

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS RESISTENTES AL MERCURIO EN SEDIMENTOS DE LA CIÉNAGA DE MALLORQUÍN, ATLÁNTICO, COLOMBIA.

Valentina Bravo Ortiz
CC 1002157931 Código
estudiantil: 201912214799
valentina.bravo@unisimon.edu.co

Natalia Carolina Consuegra Padilla
CC 1193067891
Código estudiantil: 201912215812
natalia.consuegra@unisimon.edu.co

Alfredo Robledo Meza
CC 1192722147 Código
estudiantil: 201912212771
alfredo.robledo@unisimon.edu.co

Trabajo de Investigación del Programa de Microbiología

Tutor:
Zamira Elena Soto Varela

Co-tutor:
Mario Peña Freyle

Antecedentes:

El problema de ecosistemas acuáticos contaminados por metales pesados se da en muchas zonas de diferentes países o ciudades, por ejemplo, Castaneda M & Gómez A (2004), encontraron que el río San Pedro, México, tenía valores elevados de Cd, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn. Ávila S, et al (2021), Feria J, et al. (2010), hallaron que el Cu, Ni, Cr y Zn estaban en una alta concentración en el río Sinú, Colombia y por último Fuentes F, et al (2017), encontraron que la especie *Mugil curema* tenía altas concentraciones de Zn, Ni, y Pb, y además, determinaron niveles de Cu y Zn elevados en la ciénaga de mallorquín, Barranquilla, Colombia. Con el fin de buscar alternativas para solucionar esta problemática se han aislado bacterias resistentes que tengan potencial para biorremediación, unas de estas son *E. coli*, *Enterobacter* sp, *C. serrantia*, *Klebsiella* sp, *Vibrio* sp, *Salmonella* sp, *Acinetobacter* sp y *Enterobacteria* sp.

Estas bacterias pueden resistir al Hg gracias a que poseen la enzima mercurio (II) reductasa, cuya función es reducir el Hg^{2+} a Hg^0 el cual es menos tóxico (Purkan P, et al. 2017), este mecanismo hace que las bacterias se puedan utilizar para biorremediar ecosistemas contaminados con mercurio.

Objetivos:

Objetivo General

- Determinar la presencia de bacterias tolerantes al mercurio en muestras de sedimentos en la ciénaga de Mallorquín como potencial para una futura biorremediación de este ecosistema.

Objetivos específicos

- Aislar bacterias de muestras de sedimentos en la Ciénaga de Mallorquín
- Evaluar la resistencia al mercurio de las bacterias aisladas en la Ciénaga de Mallorquín.
- Identificar las bacterias resistentes al mercurio.

Materiales y Métodos:

La investigación es de tipo descriptivo y experimental, ya que se evaluó la resistencia al Hg en bacterias endémicas de la ciénaga de Mallorquín.

Las muestras fueron recolectadas en 4 puntos diferentes donde se han encontrado las mayores concentraciones de Hg en estudios anteriores en el año 2020, las muestras se tomaron de sedimentos las cuales se depositaron en bolsas estériles para la toma de muestras (Whirl-Pak).

Para el aislamiento se realizaron diluciones seriadas 1/10, posteriormente las diluciones 10⁻³ y 10⁻⁴ se sembraron por duplicado utilizando el asa de Drigalsky, agregando 100 µl en agar BHI con un 25% de agua de mar estéril. Para la prueba de susceptibilidad se tomaron las colonias diferentes en forma, color y margen de los diferentes medios de cultivo.

Para la prueba de susceptibilidad cada aislado se inoculó en caldo BHI con diferentes concentraciones de Hg en su

forma de sal, es decir, (HgCl₂), dichas concentraciones fueron en forma ascendente (0,01, 0,05, 0,1, 0,25 y 0,75 mM)

Para la identificación primero se realizó un análisis macroscópico y microscópico mediante observación directa y tinción de Gram a todas las bacterias aisladas. La identificación molecular se realizó mediante la amplificación del rRNA 16s utilizando la PCR de colonias.

Resultados:

En el aislamiento se obtuvieron resultados significativos en la dilución 10⁻³ y 10⁻⁴. En el punto de muestreo *M1* se obtuvieron 3 cepas, en el segundo punto *M2* 1 cepa, en el tercero *M3* se aislaron 3 cepas y en el *M4* una cepa para un total de 8 cepas aisladas en los 4 puntos de muestreo.

Todas las bacterias aisladas resistieron las primeras dos concentraciones de Hg, sin embargo, a una concentración de 0,1mM la bacteria codificada como 006 no presentó crecimiento. Por el contrario, las bacterias codificadas como 003 y 008 resistieron concentraciones de hasta 0.5 mM, siendo la 003 la que presentó crecimiento a la concentración más alta (0,75mM)

Los microorganismos más resistentes identificados mediante el gen rRNA 16s fueron *Micrococcus aloeverae* y *Halobacillus dabanensis* con un 96,1 % y 91% de identidad respectivamente. La mayoría de las bacterias aisladas, fueron del género *Bacillus*, de hecho, se identificaron *Rosellomorea marisflavi* y *Priestia megaterium* que antes pertenecían a este género.

Conclusiones:

En la actualidad uno de los contaminantes que más afectan las fuentes hídricas en el mundo son los metales pesados, provenientes principalmente de industrias y de la minería, entre estos metales pesados se encuentra el mercurio que es considerado uno de los más tóxicos. La Ciénaga de Mallorquín es un ecosistema que se encuentra contaminado por metales pesados como el mercurio, lo que probablemente ha ocasionado que las bacterias presentes en este ambiente deban tolerar altos niveles de Hg para poder vivir creando mecanismos de resistencia. Las 2 bacterias que obtuvieron mayor resistencia al mercurio fueron *Micrococcus aloeverae* tolerando una concentración de 0,75 mM y *Halobacillus dabanensis* una concentración de 0,5 mM, esto puede deberse a que en los lugares donde se tomaron las muestras de estos microorganismos tienen altos porcentajes de Hg, en la zona de muestreo M2 para *M. aloeverae* se encontró un porcentaje de 0,199 ug. g-1 y M3 para *H. dabanensis* con 0,153 ug. g-1 (Bolívar D, 2020).

Palabras clave: Contaminantes, contaminación del agua, laguna, metales pesados, resistencia bacteriana.

ABSTRACT

Background:

The problem of aquatic ecosystems contaminated by heavy metals occurs in many areas of different countries or cities, for example, Castaneda M & Gómez A (2004), found that the San Pedro River, Mexico, had high values of Cd, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb and Zn. Ávila S, et al (2021), Feria J, et al. (2010), found that Cu, Ni, Cr and Zn were in a high concentration in the Sinú River, Colombia and finally Fuentes F, et al (2017), found that the species *Mugil curema* had high concentrations of Zn, Ni, and Pb, and determined elevated Cu and Zn levels in the Mallorcan swamp, Barranquilla, Colombia. In order to find alternatives to solve this problem, resistant bacteria have been isolated that have potential for bioremediation, some of these are *E. coli*, *Enterobacter sp*, *C. serrantia*, *Klebsiella sp*, *Vibrio sp*, *Salmonella sp*, *Acinetobacter sp* and *Enterobacteriaceae sp* (C.S. Neethu, et al. 2015), however, those that are most used for bioremediation are *Shewanella oneidensis* (Wiatrowski et al, 2006) and *Bacillus sp*. being resistances up to 455 µg/ml of $HgCl_2$ (Kamala S. et al, 2006).

These bacteria can resist Hg thanks to the fact that they have the enzyme mercury (II) reductase, whose function is to reduce Hg^{2+} to Hg^0 which is less toxic (Purkan P, et al. 2017), this mechanism makes the bacteria can be used to bioremediate ecosystems contaminated with mercury.

Objectives:

General Objective

Determine the presence of mercury-tolerant bacteria in sediment samples in the Mallorquín swamp as a potential for future bioremediation of this ecosystem.

- Specific objectives**
- o Isolate bacteria from sediment samples in the Mallorquin Cienega.
 - o Evaluate the mercury resistance of bacteria isolated in the Mallorquin Cienega.
 - o Identify mercury-resistant bacteria.

Materials and Methods:

The research is descriptive and experimental since resistance to Hg was evaluated in endemic bacteria of the Mallorquin Cienega.

The samples were collected in 4 different points where the highest concentrations of Hg have been found in previous studies in 2020, the samples were taken from sediments which were deposited in sterile bags for sampling (Whirl-Pak).

For insulation, 1/10 serial dilutions were made, then dilutions 10⁻³ and 10⁻⁴ were sown in duplicate using the Drigalsky loop, adding 100 µl in BHI agar with 25% sterile seawater. For the susceptibility test, the different colonies were taken in shape, color, and margin of the different culture media.

For the susceptibility test each isolate is inoculated in BHI broth with different concentrations of Hg in its salt form, i.e. (HgCl₂), these concentrations were ascending (0.01, 0.05, 0.1, 0.25 and 0.75 mM)

For identification, a macroscopic and microscopic analysis was first performed by direct observation and Gram stain to all isolated bacteria. Molecular identification was performed by amplification of 16s rRNA using colony PCR.

Results:

In isolation, significant results were obtained in the dilution 10⁻³ and 10⁻⁴. At the sampling point *M1* 3 strains were obtained, in the second point *M2* 1 strains, in the third *M3* 3 strains were isolated and in the *M4* a strain for a total of 8 isolates in the 4 sampling points.

All isolated bacteria resisted the first two concentrations of Hg, however, at a concentration of 0.1mM the bacterium encoded as 006 did not present or grow. On the contrary, the bacteria coded as 003 and 008 resisted concentrations of up to 0.5 mM, with 003 being the one that presented or growth at the highest concentration (0.75mM).

The most resistant microorganisms identified by the 16s rRNA gene were *Micrococcus aloeverae* and *Halobacillus dabanensis* with 96.1% and 91% identity respectively. Most of the bacteria isolated were of the genus *Bacillus*, in fact, *Rosellomorea marisflavi* and *Priestia megaterium* were identified that previously belonged to this genus.

Conclusions:

At present one of the pollutants that most affect water sources in the world are heavy metals, mainly from industries and mining, among these heavy metals is mercury that is considered one of the most toxic. The Ciénaga de Mallorquín is an ecosystem that is contaminated by heavy metals such as mercury, which has probably caused the bacteria present in this environment to tolerate high levels of Hg to be able to live, creating resistance mechanisms. The 2 bacteria that obtained greater resistance to mercury were *Micrococcus aloeverae* tolerating a concentration of 0.75 mM and *Halobacillus dabanensis* a concentration of 0.5 mM, this may be because in the places where the samples of these microorganisms were taken, they have high percentages of Hg, in the sampling area M2 for *M. aloeverae* a percentage of 0.199 ug. g-1 and M3 for *H. dabanensis* was found with 0.153 ug. g-1 (Bolívar D, 2020).

KeyWords: Bacterial resistance, heavy metals, lagoon, pollutants, water contamination

REFERENCIAS

1. Acevedo, R., & Severiche, C. (2013). Identification of di-bromide mercury Resistant Bacteria Isolated from Sediment Beaches in Cartagena de Indias, Colombian Caribbean. In AVANCES Investigación en Ingeniería (Vol. 10, Issue 2).
<https://revistas.unilibre.edu.co/index.php/avances/article/view/2750/2170>
2. Basu, N., Horvat, M., Evers, D. C., Zastenskaya, I., Weihe, P., & Tempowski, J. (2018). A state-of-the-science review of mercury biomarkers in human populations worldwide between 2000 and 2018. In Environmental Health Perspectives (Vol. 126, Issue 10). Public Health Services, US Dept of Health and Human Services.
<https://doi.org/10.1289/EHP3904>
3. Beltrán, M., & Gómez, A. (2016). Biorremediación de metales pesados cadmio (Cd), cromo (Cr) y mercurio (Hg), mecanismos bioquímicos e ingeniería genética: una revisión. Revista Facultad de Ciencias Básicas, 12(2), 172–197.
<https://doi.org/10.18359/rfcb.2027>
4. Biedendieck, R., Knuuti, T., Moore, S. J., & Jahn, D. (n.d.). The “beauty in the beast”-the multiple uses of *Priestia megaterium* in biotechnology.
<https://doi.org/10.1007/s00253-021-11424-6/Published>
5. Bolívar, D. (2020). CUANTIFICACIÓN DE METALES PESADOS (HG, CR, CD, NI) EN SEDIMENTOS DE LA CIÉNAGA MALLORQUÍN, BARRANQUILLA COLOMBIA.
<https://repositorio.cuc.edu.co/bitstream/handle/11323/7269/CUANTIFICACI%C3%93N%20DE%20METALES%20PESADOS%20%28HG%2C%20CR%2C%20CD%2C%20NI%20EN%20SEDIMENTOS%20DE%20LA%20CI%C3%89NAGA%20MALLORQU%C3%8DN%2C%20BARRANQUILLA%20-%20COLOMBIA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
6. Cardona, G. I., Escobar, M. C., Acosta-González, A., Marín, P., & Marqués, S. (2022). Highly mercury-resistant strains from different Colombian Amazon ecosystems affected by artisanal gold mining activities. Applied Microbiology and Biotechnology, 106(7), 2775– 2793. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11860-y>

7. Fajardo Vidal, N., & Solís Acosta, H. (2017). Determination of heavy metals in water bodies from the Regional Conservation Area Wetlands of Ventanilla-Callao, Peru (Vol. 20). <https://doi.org/10.15381/iigeo.v20i39.14177>

8. García, L., Marrugo, J., & Alvis, E. (2010). Contaminación por mercurio en humanos y peces en el municipio de Ayapel, Córdoba, Colombia, 2009Mercury. 118–124.

9. Giraldo, Jd., Gutiérrez, S., & Merino, F. (2014). OIL EMULSIFYING ACTIVITY AND REMOVAL OF HEAVY METALS BY PSEUDOMONAS AERUGINOSA PB 25 RHAMNOLIPID. In Rev Soc Quím Perú (Vol. 80, Issue 1). http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2014000100005#:~:text=El%20ramnol%C3%ADpido%20producido%20por%20P,e mpleo%20en%20procesos%20de%20biorremediaci%C3%B3n.

10. Gómez, P., & Gloria de las M. (2005). Importancia económico-ambiental del ecosistema manglar. 138, 111–134. <https://www.redalyc.org/pdf/4255/425541308005.pdf>

11. Gupta, R. S., Patel, S., Saini, N., & Chen, S. (2020). Robust demarcation of 17 distinct bacillus species clades, proposed as novel bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: Description of robertmurraya kyonggiensis sp. nov. and proposal for an emended genus bacillus limiting it only to the members of the subtilis and cereus clades of species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 70(11), 5753–5798. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004475>

12. Guzmán-Moreno, J., García-Ortega, L. F., Torres-Saucedo, L., Rivas-Noriega, P., Ramírez- Santoyo, R. M., Sánchez-Calderón, L., Quiroz-Serrano, I. N., & VidalesRodríguez, L. E. (2022). Bacillus megaterium HgT21: a Promising Metal Multiresistant Plant Growth- Promoting Bacteria for Soil Bioremediation. Microbiology Spectrum. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00656-22>

13. Invemar. (2020). Diagnóstico y evaluación de la calidad de las aguas marinas y costeras del caribe y pacífico colombianos. Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras “José Benito de Andrés.”. http://cinto.invemar.org.co/alfresco/d/d/workspace/SpacesStore/bf9631aa-cd73-48be-8ee4-73251a1f7c03/Diagn%C3%B3stico%20y%20evaluaci%C3%B3n%20de%20la%20calidad%20de%20las%20aguas%20marinas%20y%20costeras%20en%20el%20Caribe%20y%20Pac%C3%ADfico%20colombianos?ticket=TICKET_41500af697e9457eb0eb1630e360d141f6ed5dfe

14. Journal, I., Noroozi, M., Ali Amoozegar, M., Ali Pourbabaee, A., Naghavi, S., & Nourmohammadi, Z. (2017). Evaluation of the Moderately Halophilic Bacteria Resistant to Mercury from Saline Soil 1 2*. In Ecology (Vol. 44, Issue 2).
15. Kheiralla, Z. H., Ashour, S. M., Rushdy, A. A., & Ahmed, H. A. (2013). Characterization of biosurfactants produced by *Halobacillus dabanensis* and *Pontibacillus chungwhensi* isolated from oil-contaminated mangrove ecosystem in Egypt. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 49(3), 263–269.
<https://doi.org/10.1134/S0003683813030186>
16. Lebeau, T., Bagot, D., Jezequel, K., & Fabre, B. (2002). Cadmium biosorption by free and immobilised microorganisms cultivated in a liquid soil extract medium: effects of Cd, pH and techniques of culture. In *The Science of the Total Environment* (Vol. 291). 10.1016/s0048- 9697(01)01093-2
17. Liu, W. Y., Zeng, J., Wang, L., Dou, Y. T., & Yang, S. S. (2005). *Halobacillus dabanensis* sp. nov. And *Halobacillus aidingensis* sp. nov., isolated from salt lakes in Xinjiang, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(5), 1991–1996. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63787-0>
18. Londoño Franco, L. F., Londoño Muñoz, P. T., & Muñoz Garcia, F. G. (2016). LOS RIESGOS DE LOS METALES PESADOS EN LA SALUD HUMANA Y ANIMAL. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(2), 145.
[https://doi.org/10.18684/bsaa\(14\)145-153](https://doi.org/10.18684/bsaa(14)145-153)
19. Massilamany, C., Mohammed, A., Loy, J. D., Purvis, T., Krishnan, B., Basavalingappa, R. H., Kelley, C. M., Guda, C., Barletta, R. G., Moriyama, E. N., Smith, T. P. L., & Reddy, J. (2016). Whole genomic sequence analysis of *Bacillus infantis*: Defining the genetic blueprint of strain NRRL B-14911, an emerging cardiopathogenic microbe. *BMC Genomics*, 17. <https://doi.org/10.1186/s12864-0162900-2>
20. Mesquidaz, E., Marrugo, J., & Pinedo, H. (2013). Exposición a mercurio en trabajadores de una mina de oro en el norte de Colombia. 29, 534–541.
<http://www.scielo.org.co/pdf/sun/v29n3/v29n3a13.pdf>
21. Michael, G. (2000). Bioremedial potential of microbial mechanisms of metalmobilization and immobilization. *Environmental Biotechnology*, 271–279.
22. Muñoz, M., & Domínguez, Lady. (2013). IQEN INFORME QUINCENAL EPIDEMIOLOGICO NACIONAL.
<https://www.ins.gov.co/buscador/IQEN/IQEN%20vol%2018%202013%20num%204.pdf>

23. Navarro-Torre, S., Mateos-Naranjo, E., Caviedes, M. A., Pajuelo, E., & Rodríguez-Llorente, I. D. (2016). Isolation of plant-growth-promoting and metal-resistant cultivable bacteria from *Arthrocnemum macrostachyum* in the Odiel marshes with potential use in phytoremediation. *Marine Pollution Bulletin*, 110(1), 133–142. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.06.070>
24. Pabón, S., Benítez, R., Sarria, A., & Gallo, A. (2020). Contaminación del agua por metales pesados, métodos de análisis y tecnologías de remoción. Una revisión. *Entre Ciencia e Ingeniería*, 14, 9–18. <https://doi.org/10.31908/19098367.1734>
25. Paul, S. I., Rahman, M. M., Salam, M. A., Khan, M. A. R., & Islam, M. T. (2021). Identification of marine sponge-associated bacteria of the Saint Martin's island of the Bay of Bengal emphasizing on the prevention of motile *Aeromonas septicemia* in *Labeo rohita*. *Aquaculture*, 545. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737156>
26. Peter, A., Ford, S., & Brown, L. (1986). Transcriptional Regulation of the Mercuryresistance Genes of Transposon Tn501. In *Journal of General Microbiology*. 10.1099/00221287-132- 2-465
27. Portz, L., Manzolli, R. P., de Andrade, C. F. F., Villate Daza, D. A., Bolivar Bandeira, D. A., & Alcántara-Carrió, J. (2020). Assessment of Heavy Metals Pollution (Hg, Cr, Cd, Ni) in the Sediments of Mallorquin Lagoon - Barranquilla, Colombia. *Journal of Coastal Research*, 95(sp1), 158–162. <https://doi.org/10.2112/SI95-031.1>
28. Prakash, O., Nimonkar, Y., Munot, H., Sharma, A., Vemuluri, V. R. amana, Chavadar, M. S., & Shouche, Y. S. (2014). Description of *Micrococcus aloeverae* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from *Aloe vera*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 3427–3433. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.063339-0>
29. Prieto, J., Gonzáles, R., Romá, G., & Prieto, F. (2009). CONTAMINACIÓN Y FITOTOXICIDAD EN PLANTAS POR METALES PESADOS PROVENIENTES DE SUELOS Y AGUA. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10(1), 29–44. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93911243003>
30. Priyadarshane, M., Chatterjee, S., Rath, S., Dash, H. R., & Das, S. (2022). Cellular and genetic mechanism of bacterial mercury resistance and their role in biogeochemistry and bioremediation. In *Journal of Hazardous Materials* (Vol. 423). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126985>
31. Purkan, P., Nuzulla, Y. F., Hadi, S., & Prasetyawati, E. T. (2017). Biochemical Properties of Mercuric Reductase from Local Isolate of *Bacillus* sp for Bioremediation Agent. *Molekul*, 12(2), 182. <https://doi.org/10.20884/1.jm.2017.12.2.398>

32. Rajendran, P., Muthukrishnan, J., & Gunasekaran, P. (2003). Microbes in heavy metal remediation. *Indian Journal of Experimental Biology*, 41, 935–944.
33. Reyes, Y. C., Vergara, I., Torres, O. E., Díaz, M., & González, E. E. (2016). Heavy metals contamination: implications for health and food safety. 16, 66–77.
34. Vega Alonso, J. (2015). INTERACCIÓN DE PHOTOBACTERIUM DAMSELAE SUBSP. PISCICIDA CON CÉLULAS SAF-1.
35. Zarza, L. (2017). Historias del agua (3): El desastre de Minamata.
<https://www.iagua.es/blogs/laura-f-zarza/historias-agua-3-desastre-minamata>