la familia *Desulfobacteriaceae*

El segundo subgrupo de BSR más comúnmente detectado fue *Desulfococcus* presente en todos los estratos analizados, excepto en la laguna Moa (5.5 a 9.5 cm.) en este intervalo se observaron condiciones muy reducidas que podrían haber afectado a su desarrollo. Los cebadores utilizados para la identificación de este subgrupo de BSR no se limitan a la detección de *Desulfococcus*, sino también

de *Desulfonema-Desulfosarcina*. Esta podría ser una de las razones por la que este subgrupo este mayoritariamente distribuido en estos sedimentos. Este subgrupo utiliza sustratos como el etanol, lactato y acetato para su desarrollo (Devereux et al., 1989). *Desulfococcus* y *Desulfosarcina* están cercanamente emparentados entre si y comparten características fisiológicas y ecológicas. Para diferenciar estos dos géneros, frecuentemente es necesaria la secuenciación del gen 16S RNAr (Daly et al., 2000).

Desulfotomaculum, se encuentra ocupando el tercer lugar en distribución en las lagunas analizadas. Por lo general se ha observado su ausencia en estratos entre 4.5 cm. y 6-8 cm. de profundidad en las lagunas Río Viejo y Moa. Este subgrupo se encuentra comúnmente en ambientes de agua dulce (Stubner y Meuser, 2000; Smit et al., 2001). *Desulfotomaculum* es capaz de utilizar lactato (Imach et al., 2000; Londry and Des Marais, 2003) y acetato para su desarrollo y tiene una gran variabilidad (Chi-Li Liu and Peck, 1981; Londry et al., 2004). Su capacidad para formar esporas le permite sobrevivir mejor que otras BSR a la desecación y oxigenación del medio (Detmers et al., 2001), detectándose en ambientes aerobios y anaerobios, donde se ve sometido a cambios cíclicos en el medio ambiente (Scheid et al., 2001; Smit et al., 2001).

El subgrupo de *Desulfobacter* fue el cuarto en cuanto a su distribución y al igual que *Desulfobulbus*, el género *Desulfobacter* es encontrado en ambientes de agua dulce (Purdy et al., 2001; Purdy et al., 2002). No obstante, también se lo ha aislado en ambientes marinos (Ravenschalag et al., 2000). Entre los sustratos utilizados por este subgrupo se encuentran el acetato y etanol (Devereux et al., 1989). Al parecer, esta podría ser una de las razones por la que este subgrupo de BSR se encontrara en menor distribución en los sedimentos, ya que el acetato es uno de los sustratos utilizados también por *Desulfovibrio*, *Desulfococcus* y *Desulfotomaculum*.

El subgrupo *Desulfobulbus* fue el quinto en cuanto a su distribución. Un trabajo realizado por Ito et al. (2002) en biofilms en sedimentos determino que la abundancia y actividad era semejante en las zonas aerobias como anaerobias. La distribución de este subgrupo en zonas aerobias se debería a que tendría la capacidad de utilizar enzimas que capturen al oxígeno como las catalasas y esto favorecería a su sobrevivencia en ambientes con oxígeno. Sin embargo, *Desulfobulbus* en las lagunas cercanas al río se presenta generalmente hasta los 3-4 cm. de profundidad. En contraste a las lagunas alejadas del río donde *Desulfobulbus* está ausente en los primeros centímetros de profundidad (Río Viejo, San Juan y Chitiwara). Asimismo, la estrecha distribución del subgrupo *Desulfobulbus* en los sedimentos, se podría deber a que utiliza sustratos específicos como el lactato y etanol como fuente de energía para su desarrollo (Devereux et al., 1989). Sin embargo, otros estudios han revelado la existencia de BSR como *Desulfobacter*, *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus* donde la mayor actividad se realiza en los primeros micrometros de profundidad en los sedimentos y posiblemente en condiciones aerotolerantes (Okabe et al., 1999).

El subgrupo *Desulfobacterium* no fue detectado en ninguna muestra de los sedimentos analizados. Como lo señalan varios autores, las especies de *Desulfobacterium* han sido principalmente detectadas en ambientes marinos o salinos (Devereux 1996; Purdy et al., 2001; Purdy et al., 2002). Adicionalmente el subgrupo parece no tolerar condiciones aerobias para su desarrollo.

6.4. Detección de bacterias sulfato reductoras por gen bisulfito reductasa disimilatoria (DSR)

Para poder respaldar los resultados obtenidos con el gen 16S RNAr de los subgrupos de BSR se utilizó el gen bisulfito reductasa disimilatoria (DSR) en los mismos perfiles de profundidad de los sedimentos de las lagunas meándricas y de tierra firme, obteniéndose como resultado la amplificación de este gen en todos los puntos de muestreo de las lagunas estudiadas; verificando la presencia de microorganismos sulfato reductores, mediante el gen responsable de la actividad metabólica de la sulfato reducción.

El gen bisulfito reductasa disimilatoria sirve para la caracterización fisiológica de las BSR (Steuber et al., 1995). Asimismo, también se ha utilizado para la determinación de su filogenia (Wagner et al., 1998; Joulain et al., 2001; Larsen et al., 2001) y diversidad bacteriana en muestras ambientales (Cottrell et al., 1999; Minz et al., 1999; Perez-Jiménez et al., 2001). Futuros trabajos podrían utilizar este sistema de PCR como base para estudios de secuenciación y otros.

6.5. Geoquímica del Hg y MeHg en los sedimentos. Tasas de metilación y distribución de Bacterias Sulfato Reductoras

6.5.1. Distribución del Hg en los sedimentos

Los resultados obtenidos en este estudio indican que la concentración de mercurio tanto en las lagunas meándricas y de tierra firme es menor a los 80 ng/g de sedimento, encontrándose una mayor concentración en los primeros centímetros de profundidad. La deposición del mercurio en un área dada depende del mercurio emitido de fuentes locales, regionales o globales (EPA, 2004b). La concentración de Hg en la región de estudio podría estar atribuida a la sedimentación del lugar y a la ubicación fisicogeográfica de cada laguna. Asimismo, podría tener origen natural (actividad volcánica) como antropogénico (actividad aurífera y deforestación). Un estudio realizado por Maurice Bourgoïn (2001) en la región de Rurrenabaque indica que el mercurio es liberado durante la época de lluvia, desde las cabeceras andinas hasta la llanura amazónica donde es depositado en los hidrosistemas de la región, principalmente durante la estación húmeda.

Pese a que las concentraciones de Hg en todas las lagunas del estudio presentaron poca variación (55 a 73 ng/g), éstas están correlacionadas con la acumulación de materia orgánica. La laguna San Juan (tierra firme) presentó la

mayor correlación entre el Hg y la materia orgánica ($r^2=0.84$). Esto se podría deber a la afinidad del Hg por esta última (Roulet et al., 2004). La relación entre la materia orgánica y el Hg se ha encontrado en otros trabajos (Rasmussen et al., 1998; Roulet et al., 1998b; Matilainen et al., 2001). Se conoce que el Hg forma complejos estables (que dependen de la motilidad) con ácidos húmicos, aminoácidos y ácidos hidroxicarboxílicos.

Asimismo, se observa diferencias de concentración del Hg con los sedimentos provenientes de otras regiones de la amazonía (tabla 4) (Roulet et al., 1995; Roulet et al., 1998a; Roulet et al., 2001). Por ejemplo, en las lagunas Piranga, Enseada Grande y Jutuarana del Brasil el Hg en promedio es 3 veces mayor que en las lagunas Salinas, La Granja, Río Viejo y San Juan.

En la amazonía, el mercurio se ha acumulado a través del tiempo. En las últimas décadas diferentes zonas de la amazonía han sido objeto de colonizaciones sucesivas (Roulet et al., 1999; Mauro et al., 1999). Esta actividad implica el desmonte de grandes extensiones de bosques amazónicos, quedando por tanto, el suelo expuesto, lo que ha causado un aumento en la liberación de mercurio. Por otro lado, las lluvias arrastran al mercurio hacia las redes fluviales distribuyéndolo por toda la zona. En Bolivia, diferentes regiones a lo largo de la cuenca del río Beni mostrarían diferencias. En el río Zongo localizado debajo de la cordillera de La Paz y la cordillera Real, la concentración de Hg es de 1ng/g; encontrándose una mayor concentración de Hg en el río Beni (22-210 ng/g) (Tabla 4) (Maurice Bourgoïn, 2001). Otros ecosistemas naturales en diversos lugares muestran una amplia variación en la concentración de Hg (Tabla 4) (Hurley et al., 1995; Hurley et al., 1998; Macalady et al., 2000).

Tabla 4. Concentraciones de Hg y MeHg y porcentaje MeHg en diferentes tipos de sedimentos y suelos de inundación

Lugar	Hg ng/g	MeHg ng/g	% MeHg	Referencia
Lago Onondaga, USA	1008-49000	3.7-10.6	0.2-0.5	Hurley et al., 1995 ^a
Norte de Québec				Bégin, 1998 ^a
Turba			1-15	
horizonte orgánico			5-40	
horizonte mineral			<1	
Río Fox, Wisconsin, USA	970	6.8	0.7	Hurley et al., 1998 ^a
Lago Clear, California, USA	34000	7	0.0002	Macalady et al., 2000
Bosque de pinos Scots, Finlandia				Matilainen et al., 2001
Suelo fertilizado			0.092	
Incremento en la precipitación			0.072	
Incremento en la acidez			0.076	
Suelos Árticos		0.065		Loseto et al., 2004
Suelos de inundación Guiana Francesa				Roulet y Lucotte, 1995
Horizonte orgánico	103-172	2.7-29.3	2.4-19.3	
Horizonte mineral	152-197	0.6-2.5	0.3-1.6	
Río Tapajós, Brazil	210			Roulet et al., 1998a
Sedimentos amazónicos debajo de macrofitas		0.5		Roulet et al. 2001
Suelo semi-igapó		0.2-1.4		
Suelo igapó		0.2-3		
Río Madera, Bolivia	40	4-8		Malm, 1995 ^b
Río Beni, Bolivia	22-210			Maurice Bourgoïn, 2001
Río Zongo, Bolivia	1			

^a datos obtenidos del artículo de Roulet et al., 2001

^b dato obtenido del trabajo de Maurice Bourgoïn, 2001

6.5.2. Tasas de metilación en la interfase de los sedimentos

Es importante considerar que las tasas de metilación analizadas reflejan las tasas relativas de ambos procesos metilación y desmetilación en dinámico equilibrio, por lo que las tasas de metilación encontradas en las diferentes lagunas también podrían reflejar diferencias en uno y otro proceso.

En las lagunas meándricas, las tasas de metilación del Hg en la interfase aumentan según la secuencia de edad de las lagunas en orden creciente de 0.2% a 12.3%. Este incremento coincide con el enriquecimiento en carbono y cambio de la calidad del material orgánico en los sedimentos. La relación del potencial de la metilación del mercurio en la interfase, con el porcentaje de carbono de los sedimentos, destaca la importancia de la actividad heterotrófica para la metilación del mercurio en estos ambientes. La relación entre las tasas de metilación del

mercurio y el porcentaje de carbón en sedimentos también se ha observado en un estudio realizado por Guimarães et al. (2000b) en la amazonía brasileña. Por otra parte, en las lagunas meándricas, se observa también que las tasas de metilación estarían relacionadas al grado de eutrofización de éstas. La eutrofización incrementaría la extensión de zonas anaerobias, que podrían favorecer al desarrollo de BSR y consecuentemente, al potencial de metilación.

Entre los factores que podrían influir en la producción de MeHg, es importante considerar la concentración de sulfatos y/o sulfuros. En ambientes con alta concentración de sulfato se promueve por una parte el desarrollo de las BSR, pero a su vez se genera sulfuro de hidrogeno en cantidades que inhiben la producción de MeHg. A bajas concentraciones de sulfuro, la producción de MeHg esta linealmente relacionada con la concentración de Hg inorgánico biodisponible. Se ha observado que existe una correlación entre la presencia de Hg inorgánico, soluble y la concentración de sulfuros en el agua, en un cierto rango desde 96 mg/L (10^{-6} M) a 0.096 mg/L (10^{-3} M) (Benoit et al., 2001; Jay et al., 2002). Otro estudio realizado por King et al. (2000), ha demostrado que la metilación del Hg se presenta en ambientes que contienen concentraciones de sulfatos a nivel milimolar. De esta manera bajas concentraciones de sulfuro o sulfato podrían incrementar la biodisponibilidad del Hg.

Asimismo, el incremento de sulfuros estaría relacionado al incremento de las concentraciones de MeHg en el agua. Bajo condiciones de alta concentración de sulfuros (mayores al nivel micromolar), se favorecería la formación de complejos insolubles del Hg. Las concentraciones crecientes de sulfatos (1.8 mg/L a 26.7 mg/L) (Tabla 1) encontradas en las lagunas meándricas en relación a su proximidad con el río, tendrían efecto en la química de los sedimentos y a nivel microbiano favoreciendo potencialmente el crecimiento de las poblaciones de BSR, generando un incremento general de la sulfato reducción lo que a su vez potenciaría la producción de MeHg. Al respecto, las tasas de metilación encontradas en las lagunas meándricas podrían reflejar este efecto, sumado al de la calidad de materia orgánica, donde se encontró concentraciones de carbono en el agua entre 1.8 mg/L a 25.7 mg/L. A su vez, la baja tasa de metilación encontrada en la laguna San Juan pese a su alto contenido orgánico podría estar asociada a la baja concentración de sulfatos (0.06 mg/L) (Tabla 1), la cual no favorecería el desarrollo de las BSR sobre otras poblaciones microbianas. Al respecto, en esta laguna se observa un porcentaje de diversidad horizontal en la interfase de 80%, valor menor al observado en las lagunas meándricas.

Otras condiciones óptimas para la formación del MeHg en las lagunas, estarían relacionadas por una parte a diferentes factores fisicoquímicos y geoquímicos que influyen en la disponibilidad del Hg para la metilación en la forma de HgS soluble, las condiciones específicas (pH, Eh y concentración de sulfuro) que la metilación requiere así como las interacciones del MeHg con el tipo de materia orgánica que determinarían su acumulación o distribución hacia otros ambientes (motilidad, descargue al agua, etc.). Estos factores podrían ser diferentes en las lagunas analizadas enfatizando la complejidad de cada uno de estos procesos.

El efecto de acidificación en los sedimentos es un factor importante involucrado en la metilación del Hg (Compeau et al., 1984; Steffan et al., 1988; Pak et al., 1998). Un estudio realizado por Steffan et al. (1998) ha determinado que la acidificación (pH 6,1 a 4.5) inhibe la metilación del mercurio en un 65%, encontrándose que a un pH neutro existe una mayor formación de MeHg. Las condiciones ambientales como un Eh oxidativo podrían ser favorables en la producción del MeHg en laguna La Granja. Estudios realizados por Word et al. (1980) mostraron que en muestras acuáticas, el Eh oxidativo favorece la metilación del Hg⁺². Sin embargo, estudios realizados por Compeau y Bartha en el 1984, mencionan que los efectos del potencial redox (Eh) en la metilación del Hg⁺² son favorables a Eh -220 mV. Las tasas de metilación en la laguna San Juan (tierra firme) que contiene una cantidad elevada de carbono en la superficie de los sedimentos fue muy baja (0.4%) en comparación a las lagunas meándricas, En esta laguna, el alto contenido de materia orgánica podría interaccionar en complejos químicos con Hg afectando su disponibilidad para la metilación. Asimismo, se observó que el pH de esta laguna sobre todo en los primeros 3 centímetros es ácido (pH 5.9) y podría tener algún efecto sobre la tasa de metilación encontrada.

Por otra parte, la relación entre Me²⁰³Hg/MeHg, puede reflejar el “turnover” del MeHg. En la interfase sedimentaria de las lagunas meándricas, el “turnover” aumenta según la evolución temporal de las lagunas alcanzando valores mayores en la laguna Río Viejo. A pesar de tener concentraciones de MeHg similares a la laguna La Granja, la laguna San Juan tiene el “turnover” mas bajo de las lagunas estudiadas. En esta laguna, la acumulación de MeHg probablemente esta relacionada con la cantidad de material orgánico, sin observarse una producción activa de metilmercurio.

Otro aspecto a considerar estaria relacionado a la concentración de las partículas en suspensión. donde ésta decrecen en función a la edad y distribución, de las lagunas, encontrándose en las lagunas meándricas valores de 8 mg/L a 130 mg/L (Tabla 1) que son mayores a los de la laguna San Juan (<5 mg/L).

En el análisis de las lagunas en su conjunto, no se observó por lo tanto relación entre las tasas de metilación y el patrón espacial de la distribución de MeHg. Esto sugeriría que la producción *in situ* de MeHg no refleja la concentración de MeHg por lo que ésta no sería el único factor determinante, observándose que la concentración de MeHg no es necesariamente análoga a la producción de MeHg. Esta relación es contraria a lo observado en un trabajo realizado por Cleckner et al. (1999).

Datos sobre la metilación de mercurio en Norte América y Europa (Devereux et al., 1996; Matilainen et al., 2001; Siliciano et al., 2002; Loseto et al., 2004) sugieren que la mayor parte de la metilación se daría en los sedimentos gracias a las condiciones reductoras y anaerobias que favorecerían al desarrollo de las BSR, consideradas como las principales responsables de la metilación del mercurio. No

obstante, estudios realizados en la amazonía muestran que los mayores niveles de metilación del mercurio se darían en la rizósfera de macrofitas flotantes, que habitan principalmente las lagunas y las llanuras de inundación de la cuenca amazónica (Guimarães et al., 2000; Mauro et al., 2001; Mauro et al., 2002). Así, otro lado, las tasas de metilación de los sedimentos de las lagunas (La Granja y Río Viejo) son mucho mayores a las encontradas en las macrofitas de las mismas lagunas (Miranda et al., 2004). Por otro lado, en el trabajo de Achá se observó que las tasas de metilación en la rizosfera de la macrofitas *Polygonum densiflorum* son 28% a 36% mayores a las encontradas en los sedimentos, mostrando las diferencias que existen en la región tanto en los sedimentos como en la fase semiacuática. Asimismo, un estudio realizado por Guimarães et al. (2000a) comparo la tasa de metilación del mercurio en la superficie de los sedimentos, suelos de inundación y raíces de macrofitas, en diferentes ríos y lagos en la amazonía encontrando que estos ambientes presentan diferente grado de metilación del mercurio tanto en las raíces de macrofitas (media 14%) y en los sedimentos (media 0.6%).

6.5.3. Distribución MeHg en los sedimentos

El análisis de la evolución ecológica de las lagunas de meandros y la influencia sobre el ciclo del Hg y su metilación es importante para la comparación con diferentes tipos de lagunas representativas de la llanura de inundación del Beni. Existen diferencias en las concentraciones de MeHg y/o los porcentajes de MeHg entre los sedimentos de las lagunas meándricas (Salina y Río Viejo) con el sedimento de la laguna de tierra firme (San Juan). A excepción de la laguna La Granja, los porcentajes de MeHg son en promedio 3 veces menores al porcentaje encontrado en San Juan. Si se considera que los porcentajes de MeHg encontrados en los sedimentos están en función de su producción, distribución y/o acumulación, son varios los factores que podrían afectar a los mismos.

El porcentaje de MeHg en la laguna San Juan, estaría tal vez asociada al estrato húmico de esta laguna, donde se encontró mayor concentración de carbono orgánico (10 veces más en relación a las lagunas meándricas) en los primeros centímetros de profundidad. La materia orgánica de laguna San Juan parece ser el factor más importante que conduce a la acumulación de MeHg en este ambiente sedimentario. Un estudio realizado por Yoon et al. (2004) determino la predilección del MeHg por las sustancias húmicas en muestras de suelos y ambientes acuáticos. El MeHg presenta mayor afinidad al radical sulfhídrico (-SH) y en segundo lugar al grupo carboxílico (-COOH) antes que a los grupos amino (-NH₂) y a otros grupos del azufre (-S- sulfuro), (-SS- disulfuro) y (polisulfuros -SSH o -SSSH). Asimismo, cuando el MeHg se une a los ácidos húmicos la unión permanece estable. Estas interacciones podrían influir en la disponibilidad del MeHg para la desmetilación y su tendencia a concentrarse en los sedimentos. Esta laguna además presentó un pH ácido, debido quizá a la cantidad de ácidos húmicos presentes en la misma.

Una correlación positiva entre el porcentaje de MeHg y el porcentaje de carbón en sedimentos también se ha observado en un estudio realizado por Roulet et al. (2001) en la amazonía brasileña. Otros estudios muestran que el porcentaje de MeHg es mayor en suelos y sedimentos orgánicos y decrece en sedimentos minerales (Tabla 4) (Roulet y Lucotte, 1995; Bejín et al., 1998; Matilainen et al., 2001; Roulet et al., 2001). Tanto, la geoquímica del material orgánico como la estructura física de los sedimentos parecen tener un papel importante en la distribución y acumulación del Hg y del MeHg dentro de cada perfil de sedimento de las lagunas de Rurrenabaque.

Para comparar los datos obtenidos en las lagunas del Beni con datos similares del río Tapajós en la Amazonía central, se ha reunido los promedios del Hg, MeHg y porcentaje de MeHg de los 5 primeros centímetros de las zonas centrales de las lagunas. Se observa que las concentraciones de Hg total en los sedimentos de la llanura del Beni son 2 hasta 4 veces más bajas que en los sedimentos de la llanura del río Tapajós (Tabla 5). Las concentraciones de MeHg en las lagunas del Beni están en general en el mismo orden de magnitud que las del río Tapajós, pero los porcentajes de MeHg son mayores en las lagunas del Beni (Tabla 5), esto reflejaría que éstas son un importante sitio para la producción y acumulación del MeHg (sobre todo en las lagunas La Granja y San Juan) en la cuenca.

Tabla 5. Promedios de las concentraciones de Hg, MeHg y del %MeHg integrados sobre los cinco primeros centímetros del perfil sedimentario

Laguna	Hg ng/g	MeHg ng/g	%MeHg
Salina	55	0,17	0,29
La Granja	73	0,96	1,26
Río Viejo	69	0,33	0,48
San Juan	57	0,77	1,28
Comparación con otro estudio (río Tajajós, Amazonia Brasileña)			
Piranga	237	0,49	0,24
Enseada Grande	192	0,08	0,08
Jutuarana	171	0,4	0,20

6.5.4. Hg, MeHg y distribución de las BSR en los sedimentos de las lagunas de inundación

Las concentraciones de Hg en las lagunas estudiadas, en contraste a las diferencias encontradas en la concentración de MeHg y en las tasas de metilación, sugiere que el Hg no sería necesariamente el factor que controla la metilación y la distribución del Hg en estos ecosistemas.

La mayor concentración Hg, MeHg, tasas de MeHg carbono orgánico y nitrógeno orgánico se encuentra entre los primeros 3 centímetros de profundidad tanto en la lagunas meándricas como de tierra firme. Por otra parte, en estos estratos se observó la mayor diversidad de subgrupos de BSR (Figura 22). Los subgrupos *Desulfovibrio*, *Desulfococcus*, *Desulfobacter* y *Desulfobulbus*, han sido identificados como subgrupos bacterianos importantes en la metilación del mercurio (Devereux et al., 1996; Pak y Bartha, 1998b; Macalady et al., 2000; King et al., 2000).

En la tabla 6 se presenta las diferencias observadas *in vitro* respecto a las capacidades de metilación de distintos géneros de BSR. *Desulfovibrio* ha sido identificado, en varios trabajos como uno de los principales metiladores de mercurio (Choi y Bartha, 1993; Devereux et al., 1996) y la presencia mayoritaria de este subgrupo de BSR podría reflejar su potencial en la metilación del mercurio en los sedimentos estudiados. El subgrupo *Desulfococcus* también está asociado con la producción de MeHg en sedimentos (King et al., 2001). Estudios realizados por King et al. (2000) han reportado que *Desulfobacter* está involucrado en la producción de metilmercurio en los sedimentos y es uno de los subgrupos de tiene la capacidad de metilar el mercurio con mayor proporción (Tabla 5). Un estudio realizado por Benoit et al. (2001) mostró que el metilmercurio producido por *Desulfobulbus propionicus* (1pr3) es dependiente de la biodisponibilidad del mercurio y es afectado por la cantidad de sulfuro de hidrogeno presente en el medio. Por otra parte, el potencial de metilación del mercurio podría estar relacionada a la composición genética y/o metabolismo del carbono de las BSR (Ekstrom et al., 2003).

Datos de King et al. (2000) muestran que la formación de MeHg normalizada a las tasas de sulfato reducción no sería homogénea para todas las especies de SRB. Las diferencias en la abundancia relativa de los subgrupos de SRB entre lagunas, podrían jugar un papel importante en la metilación donde dependiendo de las características fisicogeoquímicas y composición de los sedimentos, además de las interacciones microbianas, existiría preponderancia de ciertos consorcios de BSR sobre otros.

La actividad y el efecto del metabolismo de la sulfato reducción de las BSR es importante para la metilación no solo por el rol directo de este grupo de bacterias en la misma, sino también, por que el sulfuro producto de la respiración bacteriana y la subsiguiente reducción del sulfato, influiría por una parte, favorablemente en la biodisponibilidad del mercurio inorgánico para la metilación

en forma de HgS disuelto y por otra negativamente, en la propia reacción de metilación.

Tabla 6. Grado de metilación del mercurio por bacterias sulfato reductoras

Bacterias ^a	MMR ^b /SRR ^c	MMR (pg cell ⁻¹ h ⁻¹)	Número de células
<i>Desulfobacterium</i>	2.58x10 ⁻⁵	6.2x10 ⁻⁶	10 ⁶
<i>Desulfobacter</i>	4.10x10 ⁻⁶	1.6x10 ⁻⁶	10 ⁶
<i>Desulfococcus</i>	4.60x10 ⁻⁶	2.7x10 ⁻⁷	10 ⁷
<i>Desulfovibrio</i>	1.37x10 ⁻⁶	4.2x10 ⁻⁸	10 ⁸
<i>Desulfobulbus</i>	2.80x10 ⁻⁷	4.3x10 ⁻⁹	10 ⁸

^a Datos obtenidos del artículo de King et al., 2000.

^b MMR razón de metilación del mercurio

^c SRR razón de reducción del sulfato

A partir de los datos del presente trabajo, sin embargo no es posible realizar mayores inferencias sobre el rol de las BSR en la metilación del Hg dada su amplia distribución en las lagunas estudiadas donde deben además participar en otros procesos geoquímicos como la mineralización del carbono y otros, por lo que estos datos deben ser considerados preliminares y será necesario analizar en futuros estudios a lo largo del perfil sedimentario la distribución (a nivel cuantitativo) de los subgrupos de BSR, la tasas de sulfato reducción, las tasas de metilación, así como la identificación *in vitro* de las bacterias con potencial de metilación en cultivos bacterianos. Asimismo, otros factores importantes en la compleja dinámica del Hg y MeHg en los ecosistemas acuáticos como la concentración de sulfatos, sulfuros, la disponibilidad de sustratos para el desarrollo de diferentes consorcios de BSR, el metabolismo microbiano relacionado a la metilación, demetilación, las condiciones de oxidación reducción en cada estrato sedimentario, la foto demetilación, la estabilidad de los complejos entre el Hg y la materia orgánica, la accesibilidad del Hg para la metilación, las interacciones del MeHg con la materia orgánica que afectan probablemente a las tasas de demetilación así como en la distribución y acumulación del MeHg en sedimentos y en su posterior transformación en el ecosistema, deberán ser considerados, tomando en cuenta además, la variación de varios de estos factores a nivel temporal y espacial dentro de cada laguna y entre éstas.

El desafío de la ecológica microbiana es complejo y por ello entender cómo se organizan las Bacterias Sulfato Reductoras en los sedimentos y cómo interaccionan entre sí con factores fisicoquímicos sigue siendo un objetivo por resolver.

7. CONCLUSIÓN

El presente estudio es una de las primeras evaluaciones de las condiciones geoquímicas, presencia de Hg, MeHg y distribución de subgrupos de BSR en diferentes lagunas de la región de Rurrenabaque en la cuenca del río Beni. Entre las conclusiones mas relevantes se señalan las siguientes:

El conjunto de lagunas analizadas son diversas en cuanto a edad, tipo de aguas, densidad de macrofitas y contenido de materia orgánica. Los sedimentos de las lagunas analizadas presentaron diferentes características de oxido-reducción (Eh), pH y porcentaje de agua, observándose variaciones dentro de cada laguna en la época húmeda y seca.

Se aplicaron métodos independientes de cultivo para evaluar la distribución de subgrupos de BSR en los sedimentos de las lagunas estudiadas. El método más eficiente para la extracción de DNA microbiano de sedimentos fue el de Zhou, obteniéndose DNA de alto peso molecular. Por otro lado, los sistemas de purificación del DNA utilizados (columnas UltraClean Soil DNA de MoBio) y las columnas de sefarosa (S-400 HR) acoplados al sistema de extracción permitieron obtener DNA óptimo para su posterior amplificación por PCR.

Se ha optimizado el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para la identificación de subgrupos de Bacterias Sulfato Reductoras en muestras sedimentarias. Mediante este método, se detectó al gen de 16S RNAr y al gen DSR en todas las muestras de los sedimentos de las llanuras de inundación. Mediante el PCR anidado se determino la presencia de 5 subgrupos de bacterias sulfato reductoras: *Desulfovibrio*, *Desulfococcus*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus* y *Desulfobacter*.

Las bacterias sulfato reductoras están presentes en todos los perfiles sedimentarios (a lo largo de 10 cm. de profundidad) con una distribución estratificada de los diferentes subgrupos de BSR.

Se observaron diferencias en la distribución estratificada de BSR a lo largo del perfil sedimentario entre lagunas y en las dos épocas de estudio (húmeda y seca). Los subgrupos de BSR que mayormente fueron detectados en todos los perfiles de profundidad fueron *Desulfovibrio* y *Desulfococcus*. Las diferencias en distribución de BSR se debieron a los subgrupos *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus* y *Desulfobacter* de los cuales *Desulfobulbus* es el que mostró mayor variación.

Las lagunas más cercanas al río y más jóvenes presentaron una distribución de los subgrupos de BSR (relativamente más uniforme) en comparación a las lagunas más alejadas del río y de tierra firme tanto en la época húmeda y seca.

La diversidad de subgrupos de BSR no está asociada específicamente a los factores fisicogeoquímicos presentes en cada una de las lagunas.

La concentración y distribución de mercurio en los sedimentos en las lagunas meándricas (Salina, La Granja y Río Viejo) y de tierra firme (San Juan) varía en un

rango de 60 a 80 ng/g y es menor al promedio encontrado en otras regiones de la amazonía brasileña.

El porcentaje de MeHg varia entre 0.32% y 1.6% alcanzando los mayores valores en la laguna meándrica (La Granja) y en la laguna de tierra firme (San Juan). Los porcentajes de MeHg encontrados, en promedio, son mayores a los encontrados en otras regiones de la amazonía brasileña.

La tasa de Me^{203}Hg en la interfase va en progresión a la edad de formación de las lagunas meándricas (Salina, La Granja y Río Viejo). Esta correlación no se observó en la laguna San Juan (tierra firme) que presenta el mayor contenido de materia orgánica.

En el conjunto de las lagunas estudiadas, no se observó correlación entre las tasas de metilación encontradas y el porcentaje de MeHg en las lagunas del estudio.

En el conjunto de lagunas estudiadas no se observó correlación entre las tasas metilación y el porcentaje de carbono, por lo que existirían diferentes condiciones fisicoquímicas y geoquímicas en cada laguna que afectaría a las tasas de metilación y distribución del MeHg.

No se observó una relación entre la diversidad de subgrupos de Bacterias Sulfato Reductoras, producción y/o distribución de MeHg en la zona de estudio.

Los resultados obtenidos de los sedimentos no reflejan en su totalidad las condiciones necesarias para la metilación del mercurio por los subgrupos de BSR y/o otros factores fisicogeoquímicos influir, por lo tanto son necesarios estudios adicionales para evaluar la producción y distribución de MeHg en estos ambientes naturales.

8. RECOMENDACIONES

Siendo este uno de los primeros trabajos sobre la diversidad de BSR en los sedimentos en las lagunas inundación de la amazonía boliviana y sin duda el primero que reporta a los subgrupos de Bacterias Sulfato Reductoras y concentración de metilmercurio en sedimentos, quedan aun muchas interrogantes por resolver.

Futuros trabajos deberán determinar la distribución y abundancia de las Bacterias Sulfato Reductoras en los sedimentos con técnicas más precisas como la hibridación, además, de determinar la filogenia de las BSR mediante la secuenciación del 16S RNAr y de los subgrupos de BSR.

Así también, deberá determinarse el rol de cada subgrupo de BSR en la metilación del mercurio y los factores involucrados en este proceso. Asimismo, la relación con otras comunidades microbianas como la metanogénicas y acetogénicas en la metilación de mercurio y demetilación de metilmercurio.

Se deberá realizar una comparación del MeHg en diferentes lugares de las lagunas cómo el bosque inundado y la fase semiacuática en la zona de las macrofitas.

Se deberá tomar en cuenta otros factores geoquímicos como concentración de sulfatos y sulfuro de hidrogeno en los perfiles sedimentarios. Asimismo, también es necesario hacer una comparación entre la concentración de MeHg, tasas de metilmercurio y épocas (húmeda y seca) y así analizar los procesos de especiación del Hg y metilación del Hg en función a su funcionamiento hidrológico, químico y ecológico.

9. BIBLIOGRAFIA

Acha, D. 2004. Bacterias Sulfato-Reductoras en la Rizósfera de Macrófitas de una laguna de la llanura de inundación del río Beni, La Granja. Tesis para optar al título de licenciatura en Biología. La Paz-Bolivia.

Allen, J., G. Shanker, K. Tan, and M. Aschner. 2002. The Consequences of Methylmercury Exposure on Interaractive Functions between Astrocytes and Neurons. *Neuro Toxicology* **23**:755-759.

Alvarez, R. V., E. Aspé, and H. Urrutia. 2000. Colonization of Supports by Methanogenic and Sulfate Reducing Bacteria in Anaerobic Filter-Type Reactors. *Revista Latino Americana de Microbiología* **42**:177-180.

Amann R.I., Ludwig W, Schleifer K-H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microb Rev* **59**: 143-169.

Annweiler, E., W. Michaelis, and R. U. Meckenstock. 2001. Anaerobic Cometabolic Conversion of Benzothiophene by a Sulfate-Reducing Enrichment Culture and in a Tar-Oil-Contaminated Aquifer. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:5077-5083.

Arteaga, D. 2004. Identificación de BSR en sedimentos de tres lagunas de inundación del río Beni, Bolivia. Pasantía de investigación. La Paz- Bolivia.

Bade, K., W. Manz, and U. Szewzyk. 2000. Behavior of sulfate reducing bacteria under oligotrophic conditions and oxygen stress in particle-free systems related to drinking water. *FEMS Microbiology Ecology* **32**:215-223.

Barton, L. 1995. *Sulfate-Reducing Bacteria*, Plenum Press ed, New York.

Benoit, J. M., C. C. Gilmour, and R. P. Mason. 2001. Aspects of Bioavailability of Mercury for Methylation in Pure Cultures of *Desulfobulbus propionicus* (1pr3). *Applied and Environmental Microbiology* **67**:51-58.

Boon, N., W. De Windt, W. Verstraete and E. M. Top. 2002. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewatertreatment plants. *FEMS Microbiology Ecology* **39**: 101-112.

Borneman, J., and E. Triplett. 1997. Molecular Microbial Diversity in Solis Fron Eastern Amazonia: Evidence for Unusual Microorganisms and Microbial Population Shifts Associated with Deforestation. *Applied and Environmental Microbiology* **63**:2647-2653.

Budtz-Jørgensen, E., N. Keiding, P. Grandjean, and P. Weihe. 2002. Estimation of health effects of prenatal methylmercury exposure using structural equation models. *Environmental Health*: 1-22.

Canstein, H. V., S. Kelly, Y. Li, and I. Wagner-Döbler. 2002. Species Diversity Improves the Efficiency of Mercury-Reducing Biofilms under Changing Environmental Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **68**:2829-2837.

Castro, H. F., N. H. Williams, and A. Ogram. 2000. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* **31**:1-9.

Colin R. J., J. P. Harper, D. Willoughby, E. E. Roden and P. F. Churchill. 1997. A Simple, Efficient Method for the Separation of Humic Substances and DNA from Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**: 4993–4995.

Chang, Y. J., A. Peacock, P. Long, J. Stephen, J. McKinley, S. Macnaughton, A. Hussain Anwar, A. Saxton, and D. White. 2001a. Diversity and Characterization of sulfate-Reducing Bacteria in Groundwater at a Uranium Mill Tailings site. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:3149-3160.

Chang, Y. J., A. D. Peacock, P. E. Long, J. R. Stephen, J. P. McKinley, S. J. Macnaughton, A. K. M. A. Hussain, A. M. Saxton, and D. C. White. 2001b. Diversity and Characterization of Sulfate-Reducing Bacteria in Groundwater at a Uranium Mill Tailings Site. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:3149-3160.

Chi-Li Liu and H. D. Peck, Jr. 1981. Comparative Bioenergetics of Sulfate Reduction in *Desulfovibrio* and *Desulfotomaculum* spp. *Journal of Bacteriology*. 966-973.

Choi, S. C., and R. Bartha. 1993. Cobalamin-Mediated Mercury Methylation by *Desulfovibrio desulfuricans* LS. *Applied and Environmental Microbiology* **59**:290-295.

Choi, S., T. Chase, and R. Bartha. 1994a. Metabolic Pathways Leading to Mercury Methylation in *Desulfovibrio desulfuricans* LS. *Applied and Environmental Microbiology* **60**:4072-4077.

Choi, S. C., J. T. Chase, and R. Bartha. 1994b. Enzymatic Catalysis of Mercury Methylation by *Desulfovibrio desulfuricans* LS. *Applied and Environmental Microbiology* **60**:1342-1346.

Cho, Jae-Chang, Dong-Hun Lee, Young-Cheol Cho, Jang-Cheon Cho and Sang-Jong Kim. 1996. Direct Extraction of DNA from Soil for Amplification of 16S rRNA Gene Sequences by Polymerase Chain Reaction. *J. Microbiology* **34**: 229-235.

Cleckner L.B., C. Gilmour, J.P. Hurley, D. P. Krabbenhoff. 1999. Mercury methylation in periphyton of the Florida Everglades. *Limnol Oceanogr* **44**: 1818-1825.

Compeau, G., and R. Bartha. 1984. Methylation and Demethylation of Mercury Under Controlled Redox, pH, and Salinity Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **48**:1203-1207.

Cottrell, M. T., and S. C. Cary. 1999. Diversity of Dissimilatory Bisulfite Reductase Genes of Bacteria Associated with the Deep-Sea Hydrothermal Vent Polychaete Annelid *Alvinella pompejana*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:1127-1132.

Council National Research. 2000. Committee on the Toxicological Effects of Methylmercury, Board on Environmental Studies y Toxicology Commission on life Sciences, vol. National Academy Press.

Cho, J. C., and J. M. Tiedje. 2002. Quantitative Detection of Microbial Genes by Using DNA Microarrays. *Applied Environmental Microbiology* **68**:1425-1439.

Daly, K., R. J. Sharp, and A. J. McCarthy. 2000. Development of oligonucleotide probes and PCR primers for detecting phylogenetic subgroups of sulfate-reducing bacteria. *Microbiology* **146**:1693-1705.

de Oliveira Santos, E., I. de Jesus, E. Brabo, M. C. V. de, E. Loureiro, A. Mascarenhas, F. F. K. de, A. da Silva, R. da Silva, R. Luiz, and H. Higuchi. 2002. Exposure to mercury in the urban population of Rio Branco City, state of acre, Brazil. *Bull Environ contam Toxicol* **69**:314-319.

Detmers, J., U. Schulte, H. Strauss, J. Kuever. 2001. Sulfate Reduction at a Lignite Seam: Microbial Abundance and Activity. *Microb Ecol* **42**:238–247

Devereux, R., Delaney M., Widdel F., and Stahl D. A. 1989. Natural Relationships among Sulfate-Reducing Eubacteria. *Journal of Bacteriology.* 6689-6695.

Devereux, R., S.H. He, C. L. Doyle, S. Orkland, D. A. Stahl, J. LeGall, and W. B. Whitman. 1990. Diversity and Origin of *Desulfovibrio* Species: Phylogenetic Defenition of a Family. *Journal of Bacteriology* **172**:3609-3619.

Devereux, R., M. R. Winfrey, J. Winfrey, and D. A. Stahl. 1996. Depth profile of sulfate-reducing bacterial ribosomal RNA and mercury methylation in an estuarine sediment. *FEMS Microbiology Ecology* **20**:23-31.

Dolbec, J., D. Mergler, F. Larribe, M. Roulet, J. Label, and M. Lucotte. 2001. Sequential analysis of hair mercury levels in relation to fish diet of an Amazonian population, Brazil. *The Science of the Total Environment* **271**:87-97.

Drzyzga, O., A. Schmidt, and K. H. Blotevogel. 1996. Cometabolic Transformation and Cleavage of Nitrodiphenylamines by Three Newly Isolated Sulfate-Reducing Bacterial Strains. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 1710–1716.

Eichner, C.A., R.W. Erb, K.N. Timmis and I. Wagner-Dobler. 1999. Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 102-109.

Edgcomb, V. P., J. H. McDonald, R. Devereux, and D. W. Smith. 1999. Estimation of Bacterial Cell Numbers in Humic Acid-Rich Salt Marsh Sediments with Probes Directed to 16S Ribosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:1516-1523.

Ehrenstein, C., P. Shu, E. B. Wickenheiser, A. V. Hiner, M. Dolfen, H. Emons, and G. Obe. 2002. Methylmercury uptake and associations with the induction of chromosomal aberrations in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Chemico-Biological Interactions* **141**:259-274.

Ekstrom, E. B., F. M. M. Morel, and J. M. Benoit. 2003. Mercury Methylation Independent of the Acetyl-Coenzyme A Pathway in Sulfate-Reducing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **69**:5414-5422.

Environmental Protection Agency. 2004a. Mercury Study Report to Congress. U.S. Environmental Protection Agency.

Environmental Protection Agency. 2004b. Efectos Ambientales, transporte y efectos ecológicos del mercurio. U.S. Environmental Protection Agency.

Finstler, K., W. Liesack, and B. Thamdrup. 1998. Elemental Sulfur and Thiosulfate Disproportionation by *Desulfocapsa sulfoexigens* sp. nov., a New Anaerobic Bacterium Isolated from Marine Surface Sediment. *Applied and Environmental Microbiology* **64**:119-125.

Fortin, D., B. Davis, and T. J. Beveridge. 1996. Role of Thiobacillus and sulfate-reducing bacteria in iron biocycling in oxic and acidic mine tailings. *FEMS Microbiology Ecology* **21**:11-24.

Fortin, D., M. Roy, J. P. Rioux, and P. J. Thibault. 2000. Occurrence of sulfate-reducing bacteria under a wide range of physico-chemical conditions in Au and Cu-Zn mine tailings. *FEMS Microbiology Ecology* **33**:197-208.

Garcia, C., D. A. Moreno, A. Ballester, M. L. Blázquez, and F. González. 2001. Bioremediation of an industrial Acid Mine Water by Metal-Tolerant Sulfate-Reducing Bacteria. *Elsevier Science* **14**:997-1008.

Guimarães, J. R. D., M. Meili, L. Hylander, E. de Castro E Silva, M. Roulet, J. B. N. Mauro, and R. de Lemos. 2000a. Mercury net methylation in five tropical flood plain regions of Brazil: high in the root zone of floating macrophyte mats but low in surface sediments and flooded soils. *Sci. Total Environ* **261**:99-107.

Guimarães, J.R., M. Roulet, M. Lucotte, D. Mergler. 2000b. Mercury methylation along a lake-forest transect in the Tapajós river floodplain, Brazilian Amazon: seasonal and vertical variations. *The Science of the Total Environment* **261**:91-98.

Hammerschmidt, C., and Fitzgerald W. F. 2004. Geochemical controls on the production and distribution of methylmercury in near-shore marine sediments. *Environ. Sci. Technol.* **38**:1487-1495.

Harada, M., J. Nakanishi, E. Yasoda, M. Pinheiro, T. Oikawa, G. de Assis Guimaraes, B. da Silva Cardoso, T. Kizaki, and H. Ohno. 2001. Mercury pollution in the Tapajós River basin, Amazon: mercury level of head hair and health effects. *Environ Int* **27**:285-290.

Harms, G., K. Zengler, R. Rabus, F. Aeckersberg, D. Minz, R. Roselló-Mora, and F. Widdel. 1999. Anaerobic Oxidation of o-Xylene, m-Xylene, and Homologous Alkylbenzenes by New Types of Sulfate-Reducing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:999-1004.

Haveman, S. A., V. Brunelle, J. K. Voordouw, G. Voordouw, J. F. Heidelberg, and R. Rabus. 2003. Gene Expression Analysis of Energy Metabolism Mutants of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough Indicates an Important Role for Alcohol Dehydrogenase. *Applied and Environmental Microbiology* **185**: 4345-4353.

Head, I. M., J. R. Saunders, and R. W. Pickup. 1998. Microbial Evolution, Diversity and Ecology: A Decade of Ribosomal RNA Analysis of Uncultivated Microorganisms. *Microbiol Ecology* **35**:1-21.

Heidelberg, J., R. Seshadri, S. Haveman, C. Hemme, I. Paulsen, J. Kolonay, and J. Eisen. 2004. The genome sequence of the anaerobic sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Nature Biotechnology*:1-5.

Hiroiyuki Imachi, Yuji Sekiguchi, Yoichi Kamagata, Akiyoshi Ohashi, and Hideki Harada. 2000. Cultivation and In Situ Detection of a Thermophilic Bacterium Capable of Oxidizing Propionate in Syntrophic Association with Hydrogenotrophic Methanogens in a Thermophilic Methanogenic Granular Sludge. *Applied and Environmental Microbiology.* **66**: 3608–3615.

Hoeler, T. M., M. J. Alperin, D. B. Albert, and C. S. Martens. 2001. Apparent minimum free energy requirements for methanogenic Archaea and sulfate-reducing bacteria in an anoxic marine sediment. *FEMS Microbiology Ecology* **38**:33-41.

Hurt, R. A., X. Qiu, L. Wu, Y. Roh, A. V. Palumbo, J. M. Tiedje, and J. Zhou. 2001. Simultaneous Recovery of RNA and DNA from Soils and Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:4495-4503.

Hurts, Ch. J., G. R. Knudsen, M. J. McInerney, L. D. Stetzenbach and M. Walter. 1997. *Manual of Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Ikingura, J. R., and H. Akagi. 1999. Methylmercury production and distribution in aquatic systems. *The Science of the Total Environment* **234**:109-118.

Isaksen, M. F., and B. B. Jorgensen. 1996. Adaptation of Psychrophilic and Psychrotrophic Sulfate-Reducing Bacteria to Permanently Cold Marine Environments. *Applied and Environmental Microbiology* **62**:408-414.

Ito, T., J. L. Nielsen, S. Okabe, Y. Watanabe, and P. H. Nielsen. 2002a. Phylogenetic Identification and Substrate Uptake Patterns of Sulfate-Reducing Bacteria Inhabiting an Oxidic-Anoxic Sewer Biofilm Determined by Combining Microautoradiography and Fluorescent In Situ Hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* **68**:356-364.

Ito, T., S. Okabe, H. Satoh, and Y. Watanabe. 2002b. Successional Development of Sulfate-Reducing Bacterial Populations and Their Activities in a Wastewater Biofilm Growing under Microaerophilic Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **68**:1392-1402.

Jay, J. A., K. J. Murray, C. C. Gilmour, R. P. Mason, F. M. M. Morel, A. L. Roberts, and H. F. Hemond. 2002. Mercury Methylation by *Desulfovibrio desulfuricans* ND132 in the Presence of Polysulfides. *Applied and Environmental Microbiology* **68**:5741-5745.

Jin, L. J., P. Guo, and X.Q. Xu. 1997. Effect of Selenium on Mercury Methylation in Anaerobic Lake Sediments. *Environmental Contamination and Toxicology* **59**:994-999.

Jorgensen, B. B. 1982. Mineralization of organic matter in the sea bed the role of sulfate reduction. *Nature* **296**:643-645.

Joulian, C., N. B. Ramsing, and K. Ingvorsen. 2001. Congruent Phylogenies of Most Common Small-Subunit rRNA and Dissimilatory Sulfite Reductase Gene Sequences Retrieved from Estuarine Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:3314-3318.

Kaksonen, A., J. Plumb, P. Franzmann, and J. Puhakka. 2004. Simple organic electron donors support diverse sulfate-reducing communities in fluidized-bed reactors treating acidic metal- and containing wastewater. *Microbiology Ecology* **47**:279-289.

King, J. K., J. E. Kostka, M. E. Frischer, and F. M. Saunders. 2000. Sulfate-Reducing Bacteria Methylate Mercury at Variable Rates in Pure Culture and in Marine Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:2430-2437.

King, J. K., J. E. Kostka, M. E. Frischer, F. M. Saunders, and R. A. Jahnke. 2001. A Quantitative Relationship that Demonstrates Mercury Methylation Rates in Marine Sediments Are Based on the Community Composition and Activity of Sulfate-Reducing Bacteria. *Environ. Sci. Technol.* **35**:2491-2496.

Kleikemper, J., O. Pelz, M. H. Schroth, and J. Zeyer. 2002. Sulfate-reducing bacterial community response to carbon source amendments in contaminated aquifer microcosms. *FEMS Microbiology Ecology* **42**:109-118.

Knoblauch, C., B. B. Jorgensen, and J. Harder. 1999. Community Size and Metabolic Rates of Psychrophilic Sulfate-Reducing Bacteria in Arctic Marine Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:4230-4233.

Koizumi, Y., S. Takii, M. Nishino, and T. Nakajima. 2003. Vertical distributions of sulfate-reducing bacteria and methane-producing archaea quantified by oligonucleotide probe hybridization in the profundal sediment of a mesotrophic lake. *FEMS Microbiology Ecology* **44**:101-108.

Krekeler, D., A. Teske, and H. Cypionka. 1998. Strategies of sulfate-reducing bacteria to escape oxygen stress in a cyanobacterial mat. *FEMS Microbiology Ecology* **25**:89-96.

Krumholz, L. R., S. H. Harris, S. T. Tay, and J. M. Suflita. 1999. Characterization of Two Subsurface H₂-Utilizing Bacteria, *Desulfomicrobium hypogeium* sp. nov. and *Acetobacterium psammolithium* sp. nov., and Their Ecological Roles. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:2300-2306.

Küsel, K., H. C. Pinkart, H. L. Drake, and R. Devereux. 1999. Acetogenic and Sulfate-Reducing Bacteria Inhabiting the Rhizoplane and Deep Cortex Cells of the Sea Grass *Halodule wrightii*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:5117-5123.

Kuske, C. R., S. M. Barns, and J. D. Busch. 1997. Diverse Uncultivated Bacterial Groups from Soils of the Arid Southwestern United States That Are Present in Many Geographic Regions. *Applied and Environmental Microbiology* **63**:3614-3621.

Label, J., M. Roulet, D. Mergler, M. Lucotte, and F. Larribe. 1997. Fish diet and mercury exposure in a riparian amazonian population. *Water, Air and Soil Pollut* **97**:31-44.

Larsen, O., T. Lien, and N. K. Birkeland. 2001. A novel organization of the dissimilatory sulfite reductase operon of *Thermodesulfohalobus norvegicus* verified by RT-PCR. *FEMS Microbiology Letters* **203**:81-85.

- Leff, L. G., J. R. Dana, J. V. McArthur, and L. J. Shimkets.** 1995. Comparison of Methods of DNA Extraction from Stream Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **61**:1141-1143.
- Li, J., K. J. Purdy, S. Takii, and H. Hayashi.** 1999. Seasonal changes in ribosomal RNA of sulfate-reducing bacteria and sulfate reducing activity in a freshwater lake sediment. *FEMS Microbiology Ecology* **28**:31-39.
- Lie, T. J., M. L. Clawson, W. Godchaux, and E. R. Leadbetter.** 1999a. Sulfidogenesis from 2-Aminoethanesulfonate (Taurine) Fermentation by a Morphologically Unusual Sulfate-Reducing Bacterium, *Desulforpopalus singaporensis* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:3328-3334.
- Lie, T. J., W. Godchaux, and E. R. Leadbetter.** 1999b. Sulfonates as Terminal Electron Acceptors for Growth of Sulfite-Reducing Bacteria (*Desulfitobacterium* spp.) and Sulfate-Reducing Bacteria: Effects of Inhibitors of Sulfidogenesis. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:4611-4617.
- Limke, T., J. Otero-Montañez, and W. Atchison.** 2003. Evidence for interactions between intracellular calcium stores during methylmercury-induced intracellular calcium dysregulation in Rat cerebellar granule neurons. *The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **304**:949-958.
- Londry, K. L. and Des Marais, D. J.** 2003. Stable Carbon Isotope Fractionation by Sulfate-Reducing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 2942–2949.
- Londry, K. L., L. L. Jahnke, and D. J. Des Marais.** 2004. Stable Carbon Isotope Ratios of Lipid Biomarkers of Sulfate-Reducing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 745–751.
- Loseto, L., S. D. Siciliano, and D. R. Lean.** 2004. Methylmercury production in High Arctic wetlands. *Environ Toxicol Chem.* **23**:17-23.
- Loubinoux, J., J. P. Bronowicki, I. A. C. Pereira, J. L. Mouguel, and A. E. L. Faou.** 2002. Sulfate-reducing bacteria in human faces and their association with inflammatory bowel diseases. *FEMS Microbiol Ecology* **40**:107-112.
- Lovley, D., and E. Phillips.** 1992. Reduction of Uranium by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Applied and Environmental Microbiology* **58**:850-856.
- Loy, A., A. Lehner, N. Lee, J. Adamczyk, H. Meier, J. Ernst, K. H. Schleifer, and M. Wagner.** 2002. Oligonucleotide Microarray for 16S rRNA Gene-Based Detection of All Recognized Lineages of Sulfate Reducing Prokaryotes in the Environment. *Applied Environmental Microbiology* **68**:5064-5081.

Luca, G. D., P. D. Philip, Z. Dermoun, M. Rousset, and A. Verméglio. 2001. Reduction of Technetium (VII) by *Desulfovibrio fructosovorans* Is Mediated by the Nickel-Iron Hydrogenase. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:4583-4587.

Luna, R. 2004. Perfil preliminar de bacterias sulfato reductoras en sedimentos de la laguna "La Granja" (Beni-Bolivia). Tesis para optar al titulo de licenciatura en Biología. La Paz-Bolivia.

Maarel, M. V. D., M. Haanstra, W. Meijer, and T. Hansen. 1996. Demethylation of Dimethylsulfoniopropionate to 3-S-Methylmercaptopropionate by Marine Sulfate-Reducing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **62**:3978-3984.

Macalady, J. L., E. E. Mack, D. C. Nelson, and K. M. Scow. 2000. Sediment Microbial Community Structure and Mercury Methylation in Mercury-Polluted Clear Lake, California. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:1479-1488.

MacGregor, B. J., D. P. Moser, B. J. Baker, E. W. Alm, M. Maurer, K. H. Nealson, and D. A. Sthal. 2001. Seasonal and Spatial Variability in Lake Michigan Sediment Small-Subunit rRNA Concentrations. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:3908-3922.

Macrae, A. 2000. The Use of 16S rDNA Methods in Soil Microbial Ecology. *Brazilian Journal of Microbiology* **31**:77-82.

Mai Faurshou, I., and J. Bo Barker. 1996. Adaptation of Psychrophilic and Psychrotrophic Sulfate-Reducing Bacteria to Permanently Cold Marine Environments. *Applied and Environmental Microbiology* **62**:408-414.

Manz, W., M. Eisenbrecher, T. R. Neu, and U. Szewzyk. 1998. Abundance and spatial organization of Gram-negative sulfate reducing bacteria in activated sludge investigated by in situ probing with specific 16S rRNA targeted oligonucleotides. *FEMS Microbiology Ecology* **25**:43-61.

Martin-Laurent, F., L. Philippot, S. Hallet, R. Chaussod, J. C. Germon, G. Soulas, and G. Catroux. 2001. DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:2354-2359.

Mauro, J., J. R. D. Guimarães, and R. Melamed. 1999. Aguapé agrava contaminación por mercurio. *Ciencia Hoje* **25**:68-71.

Mauro, J. B. N., J. R. D. Guimarães, H. Hintelmann, C. J. Watras, E. A. Haack, and S. A. Coelho-Souza. 2002. Mercury methylation in macrophytes, periphyton, and water-comparative studies with stable and radio-mercury additions. *Anal Bioanal Chem* **374**:983-989.

Maurice Bourgoïn, L. M. 2001. El mercurio en la Amazonía Boliviana. La Paz, Bolivia: 1-75.

Minz, D., J. L. Flax, S. J. Green, G. Muyzer, Y. Cohen, M. Wagner, B. E. Rittmann, and D. A. Stahl. 1999. Diversity of Sulfate-Reducing Bacteria in Oxic and Anoxic Regions of a Microbial Mat Characterized by Comparative Analysis of Dissimilatory Sulfite Reductase Genes. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:4666-4671.

Miranda, M. R., J.R. Guimarães, M. Roulet, D. Acha, S. Coelho-Souza, J.B.N. Mauro, V. Iñiguez. 2004. Mercury methylation and bacterial activity in macrophyte-associated periphyton in floodplain lakes of the Amazon basin. 7th International Conference on Mercury as a Global Pollutant. Ljubljana, Slovenia. June 27-July 2.

Miura, K., N. Koide, S. Himeno, I. Nakagawa, and N. Imura. 1999. The Involvement of Microtubular Disruption in Methylmercury- Induced Apoptosis in Neuronal and Nonneuronal Cell Lines. *Toxicology and Applied Pharmacology* **160**:279-288.

Montes, I. O. D. 1997. Geografía y Recursos Naturales de Bolivia.

Mora, R. R., and R. Amann. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* **25**:39-67.

Newman, D. K., T. J. Beveridge, and F. M. Morel. 1997. Precipitation of Arsenic Trisulfide by *Desulfotomaculum auripigmentum*. *American Society for Microbiology* **63**: 2022–2028.

Nishioku, T., N. Takai, K. I. Miyamoto, K. Murao, C. Hara, K. Yamamoto, and H. Nakanishi. 2000. Involvement of caspase 3-like protease in methylmercury-induced apoptosis of primary cultured rat cerebral microglia. *Brain Research* **871**:160-164.

Okabe, S., T. Itho, H. Satho, and Y. Watanabe. 1999. Analyses of Spatial Distributions of Sulfate-Reducing Bacteria and Their Activity in Aerobic Wastewater Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:5107-5116.

Orphan, V. J., K. U. Hinrichs, W. U. III, C. K. Paull, L. T. Taylor, S. P. Sylva, J. M. Hayes, and E. F. Delong. 2001. Comparative Analysis of Methane-Oxidizing Archaea and Sulfate-Reducing Bacteria in Anoxic Marine Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:1922-1934.

Pak, K. R., and R. Bartha. 1998a. Mercury Methylation and Demethylation in Anoxic Lake Sediments and by Strictly Anaerobic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **64**:1013-1017.

Pak, K. R., and R. Bartha. 1998b. Mercury methylation by interspecies hydrogen and acetate transfer between sulfidogens and methanogens. *Applied and Environmental Microbiology* **64**:1987-1990.

Pérez-Jiménez, J. R., L. Y. Young, and K. L. J. 2001. Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in anaerobic hydrocarbon-degrading consortia and pure cultures using the dissimilatory sulfite reductase (*dsr* AB) genes. *FEMS Microbiology Letters* **35**:145-150.

Petrova, O. E., N. B. Tarasova, and M. N. Davydova. 2002. Biotechnological potential of sulfate-reducing bacteria for transformation of nitrocellulose. *Anaerobe*:1-3.

Pheng, S. R., C. Auger, S. Chakrabarti, E. Massicotte, and L. Lamontagne. 2003. Sensitivity to methylmercury-induced autoimmune disease in mice correlates with resistance to apoptosis of activated CD4⁺ lymphocytes. *Journal of Autoimmunity* **20**:147-160.

Postgate, J. 1984. *The sulphate-reducing bacteria*, 2 ed.

Purdy, K. J., D. B. Nedwell, T. M. Embley, and S. Takii. 2001. Use of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to investigate the distribution of sulphate-reducing bacteria in estuarine sediments. *FEMS Microbiology Ecology* **36**:165-168.

Qu, H., T. Syversen, M. aschner, and U. Sonnewald. 2003. Effect of methylmercury on glutamate metabolism in cerebellar astrocytes in culture. *Neurochemistry* **43**:411-416.

Qatibi, Al, R. Bennisse, M. Jana and JL. Garcia. 1998. Anaerobic degradation of glycerol by *Desulfovibrio fructosovorans* and *D. carbinolicus* and evidence for glycerol-dependent utilization of 1,2-propanediol. *Curr Microbiol* **36**:283-290.

Rabus, R., M. Fukui, H. Wilkes, and F. Widdel. 1996. Degradative Capacities and 16S rRNA-Targeted Whole-Cell Hybridization of Sulfate-Reducing Bacteria in an Anaerobic Enrichment Culture Utilizing Alkylbenzenes from Crude Oil. *Applied and Environmental Microbiology* **62**:3605-3613.

Raskin, L., B. R. Rittmann, and D. A. Stahl. 1996. Competition and Coexistence of Sulfate-Reducing and Methanogenic Populations in Anaerobic Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **62**:3847-3857.

Rasmussen, P., D. Villard, H. Gardner, J. Fortescue, S. Schiff, and W. Shilts. 1998. Mercury in lake sediments of the precambrian Shield near Huntsville Ontario, Canada. *Environmental Geology* **33**:170-182.

Ravenschlag, K., K. Sahm, C. Knoblauch, B. B. Jorgensen, and R. Amann. 2000. Community Structure, Cellular rRNA Content, and Activity of Sulfate-

Reducing Bacteria in Marine Arctic Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:3592-3602.

Ravenschlag, K., K. Sahm, and R. Amann. 2001. Quantitative Molecular Analysis of the Microbial Community in Marine Arctic sediments (Svalbard). *Applied and Environmental Microbiology* **67**:387-395.

Reichenbecher, W. and B. Schink. 1997. *Desulfovibrio inopinatus*, sp. nov., a new sulfate-reducing bacterium that degrades hydroxyhydroquinone (1,2,4-trihydroxybenzene). *Arch Microbiol* **168** : 338–344.

Rooney-Varga, J. N., R. Devereux, R. S. Evans, and M. E. Hines. 1997. Seasonal Changes in the Relative Abundance of Uncultivated Sulfate-Reducing Bacteria in a Salt Marsh Sediment and in the Rhizosphere of *Spartina alterniflora*. *Applied Environmental Microbiology* **63**:3895-3901.

Roulet, M., and M. Lucotte. 1995. Geochemistry of Mercury in Pristine and Flooded Ferralitic Soils of a Tropical Rain Forests in French Guiana, South America. *Water, Air, and Soil Pollution* **80**:1079-1088.

Roulet, M., M. Lucotte, R. Canuel, I. Rhéault, S. Tran, Y. G. D. Freitas, N. Farella, R. S. d. Vale, C. J. S. Passos, E. D. J. d. Silva, D. Mergler, and M. Amorim. 1998a. Distribution and partition of total mercury in waters of the Tapajós River Basin, Brazilian Amazon. *The Science of the Total Environment* **213**:203-211.

Roulet, M., M. Lucotte, A. Saint-Aubin, S. Tran, I. Rhéault, N. Farella, E. D. J. D. Silva, J. Dezencourt, C. J. S. Passos, G. S. Soares, J. R. D. Guimarães, D. Mergler, and M. Amorim. 1998b. The geochemistry of mercury in central Amazonian soils developed on the Alter-do-Chao formation of the lower Tapajós River Valley, Pará state, Brazil. *The Science of the Total Environment* **223**:1-24.

Roulet, M., M. Lucotte, N. Farella, G. Serique, H. Coelho, C. Sousa Passos, E. De Jesus da Silva, P. Scavone de Andrade, D. Mergler, J.R. D. Guimarães, and M. Amorim. 1999. Effects of recent human colonization on the presence of mercury in amazonian ecosystems. *Water Air Soil Pollut* **112**:297-313.

Roulet, M., J.R. Guimarães, and M. Lucotte. 2001. Methylmercury Production and Accumulation in Sediments and Soils of an Amazonian Floodplain-Effect of Seasonal Inundation. *Water, Air, and Soil Pollution* **128**:41-60.

Roulet, M., J.R. Guimarães, L. Alanoca, M. Rodrigues, S. Sánchez, V. Iñiguez, D. Acha, R. Luna y J. Chincheros. 2004. Methyl Mercury Production in Sediment from Floodplain lakes in the Bolivian Amazon. 7th International Conference on Mercury as a Global Pollutant. Ljubljana, Slovenia. June 27-July 2.

Sanfeliu, C., J. Sebastia, and S. U. Kim. 2001. Methylmercury neurotoxicity in cultures of human neurons, astrocytes, neuroblastoma cells. *Neuro Toxicology* **22**:317-327.

Santegoeds, C. M., L. R. Damgaard, G. Hesselink, J. Zopfi, P. Lens, G. Muyzer, and D. d. Beer. 1999. Distribution of Sulfate-Reducing and Methanogenic Bacteria in Anaerobic Aggregates Determined by Microsensor and Molecular Analyses. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:4618-4629.

Sass, A. M., A. Eschemann, M. Kühl, R. Thar, H. Sass, and H. Cypionka. 2002. Growth and chemosensory behavior of sulfate-reducing bacteria in oxygen-sulfide gradients. *FEMS Microbiology Ecology* **40**:47-54.

Scheid, D., and S. Stubner. 2001. Structure and diversity of Gram-negative sulfate-reducing bacteria on rice roots. *FEMS Microbiology Ecology* **36**:175-183.

Siciliano, S. D., and D. R. S. Lean. 2002. Methyltransferase: An Enzyme Assay For Microbial Methylmercury Formation in Acidic Soils and Sediments. *Environ Toxicology and Chemistry* **21**:1184-1190.

Sigalevich, P., M. V. Baev, A. Teske, and Y. Cohen. 2000a. Sulfate Reduction and Possible Aerobic Metabolism of the Sulfate-Reducing Bacterium *Desulfovibrio oxycliniae* in a Chemostat Coculture with *Marinobacter* sp. Strain MB under Exposure to Increasing Oxygen Concentrations. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:5013-5018.

Sigalevich, P., and Y. Cohen. 2000b. Oxygen-Dependent Growth of the Sulfate-Reducing Bacterium *Desulfovibrio oxycliniae* in Coculture with *Marinobacter* sp. Strain MB in an Aerated Sulfate-Depleted Chemostat. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:5019-5023.

Sigalevich, P., E. Meshorer, Y. Helman and Y. Cohen. 2000c. Transition from Anaerobic to Aerobic Growth Conditions for the Sulfate-Reducing Bacterium *Desulfovibrio oxycliniae* Results in Flocculation. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 5005–5012.

Smit, E., P. Leeflang, S. Gommans, J. V. d. Broek, S. V. Mil, and K. Wernars. 2001. Diversity and Seasonal Fluctuations of the Dominant Members of the Bacterial Soil Community in a Wheat Field as Determined by Cultivation and Molecular Methods. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:2284-2291.

So, C. M., and L. Y. Young. 1999. Isolation and Characterization of a Sulfate-Reducing Bacterium That Anaerobically Degrades Alkanes. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:2969-2976.

Sonne-Hansen, J., P. Westesmann, and B. K. Ahring. 1999. Kinetics of Sulfate and Hydrogen Uptake by the Thermophilic Sulfate-Reducing Bacteria

Thermodesulfobacterium sp. Strain JSP and *Thermodesulfovibrio* sp. Strain R1Ha3. Applied and Environmental Microbiology **65**:1304-1307.

Stefanie, J. W. H., O. Elferink, W. J. C. Vorstman, A. Sopjes, and A. J. M. Stams. 1998a. Characterization of the sulfate-reducing and syntrophic population in granular from a full-scale anaerobic reactor treating papermill wastewater. FEMS Microbiol Ecology **27**:185-194.

Steffan, R., E. Korthals, and M. Winfrey. 1988. Effects of Acidification on Mercury Methylation, Demethylation, and Volatilization in sediments from an Acid-Susceptible Lake. Applied and Environmental Microbiology **54**:2003-2009.

Steger, J. L., C. Vincent, J. D. Ballard, and L. R. Krumholz. 2002. *Desulfovibrio* sp. Genes Involved in the Respiration of Sulfate during Metabolism of Hydrogen and Lactate. Applied and Environmental Microbiology **68**: 1932–1937.

Stern, S., C. Cox, E. Cernichiari, M. Balys, and B. Weiss. 2001. Perinatal and lifetime exposure to methylmercury in the mouse: blood and brain concentrations of mercury to 26 months of age. Neuro Toxicology **22**:467-477.

Steuber, J., A. F. Arendsen, W. R. Hagen, and P. M. Kroneck. 1995. Molecular properties of the dissimilatory sulfite reductase from *Desulfovibrio desulfuricans* (Essex) and comparison with the enzyme from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough). Eur J. Biochem. **233**:873.

Stubner, S., and K. Meuser. 2000. Detection of *Desulfotomaculum* in an Italian rice paddy soil by 16S ribosomal nucleic acid analyses. Microbiology Ecology **34**:73-80.

Summers, A., and S. Silver. 1978. Microbial Transformations of Metals.

Suzuki, M. and S. Giovannoni. 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. Applied and Environmental Microbiology **62**: 625-630.

Teske, A., C. Wawer, G. Muyzer, and N. B. Ramsing. 1996. Distribution of Sulfate-Reducing Bacteria in a Stratified Fjord (Mariager Fjord, Denmark) as Evaluated by Most-Probable-Number Counts and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified Ribosomal DNA Fragments. Applied and Environmental Microbiology **62**:1405-1415.

Teske, A., N. B. Ramsing, K. Habicht, M. Fukui, J. Küver, B. B. Jorgensen, and Y. Cohen. 1998. Sulfate-Reducing Bacteria and Their Activities in Cyanobacterial Mats of Solar Lake (Sinai, Egypt). Applied and Environmental Microbiology **64**:2943-2951.

Tonolla, M., A. Dermata, S. Peduzzi, D. Hanh, and R. Peduzzi. 2000. In Situ Analysis of Sulfate-Reducing Bacteria Related to *Desulfocapsa thiozymogenes* in the Chemocline of Meromictic Lake Cadagno (Switzerland). *Applied and Environmental Microbiology* **66**:820-824.

Van Der Maarel, M. J., M. Jansen, R. Haanstra, W.G. Meijer, and T. A. Hansen. 1996. Demethylation of Dimethylsulfoniopropionate to 3-S-Methylmercaptopropionate by Marine Sulfate-Reducing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 3978–3984

Vester, F., and K. Ingvorsen. 1998. Improved Most-Probable-Number Method To Detect Sulfate Reducing Bacteria with Natural Media and a Radiotracer. *Applied and Environmental Microbiology* **64**:1700-1707.

Voordouw, G. 1995. The Genus *Desulfovibrio*: The Centennial. *Applied and Environmental Microbiology* **61**:2813-2819.

Voordouw, G., S. M. Astromng, M. F. Reiner, B. Fouts, A. J. Telang, Y. Shen, and D. Gevertz. 1996. Characterization of 16S rRNA Genes from oil Field Microbial Communities Indicates the Presence of a Variety of Sulfate-Reducing, Fermentative, and Sulfide-Oxidizing Bacteria. *Applied Enviromental Microbiology* **62**:1623-1629.

Wagner, M., A. J. Roger, J. L. Flax, G. A. Brusseau, and D. A. Stahl. 1998. Phylogeny of Dissimilatory Sulfite Reductases Supports an Early Origin of Sulfate Respiration. *Journal of Bacteriology* **180**:2975-2982.

Weinbauer, M. G. 2002. Simultaneous Extraction from Bacterioplankton of Total RNA and DNA Suitable for Quantitative Structure and Function Analyses. *Applied and Enviromental Microbiology* **68**:1082-1087.

Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane. 1991. 16 S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology* **173**:697-703.

Word, J. M. 1980. The role of pH and oxidation-reduction potentials in the mobilization of heavy metals. In T. Y. Yoribara, M. W. Miller, and P.E. Morrow, (ed.), *Polluted Rain*. Plenum Publishing Corp. New York.

World, Health Organization. 1990. Methylmercury. World Health Organization, Geneva.

Widdel, F., and F. Bak. 1991. *The Prokaryotes*, New York.

Yokoo, E., J. Valente, L. Grattan, S. Schmidt, I. Platt, and E. Silbergeld. 2003. Low level methylmercury exposure affects neuropsychological function in adults. *Environmental Health* **2**.

Yoon, Soh-Joung, L. M. Diener, P. R. Bloom, E. A. Nater and W. F. Bleam. 2005. X-ray absorption studies of CH_3Hg^+ -binding sites in humic substances. *Geochimical et Cosmochimica Acta* **69**:1111-1121.

Yu, L., T. Ishida, K. Ozawa, H. Akutsu and K. Horiike. 2001. Purification and characterization of homo- and hetero-dimeric acetate kinases from the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris*. *J. Biochem (Tokyo)* **129**: 411-421.

Yuan, Y., and W. Atchison. 1997. Action of methylmercury on GABA_A receptor-mediated inhibitory synaptic transmission is primarily responsible for its early apparent stimulatory effects on hippocampal CA1 excitatory transmission in hippocampal slices. *The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **282**:64-73.

Yuan, Y., and W. Atchison. 1999. Comparative effects of methylmercury on parallel-fiber and climbing-fiber responses of rat cerebellar slices. *The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **288**:1015-1025.

Zhou, J., M. A. Bruns, and J. M. Tiedje. 1996. DNA Recovery from Soils of Diverse Composition. *Applied and Environmental Microbiology* **62**:316-322.

Zhou, Yi., 2003. Environmental Engineering Assessment of Mercury Methylation in Aquatic Sediments. University of Cincinnati. Thesis Master of Science.

Zinkevich, V., and I. B. Beech. 2000. Screening of sulfate-reducing bacteria in colonoscopy samples from healthy and colitic human gut mucosa. *FEMS Microbiol Ecology* **34**:147-155.

ANEXOS

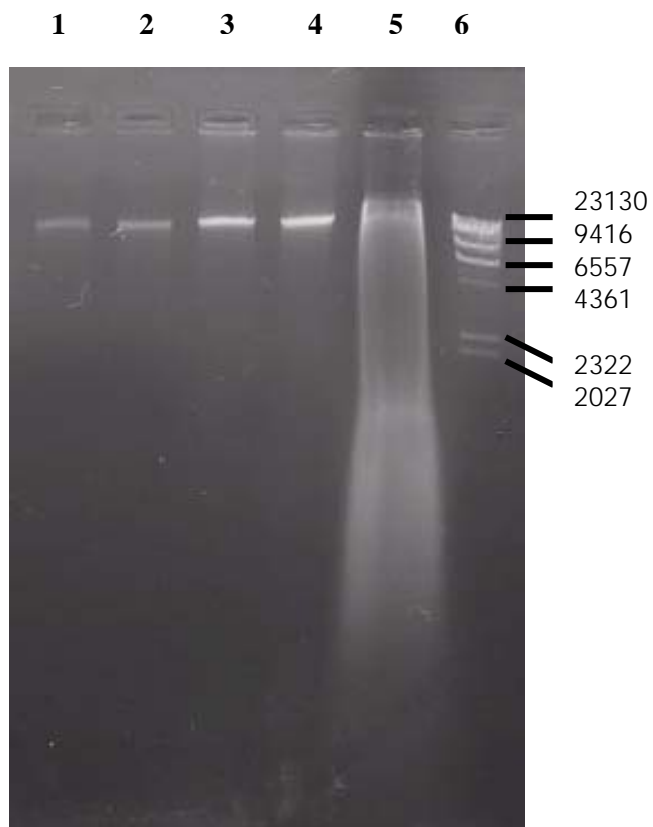


Figura 23. Extracción de DNA de sedimentos de diferente estado trofico. Carriles: 1 y 2 menos organico; 3 y 4 medio organico; 5, muy organico; 6, marcador de peso molecular LamdaHindIII.

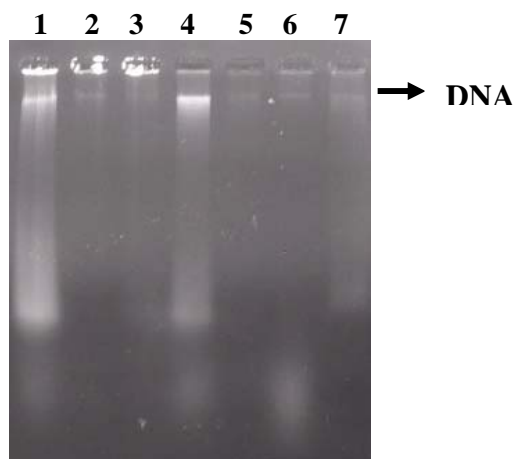


Figura 24. Extracción de DNA de sedimentos de las lagunas en estudio. Carriles: 1, La Granja; 2, Salina; 3, Río Viejo; 4, San Juan; 5, Pinky; 6, Chitiwara y Moa.

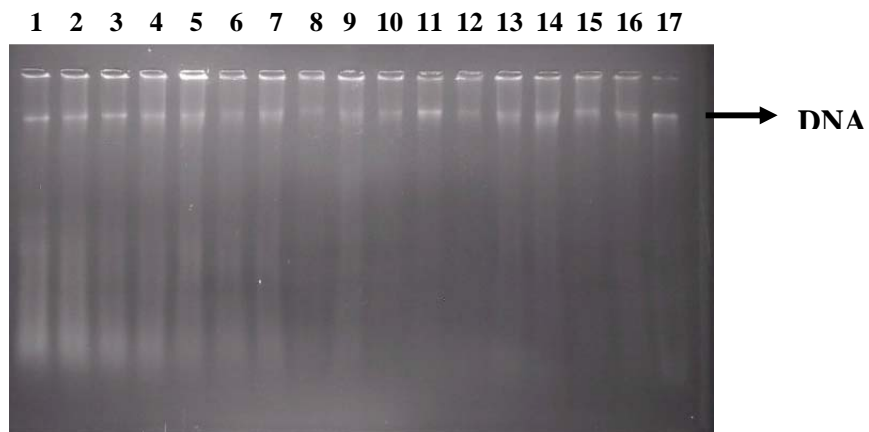


Figura 25. Extracción de DNA de sedimentos de la laguna Salina. Carriles: 1 al 17 DNA.

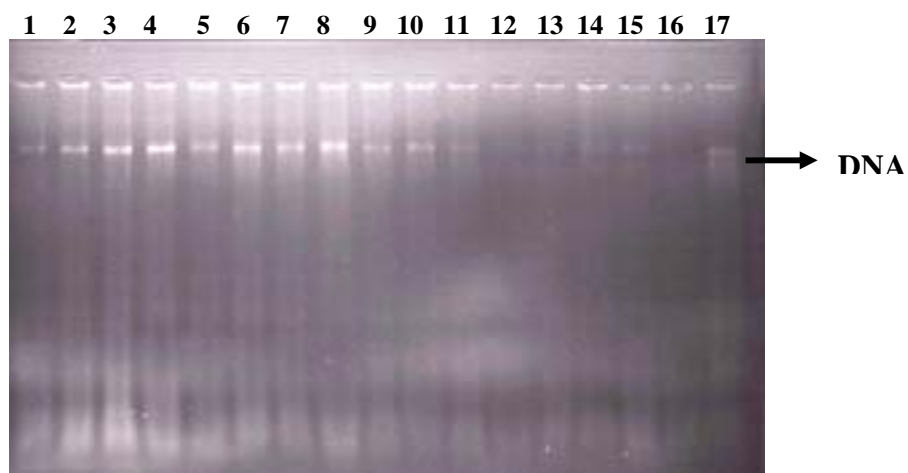


Figura 26. Extracción de DNA de sedimentos de la laguna Pinky. Carriles: 1 a 17 DNA.

