

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS PURAS Y NATURALES
CARRERA DE BIOLOGÍA**



**“BIOACUMULACION DE MERCURIO EN EL PERIFITON DE
MACROFITAS Y RELACION CON LA EUTROFIZACION EN LA BAHIA
DE COHANA”**

**Tesis de grado para optar el título de
Licenciatura en Biología**

María Elena Espinoza Sanjinés

Tutor: Darío Achá Cordero, PhD.

Asesor científico: David Point, PhD.

La Paz – Bolivia

2015

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS PURAS Y NATURALES
CARRERA DE BIOLOGÍA**

TÍTULO:

**“BIOACUMULACION DE MERCURIO EN EL PERIFITON DE MACROFITAS Y
RELACION CON LA EUTROFIZACION EN LA BAHIA DE COHANA”**

POR:

María Elena Espinoza Sanjinés

TUTOR:

Darío Achá Cordero, PhD.

ASESOR CIENTÍFICO:

David Point, PhD.

TRIBUNAL REVISOR:

Isabel Morales Belpaire, PhD.

Stéphane Guédron, PhD.

DIRECTOR DE LA CARRERA:

Darío Achá Cordero, PhD.

AGRADECIMIENTOS

Para comenzar quiero agradecer a la Carrera de Biología, al Instituto de Ecología y al IRD (Institut de Recherche pour le Développement), por haberme brindado la oportunidad de realizar este proyecto. A su vez agradezco de manera especial a mi tutor, el PhD. Darío Achá, por su enseñanza y por haberme guiado pacientemente a lo largo de este proceso.

Agradezco también el gran apoyo que me fue otorgado por parte del PhD David Point del IRD, quien como mi asesor científico me guió en el trabajo de laboratorio, enseñándome de manera dedicada todas las técnicas necesarias para el análisis de muestras.

También extendiendo el agradecimiento al personal del Laboratorio de Calidad Ambiental (LCA), quienes permitieron pueda realizar mi trabajo en sus instalaciones y me brindaron su colaboración cuando fue necesario.

A mi familia, a quienes dedico este trabajo, les agradezco todo el apoyo y amor incondicional que siempre me brindaron. Sobre todo, agradezco de corazón a mis padres por otorgarme las herramientas necesarias que me permitieron formarme a lo largo de estos años.

Y por último, a las amigas y amigos con quienes tuve la oportunidad de trabajar durante el transcurso del proyecto y quienes además de brindarme su colaboración, me brindaron su amistad y cariño.

RESUMEN

El metilmercurio (MeHg) es considerado la especie química más tóxica del mercurio debido a su capacidad de bioacumularse y biomagnificarse en la cadena trófica. En sistemas acuáticos, el perifiton asociado a macrófitas juega un papel importante en la producción y acumulación de MeHg. El proceso de metilación de mercurio está relacionado principalmente con la actividad bacteriana, siendo las bacterias sulfato reductoras (BSR) el grupo más importante en la formación de MeHg en lugares anóxicos. El presente trabajo estudió la relación entre la eutrofización y el MeHg encontrado en el perifiton asociado a macrófitas en la Bahía de Cohana. Debido a que esta zona presenta un proceso de eutrofización en curso, posee las condiciones anóxicas óptimas para la actividad de bacterias como las BSR. Por lo tanto, para poder establecer una relación entre la actividad de las BSR y la acumulación de MeHg en el perifiton asociado a macrófitas, se colectaron muestras del mismo a lo largo de un gradiente de eutrofización en dos viajes. Las muestras fueron divididas para realizar los respectivos análisis de: MeHg, mercurio total (HgT) y producción de H_2S para determinar la actividad de BSR. A causa de la gran cantidad de materia orgánica en el perifiton, fue necesario validar un método de extracción selectiva (SEM) que permite extraer la mayor cantidad de MeHg de las muestras para su correspondiente análisis. Los resultados obtenidos, mostraron que a pesar de haber actividad de BSR en el perifiton asociado a macrófitas, no existe una relación de las mismas con la acumulación MeHg. A su vez se consideraron otros parámetros, tales como: HgT, parámetros de descarte y composición isotópica de $\delta^{13}C$ (‰) y $\delta^{15}N$ (‰) para poder ver su influencia sobre la acumulación de MeHg en el perifiton. Sólo las muestras correspondientes al primer viaje presentaron relaciones significativas entre el MeHg con el HgT y con $\delta^{13}C$ (‰). La ausencia de una relación entre la acumulación de MeHg con los isótopos de $\delta^{15}N$ (‰), que son indicadores de eutrofización, nos permite confirmar que en la Bahía de Cohana la acumulación de MeHg en el perifiton asociado a macrófitas no está relacionado a la eutrofización; y más bien podría estar relacionada con otros factores, como ser la composición del perifiton.

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCION.....	9
2. MARCO TEORICO.....	10
2.1 El Lago Titicaca.....	10
2.2 Cuenca Katari.....	11
2.3 Generalidades del mercurio.....	13
2.4 El ciclo del mercurio.....	14
2.5 Bioacumulación y biomagnificación del mercurio.....	15
2.6 Efectos nocivos del metilmercurio.....	16
2.7 Perifiton asociado a macrófitas.....	17
2.8 Metilmercurio asociado a macrófitas y la eutrofización.....	17
2.9 Isótopos en estudios de eutrofización.....	19
3. HIPOTESIS.....	20
4. OBJETIVOS.....	20
5. ZONA DE MUESTRO.....	21
6. METODOLOGIA.....	22
6.1 Toma de muestras.....	22
6.2 Liofilización de muestras de perifiton.....	24
6.3 Análisis de mercurio en perifiton.....	24
6.3.1 Análisis de Mercurio Total.....	23
6.3.2 Validación del Método de Extracción Selectiva (SEM) para muestras de perifiton.....	25
6.3.3 Cuantificación del metilmercurio en perifiton.....	26
6.4 Sulfuro de hidrógeno.....	27
6.5 Composición isotópica del perifiton.....	28
6.6 Análisis estadístico.....	28

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	29
7.1 Parámetros físico químicos	29
7.2 Análisis de metilmercurio	32
7.3 Mercurio total y metilmercurio.....	33
7.4 Metilmercurio y parámetros físico químicos.....	37
7.5 Metilmercurio y otros parámetros de descarte.....	39
7.6 Producción de sulfuro de hidrógeno y relación con el metilmercurio.....	40
7.7 Mercurio y composición isotópica del perifiton.....	45
7.8 Acumulación de metilmercurio en el perifiton asociado a macrófitas en la Bahía de Cohana.....	48
8. CONCLUSIONES.....	51
9. BIBLIOGRAFIA.....	52

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Coordenadas de los puntos de muestreo.....	23
Tabla 2. Promedios de los parámetros físico químicos en la columna de agua, correspondientes a los diferentes puntos de muestreo.....	30
Tabla 3. Concentraciones de HgT, MeHg y % de MeHg en perifiton asociado a Totora, abril – 2013.....	34
Tabla 4. Concentraciones de HgT, MeHg y porcentaje de MeHg en perifiton de Caracea, Totora y Elodea; septiembre – 2013.....	34
Tabla 5. Matriz de Coeficientes de Correlación y probabilidades de Pearson entre MeHg en perifiton asociado a macrófitas con HgT; abril/2013.....	35

Tabla 6. Matriz de Coeficientes de Correlación y probabilidades de Pearson entre MeHg en perifiton asociado a macrófitas con HgT; septiembre/2013.....	36
Tabla 7. Matriz de Coeficientes de Correlación y probabilidades de Pearson entre MeHg, HgT y % de MeHg en perifiton asociado a: Caracea (n=3), Totora (n=3) y Elodea (n=5); septiembre/2013.....	36
Tabla 8. Matriz de Coeficientes de Correlación y probabilidades de Pearson entre MeHg y fosfatos, sulfatos, cloruros, sodio, potasio y calcio.....	39
Tabla 9. Concentraciones de sulfuro de hidrógeno en el perifiton asociado a macrófitas de cuatro puntos de muestreo con y sin molibdato (Mo).....	41
Tabla 10. Matriz de Coeficientes de Correlación y probabilidades de Pearson entre MeHg, % de MeHg y H₂S en perifiton.....	42
Tabla 11. Matriz de Coeficientes de Correlación y probabilidades de Pearson entre MeHg, % de MeHg y H₂S en perifiton asociado a totoras.....	42
Tabla 12. Matriz de Coeficientes de Correlación y probabilidades de Pearson entre MeHg y HgT de perifiton asociado a macrófitas con $\delta^{13}\text{C}$ (‰) y $\delta^{15}\text{N}$ (‰); abril/2013.....	46
Tabla 13. Matriz de Coeficientes de Correlación y probabilidades de Pearson entre MeHg y HgT de perifiton asociado a macrófitas con $\delta^{13}\text{C}$ (‰) y $\delta^{15}\text{N}$ (‰); septiembre/2013.....	47

INDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Cuenca del Rio Katari. Fuente: Instituto de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. 2013.....	13
Imagen 2. Ciclo del mercurio. Fuente Pérez Deiver.....	15
Imagen 3. Bloom algas en el Lago menor del Lago Titicaca. Fuente Stéphane Guedron	19

Imagen 4. Ubicación del área de muestreo en la Bahía de Cohana, Lago Menor Lago Titicaca.....	23
Imagen 5. Liofilizador y muestras en tubos polipropileno con parafilm para ser liofilizadas.....	24
Imagen 6. Resumen del protocolo de extracción de MeHg.....	26
Imagen 7. Tubos vacutainers que muestran la reacción del H₂S con la diamina.....	28

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Regresiones lineales, mostrando la tendencia de los parámetros físico químicos a lo largo del gradiente de eutrofización.....	32
Figura 2. Análisis de regresión lineal entre MeHg y HgT en perifiton asociado a macrófitas; abril / 2013.....	35
Figura 3. Producción de sulfuro de hidrógeno en presencia y ausencia de molibdato (Mo).....	41
Figura 4. Acumulación de MeHg vs producción de sulfuro de hidrógeno por punto y tipo de macrófita.....	43
Figura 5. Análisis de regresión lineal entre HgT en perifiton asociado a macrófitas y $\delta^{13}\text{C}$ (‰); abril / 2013.....	46
Figura 6. Análisis de regresión lineal entre MeHg en perifiton asociado a macrófitas y $\delta^{13}\text{C}$ (‰); abril / 2013.....	47
Figura 7. Porcentajes de MeHg en perifiton asociado a Caraceas, Totoras y Elodeas	49
Figura 8. a) Comparación de porcentajes de metilmercurio encontrado en el punto IDH-2 en abril y septiembre 2013; b) Comparación de porcentajes de metilmercurio encontrado en el punto IDH-3 en abril y septiembre 2013.....	50

1. INTRODUCCIÓN

La eutrofización ocasionada por el incremento de nutrientes, tales como el nitrógeno y fósforo, es un problema que afecta a cuerpos de agua, incrementando la producción primaria en los mismos (Welch., 1992) Debido al aumento en la concentración de nutrientes, la densidad de algas también se incrementa y las mismas tienden a acumular metales (Radway et al 2001), como ser el mercurio (Hg), causando un efecto sobre su disponibilidad. A su vez, las condiciones de anoxia, incremento en la actividad bacteriana y cambios en pH y potencial redox resultantes de la eutrofización, pueden ser factores que incrementan la metilación de mercurio.

El mercurio es un elemento tóxico que se encuentra de manera natural, pero que a causa de actividades antropogénicas, se ve incrementando tanto en la atmósfera, como en ambientes acuáticos (Wilken and Wallschläger 1996) La toxicidad de este metal está relacionada con su especie química, siendo el metilmercurio (MeHg) una de las formas orgánicas más tóxicas para la biota, debido a su capacidad de bioacumularse y biomagnificarse en la cadena trófica afectando sobre todo a ambientes acuáticos que son más sensibles frente a estas situaciones (Boening 2000; Ullrich, Tanton et al. 2010).

Los procesos eutróficos ocasionan la pérdida de oxígeno en cuerpos de agua, estas condiciones anóxicas potencian la actividad de bacterias como las BSR (bacterias sulfato reductoras) que son el grupo más conocido en la metilación de mercurio (Compeau and Bartha 1985). El perifiton asociado a las raíces de macrófitas, produce y retiene materia orgánica convirtiéndose en un ambiente apto para las BSR, y el metilmercurio producido en el perifiton asociado a las raíces de las macrófitas es altamente biodisponible (Miranda et al., 2004)

La Bahía de Cohana, situada en el Lago menor del Lago Titicaca, es una de las zonas más afectadas por la eutrofización que ha llevado a deteriorar la calidad del agua de la Bahía volviéndola no apta para el consumo de personas y de animales (Fontúrbel, 2005). Por esta razón, es importante realizar un estudio para monitorear el proceso de contaminación, y así poder realizar un control posterior. Teniendo en cuenta la importancia del perifiton asociado a las raíces de macrófitas en la metilación de mercurio y conociendo que el incremento de nutrientes causantes de la eutrofización ocasiona un aumento de la biomasa del perifiton; considero

importante determinar si existe una relación entre la eutrofización y la concentración de MeHg en la Bahía de Cohana.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 El Lago Titicaca

El lago Titicaca forma parte del sistema hidrológico cerrado (TDPS) que cuenta con cuatro cuencas principales. La primera, el Lago Titicaca (T) que drena sus aguas hacia el Río Desaguadero (D); el mismo desemboca en el Lago Poopó (P) que al desbordarse durante épocas de crecida de aguas, origina el Salar de Coipasa (S) (UNESCO & ALT)

La cuenca del lago Titicaca se encuentra ubicada en la parte norte central del Altiplano de la Cordillera de los Andes (Dejoux & Iltis. 1991). Con una altitud de 3809,5 msnm y una superficie de 8562 Km², es el lago navegable más alto del mundo y el más grande de América del Sur. De su superficie total el 45% se encuentran en territorio boliviano y el 55% restante corresponde a la República de Perú (Dejoux & Iltis. 1991; ALT).

A su vez, el lago se encuentra dividido en dos cuencas lacustres: el Lago Mayor al norte y el Lago menor al sur, ambos separados por el Estrecho de Tiquina. La Bahía de Cohana - que es la zona de estudio en cuestión - se encuentra en el Lago Menor, caracterizado por su baja profundidad media de unos 9 m y la máxima de 41 m en la fosa de Chua (Dejoux & Iltis. 1991)

Este Lago perenne es alimentado por las lluvias y por los ríos Ramis, Llave, Coata, Katari, Huancané y Suches, mientras que la pérdida de agua se da por evaporación y por el drenaje mediante el Río Desaguadero (Dejoux & Iltis. 1991; ALT)

Respecto a las condiciones climáticas, estas son características de una región de alta montaña, con temperaturas templadas durante el día y frías por la noche. Las precipitaciones son mayores en la parte central y norte con unos 1400mm/año; mientras que en la parte sur se tienen unos 200 mm/año (UNESCO & ALT). La mayor parte de las precipitaciones (entre un 65 a un 78%), se dan durante la época de lluvias que se extiende de diciembre a marzo (Dejoux & Iltis. 1991). La época seca comprendida entre mayo y agosto, aporta con un 3 a 8% de la precipitación anual. Y por último se tienen dos períodos de transición, uno en el mes de abril y otro de septiembre a

noviembre; en el transcurso de los mismos se da el 18 al 29% de las precipitaciones anuales (Dejoux & Iltis. 1991).

La pesca de especies nativas y exóticas es una actividad económica importante en la región. Se estima que del lado boliviano, se extraen unas 2600 toneladas cada año (ALT). Sin embargo, debido a la contaminación ocasionada principalmente por el desecho de aguas servidas, las actividades ganaderas y agrícolas de las zonas circundantes y otras fuentes de contaminación antropogénica; se observaron niveles elevados de parásitos tanto en el agua como en los peces. Este problema ocasiona infecciones gastrointestinales en los consumidores asiduos y daña la calidad del agua. (UNESCO & ALT).

2.2 Cuenca Katari

La cuenca del río Katari es una de las más pobladas y presenta numerosos problemas en relación a la gestión de recursos naturales. La densidad poblacional es más elevada en la sub-cuenca Seque y Seco, donde se encuentra ubicada la ciudad de El Alto.

Respecto a la demanda hídrica, esta es mayor en las sub-cuencas Pallina Alto y Katari Alto, donde el agua es utilizada sobre todo para el riego con demandas de 38 MMC (millones de metros cúbicos) y 33MMC, respectivamente. Seguidamente, en la sub-cuenca Seque y Seco la demanda es de unos 29 MMC y es predominantemente para uso doméstico por parte de la población alteña (MMayA. 2010).

Actualmente, en la cuenca se tiene un serio problema de deterioro de la calidad del agua; debido al crecimiento demográfico, actividades industriales, mineras, agrícolas y agropecuarias. Además, las aguas servidas provenientes de las ciudades de El Alto y Viacha y demás poblaciones, no reciben el tratamiento respectivo previo a su disposición final e incluso algunas poblaciones carecen de un sistema de alcantarillado. Todas estas aguas contaminadas de la cuenca desembocan en la Bahía de Cohana en el Lago Titicaca que se encuentra severamente afectada (MMayA. 2010).

La contaminación de la Bahía de Cohana es preocupante, ya que su expansión amenaza con afectar a las islas Pariti y Suriqui y zonas más alejadas. Unos de los problemas más evidentes son las descargas provenientes de la Planta de Puchukollo, que al ser obsoleta no realiza el

tratamiento respectivo de las aguas servidas. En el año 2007 se determinó que la Bahía de Cohana cumple un rol de laguna de estabilización de estas aguas contaminadas.

El problema es indudable a simple vista, ya que las aguas presentan una coloración oscura y desprenden un olor fétido y nauseabundo. Estas características resaltan más durante la época seca, donde el color es más verdoso y pardo por la materia orgánica retenida en descomposición. Para los comunarios de zonas aledañas, el problema es aún más notable en la parte económica y de salud. Esto debido a que en los últimos años, bajó considerablemente la pesca y la cantidad y calidad del forraje para ganado, que a su vez también se ve afectado por microorganismos patógenos y parasitarios. Estos problemas no solo traen consecuencias en la parte económica, sino también afectan a la salud de las personas; quienes sufren de dolencias gastrointestinales por la ingesta de alimentos contaminados sumados a la baja calidad de agua (Arismendi 2010)

La ciudad de El Alto, es la que tiene mayor impacto sobre este sistema Katari-Cohana, debido al crecimiento demográfico de los últimos años, pero también existe el impacto en menor grado de las zonas de Viacha, Pucarani y Laja. Este problema de contaminación va desde hace un par de décadas. Las comunidades afectadas son: bahías de Pajchiri, Quehuaya y la isla Pariti y el problema se va extendiendo hacia la isla Suriqui.

El río Katari recibe descargas del río Pallina que a su vez antes recibe aguas de los ríos Seco y Seque, los cuales cruzan la ciudad de El Alto y antes de Viacha recibe aguas del río Junthuma. En época de lluvias, el río Katari arrastra una notable cantidad de sedimentos, así como de basura y aguas contaminadas. En la época seca, el flujo es lento y se acumulan los contaminantes que serán transportados más adelante con las lluvias.

Todo esto lleva a la necesidad de tomar medidas para controlar la proliferación de la contaminación, tales como una planta de tratamiento adecuada para las aguas servidas, programas de educación ambiental y utilizar la información recolectada para poder plantear programas de bioremediación en la zona.

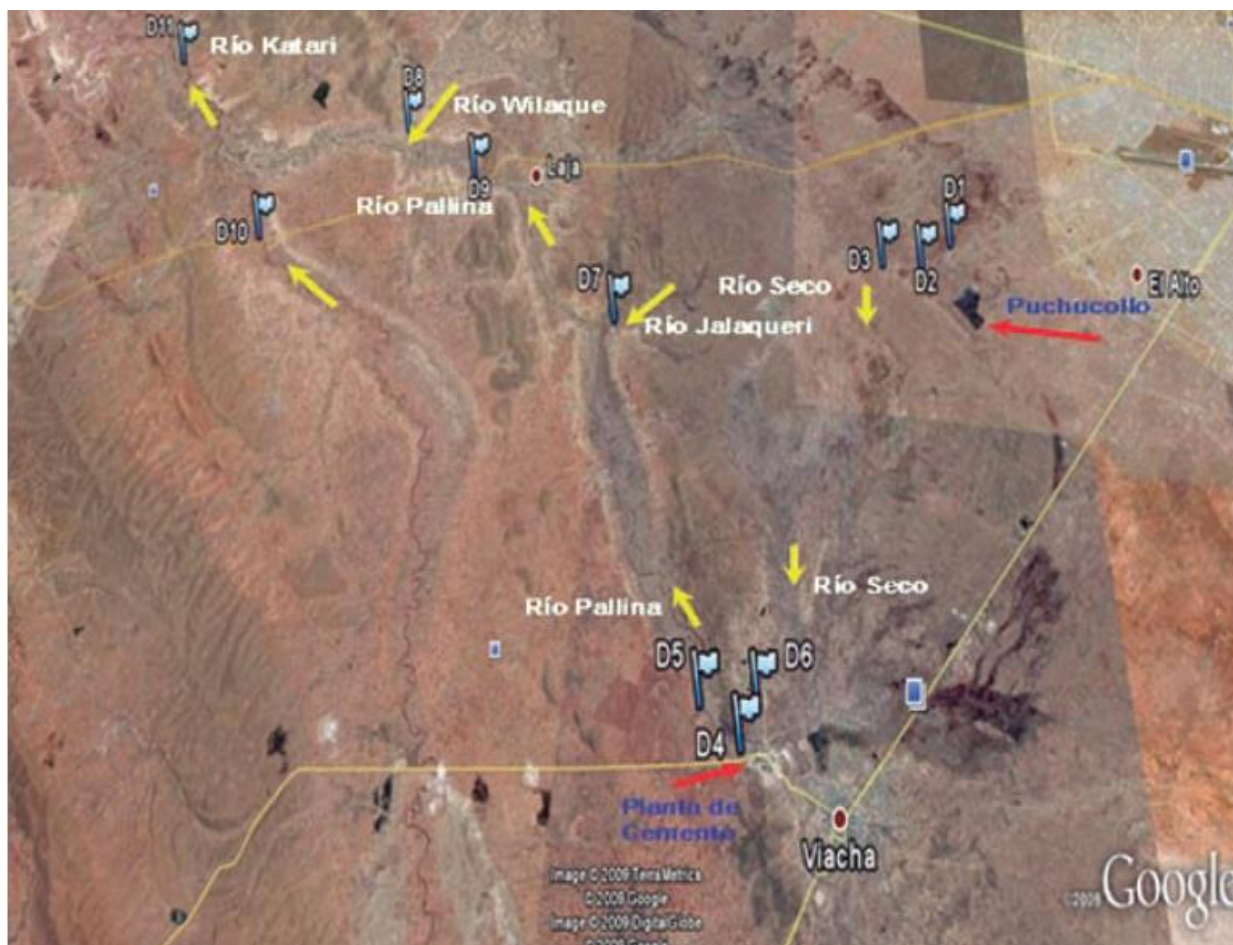


Imagen 1: Cuenca del Río Katari. Fuente: Instituto de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. 2013

2.3 Generalidades del mercurio

El mercurio es un elemento tóxico ampliamente distribuido en el ambiente. Las principales fuentes naturales del mismo, son: las emisiones volcánicas, la evaporación de cuerpos de agua y la desgasificación de la corteza terrestre (WHO 1991). También se lo encuentra de manera natural en sistemas acuáticos, pero en bajas concentraciones (Ullrich, Tanton et al. 2010).

Debido a su presencia libre en la naturaleza, el mercurio junto a otros metales nobles, fue uno de los primeros elementos en ser utilizados por el hombre (Fitzgerald, Mason et al. 1991; Clarkson 1997). Sin embargo, a causa del aumento de la actividad industrial, la combustión de combustibles fósiles, la actividad minera y el crecimiento de la agricultura (Wilken and Wallschläger 1996; Porcella, Ramel et al. 1997), actualmente existe un creciente problema de

contaminación por mercurio, tanto en la atmósfera como en ambientes acuáticos; siendo estos últimos más vulnerables debido a la acumulación de metales tóxicos en las cadenas tróficas (Nriagu and Pacyna 1988; Jackson 1997)

2.4 El ciclo del mercurio

La toxicidad del mercurio está en relación a la especie química, siendo las formas orgánicas las más tóxicas para la biota (Boening 2000). Las especies químicas de mercurio más conocidas en el ambiente, son: mercurio elemental (Hg^0), mercurio inorgánico (Hg^{2+}) y metilmercurio (MeHg).

El mercurio elemental es volátil y, debido a su elevada presión de vapor, es la forma dominante de mercurio en la atmósfera; representando el 95% del mercurio total de la misma y su tiempo de residencia va de 1 a 2 años (O'Driscoll, Rencz et al. 2005; Morel 1998). Por oxidación, el mercurio elemental se transforma en mercurio iónico (Hg^{2+}). Este proceso se da mayormente en la interfase sólido-líquida de la niebla y gotas de nubes; gracias a oxidantes atmosféricos como el bromo (Holmes et al. 2010) y ozono que juegan un rol importante en áreas contaminadas (Hall 1995; Ake, Lindqvist 1986; Morel 1998). El Hg^{2+} es un elemento muy soluble y reactivo que se deposita en cuerpos de agua mediante precipitación (Driscoll 2005; Mason 1994).

Por metilación, generalmente mediada por actividad bacteriana, el Hg^{2+} puede transformarse en metilmercurio (MeHg). Si bien las BSR (Bacterias Sulfato Reductoras) destacan en este proceso; se encontraron otros grupos de bacterias: como las Hierro Reductoras, Bacterias Metanogénicas y Alphaprotobacterias; que son capaces de metilar mercurio (Fleming, Mack et al. 2005; Hamelin *et al.* 2011 & Achá *et al.* 2012). Además de la comunidad bacteriana, existen otros factores abióticos que son importantes en la metilación, como ser: el pH, la temperatura, el potencial redox y agentes orgánicos e inorgánicos formadores de complejos (Ullrich, Tanton et al. 2010). Y también, el mercurio inorgánico puede ser nuevamente reducido a su forma volátil de Hg^0 , volviendo a la atmósfera (Mason et al. 1994).

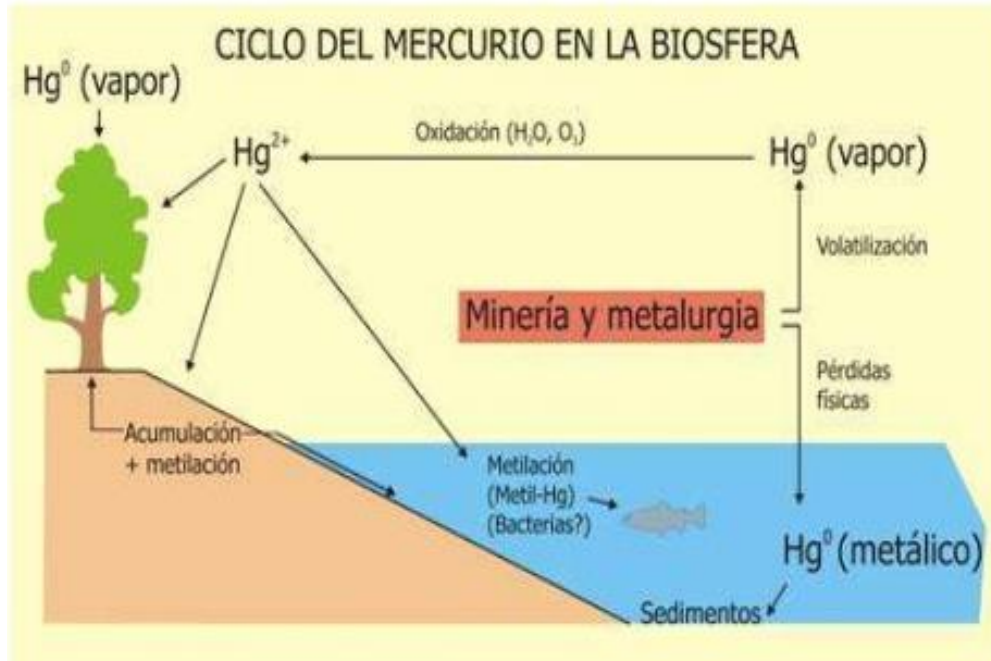


Imagen 2: Ciclo del mercurio. Fuente Pérez Deiver.

2.5 Bioacumulación y biomagnificación del metilmercurio

El término bioacumulación es utilizado para referirse a la concentración de cierta sustancia química en un organismo, que resulta siendo mayor a la encontrada en el medio. En este caso, se toma en cuenta la cantidad de metilmercurio tomado por parte del organismo, tanto del agua como de la dieta misma (Kidd 2012).

Por otro lado la biomagnificación está definida como el incremento de la concentración de un contaminante a lo largo de la cadena trófica, presentando niveles más elevados en organismos superiores (Watras *et al* 1998).

El metilmercurio es uno de los pocos metales capaces bioacumularse y biomagnificarse en la cadena trófica. En ambientes acuáticos los organismos toman el mercurio presente en el agua, por lo que su exposición a este elemento depende de la biodisponibilidad del mismo. Tanto en el caso del Hg^{2+} como del metilmercurio, su disponibilidad está en relación a la presencia de ciertos ligandos, tales como: El DOC (carbono orgánico disuelto), sulfuros, Cl^- entre otros. Con estos ligandos el mercurio forma diferentes complejos, de los cuales algunos son absorbidos con mayor facilidad por las membranas de los organismos acuáticos (Kidd 2012). En ambientes

acuáticos el mercurio ingresa en la cadena trófica mediante los productores primarios, que son una importante fuente de alimento para los organismos que habitan en las aguas. Y se ha encontrado que la concentración de MeHg, incrementa con el nivel trófico (Molina et al 2010).

2.6 Efectos nocivos del metilmercurio

De las tres especies químicas más frecuentes en el ambiente, el metilmercurio (MeHg) tiene un mayor impacto negativo sobre los organismos vivos. Esta neurotoxina cuenta con propiedades lipofílicas y de unión a proteínas que permiten su bioacumulación y biomagnificación en la cadena trófica (Ullrich, Tanton et al. 2010); siendo los ambientes acuáticos los más vulnerables a estos procesos (Molina, Gibon et al. 2010).

Los efectos nocivos del MeHg sobre los organismos vivos, fueron estudiados con mayor profundidad tras el incidente ocurrido en Minamata, Japón en el año 1953. En esta ocasión, una fábrica de acetaldehído que utilizaba sales de mercurio inorgánico como agentes catalizadores, provocó una de las más conocidas tragedias ambientales. Dicha fábrica depositaba sus desechos de mercurio, con parte del mismo ya convertido en metilmercurio, en aguas de la Bahía de Minamata, sin conocer la capacidad de bioacumulación y biomagnificación de la misma (Clarkson 1992). Al contaminar las aguas y los organismos de la Bahía, se provocó el envenenamiento de las personas y animales que habitaban en la zona cuya dieta estaba basada en el consumo de pescado y frutos de mar del área.

En la zona afectada, se observaron comportamientos extraños en peces y gatos. Los primeros rotaban continuamente sobre un punto y seguidamente aparecían flotando sobre las aguas de la bahía. De la misma manera, los gatos de la región empezaron a morir de manera masiva tras sufrir convulsiones y problemas de motricidad. Otros afectados fueron las aves, que caían de repente mientras volaban. (Harada 1995; Grandjean 2010)

Subsecuentemente, los afectados con la que se conoció como la enfermedad de Minamata, fueron los habitantes de la región (Harada 1995). En el caso de los adultos, los daños fueron más fuertes a nivel del sistema nervioso; presentando problemas de ataxia, visuales, auditivos, etc. Sin embargo, los niños y fetos son más susceptibles al envenenamiento por MeHg que en bajas dosis puede traerles problemas motores y de memoria; y en otros casos afectan negativamente al desarrollo cerebral (Zahir 2005; Harada 2005; Mergler 2007).

Debido a que en los seres humanos la principal fuente de MeHg se da por la dieta, las poblaciones que consumen cantidades mayores de pescado y frutos de mar, son las que corren mayor riesgo. Y en estos casos es necesario ver las cantidades de MeHg por comida, que idealmente no deberían exceder los 0.5 mg/kg (WHO).

2.7 Perifiton asociado a macrófitas

Las macrófitas son organismos fotosintéticos acuáticos que pueden ser emergentes, de hojas flotantes, sumergidas o flotantes libres (Thomaz, 2008). Estos organismos son importantes en el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos, ya que participan en el ciclo de nutrientes, y la regulación de condiciones físico químicas, además de albergar a otros organismos (Carpenter et al, 1986).

Tanto en las raíces como en los tallos de las macrófitas pueden establecerse comunidades de perifiton. En este contexto el perifiton es definido como un complejo de algas y otros organismos; tales como: hongos, bacterias, zooplancton, protozoos, etc.; que se encuentran protegidos por una matriz mucopolisacárida (Wetzel 1983, Goldsborough 2005). Al actuar estos organismos como una comunidad, incrementan la eficacia en la captura y procesamiento de nutrientes (Roldan 1992).

En sistemas acuáticos el perifiton cumple roles muy importantes, ya que es la base alimentaria de muchas especies acuáticas. A su vez es dominante en la fijación de carbono y en el ciclo de nutrientes. Y también funciona como un buen bioindicador de la calidad del agua (Roldán 1992; Wetzel 1983).

2.8 Metilmercurio asociado a macrófitas y la eutrofización

La eutrofización es el enriquecimiento de un cuerpo de agua ocasionado por el incremento excesivo de nutrientes, sobretodo de nitratos y fosfatos que aceleran la producción primaria (Welch., 1992). Este proceso, se ve acelerado por actividades agrícolas, industriales y domésticas. Como consecuencia del mismo, se incrementa la DBO (demanda biológica de oxígeno) por la concentración de nutrientes y disminuye la cantidad del oxígeno disuelto, lo que ocasiona una pérdida de la diversidad de especies. Además, la aparición de densas masas de algas y vegetación acuáticas, bloquea el ingreso de luz e incrementa la materia orgánica en

descomposición, poniendo de este modo en peligro a los cuerpos de agua (Roldán 1992). En el caso de los lagos, el fósforo es el factor limitante de la eutrofización, por lo que su incremento excesivo acelera este proceso (Corell 1998; Nixon., 1995).

Las macrófitas son importantes en el reciclaje de nutrientes, debido a que durante el proceso fotosintético toman fósforo y nitrógeno del agua como principales nutrientes. Este proceso de reciclaje permite la regulación de fósforo en lagos (Lapointe et al., 1994, Motomi et al., 2005, Zentina et al.). Sin embargo, el incremento acelerado de fósforo en los lagos conlleva a un incremento en la abundancia de macrófitas flotantes. Estas disminuyen la disponibilidad de luz para las macrófitas sumergidas debilitando de esta manera su capacidad de reciclar el fósforo (Motomi et al., 2005).

Las condiciones anóxicas generadas a causa de la eutrofización, favorecen la actividad de bacterias como las BSR (bacterias sulfato reductoras) que son el grupo más conocido en la metilación de mercurio (Compeau and Bartha 1985). El perifiton asociado a macrófitas produce y retiene materia orgánica, convirtiéndose en un ambiente apto para las BSR y el metilmercurio producido en el perifiton asociado a las raíces de las macrófitas es altamente biodisponible (Miranda et al., 2004)

Además, se vio que la elevada cantidad de nutrientes causantes de la eutrofización resultan en un incremento en la biomasa de perifiton, permitiendo la retención de compuestos como el MeHg (Mauro et al., 2002, Hill, 2010). Sin embargo, también se conoce que el perifiton es altamente sensible a cambios en la calidad del agua, respondiendo rápidamente al enriquecimiento de nutrientes en lagos, mostrando modificaciones tanto a nivel estructural y como funcional (McCormick et al. 1998).



Imagen 3. Bloom de algas en el Lago menor del Lago Titicaca. Fuente Stéphane Guedron

2.9 Isótopos en estudios de eutrofización

Recientemente los isótopos estables han demostrado ser una herramienta útil en estudios ecológicos, ya que permiten inferir procesos, estimar tasas, identificar fuentes contaminantes, etc. (Sulzman 2007).

En estudios de eutrofización, los isótopos de nitrógeno son buenos marcadores que permiten medir de manera directa la fuente del mismo y determinar con mayor precisión el origen de la contaminación. En estos casos el nitrógeno proveniente de fuentes antropogénicas, se encuentra enriquecido en ^{15}N respecto a otras fuentes, como ser el nitrógeno atmosférico o los fertilizantes (McClelland, Valiela et al. 1997).

Por otra parte, los isótopos de carbono son útiles para poder determinar fuentes de carbono y se ha demostrado que el ^{13}C permiten identificar si las fuentes de DOC (carbono orgánico disuelto) son de origen alóctono o autóctono ((Pierson-Wickmann, Gruau et al. 2011).

3. HIPÓTESIS

La eutrofización da lugar a la actividad de bacterias como las sulfato reductoras, por lo que se tendrá una mayor concentración de metilmercurio en el perifiton de zonas más eutrofizadas.

4. OBJETIVOS

Principal:

Establecer una relación entre la eutrofización y el metilmercurio encontrado en el perifiton de las macrófitas

Específicos:

- Colectar muestras de perifiton en un gradiente de eutrofización
- Determinar los parámetros físico-químicos de los puntos muestreados.
- Determinar la concentración de mercurio total en el perifiton.
- Determinar la concentración de metilmercurio en el perifiton.
- Determinar la actividad de BSR, mediante la producción de H₂S.

5. ZONA DE MUESTREO

La Bahía de Cohana está situada en la zona central del Lago Menor del Lago Titicaca, en la desembocadura del Río Katari y colinda con la Bahía de Taraco al sur, con la Bahía de Puerto Pérez. Al norte y al oeste se encuentran las islas Suriqui, Taquiri y Pariti (Montes de Oca, 2005).

Debido a la creciente contaminación en sus aguas, la Bahía de Cohana se ha convertido en el problema ambiental más serio del Lago Menor y también en una de las problemáticas socio-ambientales más críticas del país.

La contaminación tiene como fuente principal la descarga de desechos provenientes de la ciudades de Viacha y de El Alto, este último tiene una creciente población de 974.754 habitantes (INE,2011). Además del crecimiento poblacional, otro problema es la cantidad de industrias ubicadas en ambas ciudades, las cuales desechan sus aguas servidas en los cuerpos de agua. En la zona se tiene la planta de Puchukollo para el tratamiento de aguas, pero la misma quedó obsoleta hace bastante tiempo. La falta de una planta de tratamiento adecuada, hace que estos residuos contaminen las aguas y eventualmente las mismas desembocan mediante el Río Katari, en la ya eutrofizada Bahía de Cohana (MMAyA, 2010).

La contaminación de la Bahía es evidente a simple vista por la tonalidad de sus aguas, el olor fétido que desprende y la presencia de algas flotantes como ser la lenteja de agua (*Lemna gibba*) indicando un proceso eutrófico en curso (Fortúrbel, 2005).

6. METODOLOGIA

6.1 Toma de muestras

La toma de muestras se llevó a cabo en los meses de abril y de septiembre del 2013 en el marco del proyecto “Enfoque socio-ambiental de la eutrofización, los causantes y los potenciales de bioremediación en el continuo entre el Lago Titicaca y la Ciudad de El Alto”.

Para el muestreo, se consideraron cinco puntos y dos controles a lo largo de un gradiente de eutrofización. En los mismos, se realizaron medidas de parámetros físico-químicos y se tomaron muestras para determinar concentraciones de DOC y de otros parámetros en la columna de agua. En el caso del perifiton, durante el mes de abril, se realizó la toma de muestras en cuatro puntos (C1, C2, IDH-2 e IDH-3); y en septiembre, pudo colectarse muestras en cinco puntos (C2, IDH-2, IDH-2.5, IDH-3 e IDH-4). A su vez, en el segundo viaje también se realizaron incubaciones de perifiton para ver producción de sulfuro de hidrógeno.

Para tomar las muestras en totoras, se utilizó tijeras de podar para poder cortar los tallos y el perifiton fue colectado manualmente en tubos polipropileno (falcon) de 50 ml. En el caso de las macrófitas sumergidas, se utilizó el muestreador de sedimentos para tomar las muestras y tras la colecta, se utilizó guantes y pinzas plásticas para separar el perifiton de las macrófitas y depositarlo en tubos polipropileno de 50ml, debidamente rotulados. Seguidamente, se colocó los tubos en bolsas ziploc y se los almacenó en la nevera unos 4°C para su conservación.

En el caso de los parámetros físico químicos, estos fueron obtenidos utilizando la sonda multiparamétrica Hanna, con la cual se realizaron medidas en cada punto de muestreo.

<u>Puntos de muestreo</u>	<u>Latitud</u>	<u>Longitud</u>
IDH-C1	16°19'52.58"S	68°43'1.31"W
IDH-C2	16°19'42.71"S	68°43'13.77"W
IDH-1	16°19'52.41"S	68°44'18.05"W
IDH-2	16°20'34.65"S	68°43'58.37"W
IDH-2.5	16°21'4.97"S	68°43'36.30"W
IDH-3	16°21'19.36"S	68°43'8.40"W
IDH-4	16°22'0.12"S	68°41'43.97"W

Tabla 1: Coordenadas de los puntos de muestreo



Imagen 4. Ubicación del área de muestreo en la Bahía de Cohana, Lago Menor Lago Titicaca. Imagen adaptada de Google Earth.

6.2. Liofilización de muestras de perifiton.

Para la liofilización, se dejaron descongelar las muestras de perifiton a temperatura ambiente en los tubos de polipropileno (falcon) de 50 mls. Seguidamente, se colocó parafilm sobre las boquillas de los tubos realizando pequeños orificios sobre el mismo. Finalmente, se llevaron los tubos al liofilizador donde permanecieron por un periodo aproximado de 48 horas.

Tras la liofilización de las muestras, estas fueron molidas y almacenadas en sus respectivos tubos de polipropileno para el posterior análisis.



Imagen 5. Liofilizador y muestras en tubos polipropileno con parafilm para ser liofilizadas

6.3 Análisis de mercurio en perifiton

6.3.1 Análisis de Mercurio Total.

Una pequeña cantidad de cada muestra liofilizada (0,03 gr) fue enviada en tubos Eppendorf de 1 ml a Toulouse, Francia para el análisis de mercurio total (HgT), el cual fue llevado a cabo en el Laboratorio del Geosciences Environnement Toulouse (GET) utilizando un Analizador Directo de Mercurio (DMA por sus siglas en inglés).

Este equipo permite realizar un análisis efectivo y rápido, ya que utiliza la descomposición térmica para liberar el mercurio de la muestra, y de esta manera no es necesario la previa preparación de las muestras. En este caso las muestras de referencia utilizadas fueron NIST 2976 and MESS 3 y el tiempo de descomposición fue de dos horas a 200 °C.

METILMERCURIO

6.3.2 Validación del Método de Extracción Selectiva (SEM) para muestras de perifiton

Para el análisis de metilmercurio (MeHg) en perifiton, se trabajó con el método de extracción selectiva (SEM) estandarizado por Masbou, el cual permite separar el MeHg de la matriz perifítica (Masbou et al. 2013).

Antes de comenzar con la extracción, es preciso contar con una planilla donde anotar los pesos tras cada etapa, para poder realizar los cálculos posteriores.

A continuación, se detallan los pasos a seguir.

Primeramente se rotularon tubos polipropileno de 50 y de 15 ml y luego se los pesó junto a sus respectivas tapas. Seguidamente, se colocó 0,150 gr. de perifiton liofilizado en los tubos de 50 ml. Para comprobar el correcto funcionamiento del método, se prepararon blancos y se utilizó la muestra de referencia TORT-2, que tiene una concentración conocida y certificada de MeHg de 152 ng/g.

Seguidamente, se colocó en cada tubo 5 ml de NaBr ácido más 10 ml de CuSO₄ y se los pesó. Estos reactivos permiten liberar el MeHg de las muestras, en forma de MeHgBr. A continuación se agregó 10 ml de tolueno en cada tubo, ya que el MeHgBr es altamente soluble en este disolvente orgánico. Para concretar esta fase de la extracción, se volvieron a pesar los tubos y se los sometió a agitación en una mesa horizontal a 180 rpm durante 70 minutos.

En el transcurso de la agitación, se preparó el Na₂S₂O₃ 0,005 M, que al ser un compuesto muy inestable, debe ser preparado momentos previos a su utilización. Concluido el proceso de agitación, se centrifugaron los tubos por 5 minutos a 5000 rpm para separar las fases y utilizando una micropipeta de 1 ml; se transfirió el sobrenadante con la fase de tolueno de cada muestra a los tubos polipropileno de 15 ml.

Posteriormente, se llevó a cabo una extracción inversa de la fase solvente. Para ellos, se colocó 4 ml de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ en cada tubo y tras pesarlos, fueron llevados al vórtex por 2 minutos. Por último, se centrifugaron los tubos durante 30 minutos a 5900 rpm y con ayuda de pipetas Pasteur, se extrajo la fase acuosa de cada muestra a tubos de polipropileno de 5 ml, que fueron almacenados en el refrigerador para su posterior análisis. Gracias a la extracción inversa, se obtuvieron complejos estables de $\text{MeHg}-\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ disueltos en una fase acuosa, permitiendo un posterior análisis por fluorescencia atómica para la cuantificación del MeHg .

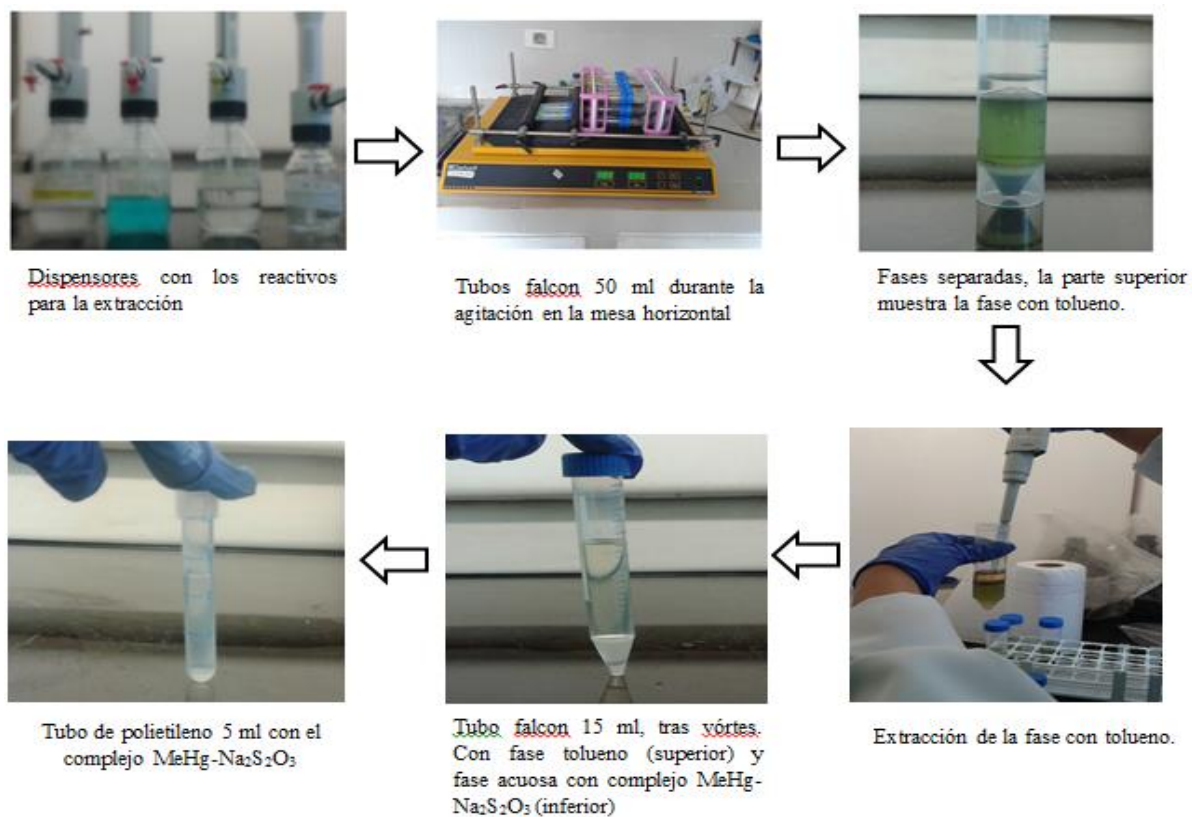


Imagen 6. Resumen del protocolo de extracción de MeHg .

6.3.3 Cuantificación del metilmercurio en perifiton

Tras la extracción, las concentraciones de MeHg fueron determinadas por Espectrometría de Fluorescencia Atómica – Vapor frío (CV-AFS), siguiendo el protocolo EPA 1631 para mercurio total.

Diferentes pruebas se llevaron a cabo para determinar las condiciones óptimas de análisis en muestras de perifiton que son detalladas a continuación:

Primeramente, se tomó una alícuota de unos 2 ml del complejo MeHg-tio sulfato de cada muestra y se lo llevó a una concentración de 0,5 N con HCl. Seguidamente, se colocó una cantidad de 500 µl de BrCl y se dejó oxidar durante una noche. Paralelamente se preparó una curva de calibración utilizando una solución madre de mercurio y siguiendo las mismas condiciones de preparado que en las muestras.

Al día siguiente se tomó una alícuota de 1.5 ml de cada muestra y se le colocó un spike de 1ng/g de la solución estándar de mercurio inorgánico (49.36 ng/g), para poder realizar una corrección al momento de realizar los cálculos. Finalmente, la absorbancia de las muestras fue leída en el Espectrómetro de Fluorescencia Atómica-Vapor frío utilizando SnCl₂ como agente reductor.

6.4 Sulfuro de hidrógeno

Para poder responder al principal objetivo de este estudio y establecer una posible relación entre la actividad de bacterias sulfato reductoras y la producción de metilmercurio en el perifiton asociado a macrófitas, se llevó a cabo un análisis de sulfuro de hidrógeno (H₂S) acorde al protocolo de Cline (Cline et al, 1969). Para ello, previo al viaje, en instalaciones del Laboratorio de Calidad Ambiental (LCA), se preparó una solución de diamina 1:10 con HCl 18,5% a partir de una solución concentrada de diamina con cloruro férrico. Seguidamente se colocó 1 ml de la dilución 1:10 de diamina en tubos vacutainers, los cuales fueron llevados al viaje.

Tras los muestreos, para las incubaciones se introdujeron aproximadamente 5 cc. de perifiton en los vacutainers con diamina y se sacó el aire con ayuda de una jeringa para mantener las condiciones anaerobias requeridas. En caso de haber presencia de sulfuro de hidrógeno, pudo observarse inmediatamente la coloración azulada característica del método. Para cada muestra se hicieron incubaciones con y sin molibdato (Mo) para determinar la presencia de bacterias sulfato reductoras (BSR).

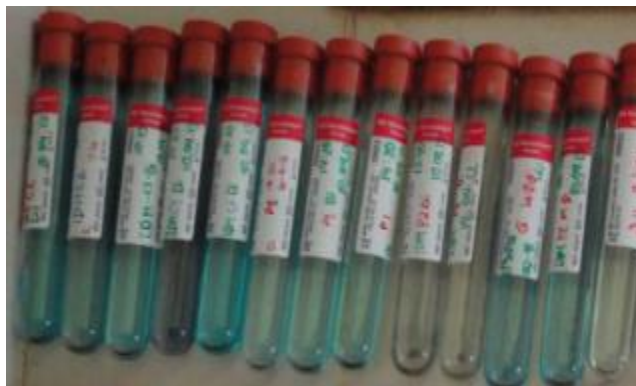


Imagen 7. Tubos vacutainers que muestran la reacción del H₂S con la diamina.

De vuelta en el laboratorio, la absorbancia de las muestras fue determinada por espectrofotometría a una longitud de onda de 670 nm. Para esto, primeramente se preparó una curva de calibración con concentraciones de 35,78 $\mu\text{mol/L}$, 17,87 $\mu\text{mol/L}$, 7,16 $\mu\text{mol/L}$ y 3,59 $\mu\text{mol/L}$ a partir de la muestra de referencia de azul de metileno RAD 171. Seguidamente, se prosiguió con la lectura de las muestras realizando diluciones con agua MilliQ en algunos casos.

6.5 Composición isotópica del perifiton

Para corroborar los resultados encontrados entre la acumulación de mercurio y la eutrofización, se hizo uso de datos complementarios de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) y $\delta^{15}\text{N}$ (‰) en el perifiton.

La composición isotópica en las muestras de perifiton se determinó utilizando un espectrómetro de masas de relación isotópica de flujo continuo (CF-IRMS) y el análisis se llevó en la Plataforma de Espectrometría Isotópica del laboratorio LIENS de la Universidad de la Rochelle en Francia.

6.6 Análisis estadístico.

Tras comprobar la normalidad de los datos, para poder ver la relación entre el metilmercurio con el mercurio total, sulfuro de hidrógeno y composición isotópica; se llevaron a cabo análisis de correlación para determinar la fuerza de la relación entre estas variables, y si la misma es significativa. A continuación, de haber correlación, se hicieron análisis de regresión para ver la

tendencia de la relación. Para estos análisis, se hizo uso del grapher SIGMA PLOT 12.0 y las gráficas fueron realizadas en el programa Excel 2010.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Parámetros físico químicos de la columna de agua.

La Tabla 2, muestra los promedios correspondientes a los parámetros físico químicos en la columna de agua, lugar donde se muestreó el perifiton asociado a macrófitas, y los mismos permitieron establecer el gradiente de eutrofización en la zona de muestreo.

En la Figura 1, observamos la tendencia que siguen estos parámetros. De los datos obtenidos, el oxígeno disuelto (DO) y el pH son los valores que permiten ver claramente el gradiente de eutrofización en el área. Por un lado, el oxígeno disuelto, en porcentaje como en concentración (%DO y DO mg/l), disminuye a medida que nos adentramos en los puntos más eutrofizados y la regresión lineal en ambos casos es alta y significativa (%DO: $R^2 = 0,9896$, $P = 0,005$; DO mg/ml: $R^2 = 0,9935$, $P = 0,003$). Este rasgo es característico de zonas eutrofizadas, ya que la descomposición de materia orgánica consume bastante oxígeno. A su vez, la proliferación de algas flotantes limita el proceso fotosintético de la vegetación sumergida, evitando de este modo la producción de oxígeno (Moreta 2008).

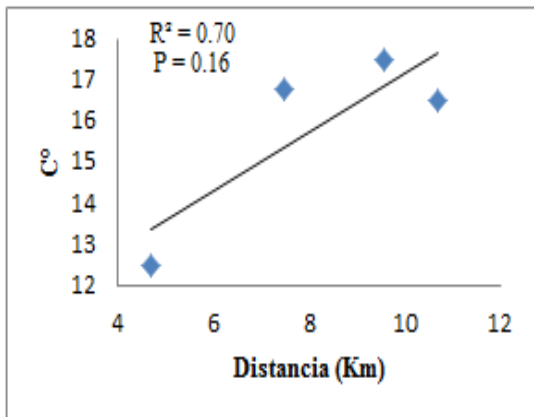
Por otro lado, el pH muestra una tendencia similar a la anterior, ya que baja en los puntos más eutrofizados y el análisis de regresión muestra una relación alta y significativa ($R^2 = 0,9516$, $P = 0,024$). Ambas condiciones de anoxia y de acidificación, son características de zonas eutrofizadas y en este caso muestran claramente que las muestras de perifiton asociado a macrófitas, fueron colectadas en un gradiente de eutrofización.

Si bien se tomaron otros parámetros, la regresión entre los mismos y los puntos de muestreo, no demostró ser significativa para la conductividad ($\mu\text{s/cm}$), la salinidad y la temperatura ($^{\circ}\text{C}$). Y en el caso del potencial redox (pH mv) la tendencia muestra que este es mayor en los puntos menos eutrofizados ($R^2 = 0,9618$, $P = 0,019$).

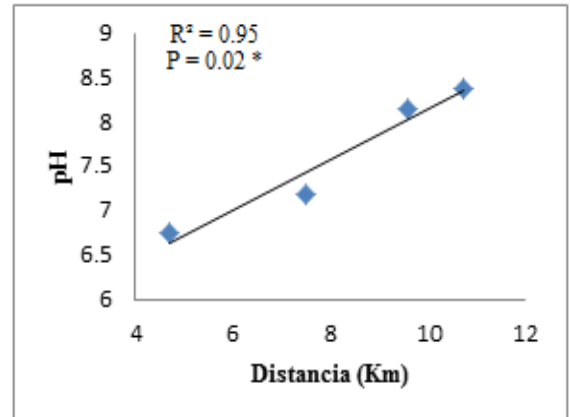
Tabla 2: Promedios de los parámetros físico químicos en la columna de agua, correspondientes a los puntos de control y de muestreo.

Punto	°C	pH	pH mV	DO %	DO mg/l	μS/cm	Salinity	Distancia (Km)
IDH-C1	16.51	7.22	-62.59	43.85	2.67	1016.53	0.51	-
IDH-C2	16.79	7.59	-81.74	58.67	3.57	935.93	0.46	-
IDH-1	16.51	8.39	-123.55	106.51	6.49	1051.87	0.52	10.71
IDH-2	17.51	8.15	-111.40	97.27	5.78	959.57	0.48	9.57
IDH-3	16.79	7.20	-61.50	56.18	3.40	962.90	0.48	7.48
IDH-4	12.52	6.76	-35.14	1.90	0.13	405.16	0.20	4.68

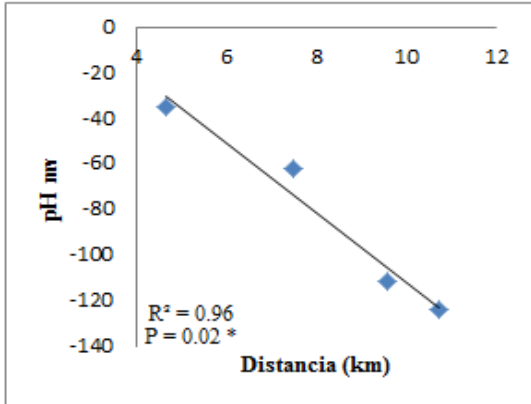
a)



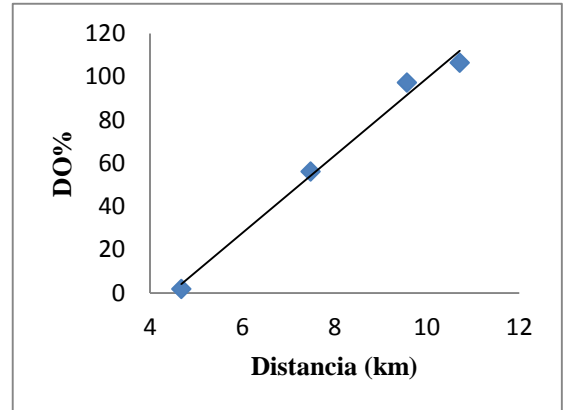
b)



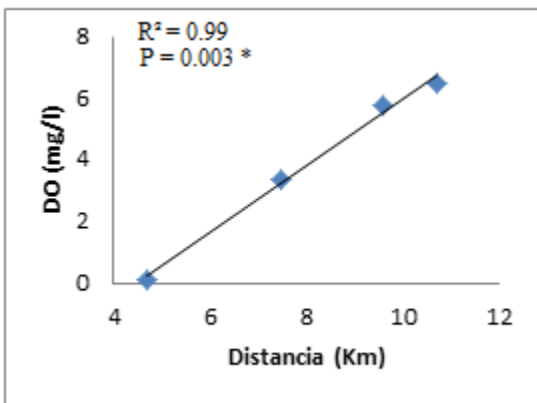
c)



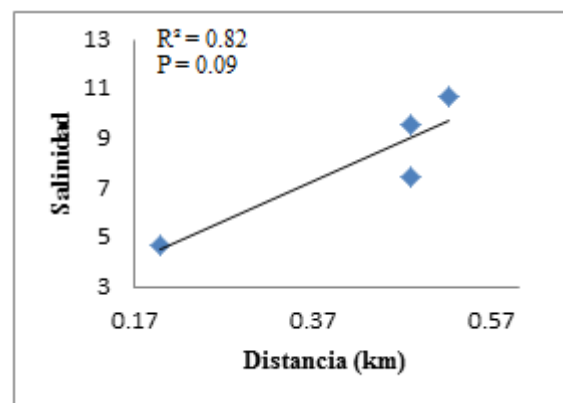
d)



e)



f)



g)

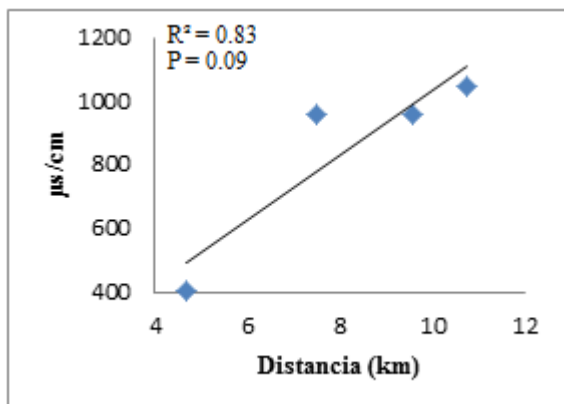


Figura 1. a) Temperatura (C°) vs distancia (Km); b) pH vs distancia (Km); c) potencial redox (pH mv) vs distancia (Km); d) DO% vs distancia (Km); e) DO (mg/l) vs distancia (Km); f) Salinidad vs distancia (Km); g) conductividad (µs/cm) vs distancia (Km) a partir de la entrada del río Katari. * Existe una relación significativa (P< 0.05).

7.2 Análisis de metilmercurio

Para poder detectar las concentraciones de MeHg, es preciso separar previamente el analito de la matriz de la muestra. Una vez que se realiza este paso, es posible detectar las concentraciones de MeHg mediante espectrofotometría de fluorescencia atómica de vapor frío (CV-AFS).

Por lo general, la separación del analito se realiza mediante destilación para muestras de agua y digestión ácida en sedimentos (EPA 1630; USEPA 2001). Sin embargo, debido a la gran cantidad de materia orgánica presente en el perifiton, estos métodos convencionales no logran separar el MeHg completamente de la matriz ocasionando interferencias al momento de realizar la cuantificación por CV-AFS.

Con el fin de obtener resultados más precisos en las concentraciones de MeHg en muestras biológicas, Masbou et al (2013), aplicaron una técnica de extracción selectiva de MeHg en diferentes materiales de referencia certificados (DOLT-4, TORT-2, BCR-463, ERM-CE464,

BCR-414). El resultado final de esta extracción, es un complejo de MeHg con tiosulfato. Se conoce que el mercurio tiene gran afinidad con este tipo de grupos (Ravichandram 2004), por lo que el resultado es un complejo muy estable.

Los resultados hallados por Masbou, et al (2013) mostraron un porcentaje de recuperación de MeHg superior al 97% en las muestras de referencia, así como una cuantificación precisa de las concentraciones por CV-AFS. Debido a que este método físico químico de extracción permite un análisis más preciso y eficiente de MeHg en muestras orgánicas, fue aplicado en el perifiton colectado en la Bahía de Cohana. En este caso, y debido a que no existe material de referencia certificado de perifiton, se trabajó con la muestra de referencia TORT – 2 para medir el funcionamiento correcto del método.

Dicho material de referencia tiene una concentración certificada de MeHg de 152 +/- 13 ng/g, y tras la extracción los resultados obtenidos fueron los esperados. Tras realizar los respectivos cálculos, pudimos constatar que se recuperó el 100% del MeHg de la muestra de referencia, obteniendo un valor de 152.96 ng/g. Este resultado, nos permite validar la aplicación de esta técnica para el análisis de MeHg en muestras de perifiton.

Esencialmente se siguieron los pasos validados por Masbou. Sin embargo, fue preciso realizar ciertas modificaciones para el análisis de cuantificación por CV-AFS. Para empezar, Masbou tomo una alícuota de la fracción purificada del complejo metilmercurio-tio sulfato (MeHg-TS) y la diluyó unas cinco veces en HCl 0.5%. En este caso, fue preciso utilizar casi toda la fracción purificada, ya que se tomó una alícuota de 2 ml y se la llevó a una concentración de 0.5N con HCl. Además a diferencia de Masbou, fue preciso utilizar una mayor cantidad de BrCl (0.5ml) para la oxidación del mercurio y no se colocó hidroxilamina previo a la cuantificación, ya que se vio que la misma afectaba la detección por CV-AFS.

7.3 Mercurio total y metilmercurio

Las Tablas 3 y 4 muestran las concentraciones de mercurio total (HgT) y metilmercurio (MeHg) encontrado en el perifiton muestreado. Cabe esclarecer que durante la campaña realizada en el mes de abril, sólo se encontró perifiton asociado a totoras en cuatro de los puntos muestreados (IDH-C1, IDH-C2, IDH-2 e IDH-3). Por otra parte, en el mes de septiembre se encontró perifiton

asociado a totoras, caraceas y elodeas en cinco puntos (IDH-C2, IDH-2, IDH-2.5, IDH-3 e IDH-4).

Tabla 3: Concentraciones de HgT, MeHg y % de MeHg en perifiton asociado a Totora, abril – 2013.

<u>Ptos. Muestreo</u>	<u>HgT (ng/g)</u>	<u>MeHg (ng/g)</u>	<u>% MeHg</u>
IDH-C1	13.29	3.82	28.76
IDH-C2	17.46	6.92	39.61
IDH-2	28.46	11.22	39.42
IDH-3	11.22	3.16	28.15

Tabla 4: Concentraciones de mercurio total (HgT), metilmercurio (MeHg) y porcentaje de MeHg en perifiton de Caracea, Totora y Elodea; septiembre – 2013.

	<u>Ptos. muestreo</u>	<u>HgT (ng/g)</u>	<u>MeHg (ng/g)</u>	<u>% MeHg</u>
<u>P. Caracea</u>	IDH-C2	20.02	0.8	4
	IDH-2	39.66	2.21	5.58
		57.79	2.75	4.76
<u>P. Totora</u>	IDH-2	53.13	22.21	41.8
	IDH-2.5	12.28	3.02	24.56
	IDH-3	5.76	2.33	40.52
<u>P. Elodea</u>	IDH-4	38.6	0.87	2.26
		13.8	1.61	11.67
		20.82	2.98	14.29
		45.79	3.66	7.98
		22.72	1.46	6.41

Los datos correspondientes al mes de abril (Tabla 5) muestran una elevada correlación positiva entre HgT y MeHg del perifiton asociado a totoras ($r = 0,99$, $p = 0,009$). A continuación, el análisis de regresión lineal (Figura 2), muestra que la intensidad de dicha relación es alta y significativa ($R^2 = 0,98$, $P = 0,009$); mostrando que las concentraciones de MeHg encontradas en esta primera campaña, dependen de la disponibilidad de HgT en el perifiton asociado a totoras.

Tabla 5: Matriz de Coeficientes de Correlación y probabilidades de Pearson entre MeHg en perifiton asociado a macrófitas con HgT; abril/2013. * Existe una correlación significativa ($P < 0.05$). (n=4)

<u>Correlación de Pearson</u>		<u>MeHg</u>
<u>HgT</u>	R	0.99
	P	0.009 *

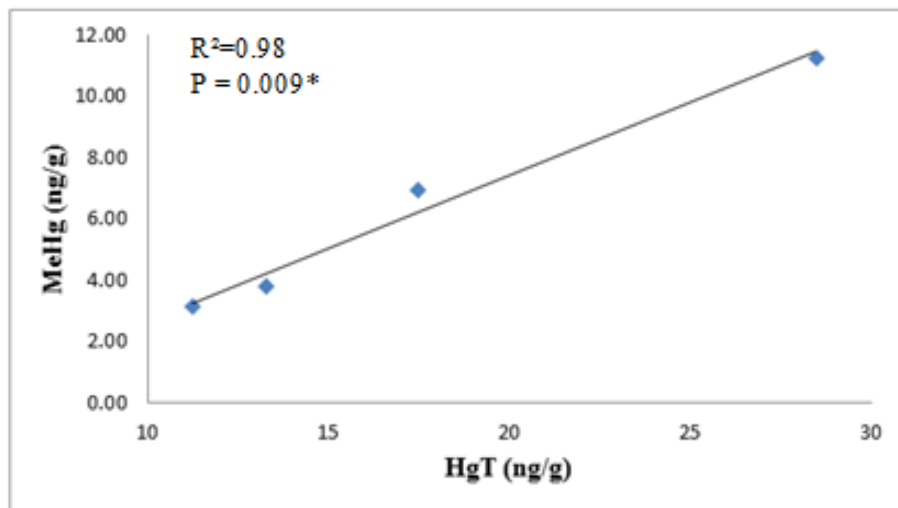


Figura 2: Análisis de regresión lineal entre MeHg y HgT en perifiton asociado a macrófitas; abril / 2013. * Existe una relación significativa ($P < 0.05$).

Por otra parte, de manera general los datos correspondientes a septiembre (Tabla 6) no muestran una correlación significativa entre el HgT y el MeHg. Adicionalmente y debido a que durante este segundo viaje se obtuvieron muestras de perifiton asociado a diferentes macrófitas, se realizaron análisis de correlación por separado para cada caso. Sin embargo, los resultados obtenidos no son significativos para ninguno de los casos, por lo que en esta segunda campaña no puede establecerse una influencia del HgT sobre las concentraciones de MeHg encontradas en las muestras de perifiton (Tabla 7).

Tabla 6: Matriz de Coeficientes de Correlación y probabilidades de Pearson entre MeHg en perifiton asociado a macrófitas con HgT; septiembre/2013 * Existe una correlación significativa ($P < 0.05$).

<u>Correlación de Pearson</u>		<u>MeHg</u>
<u>HgT</u>	R	0.46
	P	0.25

Tabla 7: Matriz de Coeficientes de Correlación y probabilidades de Pearson entre MeHg, HgT y % de MeHg en perifiton asociado a: Caracea (n=3), Totora (n=3) y Elodea (n=5); septiembre/2013.

<u>Correlación de Pearson</u>		<u>MeHg</u>		
		<u>Caracea</u>	<u>Totora</u>	<u>Elodea</u>
<u>HgT</u>	R	0.97	0.99	0.3
	P	0.15	0.06	0.62

La disponibilidad de mercurio es considerada, en ciertos casos, un factor importante en la presencia de MeHg en sistemas acuáticos y diferentes estudios llevados a cabo en los diversos compartimientos acuáticos, han comprobado la importancia de este factor. En sedimentos de la

Laguna de Venecia se encontró una elevada correlación positiva ($r=1$, $p < 0.05$) entre el HgT y el MeHg en los primeros 2.5 cm (Seunghye, et al. 2007). A su vez, en el caso de sedimentos se vio que el mercurio inorgánico (Hg^{2+}) es la especie química que tiene mayor impacto sobre la producción de MeHg; esto fue determinado mediante ensayos de laboratorio, donde la adición de Hg^{2+} incrementó la producción de MeHg (King et al. 1999, Hintelmann, et al. 2009). En el caso de perifiton, también se estudió la importancia de la disponibilidad de mercurio; Bell y Scudder. 2007, obtuvieron una correlación positiva significativa ($r= 0.88$, $p < 0.001$) entre el HgT y el MeHg en el perifiton colectado en ríos (Bell & Scudder. 2007).

No obstante, al igual que en los datos correspondientes a septiembre, no siempre se presenta una relación entre estas variables. En ocasiones el mercurio se une a otros compuestos, o se presentan factores que afectan su disponibilidad; haciendo que solo una pequeña fracción se encuentre disponible para la metilación (Hsu Kim et al. 2013). Además otros estudios, demostraron que en ciertos casos existen otros los factores que tienen mayor influencia sobre la metilación de mercurio, como ser Lanza 2013, quien determinó una fuerte influencia de la comunidad algal sobre la acumulación de MeHg en el perifiton de macrófitas del lago Uru Uru.

7.4. *Metilmercurio y parámetros físicoquímicos*

Los factores abióticos juegan un rol muy importante en la metilación de mercurio. Empezando por el pH, muchos estudios estipulan que los pH ácidos incrementan la disponibilidad del mercurio para su metilación (Winfrey et al. 1990; Miskimmin et al 1992). Un estudio realizado con raíces de *E. crassipes* coincidió con este dato, mostrando mayor metilación de mercurio cuando los valores de pH se encontraban entre 6 y 7 (Guimaraes et al, 1999). Al contrario, en el caso de sedimentos se ha encontrado que los pHs ácidos inhiben la metilación; esto podría deberse a que a una supresión de la actividad de bacterias metiladoras (Steffan et al. 1988; Gilmour et al. 1991); o debido a que niveles bajos de pH afectan la disponibilidad de mercurio inorgánico al promover su asociación con otras partículas. (Ullrich 2001)

Otros factores importantes son el oxígeno y el potencial redox. Por lo general, los medios anóxicos con potenciales redox negativos presentan mayor acumulación de MeHg. Esto debido a que estas condiciones son aptas para grupos de organismos metiladores como ser las bacterias sulfato reductoras (BSR), en este caso su potencial redox óptimo es de alrededor de -100mv. A

valores más bajos, otras bacterias, como ser las metanogénicas, juegan roles importantes en la metilación de mercurio (Webber 1993). La importancia de estas condiciones, fue comprobada en estudios llevados a cabo en diferentes componentes de sistemas acuáticos. Por ejemplo en sedimentos se vio que al incrementarse el potencial redox, la producción de MeHg se vio afectada (DeLaune et al. 2004; Sunderland et al. 2006). Lo propio fue observado en la columna de agua de lagos canadienses, que durante el otoño, tras la mezcla y re-oxigenación de las aguas, los valores de potencial redox se tornaron positivos y se inhibió por completo la producción de MeHg (Eckley et al. 2005). En el caso del perifiton asociado a *E. crassipes*, se vio que el potencial redox además de ser un factor importante en la metilación bacteriana, también afecta la abundancia del perifiton. (Guimaraes et al. 2006).

Por último, la temperatura es otro factor importante en la metilación de mercurio. Por lo general, son las temperaturas moderadas, que oscilan entre 16.4 y 17.4 °C, las que favorecen la metilación (Flanders et al. 2010). Sin embargo, en perifiton se observó un mayor metilación a una temperatura máxima de 35°C (Guimaraes et al. 2006). Este incremento en la producción de MeHg en relación a la temperatura se debe al efecto positivo que tiene la misma sobre la actividad metabólica de bacterias metiladoras (Ullrich. 2001).

En el caso de este estudio, los parámetros físico-químicos fueron tomados en la columna de agua para establecer el gradiente de eutrofización. No obstante, dichos parámetros no tendrían un efecto en la acumulación de MeHg en el perifiton de macrófitas, debido a que la matriz polisacárida que recubre el perifiton protege a los organismos que forman parte del mismo, aislándolos de este modo de condiciones externas (Costerton et al. 1995). Es gracias a esta matriz que los biofilms permiten formar micronichos con condiciones específicas haciendo que los diferentes organismos que forman parte de los mismos, realicen funciones que no podrían en el exterior (Morris & Monier. 2003).

Al igual que con los anteriores parámetros físico-químicos, en este estudio se tomaron datos de DOC correspondientes a la columna de agua que no afectan a la acumulación de MeHg dentro del perifiton. Sin embargo, este factor es importante debido a que forma complejos con el mercurio.

La materia orgánica disuelta (DOM por sus siglas en inglés) o también llamada carbono orgánico disuelto (DOC) está formada por una mezcla de componentes orgánicos. Un 20% corresponde a carbohidratos, amino ácidos, ácidos carboxílicos, entre otros y el 80% restante está conformado por sustancias húmicas que son una mezcla compleja de residuos provenientes de la descomposición de plantas y animales. (Ravichandran, et al. 2004).

Debido a sus características, la materia orgánica forma fuerte complejos con el mercurio influyendo en la disponibilidad del mismo para su metilación (Miskimmin 1991; Barkay, Gillman et al. 1997). En el caso de la eutrofización, el incremento en la producción primaria permite generar mayor cantidad de materia orgánica; la misma bajo condiciones anaerobias actúa como una fuente de energía, proporcionando nutrientes que estimulan la actividad bacteriana para la metilación de mercurio (Orson & Cooper 1976; Ullrich, et al 2001).

A su vez la materia orgánica también tiene un efecto en la movilización del mercurio, permitiendo que los complejos formados con el mercurio, puedan pasar de cuencas hacia lagos y ríos (Mierle 1990; Babiarz, Hurley et al. 1997). Tal fue el caso en los lagos Adirondack, donde se observó un incremento de mercurio en el sistema debido a la movilización de este metal favorecido por la DOM, lo que resultó en un incremento de Hg en el agua (Driscoll, Bletre et al. 1995).

7.5 Metilmercurio y otros parámetros de descarte

No se encontró ninguna correlación entre el MeHg y fosfatos, sulfatos, cloruros, sodio, potasio o calcio presentes en la columna de agua (Tabla 8). Por otra parte, el análisis de nitritos dio resultados por debajo del límite de detección.

Tabla 8: Matriz de Coeficientes de Correlación y probabilidades de Pearson entre MeHg y fosfatos, sulfatos, cloruros, sodio, potasio y calcio, n=11.

<u>Correlación de Pearson</u>		<u>PO4 - 3mg/l</u>	<u>Sulfatos mg/l</u>	<u>Cloruros mg Cl/l</u>	<u>Sodio mg/l</u>	<u>Potasio mg/l</u>	<u>Calcio mg/l</u>
<u>MeHg</u>	R	-0.3	-0.04	-0.31	-0.18	-0.36	-0.23
	P	0.37	0.92	0.36	0.60	0.28	0.50
<u>PO4 -3mg/l</u>	R		-0.77	-0.33	-0.57	-0.15	-0.23
	P		0.01	0.32	0.07	0.67	0.50
<u>Sulfatos mg/l</u>	R			0.85	0.96	0.74	0.71
	P			0.00	0.00	0.01	0.01
<u>Cloruros mg Cl/l</u>	R				0.96	0.97	0.86
	P				0.00	0.00	0.00
<u>Sodio mg/l</u>	R					0.89	0.84
	P					0.00	0.00
<u>Potasio mg/l</u>	R						0.91
	P						0.00

En otros casos se ha determinado la influencia de algunos de estos parámetros sobre el MeHg. Como ser Huguet et al (2009), que observaron mayores tasas de metilación de mercurio en biofilms, tras la adición de nutrientes. Otro parámetro importante es el sulfato que permite la sulfato reducción, y en compartimientos como los sedimentos, la misma está relacionada a tasas de metilación. (Gilmour et al. 1998).

En otra investigación, Celo et al (2004) al estudiar la posibilidad de una metilación abiótica de mercurio en la columna de agua, encontró una fuerte influencia por parte del pH, la temperatura y agentes acomplejantes como ser los cloruros, que en aguas marinas parecen favorecer la formación de MeHg. Por otro lado, en los ríos de la Provincia Pacajes, Piza (2014) encontró que los iones de cloro y sodio, tienen un efecto negativo sobre la concentración de MeHg encontrado en sedimentos.

7.6 Producción de Sulfuro de Hidrógeno y relación con Metilmercurio.

Las incubaciones del perifiton de macrófitas con diamina, mostraron a simple vista presencia de sulfuro de hidrógeno en todas las muestras que tomaron el color característico del azul de metileno (imagen 3). La medición por espectrofotometría dio los resultados observados en la

tabla 9, donde también en conjunto con la figura 3, puede observarse que la adicción de molibdato disminuye la producción de sulfuro de hidrógeno (H_2S), sobre todo en el perifiton asociado a totoras que fue colectado en los puntos IDH-2 e IDH-3 con un porcentaje de reducción de un 66.74% y 74.06%, respectivamente. Sin embargo, en todos los casos pese a la adicción de molibdato, aún se detecta presencia de H_2S . Esto puede deberse a que el molibdato genera una interferencia con la lectura del azul de metileno, ya que parte del H_2S se produce por descomposición de la materia orgánica.

Tabla 9: Concentraciones de sulfuro de hidrógeno en el perifiton asociado a macrófitas de cuatro puntos de muestreo con y sin molibdato (Mo)

PUNTO	Absorbancia sin Mo	Sulfuro de hidrógeno ($\mu\text{mol/L}$) sin Mo	Absorbancia con Mo	Sulfuro de hidrógeno ($\mu\text{mol/L}$) con Mo	% producción H_2S reducido por Mo
IDH-2 (caracea)	0.24	9.66	0.07	5.78	40.16
IDH-2 (totora)	0.16	6.40	0.05	2.13	66.74
IDH-2.5 (totora)	0.33	13.57	0.10	6.06	55.33
IDH-3 (totora)	0.21	8.76	0.06	2.27	74.07
IDH-4 (elodea)	0.56	22.74	0.18	12.65	44.36

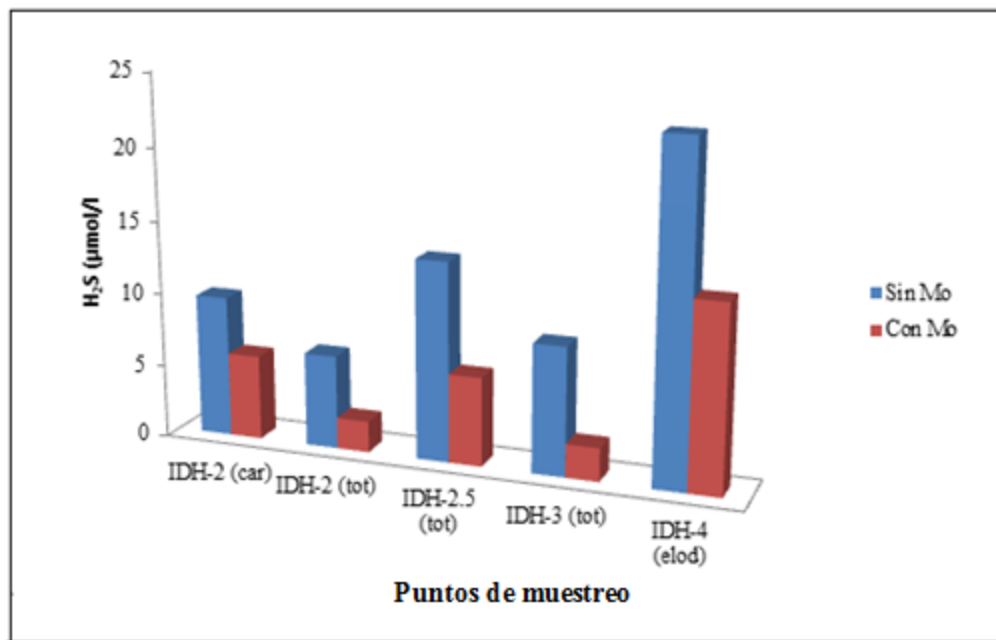


Figura 3: Producción de sulfuro de hidrógeno en presencia y ausencia de molibdato (Mo)

De manera general, podemos ver en la Tabla 10, que no existe correlación entre la acumulación de MeHg y la de H₂S ($r=0.084$, $p=0.817$). Paralelamente, al tener muestras de perifiton asociado a totora en tres puntos (IDH-2, IDH-2.5 e IDH-3), se hizo un análisis de correlación con estos datos (Tabla 11), pero tampoco se encontró ninguna correlación en este caso ($r=-0.73$, $p=0.48$).

Tabla 10: Matriz de Coeficientes de Correlación y probabilidades de Pearson entre MeHg, % de MeHg y H₂S en perifiton.

<u>Correlación de Pearson</u>		H₂S
<u>MeHg</u>	R	0.08
	P	0.82
<u>%MeHg</u>	R	-0.24
	P	0.51

Tabla 11: Matriz de Coeficientes de Correlación y probabilidades de Pearson entre MeHg, % de MeHg y H₂S en perifiton asociado a totoras.

<u>Correlación de Pearson</u>		<u>H₂S (P. Totorá)</u>
<u>MeHg (P. Totorá)</u>	R	-0.73
	P	0.48
<u>%MeHg (P. Totorá)</u>	R	-0.97
	P	0.17

En la figura 4, puede observarse que existe una mayor acumulación de MeHg en el punto IDH-2 en el perifiton asociado a totoras (22.21 ng/g), y a su vez es el punto donde se tienen menor cantidad de H₂S (6.40 μmol/L). Además de manera general, pese a no haber ninguna correlación entre estas variables, podemos observar en la misma figura que a mayores cantidades de H₂S, presentan una menor acumulación de MeHg.

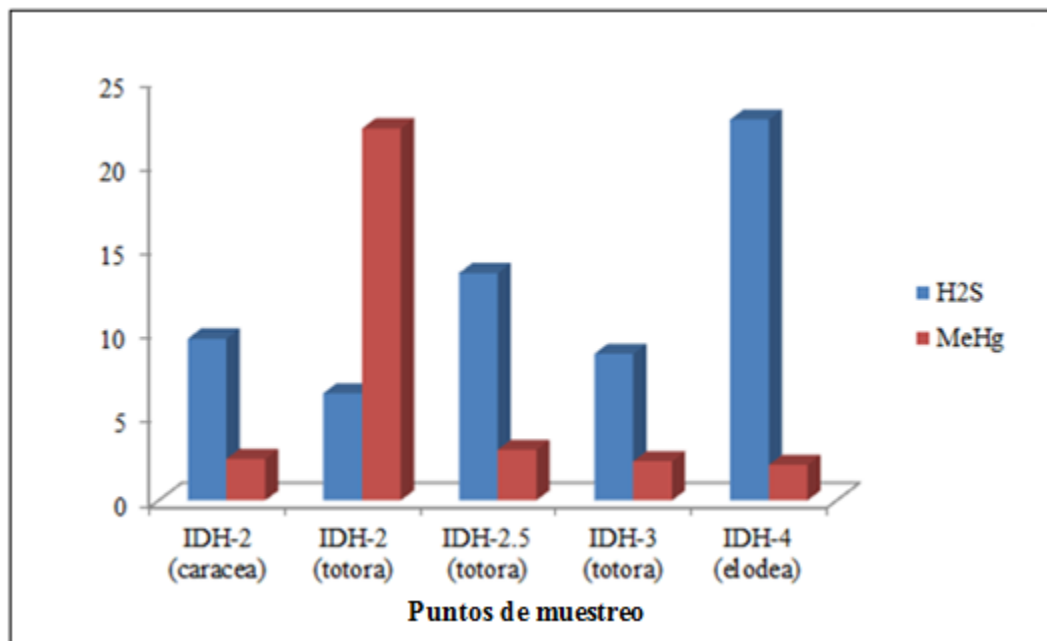


Figura 4: Acumulación de MeHg vs producción de sulfuro de hidrógeno por punto y tipo de macrófita.

Las bacterias sulfato reductoras (BSR), son consideradas las principales metiladoras de mercurio. Gilmour et al (1992) estudió que en sedimentos la adición de sulfato resulta en un aumento sobre la producción de MeHg; y al inhibir la actividad de las BSR se detiene la producción del mismo. Posteriormente, otros estudios demostraron la importancia de este grupo bacteriano en la metilación de mercurio en otros compartimientos acuáticos. Cleckner et al (2009), encontraron una influencia de las BSR sobre la metilación de mercurio en perifiton en la región de Everglades, Florida. Lo propio fue estudiado Desrosiers et al (2006) en el epilíton de un lago boreal Canadiense, en el cual la inhibición de BSR disminuyó en un 60% la producción de MeHg. Y por su lado, Achá et al (2005) consiguieron separar cinco subgrupos de BSR responsables de la metilación de mercurio en la rizósfera de macrófitas flotantes en la Amazonía Boliviana. Además, ya relacionando la actividad de estas bacterias, Achá et al (2011) encontraron una relación lineal entre la abundancia de Desulfobacteraceae y la producción de MeHg en el perifiton asociado a macrófitas en la Amazonía.

Sin embargo, pese a que la Bahía de Cohana se encuentra en un estado eutrófico generando condiciones anaerobias ideales para la actividad de este grupo bacteriano, los resultados obtenidos muestran que en el caso del perifiton asociado a las macrófitas, la acumulación de MeHg no está relacionada a la actividad de bacterias sulfato reductoras. Si bien en este estudio no se midieron tasas de sulfato reducción, se asumió que de haber actividad de bacterias sulfato reductoras se encontraría sulfuro de hidrógeno en el perifiton asociado a las macrófitas, ya que la reducción del sulfato por parte de las bacterias genera H_2S . Además, la adición de molibdato que inhibe la actividad de las BSR, mostró una reducción en la producción de H_2S por lo que puede atribuirse que la producción del mismo se debe a la actividad metabólica de estas bacterias.

No obstante, cabe resaltar que el sulfuro forma fuertes complejos con el mercurio limitando su disponibilidad para su metilación (Fagerström T and Jernelöv A. 1971). Tal es el caso observado en sedimentos, donde se tienen elevadas concentraciones de sulfuro que resultan en bajos porcentajes de producción de MeHg (Benoit and Gilmour. 1998). Si bien los sulfuros tienen un efecto sobre la biodisponibilidad del mercurio para su metilación, la cantidad en la que se encuentran los mismos parece ser determinante en este proceso. Por ejemplo en el caso de sedimentos se observó que a bajas cantidades de sulfuro se forman complejos neutros de $Hg-S^0$,

los cuales pueden atravesar las membranas celulares y ser metilados por actividad microbiana. Sin embargo, a mayores concentraciones de sulfuro se forman complejos Hg-disulfuros que no pueden ser metilados de manera biótica (Benoit. 1999). Estos datos muestran que si bien las bacterias sulfato reductoras, utilizan sulfato como aceptor final de electrones, parece ser que cuando la cantidad de sulfato es muy elevada, la producción de sulfuros incrementa y la metilación se ve inhibida (Choi y Nartha. 1994). Esto podría ser el caso en zonas eutrofizadas, donde los niveles de sulfato puede ser muy elevados y podrían interferir con la metilación de mercurio.

Por otra parte, otros estudios han demostrado que existen otros grupos bacterianos que juegan un rol importante en la metilación, además de las BSR. Fleming et al (2006) mostró que en sedimentos, pese a existir actividad de bacterias sulfato reductoras, las bacterias hierro reductoras pueden ser importantes metiladoras de mercurio. En el caso de perifiton asociado a macrófitas; Hamelin (2011) encontró en lagos fluviales de Canadá que la producción de MeHg está altamente relacionada con la actividad de bacterias metanogénicas y no tanto así con las BSR. Esto fue probado al ver que la inhibición de las metanogénicas causaba una disminución de casi 100% en la tasa de metilación de mercurio. Finalmente, Achá et al (2012) encontraron que las Alphaprotobacterias influyen en la metilación de mercurio en el perifiton asociado a macrófitas en la Amazonía. Dichos estudios muestran que más de un grupo bacteriano está relacionado con la metilación de mercurio. Recientemente Parks et al (2013) encontraron que dos clusters de genes, *hgcA* y *hgcB*, son esenciales para la metilación bacteriana en *Desulfovibrio desulfuricans* y *Geobacter sulfurreducens*. Posteriormente Gilmour et al (2013) observaron presencia de estos genes en diferentes cepas de bacterias y arquea, si está relacionada a la capacidad de metilar mercurio.

Además de las comunidades de bacterias, se debe tomar en cuenta que el perifiton está formado por diferentes grupos de microorganismos que interactúan de manera compleja dentro del mismo. Es por ello que la presencia de MeHg podría ser influida no solo por un grupo en particular, sino por diferentes interacciones entre los mismos. Como en el caso estudiado por Correia et al (2012), en lagos de la Amazonía Boliviana y Brasileña, donde encontró que la producción de MeHg se veía afectada por la co-inhibición de bacterias sulfato reductoras y metanogénicas (Correia et al 2012). Por su parte, en el perifiton de la Amazonía Boliviana, Achá

et al (2011) obtuvieron solo una parcial inhibición en los potenciales de metilación tras la adición de molibdato; sugiriendo de este modo que el efecto sobre la metilación radica en la diversidad de la comunidad microbiana y las interacciones dentro de la misma.

7.7 Mercurio y composición isotópica del perifiton

En la tabla 12, podemos observar que existe una correlación positiva y significativa entre $\delta^{13}\text{C}$ con los datos de mercurio total ($R=0.98$, $P=0.02$) y con los de metilmercurio ($R=0.96$, $P=0.04$), obtenidos durante la primera campaña de abril. Las regresiones lineares (Figuras 5 y 6), muestran en ambos casos una fuerte relación entre estas variables. Sin embargo, cabe resaltar que de este viaje solo se tienen cuatro datos, de los cuales dos pertenecen a puntos de control.

Table 12. Matriz de Coeficientes de Correlación y probabilidades de Pearson entre MeHg y HgT de perifiton asociado a macrófitas con $\delta^{13}\text{C}$ (‰) y $\delta^{15}\text{N}$ (‰); abril/2013 * Existe una correlación significativa ($P < 0.05$). (n=4)

<u>Correlación de Pearson</u>		$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)
<u>MeHg</u>	R	0.96	-0.88
	P	0.04*	0.12
<u>HgT</u>	R	0.98	-0.87
	P	0.02*	0.13

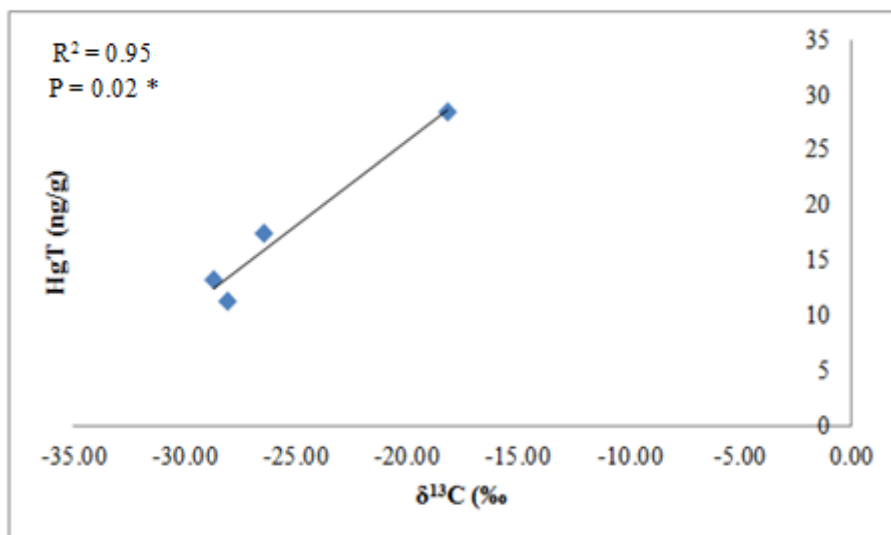


Figura 5. Análisis de regresión lineal entre HgT en perifiton asociado a macrófitas y $\delta^{13}\text{C}$ (‰); abril / 2013. * Existe una relación significativa ($P < 0.05$).

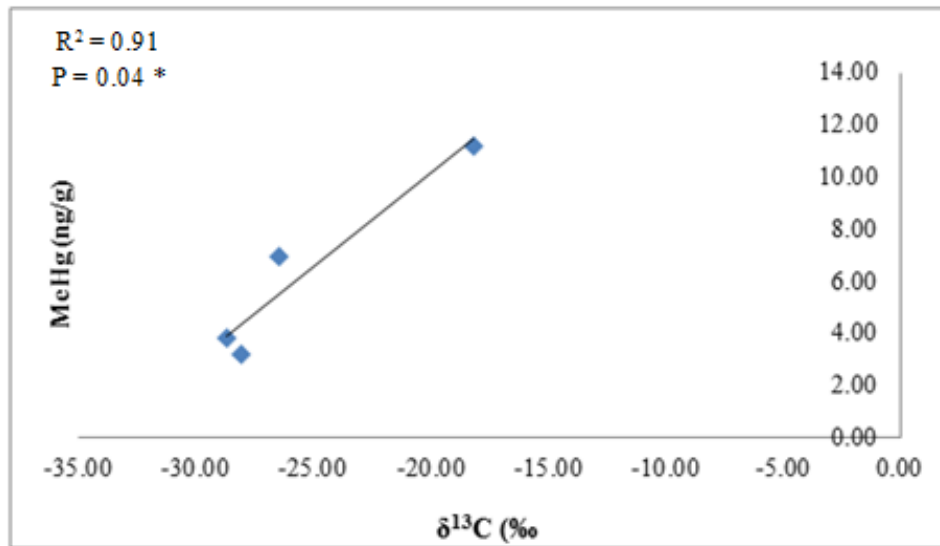


Figura 6. Análisis de regresión lineal entre MeHg en perifiton asociado a macrófitas y $\delta^{13}\text{C}$ (‰); abril / 2013. * Existe una relación significativa ($P < 0.05$).

Por otro lado, la Tabla 13 muestra los resultados de la correlación correspondiente a la campaña de septiembre, que es donde se obtuvo mayor cantidad de datos. En este caso podemos observar que no hay correlación alguna entre las variables de metilmercurio y mercurio total con las de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$.

Tabla 13. Matriz de Coeficientes de Correlación y probabilidades de Pearson entre MeHg y HgT de perifiton asociado a macrófitas con $\delta^{13}\text{C}$ (‰) y $\delta^{15}\text{N}$ (‰); septiembre/2013, (n=8).

<u>Correlación de Pearson</u>		$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)
<u>MeHg</u>	R	0.095	0.38
	P	0.82	0.35
<u>HgT</u>	R	0.03	0.72
	P	0.94	0.87

La ausencia de una correlación entre el marcador de eutrofización $\delta^{15}\text{N}$ y el MeHg, confirma que no existe una relación entre la acumulación de MeHg en el perifiton asociado a macrófitas y la eutrofización presente en la Bahía de Cohana. Sin embargo en el mes de abril, la fuerte

correlación positiva encontrada entre el $\delta^{13}\text{C}$, que indica fuentes de carbono, y el MeHg acumulado en el perifiton asociado a totoras, indica que en esta época los fijadores de carbono en el perifiton podrían ser condicionantes sobre la acumulación del MeHg. Lanza (2013), mostró que en el perifiton asociado a macrófitas en el Lago Uru Uru, la acumulación de MeHg está altamente relacionada con la comunidad de algas, más que con otros factores.

Pese a contar con este dato interesante, debe recalarse que la mayor cantidad de muestras se obtuvo en el mes de septiembre, donde no se encontró correlación alguna entre estas variables. Este resultado es contradictorio con el encontrado en la cuenca del río Tapajós en Brasil, donde se encontró que tanto el origen como la calidad del carbono y del nitrógeno, están relacionados con los ciclos de inundación y determinan la acumulación y metilación del mercurio, teniendo potenciales de metilación más elevados durante la época húmeda (Coelho-Souza, 2011).

La información que brindan los isótopos estables, resulta ser de gran utilidad en trabajos de monitoreo ecológicos, como ser la eutrofización que fue estudiada en este caso. Esto debido a que estos datos presentan una escala más integral que los parámetros físico-químicos, los cuales pueden arrojar datos muy variables. En estudios de eutrofización, los isótopos de nitrógeno permiten rastrear las fuentes de contaminación por nitratos, y esta información se ve complementada con la de isótopos de carbono que son más sensibles frente a cambios en la producción primaria ocasionados por actividades antropogénicas (Oczkowski et al 2013; Voss et al 2000). Como ser el caso en lagos situados al oeste de Irlanda, donde se encontraron valores más bajos de C^{13} y elevados valores de N^{15} en zonas impactadas por agricultura, en comparación con zonas no impactadas (Woodward et al 2011).

7.8 Acumulación de metilmercurio en el perifiton asociado a macrófitas en la Bahía de Cohana.

El perifiton colectado durante las campañas de abril y septiembre, no fue abundante y tampoco se detectó su presencia en todos los puntos de muestreo. La campaña de abril fue la que mostró menor presencia de perifiton en la región de la Bahía de Cohana, ya que solo pudo realizarse la colecta en cuatro puntos de los siete establecidos.

Sin embargo y pese a la escasa cantidad de perifiton, los datos obtenidos en este estudio muestran que al igual que en ecosistemas tropicales, el perifiton es un lugar importante para la acumulación de mercurio en ecosistemas de altura, ya que en todas las muestras colectadas pudo detectarse la presencia de este compuesto.

Aunque en abril no se obtuvo muestras de perifiton más que en totoras, los datos muestran porcentajes de MeHg que oscilan entre 28.15% y 39.61% (Tabla 3). Por otra parte, en septiembre además de totoras, se pudo colectar perifiton asociado a elodeas y caraceas (Tabla 4); pero de todas, fue sin duda el perifiton asociado a totoras, el que presentó mayores concentraciones metilmercurio en comparación con los otros grupos de macrófitas (figura 7).

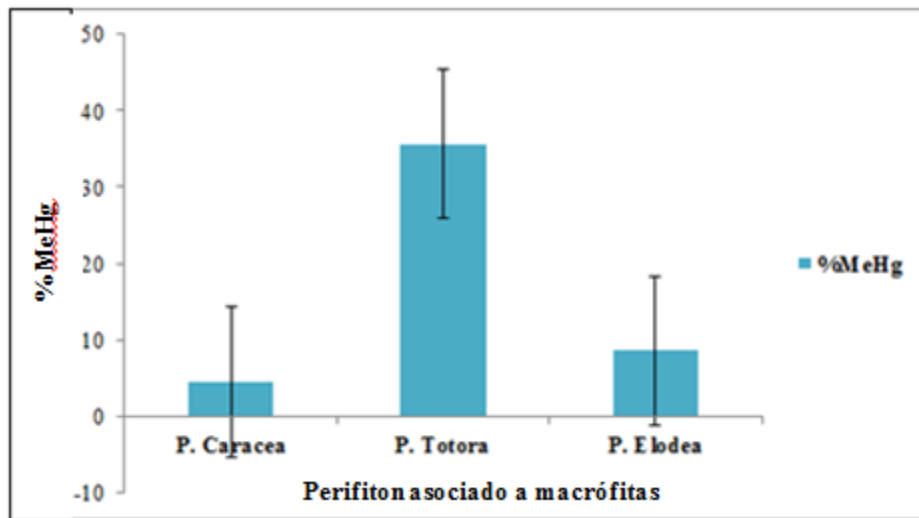
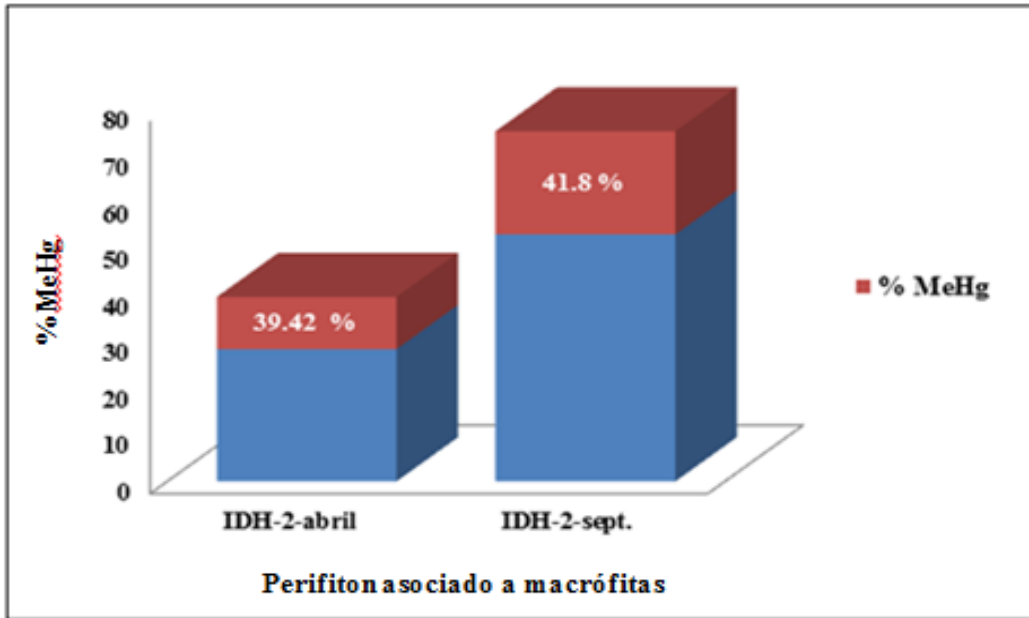


Figura 7. Porcentajes de MeHg en perifiton asociado a Caraceas, Totoras y Elodeas.

Solo en los puntos IDH-2 e IDH-3 se tuvo la posibilidad de colectar perifiton de totora en ambos viajes, por lo que se realizó una comparación en los mismos respecto a la acumulación de metilmercurio (Figura 8). La figura 8.a, corresponde a la comparación en el punto IDH-2, y muestra que pese a tener mayor cantidad de mercurio total en septiembre, el porcentaje de metilmercurio es similar en ambos casos con 39.42% en abril y 41.8% en septiembre. Por otra parte, el punto IDH-3 muestra gran variación entre las dos épocas, ya que hay mayor cantidad de mercurio total en abril, pero el porcentaje de metilmercurio es mucho mayor en septiembre con 40.52% respecto a 28.15% de abril (figura 8.b).

a)



b)

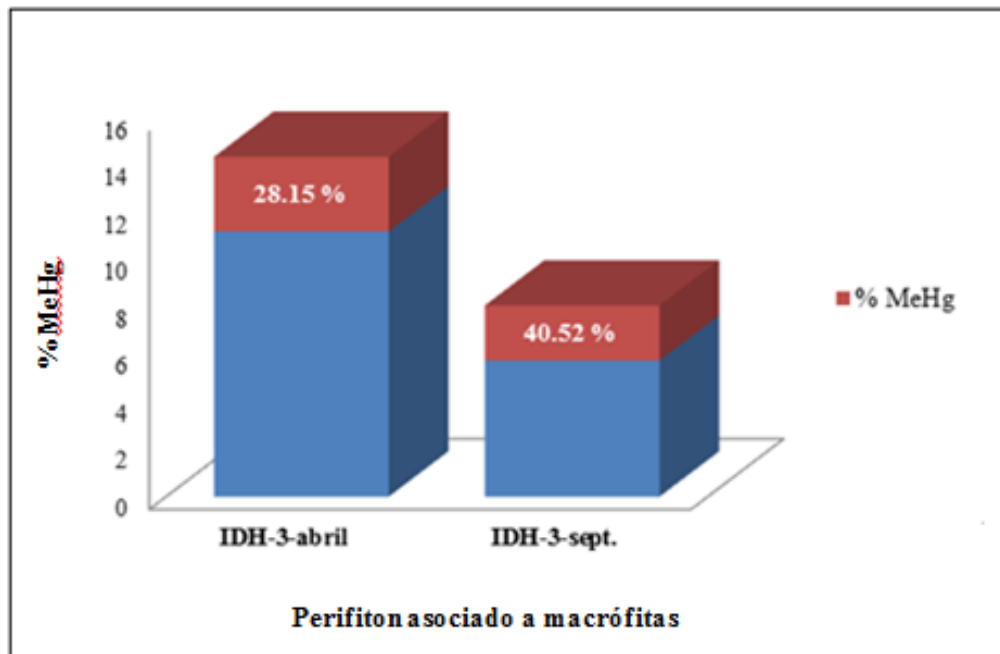


Figura 8: a) Comparación de porcentajes de metilmercurio encontrado en el perifiton asociado a totoras en el punto IDH-2 en abril y septiembre 2013; b) Comparación de

porcentajes de metilmercurio encontrado en el perifiton asociado a totoras en el punto IDH-3 en abril y septiembre 2013

En promedio, tanto en abril como en septiembre, el perifiton asociado a totoras muestra una mayor acumulación de metilmercurio, con porcentajes de 33.99% y 35.63% del mercurio total, respectivamente. Estos datos son similares a aquellos encontrados por Dominique et al (2007) donde el metilmercurio en biofilms representaba de un 27 a un 40% del total de mercurio. Por su parte en la cuenca Amazónica, Miranda et al (2004) detectaron un mayor potencial de metilación en el perifiton asociado a raíces de macrófitas, en comparación con el detectado en sedimentos.

Si bien los resultados muestran que evidentemente el perifiton juega un rol importante en la acumulación de MeHg, no podemos indicar con certeza cuál es el factor más influyente en el caso de la Bahía de Cohana. Por lo general, la actividad bacteriana es la más relacionada con la presencia de MeHg, pero en algunos casos se mostraron elevados potenciales de metilación en ausencia de la misma (Coelho et al. 2011; Miranda et al. 2004) y en otros casos se ve mayor influencia por parte de parámetros fisicoquímicos (Frohne et al. 2012). Sin embargo, Bell et al (2008) encontraron mayores tasas de metilación en comunidades perifíticas con mayor abundancia de diatomeas y algas verde-azules; este estudio es un ejemplo de la importancia que tienen otros organismos de la comunidad perifítica sobre la metilación de mercurio (Bell et al 2008).

8. CONCLUSIONES

La concentración de MeHg en el perifiton asociado a macrófitas en la Bahía de Cohana, fue determinada haciendo uso de un novedoso método de extracción selectiva que permitió recuperar en su totalidad el analito de las muestras de perifiton, para su posterior cuantificación por CV-AFS. Este método demostró ser eficaz en muestras, que como el perifiton, tienen un alto contenido de materia orgánica, la cual dificulta su análisis.

Si bien se realizaron dos viajes para este estudio, fue durante la campaña realizada en septiembre donde pudo colectarse mayor cantidad perifiton en diferentes puntos de muestreo, caso que no se dio en el mes de abril, donde no se obtuvo mucha muestra.

Los datos sobre las concentraciones de MeHg en el perifiton, mostraron que en cuestión de porcentajes, el perifiton asociado a macrófitas en el Bahía de Cohana, es importante en la acumulación de MeHg. De todas las macrófitas muestreadas, se determinó que el perifiton asociado a totoras tiene los porcentajes de MeHg más elevados con un promedio de 33.98% correspondiente a las muestras de abril y un 35.63% correspondiente a septiembre.

A pesar que las condiciones anóxicas generadas por el proceso de eutrofización en curso, favorecerían la actividad de bacterias sulfato reductoras, estas no juegan un rol importante en la acumulación de mercurio en las muestras de perifiton estudiadas. Cabe resaltar que el perifiton alberga a una comunidad compleja de microorganismos, por lo que además de bacterias, hay diferentes grupos que pueden ser importantes metiladores de mercurio. Por ello, de contar con mayor cantidad de muestra, se considera necesario para posteriores trabajos realizar estudios de composición algal y de otros organismos que forman parte de la comunidad perifítica y que pueden ser importantes metiladores de mercurio.

Los datos encontrados en este estudio, son importantes y deben ser considerados para posteriores estudios; ya que al ser el perifiton un productor primario, el MeHg acumulado dentro del mismo, puede ser transferido a lo largo de la cadena trófica. Además, contribuyen al estudio sobre la dinámica de este metal en un ecosistema único, como es el Lago Titicaca.

A pesar de las limitaciones que se tuvo con los tamaños muestrales, ocasionados por factores ajenos a nuestro control, queda claro que no existe una relación entre la eutrofización y la acumulación de MeHg en el perifiton. Al contrario, parece haber una fuerte estacionalidad en la acumulación de mercurio, por lo que otros factores biológicos como las comunidades de algas podrían ser clave en el control de la acumulación de MeHg.

9. **BIBLIOGRAFÍA**

- Achá, D., Hintelmann, H., et al. 2011. Importance of sulfate reducing bacteria in mercury methylation and demethylation in periphyton from Bolivian Amazon region. *Chemosphere* 82, 911–916

- Achá, D., Iñiguez, V., et al. 2005. Sulfate-Reducing Bacteria in Floating Macrophyte Rhizospheres from an Amazonian Floodplain Lake in Bolivia and Their Association with Hg Methylation. *Applied Environmental Microbiology* 71, 7531-7535.
- Achá, D., Pabón, C.A., et al. 2012. Mercury methylation and hydrogen sulfide production among unexpected strains isolated from periphyton of two macrophytes of the Amazon. *FEMS Microbiology Ecology* 80, 637–645
- ALT. Caracterización del Lago Titicaca. En: http://www.altperubolivia.org/web_lago/WEB_LT/Finales/2_carac_fisicas/carac.htm
- Arismendi M.A. 2010. La Bahía de Cohana. Actualización 2009-2010. Programa de Observación Ambiental de LIDEMA. Programa de Investigación y Monitoreo. 78 pags.
- Barkay, T., M. Gillman, et al. (1997). "Effects of Dissolved Organic Carbon and Salinity on Bioavailability of Mercury." *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 4267-4271.
- Bell A. & Scudder B. 2007. Mercury accumulation in periphyton of eight river ecosystems. *Journal of the American Water Resources Association* 43, 957-968
- Celo V., Lean D.R.S., Scott S. L. 2006. Abiotic methylation of mercury in the aquatic environment. *Science of the Total Environment* 368, 126– 137
- Cleckner, L. B., Gilmour, C. C., et al. 1999. Mercury methylation in periphyton of the Florida Everglades. *Limnology and Oceanography*. 44, 1815–1825.
- Cline J. D. 1969. Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnology and Oceanography* 14, 454-458.
- Coelho-Souza S.A., Guimaraes J.R.D., et al. 2011. Mercury and flooding cycles in the Tapajós river basin, Brazilian Amazon: The role of periphyton of a floating macrophyte (*Paspalum repens*). *Science of the Total Environment* 409, 2746–2753
- Costerton J.W., Lewandowski Z., et al. 1995. Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology* 49, 711-745
- Compeau, G. C. and D. R. Bartha (1985). "Sulfate-Reducing Bacteria: Principal Methylators of Mercury in Anoxic Estuarine Sedimentt." *Applied and Environmental Microbiology* **50**: 498-502.
- Correia, R. R. S., Miranda, M.R et al. 2012. Mercury methylation and the microbial consortium in periphyton of tropical macrophytes: Effect of different inhibitors. *Environmental Research* 112, 86–91

- DeLaune, R.D., Jugsujinda, A., et al. 2004. Relationship of Sediment Redox Conditions to Methyl Mercury in Surface Sediment of Louisiana Lakes. *Journal of Environmental Science and Health* 39, 1925-1933
- Dejoux C. & Iltis A. 1991. El Lago Titicaca: Síntesis del conocimiento limnológico actual. Orstom. La Paz-Bolivia. 578 pags.
- Desrosiers, M., Planas, D., et al. 2006. Mercury Methylation in the Epilithon of Boreal Shield Aquatic Ecosystems. *Environmental Science & Technology* 40, 1540-1546
- Dominique, Y., Maury-Brachet, R., et al. 2007. Biofilm and mercury availability as key factors for mercury accumulation in fish (*Curimata cyprinoides*) from a disturbed amazonian freshwater system. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 45–52
- Driscoll, C. T., V. Bletre, et al. 1995. "The role of dissolved organic carbon in the chemistry and bioavailability of mercury in remote Adirondack lakes." *Environmental Management* 81, 95–100
- Frohne T., J. Rinklebe, U. Langer, G. Du Laing, S. Mothes, R. Wennrich. 2012. Biogeochemical factors affecting mercury methylation rate in two contaminated floodplain soils. *Biogeosciences*, 9, 493–507.
- Flanders J.R., Turner R.R., Morrison T., Jensen R., Pizzuto J., Skalak K., Stahl R. 2010. Distribution, behavior, and transport of inorganic and methylmercury in a high gradient stream. *Applied Geochemistry* 25, 1756–1769
- Gaiser, E.E, Childer, D.L., et al. 2006. Periphyton responses to eutrophication in the Florida Everglades: Cross-system patterns of structural and compositional change *Limnology and Oceanography* 51, 617–630
- Gilmour, C. C. and Henry, E. A. 1991: Mercury methylation in aquatic systems affected by acid deposition, *Environ. Pollut.*, 71, 131–169.
- Gilmour, C. C., Henry, E. A., et al 1992. Sulfate stimulation of mercury methylation in freshwater sediments. *Environmental Science and Technology* 26, 2281–2287.
- Gilmour, C. C., Podar M., et al. 2013. Mercury Methylation by Novel Microorganisms from New Environments. *Environmental Science and Technology* 47, 11810-11820.
- Gilmour, C. C., Riedel, G.S, et al. 1998. Methylmercury concentrations and production rates across a trophic gradient in the northern Everglades. *Biogeochemistry* 40, 327–345
- Guimaraes, J.R.D., J. B. N. Mauro, R. Melamed. 1999. Mercury methylation in a tropical macrophyte: influence of abiotic parameters. *Applied Organometallic Chemistry* 13, 631–636.

-
- Guimaraes, J.R.D., Mauro, J.B.N., et al. 2006. Simultaneous radioassays of bacterial production and mercury methylation in the periphyton of a tropical and a temperate wetland. *Journal of*
- Guimaraes, J.R.D., M. Roulet, M. Lucotte, D. Mergler. 2000. 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
- Hall, B.D., Aiken, G.R., et al. 2008. Wetlands as principal zones of methylmercury production in southern Louisiana and the Gulf of Mexico region. *Environmental Pollution* 154. 124-134.
- Hamelin, S., Amyot, M., et al. 2011. Methanogens: principal methylators of mercury in lake periphyton. *Environmental Science & Technology* 45, 7693–7700.
- Hintelmann, H., Keppel-Jones, K., et al. 2009. Constants of mercury methylation and demethylation rates in sediments and comparison of tracer and ambient mercury availability. *Environmental Chemistry* 19, 2204-2211
- Holmes, C.D., Jacob, D.J., et al. 2010. Global atmospheric model for mercury including oxidation by bromine atoms. *Atmospheric Chemistry and Physics* 10, 12037–12057
- Hsu-Kim, H., Hucharzyk, K.H., et al. 2013. Mechanisms Regulating Mercury Bioavailability for Methylating Microorganisms in the Aquatic Environment: A Critical Review. *Environmental Science & Technology* 47, 2441–2456.
- Lanza W. G. 2013. Influencia de la composición algal en la bioacumulación de metilmercurio en el perifiton asociado a macrófitas del Lago Uru Uru. Tesis de Licenciatura. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz-Bolivia.
- Masbou J., Point D., et al. 2013. Application of a selective extraction method for methylmercury compound specific stable isotope analysis (MeHg-CSIA) in biological materials. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 28, 1620-1628
- McClelland, J. W., I. Valiela, et al. 1997. Nitrogen-stable isotope signatures in estuarine food webs: A record of increasing urbanization in coastal watersheds. *Limnology and Oceanography* 42: 930-937.
- McCormick, P.V & Stevenson, R. J. 1998. Minireview: Periphyton as a tool for ecological assessment and management in the Florida Everglades. *Journal of Phycology* 34, 726–733
- Miranda, M. R., Guimaraes, J. R. D., et al. 2004. Mercury methylation and bacterial activity in macrophyte-associated periphyton in floodplain lakes of the Amazon basin.

Proceedings of the 7th International Conference on Mercury as a Global Pollutant, Ljubljana – Slovenia

- Miskimmin, B. M. (1991). "Effect of Natural Levels of Dissolved Organic Carbon (DOC) on Methyl Mercury Formation and Sediment-Water Partitioning." *Environmental contamination and toxicology* 47: 743-750.
- Miskimmin, B. M., Rudd, J. W. M., et al. 1992. Influence of Dissolved Organic Carbon, pH, and Microbial Respiration Rates on Mercury Methylation and Demethylation in Lake Water. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49, 17-22
- MMAyA. 2010. Plan Director de la Cuenca Katari. La Paz-Bolivia. 23 pags. En: http://www.cuencasbolivia.org/files/plan_director_katari.pdf
- Moreta, J.C. 2008. La eutrofización de los lagos y sus consecuencias. Trabajo de Grado. Universidad Técnica del Norte. Ibarra-Ecuador.
- Morris C. E. & Monier J-M. 2003. The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 41. 429-453
- Oczkowski A., Markham E., et al. 2013. Carbon stable isotopes as indicators of coastal eutrophication. *Ecological Applications* 24:457–466.
- Parks, J. M., Johs, A., et al. 2013. The Genetic Basis for Bacterial Mercury Methylation. *Science* 339, 1332-1335
- Pérez Deiver. Ciclo del mercurio. En: <http://es.slideshare.net/deiverperez482/ciclos-biogeoquimicos-27887233>
- Pierson-Wickmann, A. C., G. Gruau, et al. 2011. Development of a combined isotopic and mass-balance approach to determine dissolved organic carbon sources in eutrophic reservoirs. *Chemosphere* 83: 356-366.
- Piza C. A. 2014. Efecto de la salinidad en la acumulación de metilmercurio en ríos de la Provincia Pacajes y determinación de la actividad de las bacterias sulfato reductoras en un gradiente de contaminación en la Bahía de Cochana. Tesis de Licenciatura. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz-Bolivia.
- Radway, J.C., Wilde, E.W., et al. 2001. Screening of algal strains for metal removal capabilities. *Journal of Applied Physiology* 13, 451-455.
- Ravichandran, M. (2004). "Interactions between mercury and dissolved organic matter—a review." *Chemosphere* 55: 319-331.

- Roldán , P. G. 1992. Fundamentos de Limnología Neotropical. 1° edición. Universidad de Antioquia – Colombia: 529 pags.
- Seunghhee, H., Obraztsova A., et al. 2007. Biogeochemical factors affecting mercury methylation in sediments of the Venice Lagoon, Italy. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 655-663.
- Sulzman, E. W. 2007. Stable isotope chemistry and measurement: a primer. *Stable isotopes in ecology and environmental science*. R. Michener and K. Lajtha, Blackwell Publishing: 1-21.
- Steffan, R.J., Korthals, E.T., et al. 1988. Effects of Acidification on Mercury Methylation, Demethylation, and Volatilization in Sediments from an Acid-Susceptible Lake. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 2003-2009
- Sunderland, E. M., Gobas, F. A. P. C., et al. 2006. Environmental controls on the speciation and distribution of mercury in coastal sediments, *Marine Chemistry* 102, 111–123.
- Ullrich, S. M., T. W. Tanton, et al. (2001). "Mercury in the Aquatic Environment: A Review of Factors Affecting Methylation." *Environmental science and technology*3: 241-293.
- UNESCO & ALT. La Cuenca del Lago Titicaca, Bolivia y Perú La Cuenca del Lago Titicaca, Bolivia y Perú. En: http://webworld.unesco.org/water/wwap/wwdr/wwdr1/pdf/chap21_es.pdf
- Voss M., Larsen B., et al. 2000. Stable isotopes signals of eutrophication in Baltic Sea sediments. *Journal of Marine Systems* 25. 287-298.
- Wetzel, R. G. 1983. *Periphyton of Aquatic Ecosystems*. Dev. Hydrobiology. Vol 17. Dr. W. Junk Publisher.
- Winfrey, M.R. & Rudd, J.W. 1990. Environmental factors affecting the formation of methylmercury in low pH lakes. *Environmental Toxicology and Chemistry* 9, 853-869.
- Woodward C.A., Potito A.P. & Beilman D.W. 2011. Carbon and nitrogen stable isotope ratios in surface sediments from lakes of western Ireland: implications for inferring past lake productivity and nitrogen loading. *Journal of Paleolimnology* 47. 167-184

