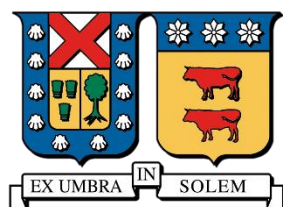


UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL
VALPARAISO - CHILE



**EVALUACIÓN DE UNA ESPECIE SULFATO
REDUCTORA EN EL CICLAJE DE ARSÉNICO EN
AMBIENTES SULFIDOGÉNICOS**

CRISTIAN IGNACIO GIOVINE PUEBLA

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL AMBIENTAL

Profesor Guía: Dra. Lorna Guerrero
Profesores Correferentes: Msc. Andrea Barahona
Dr. Roberto Orellana

AGOSTO - 2025



CONSTANCIA DE VALIDACIÓN Y CONFIDENCIALIDAD DE MONOGRAFÍA A REPOSITORIO ACADÉMICO

1.- IDENTIFICACIÓN DEL TRABAJO ACADÉMICO

Tipo de monografía (marcar una opción): Memoria o trabajo de título; Tesis de Postgrado;

Título del trabajo: Evaluacion de una Especie Sulfato Reductora en el Ciclaje de Arsenico en Ambientes Sulfidogenicos

Nombre del candidato(a): Cristian Ignacio Giovine Puebla

Carrera / Grado: Ingenieria Civil Ambiental

Campus: Casa Central Valparaiso ; **Departamento:** Departamento de Quimica y Ambiental

2.- VALIDACIÓN DEL PROFESOR GUÍA/DIRECTOR DE TESIS

Yo, Lorna Guerrero, en mi calidad de profesor(a) guía/director(a) del trabajo académico mencionado anteriormente **DEJO CONSTANCIA** que:

- He revisado esta versión del documento y corresponde a la versión final aprobada del trabajo.
- El trabajo cumple con los requisitos académicos y de formato establecidos por la institución

3.- EVALUACIÓN DE CONFIDENCIALIDAD POR PROPIEDAD INDUSTRIAL

El trabajo **NO contiene información que amerite confidencialidad** y puede ser publicado de inmediato en repositorio con acceso abierto.

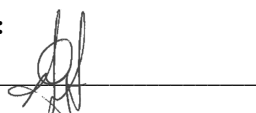
El trabajo **CONTIENE** información con potenciales implicancias de propiedad industrial o intelectual y requiere un periodo de confidencialidad (embargo) por:

6 meses; 12 meses; 2 años; 3 años; 5 años; 10 años


Fundamentación de la necesidad de confidencialidad (obligatorio si se solicita embargo):

4.- FIRMAS

Profesor(a) guía o director(a) de memoria o tesis:

Fecha: _____ ; **Firma:** 

Estudiante o Candidato(a):

Fecha: _____ ; **Firma:** 

Este formulario debe ser insertado como página 2 de la memoria o tesis, completado y firmado por estudiante y profesor(a) antes de la entrega en portal PRISMA de Biblioteca USM.

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia, quiero agradecer a mi familia, quienes en todo momento han creído en mí y me han dado la fuerza y los motivos para seguir adelante. Mis padres, por su amor y sacrificio, quienes me han otorgado todo de sí para que pueda estar en donde estoy hoy en día, siendo un pilar fundamental en mi vida; a mi hermana quien me ha orientado en todo relacionado a la universidad, y a mi hermano, quien siempre fue mi inspiración a continuar avanzando siempre firme a mis convicciones y valores.

A mi familia marcial, quienes con su disciplina y compañerismo no solo me mantuvieron enfocado en mis objetivos académicos, sino que también me proporcionaron un espacio de apoyo y crecimiento personal. Gracias por cada lección y por mantenerme siempre en el camino correcto.

Agradezco al Dr. Roberto Orellana y a la Dra. Alejandra Arancibia, ya que su sabiduría y dedicación fueron esenciales para la realización de este trabajo. Gracias por transmitirme sus conocimientos, por la paciencia y por guiarme con tanta maestría en cada paso de esta investigación. La orientación de ambos fue clave para el éxito de esta tesis.

Al equipo del Laboratorio de Biología Celular y Ecofisiología Microbiana: Dra.(c) Josefina Abarca y Ruth Toro, ya que, más allá de compartir un espacio de trabajo, compartimos un proceso de aprendizaje enriquecedor. Gracias por enseñarme tanto a nivel teórico como experimental, por su apoyo constante y por cada momento compartido durante este desafío. Su compañerismo hizo este recorrido mucho más ameno.

Les agradezco enormemente la oportunidad otorgada por las profesoras Dra. Lorna Guerrero y Msc. Andrea Barahona, como también la orientación y confianza para poder trabajar en el Laboratorio de Biología Celular y Ecofisiología Microbiana, un espacio externo a nuestra universidad, y con ello explorar un área que, si bien no es el fuerte de nuestra carrera, me apasiona profundamente. Su visión y confianza abrieron las puertas a una experiencia que enriqueció significativamente mi formación y mi tesis. Esto fue un privilegio que atesoraré.

Esta investigación fue llevada a cabo gracias a los proyectos ANID-Milenio-NCN2023_054 y Proyecto Redes FOVI 230154, adicionalmente del apoyo parcial de la infraestructura del supercomputador Leftraru del NLHPC (ECM-02).

A todos ustedes, mi más sincero agradecimiento. Este logro es también suyo.

Atentamente,

Cristian Giovine Puebla

A mi Familia

*A mis padres, quienes sacrificaron todo por mi
A mi hermana, quien orienta y apoya mi saber
Y a mi hermano, quien es la luz que guía mi camino*

“Nunca detenerse, hasta alcanzar el cielo”

RESUMEN

Chile, como un país principalmente minero, genera una gran cantidad de relaves que suscitan una preocupación por el potencial de liberación de arsénico a fuentes de aguas subterráneas. La zona de interacción entre relaves y cuerpos de agua, y con especial relevancia zonas sulfidogénicas, que provoca cierta preocupación por ser un área biogeoquímicamente activa. En estas zonas sulfidogénicas predominan bacterias sulfato reductoras que tienen un rol importante en la movilización de contaminante desde relaves mineros como metales pesados (plomo, mercurio, cadmio y otros) y metaloides tóxicos como el arsénico, por lo que es importante comprender la dinámica de estos elementos como del metabolismo de los microorganismos que permita generar las herramientas para el control y/o abatimiento de estos contaminantes.

En este estudio, se propone el análisis del rol de una especie de bacteria sulfato reductora (BSR), *Halodesulfovibrio aestuarii*, como un modelo en el ciclaje del arsénico producto de su alta predisposición a ambientes contaminados y alta tolerancia a la salinidad, característica de entornos mineros.

Para ello, se analizaron una serie de mejoras en el procedimiento de cultivo. El medio de cultivo DSMZ 195c tradicional presenta Na₂S como agente reductor que precipita con As(III), por lo que este medio se modificó con 1 mM de citrato de titanio (III) o 1,42 mM de HCl-cisteína. El primero generó un precipitado marrón en conjunto al aumento paulatino del potencial reductor evidenciado por la coloración rosada de resazurina. Por otro lado, el segundo no evidenció cambios visuales o del potencial reductor, siendo escogido para el análisis de crecimiento.

El análisis de la afección del crecimiento bajo la exposición de arsénico fue analizado y comparado con una bacteria modelo ferro reductora, *Geobacter sulfurreducens*. Mientras esta se ve drásticamente afectada a 0,1 mM de As(III) y a 1 mM de As(V), disminuyendo la densidad óptica (OD) máxima un 39,3% y 71,4% respectivamente, *Halodesulfovibrio aestuarii* se vio levemente afectada bajo las mismas concentraciones de As(III) y As(V), disminuyendo su OD solo un 21% y 59,5% respectivamente, dando indicios de un mecanismo contra arsénico más sofisticado que su par ferro reductora. Así lo demuestra el análisis de las anotaciones del genoma, en donde se evidencian estructuras asociadas a la reducción de As(V) a As(III), a través de una arseniato reductasa ArsC; la expulsión de arsenito a través de la bomba de eflujo *acr3*, y a la biometilación de este último mediante una arsenito metiltransferasa ArsM. Sin embargo, la precipitación de sulfuros de arsénico, advertido en otras BSR, no fue evidenciada

Con ello, se revela parte del potencial de *Halodesulfovibrio aestuarii* como BSR modelo ante la exposición de arsénico, sugiriendo que su metabolismo podría entregar algunas directrices para la generación de tecnologías para el control y abatimiento de este contaminante en entornos sulfidogénicos.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Porcentaje de los relaves que superan la norma italiana de contaminación de suelo por arsénico para zonas industriales y comerciales (izquierda) y zonas verdes públicas o privadas (derecha) según el estado en que se encuentran: INACTIVO, en desuso y con propietario conocido; ACTIVO, en uso actual (para el año del catastro); y ABANDONADO, con propietario desconocido o inubicable. Elaboración propia en base a datos de SERNAGEOMIN - Subdirección de Minería (2023).	3
Figura 2. Ley de cobre en óxidos y sulfuros y ley de arsénico en estos minerales a través de los años.	3
Figura 3. Principales formas químicas del arsénico inorgánicas y orgánicas encontradas en la naturaleza.	5
Figura 4. Diagrama Eh-pH para el sistema As-O-H-S, en donde el equilibrio es impuesto con S(α)8(s) y las áreas sombreadas corresponden a las fases sólidas.	6
Figura 5. Diagrama Eh-pH para el sistema As-O ₂ -H ₂ O, a 25°C y 1 bar de presión total.	5
Figura 6. Disolución y precipitación de As producto de cambios en el medio y mediado por bacterias sulfato reductoras. Las condiciones de pH y potencial redox influyen en las especies de As, liberándolo o precipitándolo, sin embargo, microorganismos sulfato reductores pueden, a través de la producción de sulfhídrico, precipitar As como sulfuro.	7
Figura 7. Disolución de As ₂ S ₃ . A la izquierda, el efecto del pH en la liberación de arsénico total a través de los días, mientras que a la derecha, el estado de oxidación principal del arsénico disuelto (arsenito As(III) y Arseniato As(V)).	7
Figura 8. Efecto de la adición de acetato en zona contaminada con U(VI) en la concentración de arsénico (izquierda) y en la transcripción del gen <i>acr3</i> (derecha), que codifica la bomba proteica de As(III) <i>Acr3</i> .	9
Figura 9. Sorción y coprecipitación de As producto de las condiciones ambientales como por efecto del metabolismo microbiano.	8
Figura 10. Reducción y Oxidación de As por agentes inorgánicos y microorganismos.	10
Figura 11. Mecanismos de detoxificación de arsénico y metabolismo en bacterias, evidenciándose los 4 principales mecanismos: (de izquierda a derecha y desde la parte superior a la inferior) reducción y expulsión de As(III), metilación, oxidación disimilativa de As(III) y reducción disimilativa de As(V). MAs(III) y MAs(V) refiere a todo compuesto metilado de arsenito y arseniato respectivamente.	14
Figura 12. Funcionamiento de la bomba de eflujo de arsenito <i>ArsAB</i> .	15
Figura 13. Árbol filogenético evidenciando los 4 clados diferenciados de la Arseniato Reductasa <i>ArsC</i> , en donde se evidencian los principales homólogos enmarcando en rojo los sitios activos.	17
Figura 14. Modelo de transferencia de As(III) entre <i>ArsD</i> y <i>ArsA</i> .	16
Figura 15. Modelo de reducción de As(V) a As(III) mediante la arseniato reductasa <i>ArsC</i> acoplada a la oxidación de glutatión (GSH).	17
Figura 16. Cascada de reacciones de la reducción de As(V) a As(III) mediante la arseniato reductasa <i>ArsC</i> acoplada a la oxidación de Tiorredoxina (Trx).	18

Figura 17. Mecanismo de Challenger para la conversión de arseniato (A) a trimetilarsina (H)(izquierda) y reacciones típicas de este mecanismo (derecha), donde la S-adenosilmetionina (SAM) es abreviada como CH ₃ -S ⁺ -(C) ₂ y convertida en el proceso de metilación a S-adenosilhomocisteína (SAH) abreviada como S-(C) ₂ .	19
Figura 18. Pasos de la Biometilación de As(III) en la estructura proteica de la ArsM, en donde se indica la zona activa. En verde se denotan las cadenas de carbono de cisteína, en amarillo los grupos tioles y en morado As.	19
Figura 19. Mecanismo de acción conjunta entre la enzima GAPDH y la bomba de eflujo ArsJ.	20
Figura 20. Representación esquemática del mecanismos de oxidación de arsenito en el grupo M=O, y la transferencia de electrones desde este grupo a azurina o un citocromo tipo C.	21
Figura 21. Modelos para la Heterodímera arsenito oxidasa (izquierda) y arseniato reductasa (derecha) en donde se evidencian las subunidades de ambas estructuras y los sitios activos de estas.	21
Figura 22. Metabolismo del lactato y piruvato por Desulfovibrio.	23
Figura 23. Escalera redox evidenciando la progresión de transformaciones redox como también el descenso del potencial relativo oxido-reductor.	24
Figura 24. Potencial redox de procesos de oxido reducción mediado por microorganismos.	24
Figura 25. Crecimiento de Geobacter sulfurreducens con distintas combinaciones de dador y aceptor de electrones.	27
Figura 26. Imagen de Microscopia de Transferencia de Electrones de Geobacter sulfurreducens asociado a un ánodo.	27
Figura 27. Vía de producción de sulfuros a partir de la reducción disimilatoria de sulfatos por especies de Desulfovibrio.	30
Figura 28. Micrografía electrónica de tinción negativa (izquierda, barras de 5 μm) y micrografía de contraste de fase (derecha, barra de 10 μm) de Desulfovibrio acrylicus (<i>Halodesulfovibrio aestuarii</i>). A y B diferencian el crecimiento con (A) lactato/sulfato contra (B) lactato/acrilato.	31
Figura 29. Curva de crecimiento microbiano típico, evidenciando la similitud entre la densidad óptica del cultivo y el recuento de células viables, y las distintas etapas del cultivo.	33
Figura 30. Aplicabilidad de la Ley de Lambert-Beer para diferentes tipos de muestras, de izquierda a derecha, (A) diferentes colorantes, (B) <i>Escherichia coli</i> y (C) cultivo del alga <i>Chlorella vulgaris</i> .	34
Figura 31. Extracción de ruido para tres cultivos bacterianos distintos. (A) <i>Escherichia coli</i> , (B) <i>Staphylococcus aureus</i> y (C) <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	35
Figura 32. Reducción de Resazurina (azul) a Resorufina (rosada) y posteriormente a dihidroresorufina (incolora) en un medio reductor.	43
Figura 33. (A) Reacción de LVM, incoloro, con I ₂ a VM, de color verde cian. (B) Longitud de onda de ambos compuestos, LVM y VM evidenciando una alta absorbancia a una longitud de 617 nm en este último.	43
Figura 34. Precipitado amarillo en M195c con Sulfuro de Sodio como agente reductor, ante la adición de As(III). La reacción es rápida, de tan solo 10 segundos para que le medio de cultivo se torne totalmente amarillo, y pasados unos minutos, sedimente el precipitado.	48

Figura 35. M195c con Na₂S como agente reductor, sin inoculación y con As(III). De izquierda a derecha: blanco sin arsénico, 0,1, 1 y 2mM de As(III). _____ 48

Figura 36. Efecto de la adición de As(III) a M195c con 1,66 mM de Na₂S y resazurina como indicador de potencial oxido reducción. Notar que el precipitado es rápidamente solubilizado a bajas concentraciones de As(III) (derecha), y que a mayores concentraciones, el potencial aumenta en mayor parte del volumen, generando una diferencia notoria en la coloración de la resazurina producto de la difusión del O₂ en el medio y dicho aumento del potencial. _____ 49

Figura 37. Medio de cultivo M195c, con 1,66mM de Na₂S como agente reductor y 0,5, 1 y 2 mM de As(III) en duplicado, y con precipitado de sulfuro de arsénico. Tubos de la izquierda corresponden a condición anóxica, y a la derecha abiertos a la atmosfera. A, B, C y D corresponden a 0, 24, 72 y 120 horas desde comenzado el experimento, evidenciándose la total disolución del precipitado en condiciones aerobias a las 120 horas. _____ 49

Figura 38. Cambios evidenciados en el medio de cultivo M195c 1,66 mM de Na₂S a diferentes concentraciones de As(V). A, B C y D corresponden a 0, 48, 168 y 336 horas (2 semanas). En todos los registros, de izquierda a derecha, las concentraciones de As(V) son: 0 (blanco-control), 0,5, 1, 3, 4, 10 y 20 mM. A la izquierda de cada registro, tubo con mismas condiciones y 10 mM de As(V) que motivo la prueba de análisis al volverse rosado en solo 72 horas. 50

Figura 39. Cambios evidenciados durante una semana en M195c con 1 mM de Ci-Ti (III) como agente reductor, anóxico y estéril, a concentraciones variables de As(III). Tubos ordenados de izquierda a derecha: M195c con Na₂S, M195c con Ci-Ti (III) en ausencia de arsénico, duplicados de M195c con Ci-Ti(III) con 0,5 mM, 1,0 mM de As(III) y ultimo con 5 mM de As(III). Imágenes A, B C y D son para: medios recién preparados (0 horas), 24 horas, 48 horas y 96 horas respectivamente. Es de notar que a las 72 horas no se evidencian cambios de la condición predecesora. __ 51

Figura 40. Medio de cultivo M195c con 1,44 mM de HCl-Cisteína como agente reductor, a diferentes concentraciones de As(III). A la izquierda (A) registro de la primera observación (0 horas) y a la derecha (B) luego de 30 días. En ambas fotografías, las concentraciones de As(III) son, de izquierda a derecha: 0 (blanco-control), 0,1, 0,5, 1, 2, 5 mM. _____ 52

Figura 41. . Medio de cultivo M195c con 1,44 mM de HCl-Cisteína como agente reductor, a diferentes concentraciones de As(V). (A) corresponde al registro de la primera observación (0 horas), (B) luego de 21 días y (C) al día número 32. En las 3 fotografías, las concentraciones de As(III) son, de izquierda a derecha: 0 (blanco-control), 0,5, 1, 3, 5, 10 y 20 mM. _____ 53

Figura 42. Comparativa entre la biopelícula de *Halodesulfovibrio aestuarii* con y sin 0,1 mM de arsenito de sodio. A la izquierda, inculo sin arsénico, mientras que a la derecha, inculo con arsénico. Aunque se denota una diferencia en la morfología macroscópica de la biopelícula, al cabo de dos días, ambas biopelículas son similares entre sí, con biopelículas claramente delimitadas y de un color grisáceo oscuro. _____ 55

Figura 43. OD de curva de crecimiento de *Halodesulfovibrio aestuarii* en medio DSMZ 195c tradicional (1,67 mM de Na₂S como agente reductor), a distintas concentraciones de Arsenito de Sodio [As(II)]: Control 0mM, 0,1 mM, en triplicado. _____ 55

Figura 44. OD de curva de crecimiento de *Halodesulfovibrio aestuarii* en medio DSMZ 195c con 1 mM de Ci-Ti(III) como agente reductor, a distintas concentraciones de Arsenito de Sodio [As(II)]: Control 0mM, 0,1 mM y 1,0 mM, en triplicado. _____ 56

Figura 45. Precipitado en muestras de M195c con 1 mM de Citrato de Titanio. A) En orden de izquierda a derecha: control 0,5 mM As(III), muestra 0,5 mM As(III) inoculada, control abiótico con 1 mM de As(III) y muestra de 1 mM As(III) inoculado. B) Acercamiento a muestras con 0,5 mM de As(III), inoculado y control abiótico a la izquierda y derecha respectivamente. _____ 57

- Figura 46. Precipitado marrón en M195c modificado con 1mM Citrato de Titanio (III) como agente reductor, emendado con 0,1 mM de As(III). A la izquierda, biopelícula de *Halodesulfovibrio aestuarii* en tubos con y sin arsénico (primer tubo de la izquierda). A la derecha, control abiótico. _____ 57
- Figura 47. OD de curva de crecimiento de *Halodesulfovibrio aestuarii* en medio DSMZ 195c con 1,42 mM de HCl-Cisteína como agente reductor, a distintas concentraciones de Arsenito de Sodio [As(II)]: Control sin As y 0,1, 0,2, 0,3 y 0,4 mM en triplicado. _____ 58
- Figura 48. Diferencias en la formación de biopelícula de *Halodesulfovibrio aestuarii* en presencia y sin arsenito de sodio As(III). A la izquierda, inóculos sin arsénico, a la derecha réplicas de inóculos con 0,1 mM de As(III) en contraste con control sin inoculo. _____ 59
- Figura 49. OD de curva de crecimiento de *Geobacter sulfurreducens* en medio DSMZ 826 con 20mM de Acetato de Sodio y 40 mM de Fumarato de Sodio, a distintas concentraciones de Arsenito de Sodio [As(III)]: Control 0mM, 0,1 mM y 1,0 mM, en triplicado. _____ 60
- Figura 50. Biopelícula *Geobacter sulfurreducens* en M826 de muestras con y sin As(III). A la izquierda, inóculos sin arsénico, a la derecha muestras con 0,1mM de As(III). _____ 61
- Figura 51 . OD de curva de crecimiento de *Halodesulfovibrio aestuarii* en medio DSMZ 195c con 1,42 mM de HCl-Cisteína como agente reductor, a distintas concentraciones de Arseniato de Sodio [As(V)]: Control 0mM, 0,5, 1, 3 y 5 mM en triplicado. _____ 62
- Figura 52. Crecimiento de biopelícula de *Halodesulfovibrio aestuarii* por paredes de los tubos de ensayo, solo evidenciado en muestras con As(V) 0,5 y 1mM y en las 3 réplicas respectivas. _____ 63
- Figura 53. OD de curva de crecimiento de *Geobacter sulfurreducens* en medio DSMZ 826 con 20mM de Acetato de Sodio y 40 mM de Fumarato de Sodio, a distintas concentraciones de Arseniato de Sodio [As(V)]: Control 0mM, 1, 2,4 y 5 mM, en triplicado. _____ 64
- Figura 54. Biopelícula de *Geobacter sulfurreducens* en presencia de As(V). En ambas imágenes se exponen las muestras de izquierda a derecha con 1, 2, 4 y 5 mM de As(V), pero distintas replicas. En la imagen de la derecha, el ultimo tubo corresponde a solo medio 826 sin inoculo o arsénico. _____ 65
- Figura 55. Metabolismo del Piruvato y enzimas encontradas en las anotaciones del genoma de *Halodesulfovibrio aestuarii* a través de KBase (indicadas en celeste) y encontradas a través de una búsqueda directa (verde) a través de la base de datos de KEGG. _____ 66
- Figura 56. Metabolismo del Sulfato y enzimas encontradas en las anotaciones del genoma de *Halodesulfovibrio aestuarii* a través de KBase (indicadas en celeste) y encontradas a través de una búsqueda directa (verde). _____ 69
- Figura 57. Diagrama del mecanismo de acción hipotético (coloreado) de *Halodesulfovibrio aestuarii* frente al estrés de la presencia de As(III) y As(V). _____ 71
- Figura 58. Muestras de medio M195c con concentraciones desde 0 a 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As(III) bajo procedimiento con KI. Notar precipitado negro y coloración amarilla (A), que al adicionar la LVM con la solución buffer, se torna de un verde negro (B). _____ 73
- Figura 59. Diferencia de color de muestras con (I) y sin inoculo (C) en el tratamiento con KI previo al procedimiento con LVM (derecha) y sin este (izquierda). _____ 74

Figura 60. Muestras de análisis de la viabilidad de la metodología de análisis de arsénico con nitrato de plata. (A) Muestras depositadas en la placa, (B) muestras precipitadas con AgNO_3 . C y D muestran la precipitación con AgNO_3 en el líquido sobrenadante de las muestras: II líquido sobrenadante de I, III líquido sobrenadante de II. _____	75
Figura 61. Análisis de estándares de As(III) y As(V) a distintas diluciones según se indica. En la primera línea, 10 mm As(III), mezcla 1:1 v/v, 100 mM As(V)._____	75
Figura 62. Efecto de la dilución de las muestras en la abundancia y color del precipitado. Precipitados de plata en medio M195c a diluciones 1:10, 1:100 y 1:500; muestras con inoculo (I) y estériles (C); y con concentraciones de 0,5 mM As(V), 0,1 mM As(III) o sin arsénico. _____	76
Figura B - 1. Curvas de calibración para metodología de medición de As con LVM. A la izquierda, estándar de arsénico diluido con agua MiliQ, mientras que a la derecha, estándar de arsénico diluido con M195c a su vez diluido a una razón de 1:500.....	97
Figura C - 1. Relave Petronila Diaz, ubicado a una cuadra del centro de Petorca, Región de Valparaíso, Chile. En amarillo, sección del relave, respecto a la ciudad de Petorca.....	99
Figura C - 2. Tubos sellados con tapón de goma y sello de aluminio, anóxicos e inoculados con microorganismo correspondiente.	99
Figura C - 3. Citrato de Titanio (III) con precipitado de carbonato. A la derecha, sin agitar, mientras que a la izquierda se muestra luego de su agitación.	100
Figura C - 4. Proceso de gasificación en tubos (izquierda) y en botellas (derecha). Notar además que al gasificar con una atmosfera 80%:20% de N_2 : CO_2 , la resazurina acuosa (violeta) se reduce a resorufina (rosada).....	109
Figura C - 5. Diagrama de la estación gasificadora (izquierda) y estación utilizada (derecha). Se indican en rojo el ingreso del gas anóxico (g) consistente en 80%:20% de N_2 y CO_2 , las válvulas de paso (stc), la salida de gas a través de la jeringa estéril (gs) y la salida a los brazos flexibles para la gasificación de tubos y botellas.	100
Figura D - 1. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen 16s de rRNA evidenciando la ubicación de <i>Halodesulfovibrio aestuarii</i>	101
Figura D - 2. Árbol filogenético basado en la secuenciación del gen 16S rRNA evidenciando ubicación de <i>Geobacter sulfurreducens</i>	101
Figura E - 1. Linealización etapa exponencial para <i>Halodesulfovibrio aestuarii</i> en M195c con Na_2S como agente reductor y As(III). Control (sin As) en verde, en azul muestra con 0,1 mM de NaAsO_2	102
Figura E - 2. Linealización etapa exponencial para <i>Halodesulfovibrio aestuarii</i> en M195c con HCl-Cisteína como agente reductor y As(III). Control (sin As) en verde, celeste, naranja, rojo y morado corresponden a muestras con 0,1, 0,2, 0,3 y 0,4 mM de As(III) respectivamente.	103
Figura E - 3. Linealización etapa exponencial para <i>Halodesulfovibrio aestuarii</i> en M195c con Ci-Ti(III) como agente reductor y As(III). Control (sin As) en verde, en azul muestra con 0,1 mM de NaAsO_2	103
Figura E - 4. Linealización etapa exponencial para <i>Geobacter sulfurreducens</i> en M826 c/ NaAsO_2 . Control sin As en verde, en azul muestra con 0,1 mM de NaAsO_2	103
Figura E - 5. Linealización etapa exponencial para <i>Geobacter sulfurreducens</i> en M826 con As(V). Control sin As en verde, en celeste, naranja, rojo y morado muestras con concentraciones de 1, 2, 4, 5 mM de As(V) respectivamente.	104

Figura E - 6. Linealización etapa exponencial para *Halodesulfobivrio aestuarii* en M195c con HCl-Cisteína como agente reductor y As(III). Control (sin As) en verde, celeste, naranja, rojo y morado corresponden a muestras con 0,5, 1, 3 y 5 mM de As(V) respectivamente. 104

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Numero de depósitos de relaves mineros que superan la Norma Italiana de calidad de suelos, para áreas verdes públicas o privadas y para zonas comerciales y/o industriales.....	2
Tabla 2. Tipos de mecanismos según la conversión de energía, la fuente del dador de electrones y la fuente dadora de carbono, y la tipología de cada uno.....	22
Tabla 3. Indicación de los posibles mecanismos de acción contra As en especies de Geobacter según los genes asociados a estos.	28
Tabla 4. Reacciones, enzimas y energía libre de Gibbs involucradas en la reducción disimilativa de sulfato a sulfuro de hidrogeno.....	29
Tabla 5. Termodinámica de las reducciones de metales disimilatorios por BSR.	31
Tabla 6. Solución Mineral de Wolin modificada	36
Tabla 7. Solución de Vitaminas de Wolin.....	37
Tabla 8. Solución de Elementos Traza SL-10.....	38
Tabla 9. Contraste entre las concentraciones en M195c y el límite de tolerancia para distintos iones interferentes en la metodología para safranina y fucsina y para Leuco Verde Malaquita.	44
Tabla 10. Algunos compuestos iónicos sólidos generados por la reacción de precipitación con nitrato de plata, color del precipitado, reacción y constante de solubilidad.	45
Tabla 11. Densidad óptica, variación final de OD y pH final de M195c con 1,66 mM de Na ₂ S y concentraciones variables de As(V).	50
Tabla 12. Densidad óptica, variación final de OD y pH final de M195c con 1,0 mM de Ci-Ti(III) y concentraciones variables de As(III).	51
Tabla 13. Densidad óptica, variación final de OD y pH final de M195c con 1,42 mM de HCl-Cisteína y concentraciones variables de As(V).	52
Tabla 14. Densidad óptica, variación final de OD y pH final de M195c con 1,42 mM de HCl-Cisteína y concentraciones variables de As(V).	53
Tabla 15. Parámetros cinéticos de crecimiento para <i>Halodesulfobivrio aestuarii</i> en M195c con Na ₂ S como agente reductor, en ausencia y presencia de As(III).	56
Tabla 16. Parámetros cinéticos de crecimiento para <i>Halodesulfobivrio aestuarii</i> en M195c con Ci-Ti(III) como agente reductor, en ausencia y presencia de As(III).	58

Tabla 17. Parámetros cinéticos de crecimiento para <i>Halodesulfovibrio aestuarii</i> en M195c con HCl-Cisteína como agente reductor, en ausencia y presencia de As(III).....	59
Tabla 18. Parámetros cinéticos de crecimiento para <i>Geobacter sulfurreducens</i> en M826 en ausencia y presencia de NaAsO ₂	61
Tabla 19. Parámetros cinéticos de crecimiento para <i>Halodesulfovibrio aestuarii</i> en M195c con HCl-Cisteína como agente reductor, en ausencia y presencia de As(V).....	63
Tabla 20. Parámetros cinéticos de crecimiento para <i>Geobacter sulfurreducens</i> en M826 en ausencia y presencia de As(V).	64
Tabla 21. Resumen de enzimas encontradas en las anotaciones del genoma de <i>Halodesulfovibrio aestuarii</i> involucradas en el metabolismo del piruvato.	66
Tabla 22. Enzimas evidenciadas en <i>D. desulfuricans</i> (dds00620 Pyruvate Metabolism) que no fueron encontradas en las anotaciones del genoma de <i>Halodesulfovibrio aestuarii</i>	67
Tabla 23. Resumen de enzimas encontradas en las anotaciones del genoma de <i>Halodesulfovibrio aestuarii</i> involucradas en el metabolismo del azufre.....	69
Tabla 24. Enzimas evidenciadas en <i>D. desulfuricans</i> (dds00920 Sulfur Metabolism) que no fueron encontradas en las anotaciones del genoma de <i>Halodesulfovibrio aestuarii</i>	70
Tabla 25. Estructuras evidenciadas en la base de datos de las anotaciones del genoma de <i>H. aestuarii</i> provistas por el Dr. R. Orellana.....	71
Tabla 26. Resultados de absorbancia de muestras con inóculo de <i>Halodesulfovibrio aestuarii</i> (I) y control sin inóculo (C) con 0, 0,1, 0,2, 0,3 y 0,4 mM de As(III).	73
Tabla 27. Detalle de muestras y estándares utilizados para el análisis de la viabilidad de la metodología de precipitación de arsénico con nitrato de plata.	75
Tabla A - 1. Concentraciones límites de contaminación de suelos (superficial y profundo) en relación al destino específico de uso de los sitios en remediación.	92
Tabla A - 2. Principales minerales de As evidenciados en la naturaleza.	92
Tabla A - 3. Minerales formadores de roca comunes y concentraciones de As encontrados.	93
Tabla A - 4. Concentración de arsénico en rocas y sedimento.....	94
Tabla A - 5. Concentración máximas de arsénico reportadas en aguas subterráneas alrededor del mundo.	96
Tabla A - 6. Límites máximos permitidos de As según el destino de descarga de líquidos a cuerpos de agua superficiales o respecto al tipo/uso del agua.	96
Tabla B – 1. Curva de calibración para medición de arsénico con LVM. Dilución arsénico en agua MiliQ.....	97
Tabla B - 2. Curva de calibración para medición de arsénico con LVM. Dilución de arsénico en M195c diluido 1:500.	98

Tabla B - 3. Prueba de medición de arsénico total en M195c diluido 1:500 con LVM, con procedimiento previo de reducción de As(V) a As(III) con KI.	98
Tabla B - 4. Detalle del análisis espectrofotométrico con LVM de muestras inoculadas con <i>Halodesulfovibrio aestuarii</i> (I) y medio estéril (C) a 0,1, 0,2, 0,3 y 0,4 mM de As(III).....	98
Tabla E - 1. Resumen de los parámetros cinéticos obtenidas con ambos microorganismos, <i>Geobacter sulfurreducens</i> como <i>Halodesulfovibrio aestuarii</i> , para las distintas especiaciones de arsénico como también en los distintos agentes reductores utilizados (solo la segunda especie).....	102
Tabla E - 2. Resumen de actividades, resultados y principales conclusiones por objetivo planteado.....	105

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, Chile es el mayor productor mundial de cobre (~27% de la producción mundial) y sus yacimientos se concentran en regiones como Antofagasta, Coquimbo y Tarapacá (Desierto de Atacama) (Venditti, B., 2022). Durante el año 2023 en Chile se produjo 5,33 millones de toneladas métricas de cobre, lo que se tradujo en el 11,9% del Producto Interno Bruto del país. (Consejo Minero, 2025). La tecnología de producción de cobre genera un material de descarte, constituido principalmente por material de roca molida el que es mayoritariamente acumulado en depósitos, ya sea tranques o embalses de relave, ubicados en zonas de bajas precipitaciones. La producción de material de descarte alcanza las 600 millones de toneladas anuales y se proyecta una tendencia al aumento hasta las 1.000 millones de toneladas anuales o incluso más durante la próxima década (Dirección de estudios y políticas públicas, 2022).

La construcción de nueva infraestructura de tranques y embalses de relave permite el almacenamiento y manejo del material con altos estándares de seguridad. Sin embargo, una serie de reportes (Hassan S. *et al.*, 2024; Khademi, H. *et al.*, 2018; Li, W. *et al.*, 2024; Sun, R. *et al.*, 2022) han destacado condiciones de mayor riesgo de liberación de contaminantes al ambiente en infraestructura antigua, sobre todo en condiciones ambientales producto del Cambio Climático (Castillo G., 2021; Erhart S. y Erhart K., 2023). Este problema es aún mayor producto del estancamiento técnico-administrativo en el cierre de un alto número de faenas mineras de nuestro país. Por ejemplo, el Plan Nacional de Depósitos de Relaves para una Minería Sostenible reportó que 636 relaves mineros que han cumplido su vida útil aún no presentan un plan de cierre acorde con la ley. De estos depósitos, 463 son unidades inactivas y 173 corresponden a relaves abandonados de los cuales se desconoce incluso la información respecto a la titularidad de su propiedad (División de Desarrollo Sostenible del Ministerio de Minería, 2019). Estas condiciones de riesgo pueden aumentar ya sea por el alza de la producción de otros minerales, incluyendo molibdeno, oro, plata y litio, o también producto de faenas de reprocesamiento de materiales de descarte desde los propios depósitos.

Diversos estudios han reportado que los relaves impactan significativamente el ambiente y la salud humana (Jiang, X., *et al.*, 2021) ya que son fuentes de contaminantes de interés por su toxicidad y riesgo (Tchernitchin, A., y Herrera, L., 2006). La actividad minera ha provocado que grandes áreas se contaminen con subproductos industriales y residuos mineros, principalmente ricos en arsénico (As), generando un aumento de la prevalencia de éste en su entorno (Roussel, C. *et al.*, 2000). Los efectos de la exposición de dicho contaminante están asociados a un mayor riesgo oncogénico, padecimiento de lesiones cutáneas e incluso afecciones en el desarrollo cognitivo (Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2007a). Normalmente, el agua contaminada es la mayor fuente de exposición de As en la población (Sultan, M. *et al.*, 2025).

La zona de interacción entre relaves y cuerpos de agua está constituida en una alta proporción por ambientes anóxicos, es decir, carecen de oxígeno, y que sostienen una serie de procesos biogeoquímicos tales como la ferro-reducción y sulfato-reducción (Keim, C. *et al.*, 2021; Zhang, M. *et al.*, 2022). Este último proceso es llevado a cabo por un grupo filogenéticamente diverso de

bacterias que tienen en común el uso de sulfato como aceptor de electrones y la producción de ácido sulfhídrico como producto final (Thauer, R. *et al.*, 1989). Estas bacterias sulfato reductoras (BSR) juegan un papel clave en la mineralización de la materia orgánica en ambientes naturales anóxicos donde el sulfato está disponible, incluyendo sistemas acuáticos como océanos, estuarios, lagos y ríos, entre otros. Los BSR también son componentes abundantes y relevantes para los procesos de ensamblajes microbianos anaerobios de varios sistemas artificiales, incluyendo a zonas contiguas de relaves mineros (Muyzer, G. y Stams, A., 2008). La abundancia de BSR en muchos ambientes anóxicos se debe a que utilizan varios productos de fermentación como donantes de electrones, incluyendo hidrógeno y compuestos orgánicos como acetato, etanol, formiato, lactato, piruvato, malato y succinato, entre otros (Jin, Q., 2012).

Una alta proporción de las zonas de interacción entre relaves y cuerpos de agua corresponden a ambientes sulfidogénicos producto de que la sulfato reducción constituye uno de los procesos predominantes (Keim, C. *et al.*, 2021; Zhang, M. *et al.*, 2022). Es por esto, que la actividad microbiana de dichas comunidades juega un rol clave en los ciclos de retención o liberación de contaminantes al ambiente (Akhavan, A. y Golchin, A., 2021).

En particular, el riesgo del As en el ambiente es influenciado por su toxicidad y movilidad. Los oxianiones arsenito (As(III)) y arseniato (As(V)) corresponden a las dos formas de arsénico más dominantes en el ambiente (Nordberg, G. *et al.*, 2007). Mientras el arsenito es más dominante en zonas reductoras, es a su vez 30 veces más tóxico que el arseniato, el que es más dominante en zonas mejor aireadas (Neff, J., 1997). La movilidad del arsénico en el ambiente es controlada en gran medida por procesos de sorción, fuertemente influenciados por la especiación del As en medio acuoso, lo que a su vez es definido por el pH y el potencial de oxidorreducción (Charlet, L. *et al.*, 2011).

Sin embargo, la actividad microbiológica puede ser ampliamente contribuyente en la distribución del arsénico en el ambiente, tanto por la oxidación de As(III) a As(V), como por la reducción de su forma pentavalente a arsenito (Smedley, P. y Kinniburgh, D., 2002), extensamente más móvil por su baja adsorción en comparación con las formas de arseniato. También, este último puede ser liberado producto de la actividad de bacterias ferroreductoras que generen la disolución reductora de óxidos férricos, proceso ampliamente estudiado (Cummings, D. *et al.*, 1999), no así el impacto de la reducción disimilatoria de sulfato, y es que, este proceso, ejerce un impacto significativo en la movilización y fijación del arsénico (Burton, E. *et al.*, 2013).

El sulfuro, producto de esta actividad microbiana de especies sulfato reductoras, desencadena una serie de reacciones químicas que influyen directamente en el destino de metales pesados como del arsénico (Lewis, A., 2010), ya que este precipita en forma de minerales de sulfuro de arsénico (Newman, D. *et al.*, 1997b), facilitando su inmovilización en condiciones reductoras. También, puede mediar la coprecipitación del arsénico con hierro, o propiciar la adsorción del arsénico sobre la superficie de los sulfuros de hierro precipitados, contribuyendo así a la retención de este elemento en el medio (Burton, E. *et al.*, 2013; Fares, A. y Singh, S., 2020).

Es por ello por lo que, la liberación de arsénico desde relaves y su transporte hacia cuerpos de agua genera preocupaciones por el desarrollo de efectos adversos en la población, lo que determina que el entendimiento de las transformaciones de arsénico en dichos ambientes sea clave para disminuir su riesgo (Taschereau, C. y Fytas, K., 2000).

La presente investigación se enfocará en la interacción de microorganismos sulfato reductores y arsénico en ambientes sulfidogénicos, utilizando como modelo la bacteria *Halodesulfovibrio aestuarii*, evaluando los efectos de su actividad metabólica en la biodisponibilidad del arsénico en este tipo de ambientes, realizando un contraste con una bacteria modelo ferrosreductora bien estudiada, *Geobacter sulfurreducens*. Los alcances de esta investigación contribuyen significativamente al entendimiento de la dinámica de contaminantes prioritarios por su distribución, movilidad y toxicidad, como es el caso del arsénico, pudiendo contribuir al desarrollo de tecnologías para el manejo o saneamiento de relaves mineros.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

Evaluar el rol de una especie de bacteria sulfato reductora (BSR), *Halodesulfovibrio aestuarii*, en el ciclaje de As en ambientes sulfidogénicos.

1.1.2 Objetivos específicos

- Testear una serie de mejoras técnicas para la evaluación del efecto de As en el crecimiento de *H. aestuarii*.
- Evaluar el potencial metabólico y su interacción con As de la especie SR *H. aestuarii*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 MINERÍA Y RELAVES EN CHILE

En el año 2023, alrededor del 11.9% del Producto Interno Bruto del país fue asociado con la actividad minera, destacándose con 29.290 millones de US\$ solo en la contribución del cobre contando con más de 5.330 de miles de toneladas métricas de mineral de cobre producido, y de 10.693 millones de US\$ de otras actividades mineras (Consejo Minero, 2025), destacándose la exportación de molibdeno, oro, plata y hierro. De esta actividad, el material de descarte denominado relave, consistente en una suspensión de sólidos en líquidos en una pulpa, es acumulado en zonas especificadas para ello, en donde se debe realizar el monitoreo del comportamiento estructural e hidráulico del depósito, buscando minimizar la filtración de aguas contaminadas al exterior de este o a cursos de aguas subterráneas (Ministerio de Minería de Chile, 2007).

Debido a lo anterior, Chile cuenta con numerosos relaves de diversa antigüedad que datan principalmente de los comienzos de la expansión de la minería del cobre en el país, a principios del siglo XX (Torres, J., 2002), y su producción continua en constante crecimiento, acumulando un total de 600 millones de toneladas anuales al 2022, proyectándose incluso un aumento a 1000 millones de toneladas anuales o superior en la década del 2030 (Dirección de estudios y políticas públicas, 2022).

Estos relaves, como reservorios de desechos de minerales de metales de importancia comercial, pueden impactar significativamente el entorno ecológico (Jiang, X. *et al.*, 2021) producto del riesgo de la liberación de contaminantes de interés por su toxicidad y riesgo tanto para el ambiente como para la salud (Tchernitchin, A. y Herrera, L., 2006). Sin embargo, y pese a que actualmente se cuenta con la legislación que exige el constante monitoreo y la ejecución de medidas mitigatorias a fin de evitar la contaminación de los espacios aledaños como de los cursos de aguas superficiales y subterráneas, existe un gran número de relaves con potencial de liberación de contaminantes (Dirección de estudios y políticas públicas, 2022). Para mediados del año 2023, se registraron un total de 764 depósitos de relaves mineros en el Catastro Nacional de Depósitos Mineros, en donde tan solo en 653 se han realizado los análisis geoquímicos correspondientes, es decir, respecto a la composición de estos y al riesgo potencial que supone la presencia de algunos elementos y compuestos reconocidos como contaminantes (SERNAGEOMIN - Subdirección de Minería, 2023). De estos últimos, un total de 636 depósitos de relaves han cumplido con su vida útil y no presentan un plan de cierre acorde a la ley, entre los cuales 463 son catalogados como inactivos, es decir, se tiene información respecto al titular, y 173 como abandonados, desconociéndose el titular a cargo de estos (División de Desarrollo Sostenible del Ministerio de Minería, 2019).

En Chile, no existe aún normas de calidad de suelos con los cuales se buscaría el análisis, monitoreo y remediación de estos relaves. Según el artículo 11 del Título II del Decreto 40 del 2003, que Aprueba el Reglamento del Sistema de Evaluación de Impacto Ambiental, se admite la utilización de normas de 14 países como referencia (Ministerio del Medio Ambiente de Chile, 2013), ante lo

cual, y por la similitud geoquímica de los suelos, como también por la generación de un marco regulatorio riguroso en la gestión de suelos contaminados, generalmente es utilizada para estos casos la norma de la República Italiana (Neaman, A., 2022).

Según datos del 2023 del Departamento de Evaluación de Proyectos Mineros, del Servicio Nacional de Geología y Minería (División de Desarrollo Sostenible del Ministerio de Minería, 2019), de los 629 depósitos de relaves catastrados, 301 y 284 relaves superan la norma ambiental italiana respecto a la calidad de suelos para “Sitios para uso residencial y área verde pública y privada” y “Sitio para uso comercial e industrial” (Ministerio Della Giustizia Italiano, 2006) para arsénico respectivamente en alguno de los puntos de muestra, siendo también recurrente en otros elementos de importancia por la toxicología asociada, como el Plomo (Pb), Mercurio (Hg) y Cadmio (Cd), evidenciados en la Tabla 1, siendo además que más del 8% de estos relaves catastrados, que superan la norma italiana expuesta, están en calidad de abandonados y más del 77% como inactivos, sin un plan de contención (Figura 1).

Tabla 1. Numero de depósitos de relaves mineros que superan la Norma Italiana de calidad de suelos, para áreas verdes públicas o privadas y para zonas comerciales y/o industriales (Tabla A - 1). Elaboración propia en base a datos SERNAGEOMIN - Subdirección de Minería (2023).

Región	N° Depósitos	Áreas Verdes Publicas/Privadas				Zonas Comerciales/Industriales			
		Pb	As	Hg	Cd	Pb	As	Hg	Cd
COQUIMBO	320	208	123	166	312	46	117	66	12
ATACAMA	143	116	91	56	112	44	84	19	2
VALPARAISO	65	44	22	7	49	7	20	2	8
ANTOFAGASTA	46	38	27	8	42	16	27	1	11
METROPOLITANA	26	18	13	4	20	10	13	0	5
OHIGGINS	14	14	12	2	10	3	11	0	3
AYSEN	9	9	9	6	9	8	8	0	7
TARAPACA	5	4	3	1	4	2	3	0	0
MAULE	1	1	1	0	1	0	1	0	0
TOTAL	629	452	301	250	559	136	284	88	48

Es así como, debido a las condiciones ambientales, los depósitos de relaves mineros presentan una alta predisposición a la contaminación del medio ambiente (Jiang, X. *et al.*, 2021). La dispersión de material particulado seco y fino, levantado por la acción del viento, transporta partículas cargadas de metales pesados que pueden ser inhaladas o depositarse en suelos y cuerpos de agua cercanos (Khademi, H. *et al.*, 2018), contaminando ecosistemas y representando un riesgo para la salud humana (Stovern, M. *et al.*, 2016). El contacto directo con los relaves, ya sea por actividades agrícolas como la producción de granjas sobre estos depósitos o por el uso de estas áreas como zonas públicas (Por ejemplo, lo expuesto en la Figura C - 1), expone a las personas y al ganado a altas concentraciones de contaminantes, facilitando la bioacumulación de metales pesados en la cadena trófica (Yu, H. *et al.*, 2023), siendo importante un análisis detallado previo al cambio del uso de dichos suelos. Además, la escorrentía superficial durante eventos de lluvia arrastra material

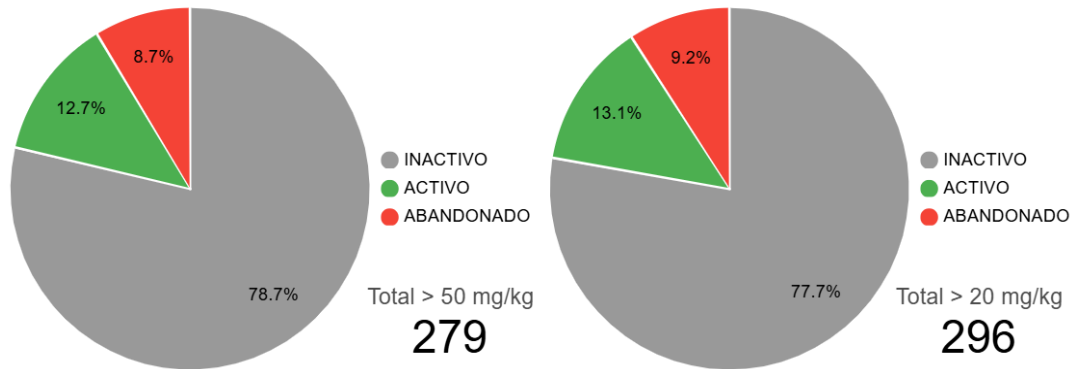


Figura 1. Porcentaje de los relaves que superan la norma italiana de contaminación de suelo por arsénico para zonas industriales y comerciales (izquierda) y zonas verdes públicas o privadas (derecha) según el estado en que se encuentran: INACTIVO, en desuso y con propietario conocido; ACTIVO, en uso actual (para el año del catastro); y ABANDONADO, con propietario desconocido o inubicable. Elaboración propia en base a datos de SERNAGEOMIN - Subdirección de Minería (2023).

particulado y disuelto hacia cuerpos de agua superficiales, alterando su calidad (Sun, R. *et al.*, 2022). Los lixiviados, generados por la percolación de agua a través de los relaves, infiltran el suelo y pueden contaminar las aguas subterráneas (Li, W. *et al.*, 2024), una fuente crucial de agua potable y para ecosistemas. Es por ello por lo que, la zona de interacción entre relaves y cuerpos de agua, sean superficiales como subsuperficiales, generan una creciente preocupación por el rol clave que presentan en la liberación de contaminantes al ambiente (Akhavan, A. y Golchin, A., 2021).

Esto es aún más relevante considerando que el agotamiento del mineral provoca un aumento de los contaminantes presentes en el material extraído, concentrándolos aún más en los relaves actualmente activos y exponiendo a una situación de mayor liberación de estos, siendo el contaminante más estudiado en esta condición y que es preocupante debido a su toxicidad, el arsénico (Figura 2).

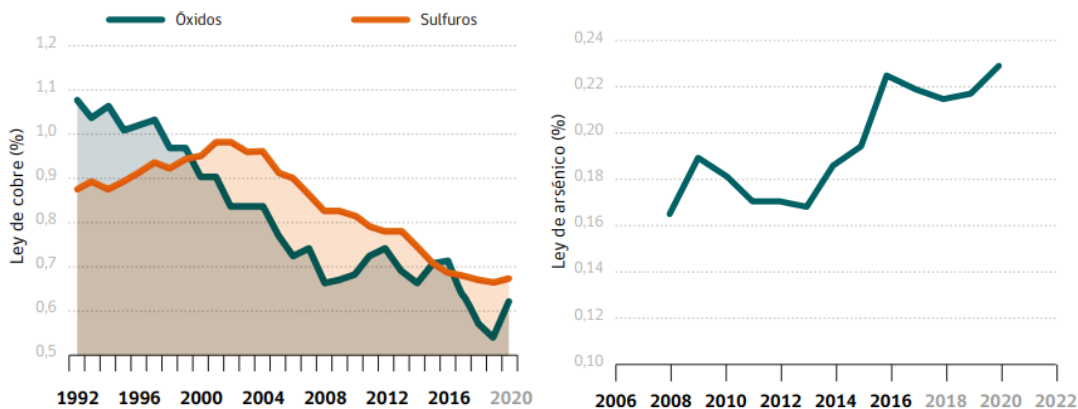


Figura 2. Ley de cobre en óxidos y sulfuros y ley de arsénico en estos minerales a través de los años (Ecometales, 2016).

La alta especiación en combinación con la alta prevalencia en el ambiente del arsénico, ha generado que se evidencie este contaminante en distintos tipos de minerales (Smedley, P. y Kinniburgh, D., 2002), por ejemplo, en la Tabla A - 3 se presentan distintos minerales en los cuales se han encontrado concentraciones variables de arsénico, sea adherido superficialmente o de manera química en estos.

También, ante el aumento de la concentración de arsénico en los concentrados de cobre, producto del agotamiento del mineral, se han planteado diversos procesos para eliminar este contaminante, destacando la adhesión y coprecipitación en minerales de hierro (Jiang, X. *et al.*, 2015; Swash, P. y Monhemius, A., 1998). El más importante de estos, es la formación de Escorodita ($\text{FeAsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), el cual es desechado y acumulado en rellenos de seguridad destacando la estabilidad del mineral (Ecometales, 2016). Sin embargo, la estabilidad de este mineral depende de las condiciones ambientales como de la actividad microbiológica a la cual sea sometido. Krause, E. *et al.* (1989) demostró el efecto de la razón Fe:As en la solubilidad de ferrihidrita precipitada con arsénico, indicando que a valores menores a 4 la solubilidad aumenta rápidamente. Pese a ello, sobre dicho valor, la presencia de CO_2 como de reactivos sólidos como piritita y pirrotina no aumentan la solubilidad de este, indicando que este mineral es generalmente estable a condiciones atmosféricas.

Es así como, el arsénico puede liberarse desde estos rellenos y relaves, y entrar a los sistemas acuáticos, a suelos y sedimentos (Akhavan, A. y Golchin, A., 2021), exponiendo a la población y colmando la salud de esta, siendo así, un riesgo inminente y presente a tomar en cuenta.

2.2 ARSÉNICO, UN TOXICO PREDOMINANTE

El arsénico, es un metaloide con número atómico de 33 perteneciente al grupo 15 de la tabla periódica, anteriormente llamado “grupo del nitrógeno” o “grupo Pnictógeno”, al igual que el nitrógeno (N° atómico 7) fósforo (N° atómico 15), el Antimonio (N° atómico 51) y Bismuto (N° atómico 83), compartiendo la configuración electrónica de su capa de valencia ns^2p^3 y, por lo tanto, algunas otras propiedades como la energía de ionización y la afinidad electrónica (Burford, N. *et al.*, 2011).

Puede encontrarse naturalmente en gran parte de la corteza terrestre (Tabla A – 4) con un contenido promedio de 2 mg/kg (Fares, A. y Singh, S., 2020), en formaciones cristalinas, pulverulentos, vítreos o acuosos (Sultan, M. *et al.*, 2025). Algunos de los principales minerales de arsénico presentes en la naturaleza son presentados en la Tabla A - 2.

Este, presenta los estados de oxidación -3, 0, +5 y +3, presentándose en ambientes acuáticos naturales producto de la disolución mineral natural de los depósitos geológicos la descarga de efluentes y la sedimentación atmosférica (Ortiz, J. *et al.*, 2022), en sus formas inorgánicas como oxianiones de arsenito trivalente As(III) o arseniato pentavalente As(V) (Smedley, P. y Kinniburgh, D., 2002), como también en minerales como la arsenopiritita (AsFeS), rejalgar (AsS) y oropimente (As_2S_3), incluso reemplazando al fosfato por su afinidad química en la apatita (composición aproximada $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F,Cl,OH})$) (Boyd, C., 2020), siendo encontrado en Chile principalmente en los minerales calcófidios naturales como la arsenopiritita y enargita (Cu_3AsS_4) (Byrne, S. *et al.*, 2010). También, es posible encontrarlo en formas orgánicas, producidos por algunos

microorganismos, como compuestos arsenicales metilados de As(III) y As(V) (de Francisco, P. *et al.*, 2021) como ácido monometilarsónico (MMA), ácido dimetilarsínico (DMA) y el óxido de trimetilarsina (TMAO), entre otros, evidenciados en la Figura 3.

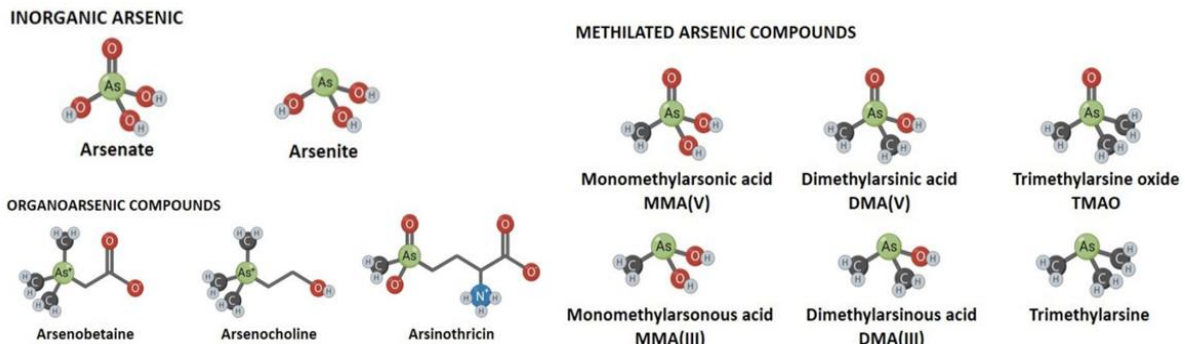


Figura 3. Principales formas químicas del arsénico inorgánicas y orgánicas encontradas en la naturaleza (de Francisco, P. *et al.*, 2021)

En sistemas acuáticos, suelos y sedimentos, la especiación del arsénico está fuertemente controlada por el potencial de óxido-reducción (Eh), el pH y la presencia de iones complejantes (Panagiotaras, D. *et al.*, 2012). En condiciones oxidantes y generalmente a valores de pH neutro a alcalino, la especie dominante es el arseniato, que se presenta como aniones oxigenados como H_2AsO_4^- , a pH cercanos a 6.9, y HAsO_4^{2-} a pH mayores (Smedley, P. y Kinniburgh, D., 2002). Por otro lado, en condiciones reductoras y a valores de pH más ácidos a neutros, el arsenito [As(III)] se convierte en la especie predominante, principalmente en su forma neutra y mayormente móvil H_3AsO_3 (Shaw, D., 2006) aunque también como H_2AsO_3^- y HAsO_3^{2-} a pH alcalino Figura 4.

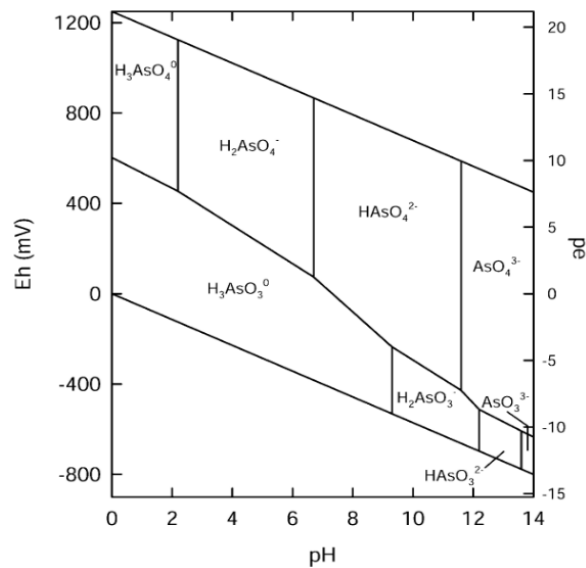


Figura 4. Diagrama Eh-pH para el sistema As-O₂-H₂O, a 25°C y 1 bar de presión total (Smedley, P. y Kinniburgh, D., 2002).

En presencia de concentraciones altas de sulfuro, las especies disueltas de sulfuro de arsénico pueden ser significativas, en donde las condiciones de alta acidez y ambientes reductores favorecen la precipitación de oropimente (As_2S_3) y realgar (AsS) además de otros minerales sulfurados en donde el As coprecipita (Zhu, X. *et al.*, 2015), esperándose por lo tanto un bajo contenido de As en aguas con una alta concentración de sulfuro libre (Smedley, P. y Kinniburgh, D., 2002), y a condiciones reductoras extremas la posibilidad de formar HAS_2 , derivados de arsina (AsH_3), y arsénico metálico (Panagiotaras, D. *et al.*, 2012), como es posible ver en la Figura 5.

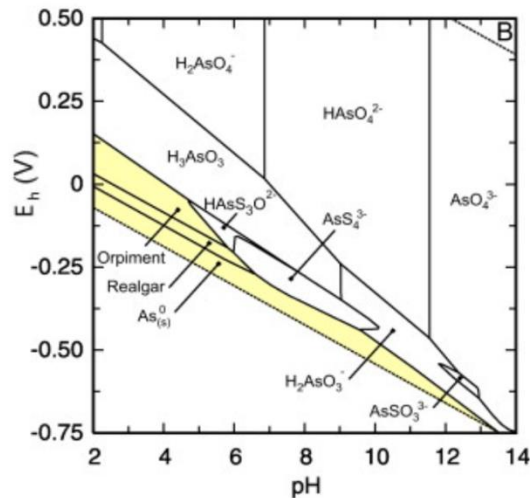


Figura 5. Diagrama Eh-pH para el sistema As–O–H–S, en donde el equilibrio es impuesto con $\text{S}(\alpha)\text{S}(s)$ y las áreas sombreadas corresponden a las fases sólidas (Couture, R. y van Cappellen, P., 2011)

2.2.1 Movilización de As en la naturaleza

Por la abundancia de este elemento en la naturaleza, el arsénico está altamente distribuido en la corteza terrestre (Smedley, P. y Kinniburgh, D., 2002). La fuerte influencia de la interacción agua-roca, dependiendo de la fuente de As como de las condiciones geoquímicas del ambiente, genera que se evidencien mayores concentraciones en aguas subterráneas (Sultan, M. *et al.*, 2025). Sin embargo, el rango de concentraciones es amplio y, por lo tanto, difícil de obtener valores típicos debido a que muchos estudios se centran preferentemente en zonas altamente contaminadas o problemáticas (Smedley, P. y Kinniburgh, D., 2002).

Debido a esto, la movilización de este elemento en la naturaleza está bien estudiada en las fases sólidas (Couture, R. y van Cappellen, P., 2011; Yang, H. *et al.*, 2012). Los principales mecanismos que provocan la movilización o inmovilización de As son la disolución y precipitación, la adsorción y desorción (o coprecipitación), y la reducción y oxidación (Panagiotaras, D. *et al.*, 2012):

a) **Disolución y precipitación**

La especiación de As está principalmente influenciada por los cambios en el pH y en el potencial de reducción (Eh) (Panagiotaras, D. *et al.*, 2012), como puede evidenciarse en la Figura 6.

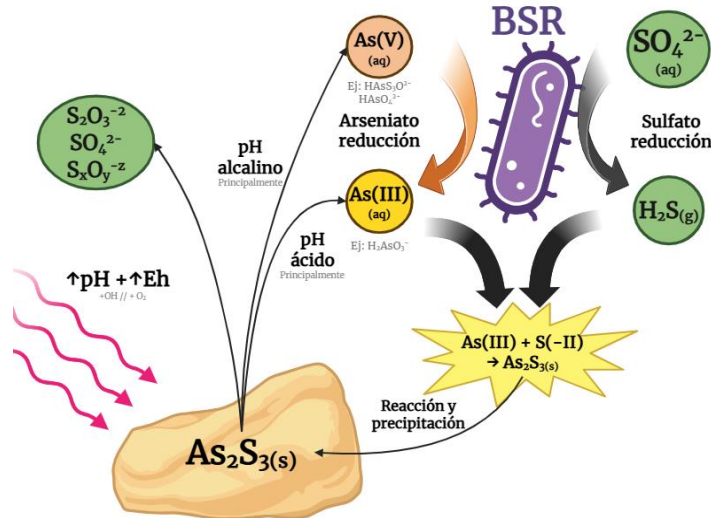


Figura 6. Disolución y precipitación de As producto de cambios en el medio y mediado por bacterias sulfato reductoras. Las condiciones de pH y potencial redox influyen en las especies de As, liberándolo o precipitándolo, sin embargo, microorganismos sulfato reductores pueden, a través de la producción de sulfhídrico, precipitar As como sulfuro. Elaboración propia.

En condiciones altamente reductoras y/o acidas, y a altas concentraciones de sulfuro, se favorece la precipitación del arsénico presente en la fase acuosa en forma de realgar (AsS) y oropimente (As_2S_3), como también de otros minerales sulfurados (Smedley, P. y Kinniburgh, D., 2002). Por el contrario, en el ambiente, ante condiciones alcalinas, la oxigenación del medio y el aumento del Eh, los minerales sulfurados de arsénico tienden a oxidarse y disolverse, como lo evidenciado en la Figura 7, predominando la especie oxidada pentavalente (Mirazimi, M. *et al.*, 2021).

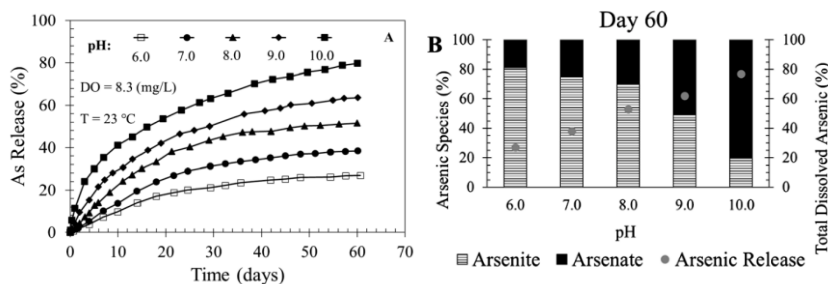


Figura 7. Disolución de As_2S_3 . A la izquierda, el efecto del pH en la liberación de arsénico total a través de los días, mientras que a la derecha, el estado de oxidación principal del arsénico disuelto (arsenito $As(III)$ y Arseniato $As(V)$) (Mirazimi, M. *et al.*, 2021).

También, los microorganismos generan una influencia notoria en la especiación de arsénico en el ambiente (Smedley, P. y Kinniburgh, D., 2002. En 1997 (b), Newman, D. *et al.* lograron aislar una BSR desde el *Upper Mystic Lake* (Woburn, Mass., EE. UU.), lago con una alta concentración de arsénico (Aurillo, A. *et al.*, 1994), a la que nombraron *Desulfotomaculum auripigmentum* (reclasificada en el 2003 por Stackebrandt, E. *et al.* como *Desulfosporosinus auripigmenti*), la cual

evidenciaron la capacidad de reducir disimilatoriamente arseniato, lo que acoplado a la reducción disimilatoria de sulfato, generó un precipitado amarillo de As_2S_3 intra y extra celular.

b) Desorción y coprecipitación

La sorción en partículas sólidas es crucial en la movilidad del arsénico (Wolthers, M. *et al.*, 2007), ya que el arsénico puede adherirse firmemente a la superficie de ciertos minerales (Figura 8).

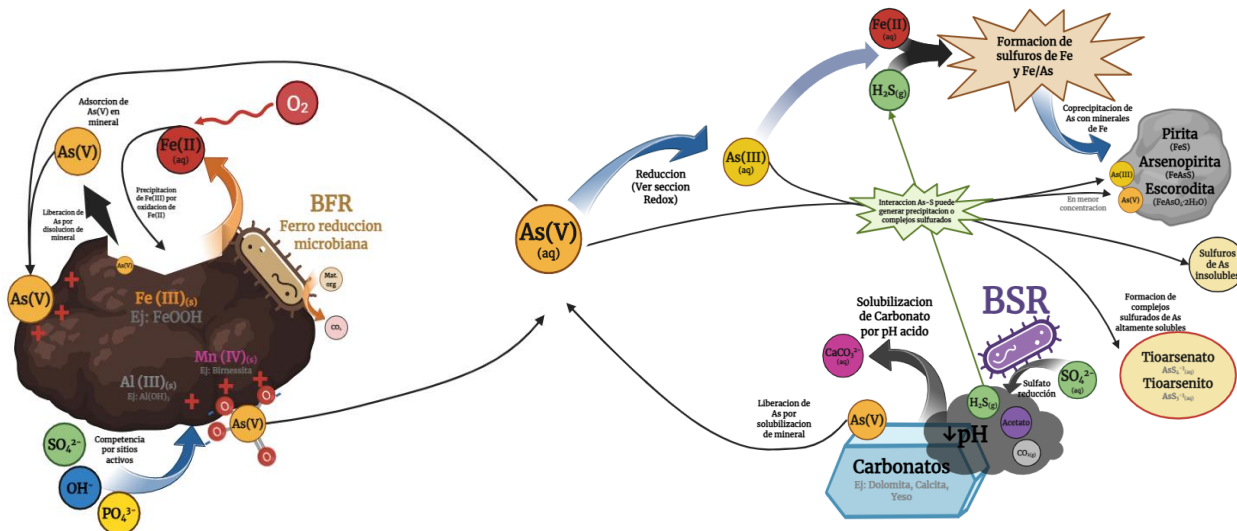


Figura 8. Sorción y coprecipitación de As producto de las condiciones ambientales como por efecto del metabolismo microbiano. Elaboración Propia.

En condiciones oxidantes, la especie predominante de arsénico es la pentavalente como oxianión (AsO_4^{3-}), el cual presenta una alta afinidad con la superficie de distintos minerales (Fakhreddine, S. y Fendorf, S., 2021), principalmente óxidos de Fe, Mn y Al, como Goethita ($FeOOH$), Hematita (Fe_2O_3), Birnessita ($(Na, Ca, K)_{0.6}(Mn^{4+}, Mn^{3+})_2O_4 \cdot 1.5H_2O$), Gibbsita ($Al(OH)_3$) y la Caolita ($Al_2Si_2O_5(OH)_4$) (Smedley, P. y Kinniburgh, D., 2002), como es posible evidenciar en la Tabla A - 2. Es por esto por lo que, la valencia de los cationes en el agua intersticial de las arcillas en sedimentos aumentan la sorción del arseniato al aumentar la carga positiva superficial de estas, facilitando los mecanismos de puenteo catiónico (Fakhreddine, S. y Fendorf, S., 2021). También, por su similitud química con el As en su forma pentavalente, los iones fosfatos (PO_4^{3-}) compiten por los sitios activos en la superficies de los minerales (Fendorf, S. *et al.*, 2010), incluso compitiendo con los iones sulfato (SO_4^{2-}), por ejemplo en el yeso (Zhu, X. *et al.*, 2015), aunque en menor medida,

Al contrario de que los cationes de metales traza tóxicos, como Pb^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , que se vuelven cada vez más insolubles a mayores pH ante la fuerte adherencia a óxidos metálicos hidratados, arcilla o materia orgánica, los oxianiones, incluyendo al arseniato, tienden a adsorberse con menor fuerza ante dicho aumento de pH (Smedley, P. y Kinniburgh, D., 2002). A valores de pH alcalinos, el desplazamiento de iones hidroxilos movilizan el arsénico compitiendo por los sitios activos de sorción en estos minerales (Martíñá, D. *et al.*, 2018). Por el contrario, en condiciones

altamente reductoras y ácidas, con altas concentraciones de sulfuro, el As puede coprecipitar en minerales sulfurados y carbonatos (DeVore, C. *et al.*, 2019), siendo la piritita un importante sumidero de este contaminante (Wolthers, M. *et al.*, 2007), siendo además posible la desorción desde sulfuros de Fe (II), minerales predominantes en ambientes sulfídicos anóxicos (Fendorf, S. *et al.*, 2010) y la formación de complejos sulfurados de arsénico solubles, como tioarsenatos ($\text{As}^{(\text{V})}\text{S}_4^{3-}$) y tioarsenitos ($\text{As}^{(\text{III})}\text{S}_3^{3-}$) (Saalfeld, S. y Bostick, B., 2009).

Por otro lado, metales pesados como Mn, Cd y Pb, como también metales alcalino térreos como Ca Mg y Ba pueden precipitar con arseniato, aunque con una relativamente alta solubilidad, generando un impacto limitado en las concentraciones de arsénico acuoso (Fendorf, S. *et al.*, 2010).

También, Schultze-Lam, S. *et al.* (1996) indica la facilidad de adherencia de metales en la superficie de la pared celular de los microorganismos, promoviendo una eventual precipitación de biominerales, siendo los exopolisacáridos generados en la biopelícula microbiana un sitio ideal para la sorción de metales y su posterior precipitación (Fleming, H., 1995).

Otro mecanismo que permite la desorción y coprecipitación de arsénico es la reducción disimilatoria de los minerales en que el arsénico este adherido, producto de la actividad microbiana (Smedley, P. y Kinniburgh, D., 2002). Procesos como la ferro reducción, mediada por BFR como las especies de *Geobacter*, reducen el Fe(III) solido a Fe(II) acuoso, liberando As al solubilizar la matriz solida a la que este está adherido (Osborne, T. *et al.*, 2015). En el 2013, (Giloteaux, L. *et al.*, 2013) notaron que, en el proceso de biorremediación de uranio, la reducción de U(VI) es acoplada a la reducción de óxidos de Fe(III), elevando las concentraciones de As acuoso ante la adición de materia orgánica para estimular la microbiota de la zona contaminada, evidenciándose también la transcripción de genes asociados al estrés microbiano por dicho contaminante (Figura 9).

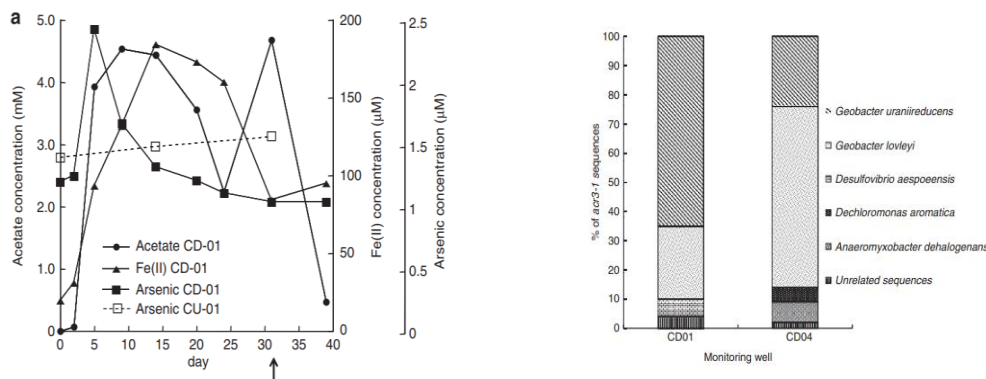


Figura 9. Efecto de la adición de acetato en zona contaminada con U(VI) en la concentración de arsénico (izquierda) y en la transcripción del gen *acr3* (derecha), que codifica la bomba proteica de As(III) Acr3 (Giloteaux, L. *et al.*, 2013).

Por el contrario, el Fe(II) acuoso liberado por BFR y, en conjunto con el efecto del metabolismo de BSR con la producción de S(-II), promovería la formación de magnetita ($\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4$) y sulfuros

de hierro, los que tienden a coprecipitar con As(III) principalmente, aunque una pequeña porción de As(V) puede adherirse a este (Saalfield, S. y Bostick, B., 2009).

El arsénico también puede adherirse a carbonatos como calcita (CaCO_3), dolomita ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$), y yeso ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Zhu, X. *et al.*, 2015) y por lo tanto, liberarse ante la dilución de estos minerales tanto por efectos ambientales como producto de la actividad microbiana de BSR (Meng, X. *et al.*, 2016). Jiang, X. *et al.* (2024) demostraron que se puede liberar As de estos minerales a través de dos mecanismos principales, la disolución de los minerales producto de la generación acetato, H_2S y CO_2 , que reducen localmente el pH, como también a través de la ruptura de los enlaces de hidrogeno desde la superficie del mineral.

c) Reducción y Oxidación

La dinámica del arsénico (As) en sistemas ambientales está regida principalmente por reacciones abióticas como también por la actividad microbiana (Figura 10). El As(V) presenta una mayor adherencia a minerales de hierro, por lo que su reducción a As(III), provocará la liberación de este elemento a la fase acuosa (Smedley, P. y Kinniburgh, D., 2002).

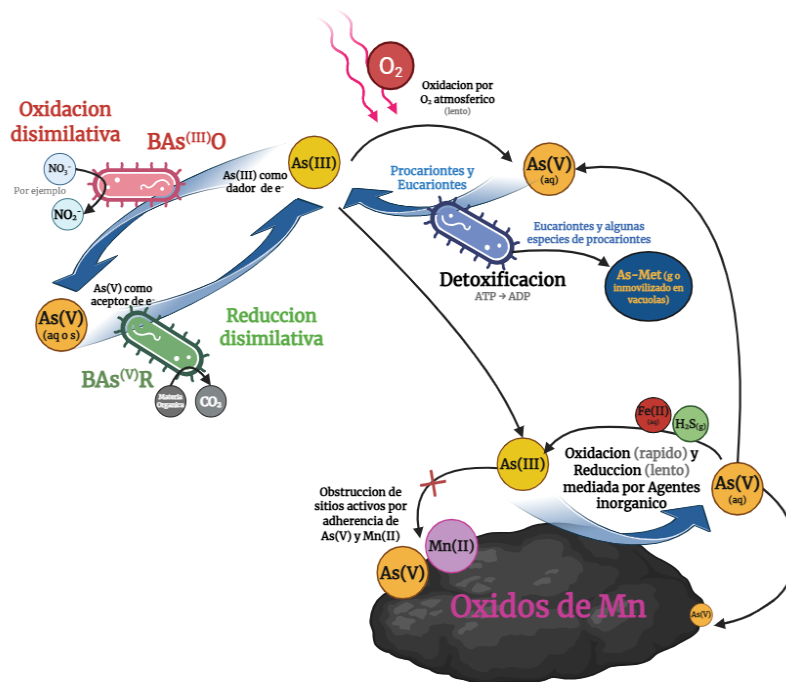


Figura 10. Reducción y Oxidación de As por agentes inorgánicos y microorganismos. Elaboración propia.

En condiciones anaeróbicas, agentes reductores inorgánicos como $\text{S}(-\text{II})$ y $\text{Fe}(\text{II})$, así como la materia orgánica disuelta, pueden mediar esta transformación a $\text{As}(\text{III})$, liberándolo, aunque a una cinética lenta a pH neutro (Saalfield, S. y Bostick, B., 2009).

Por ello, la reducción de As(V) a As(III) es principalmente mediada a través de microorganismos arseniato reductores, liberando este último igualmente (Fendorf, S. *et al.*, 2010). Esta reducción del

arseniato presente en ambiente puede ser realizada a través de dos mecanismos principales que difieren en la finalidad, y son la detoxificación y la respiración (Smedley, P. y Kinniburgh, D., 2002), mediados por los operones *ars* y *arr* respectivamente (Yan, G. *et al.*, 2019), los que son abordados en profundidad en la sección 2.2.3 Mecanismos de acción celular.

Por ejemplo, Cai, X. *et al.* (2016) lograron aislar 3 especies distintas, filogenéticamente cercanas a *Bacillus*, *Desulfitobacterium* y *Exiguobacterium* respectivamente, que fueron capaces resistir altas concentraciones de arsénico en un ambiente anóxico y de reducir y liberar As(V) hasta incluso un 90,5% del As presente en goetita; también, Babechuk, M. *et al.* (2009) evidenció la liberación de arsénico desde simplexita $[\text{Fe(II)}_3(\text{As(V)O}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}]$ a través de la reducción disimilativa de As(V) por parte de *Shewanella sp.* cepa ANA-3, y no solo eso, sino también que evidenciaron la precipitación de nanopartículas, las cuales determinaron que consistía en un mineral reducido de As-Fe similar a arseniatos férrico.

Por otro lado, la oxidación de As(III) a As(V) ocurre principalmente por métodos químicos a una tasa rápida (Yuan, C. *et al.*, 2023), a través de oxidantes fuertes como minerales de óxidos de manganeso, minerales de alta reactividad y abundancia en el ambiente (Oscarson, D. *et al.*, 1981), y rápidamente disminuye la tasa de reacción al ser bloqueados los sitios activos de la superficie del mineral por el aumento de la concentración de As(V), Mn(II) y posiblemente Mn(III) (Lafferty, D. *et al.*, 2010). Dong, D. *et al.* (2014) demostraron que, a través del cultivo en muestras de suelo de un campo de arroz en Japón, la oxidación de As(III) fue principalmente mediada en un inicio por óxidos de manganeso, a un ritmo del 28 al 38% de As(III) diario, cesando a las 24 horas producto de la pasivación de los sitios activos de la superficie de los minerales, y posterior a este la predominancia fue biótica a través de bacterias As(III) oxidantes a un ritmo desacelerado, entre 2,5 a 2,8% diaria de As(III).

Además, condiciones aerobias, es decir, ante la exposición del oxígeno atmosférico, el As(III) puede oxidarse a As(V) pero, en ausencia de catalizadores como peróxido de hidrogeno, dióxido de azufre, ion ferrato (Fe^{6+}), ozono u otros, tiende a ser una reacción lenta (Nazari, A. *et al.*, 2017). Por otro lado, a una menor velocidad de reacción y posterior a la etapa química anaerobia, la oxidación es mediada por microorganismos As(III) oxidantes (Yuan, C. *et al.*, 2023), sin embargo, se han encontrado evidencias de oxidación de arsenito mediada por microorganismos a una mayor velocidad en aguas geotérmicas y termales (Oremland, R. y Stolz, J., 2003). En este caso, el mecanismo es mediado por los operones *aioBA*, ampliamente encontrado en microorganismos autótrofos y heterótrofos aerobias, y *arx*, de menor presencia y encontrado en microorganismos anóxicos fotosintéticos y quimiolitotrófico, que acoplan la oxidación de As(III) a procesos de reducción de, por ejemplo, nitrato (Yan, G. *et al.*, 2019).

2.2.2 Toxicidad

La toxicidad del arsénico dependerá de distintos factores. Condiciones ambientales como el pH, la temperatura, el contenido de materia orgánica, humedad, el estado redox como la influencia biótica son influyentes en la capacidad toxicológica de este contaminante ya que afectan directamente su especiación y biodisponibilidad (De Francisco, P. *et al.*, 2021).

Los efectos toxicológicos del arsénico son conocidos desde la antigüedad (Frith, J., 2013), desde su uso como medicamento por Hipócrates durante el siglo I a.C. en la antigua Grecia, quien recetaba sulfuros de arsénico, como realgar y oropimente, para el tratamiento de úlceras cutáneas (Jacob, H., 2008); pasando por los numerosos y meticulosos envenenamientos durante el imperio romano, como por ejemplo el emperador Nerón envenenando a su hermanastro Tiberius Britannicus en el año 55 d.C. para asegurar su posición como emperador romano (Frith, J., 2013) con un mayor énfasis durante el Renacimiento, como por ejemplo los envenenamientos en las familias Medicis y Borgias, dos familias de renombre de dicha época (Retief, F. y Cilliers, L., 2000), o la famosa asesina de cientos de hombres Giulia Toffana y su hija, Girolama Toffama (Frith, J., 2013); los envenenamientos accidentales por su uso frecuente como tinte en pinturas y telas, como los colores verde de Scheele (CuHAsO_3) y verde de Paris ($\text{Cu}(\text{AcO})_2 \cdot 3\text{Cu}(\text{AsO}_2)_2$) (Silva, 2013); hasta su uso como arma química durante la primera guerra mundial, como la arsina (AsH_3) y la lewisita ($\text{C}_2\text{H}_2\text{AsCl}_3$) (Flora, S., 2015) y su prohibición como arma en el 1997 por la Convención de Armas Químicas (CWC por sus siglas en inglés). Inclusive, la exposición humana a arsénico se data de la antigüedad, encontrando rastros de este elemento en el cabello de momias Chinchorros, en el desierto de Atacama, Chile, con al menos 1000 años de antigüedad (Byrne, S. *et al.*, 2010).

Por ello, y debido a su alta toxicidad como también por ser un carcinógeno bien estudiado (Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2007), la Organización Mundial de la Salud, establece como límite de concentración para cuerpos de agua subterráneos de máximo $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (World Health Organization, 2024). En Chile, existe normativa (Decreto 90, 2000; Decreto 106, 1997; NCh 409, 2005; NCh 1333, 1978) que indican las concentraciones límites para este contaminante en descarga de residuos líquidos según el cuerpo de agua respectivo, como también respecto al uso del agua, indicando valores entre $0,1$ a 1 mg L^{-1} (Tabla A - 6).

La toxicidad depende del estado de oxidación, la estructura química y la solubilidad. La escala de toxicidad del arsénico disminuye generalmente en la siguiente dirección: Arsinas (AsH_3 y sustituciones halogenadas) > As(III) inorgánico > As(III) orgánico > As(V) inorgánico > As(V) orgánico > compuestos arsenicales y arsénico elemental (Ortiz, J. *et al.*, 2022), siendo el arsénico trivalente alrededor de 60 veces más tóxico que el arseniato (Mabuchi, K. *et al.*, 1979) y los compuestos inorgánicos alrededor de 100 veces más tóxicos que los compuestos metilados de arsénico (Thompson, D., 1993).

El arsénico trivalente As(III) ingresa a las células a través de las acuagliceroporinas y las hexosas permeasas (solo evidenciadas en levaduras y mamíferos) (Dhuldhaj, U. *et al.*, 2012), proteínas transportadoras encargadas de incorporar a las células agua, solutos no polares como la urea y glicerol, las especies reactivas de oxígeno, peróxido de hidrógeno, y gases como amoníaco, dióxido de carbono y óxido nítrico, y otros metaloides como Sb(III) (De Francisco, P. *et al.*, 2021).

Este, presenta una gran afinidad a los grupos tioles (-SH) de proteínas y por los grupos sulhidrilos vecinales, pudiendo inutilizarlas e inhibir el metabolismo oxidativo, por ejemplo, del ácido lipoico y, por lo tanto, de la enzima piruvato deshidrogenasa que depende íntegramente de este ácido

(Dhuldhaj, U. *et al.*, 2012), afectando al proceso de oxidación de piruvato a acetil-CoA, un precursor de los intermediarios del ciclo del ácido cítrico, e inhibiendo así la producción de ATP (Hughes, 2002). Chillé, D. *et al.* (2022) demostró que el As(III) también puede interactuar con grupos carboxilos (-COOH), que a su vez puede desplazar los grupos hidroxilos del ácido arsenioso (As(OH)₃), y con los grupos amino (-NH₂), e igualmente con estos mismos grupos en las inmediaciones (incluidos grupos tioles, con mayor afinidad por estos), inhibiendo el metabolismo asociado a las proteínas y enzimas afectadas.

También, se ha relacionado el arsenito con la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS por su siglas en inglés), que agotan las reservas de glutatión y, por lo tanto disminuye la capacidad antioxidantes de las células (Hughes, M., 2002); y con la inhibición del mecanismo de reparación del ADN (Rosen, B. y Tamás, M., 2010), induciendo daños al ADN a través del estrés oxidativo directo, el daño oxidativo y las alteraciones en las proteínas de reparación del ADN pueden conducir a una reparación alterada del ADN (Zhou, X. *et al.*, 2021), siendo estas las bases de los mecanismos cancerígenos y co-carcinogénicos del arsénico.

Por su parte, el arseniato As(V), por su similitud química con el ion fosfato (PO₄³⁻), logra entrar a las células a través de los canales de fosfatos Pit, canal de baja afinidad e impulsado por la fuerza motriz de protones, y Pst, canal de mayor afinidad impulsado por la utilización de ATP (Yang, G. *et al.*, 2015), compitiendo directamente con este ion esencial en, por ejemplo, la reacción con glucosa y gluconato, inhibiendo a la hexoquinasa y el metabolismo de la glucosa (Hughes, M., 2002), como también actuando como un desacoplador de la fosforilación oxidativa (Dhuldhaj, U. *et al.*, 2012).

Por otro lado, el ingreso de especies orgánicas de arsénico metilado a las células, tanto para As(III) como As(V), ocurre similar que sus versiones inorgánicas, es decir, son absorbidos por las bacterias a través de permeasas de fosfato o acuagliceroporinas (Yan, G. *et al.*, 2019), e igualmente presentan efectos similares en la célula. Sin embargo, la toxicidad variará enormemente entre compuestos, en donde, por ejemplo, especies de arsénico trivalentes orgánicas, como MMA(III) y DMA(III), tienden a ser más tóxicas que sus versiones inorgánicas (De Francisco, P. *et al.*, 2021). Así, las especies metiladas de As(III) son más dañinas para el ADN en el siguiente orden: DMAA(III) MMAA(III) > [As(III), As(V)] > MMAA(V) > DMAA(V) > [TMAO(V)] (Dhuldhaj, U. *et al.*, 2012) producto de la mayor afinidad con este.

2.2.3 Mecanismos de acción celular

Debido a la naturaleza ubicua del arsénico y a la predominancia de sus fases inorgánicas As(III) y As(V), es asumible que durante la evolución se han generado los mecanismos celulares que permitan la resistencia necesaria para la subsistencia de los organismos (William, V. y Magpantay, H., 2024). La tierra prehistórica, con altas concentraciones de As(III) y la posterior gran oxidación generaron una presión selectiva para la detoxificación de este elemento en sus dos formas principales, derivando en la generación de los genes asociados a su resistencia (Chen, S. *et al.*, 2020).

Producto del avance en la secuenciación genómica y análisis transcriptómicos (Yan, G. *et al.*, 2019), se han identificado determinantes genéticos clave para 4 procesos de desintoxicación del metabolismo y biotransformación del arsénico (William, V. y Magpantay, H., 2024): sistema de resistencia (*ars*); metilación de arsénico (*arsM*); reducción disimilativa (*arr*) y oxidación disimilativa (*aio/arx*) de arsénico, los cuales son presentados de manera resumida en la Figura 11.

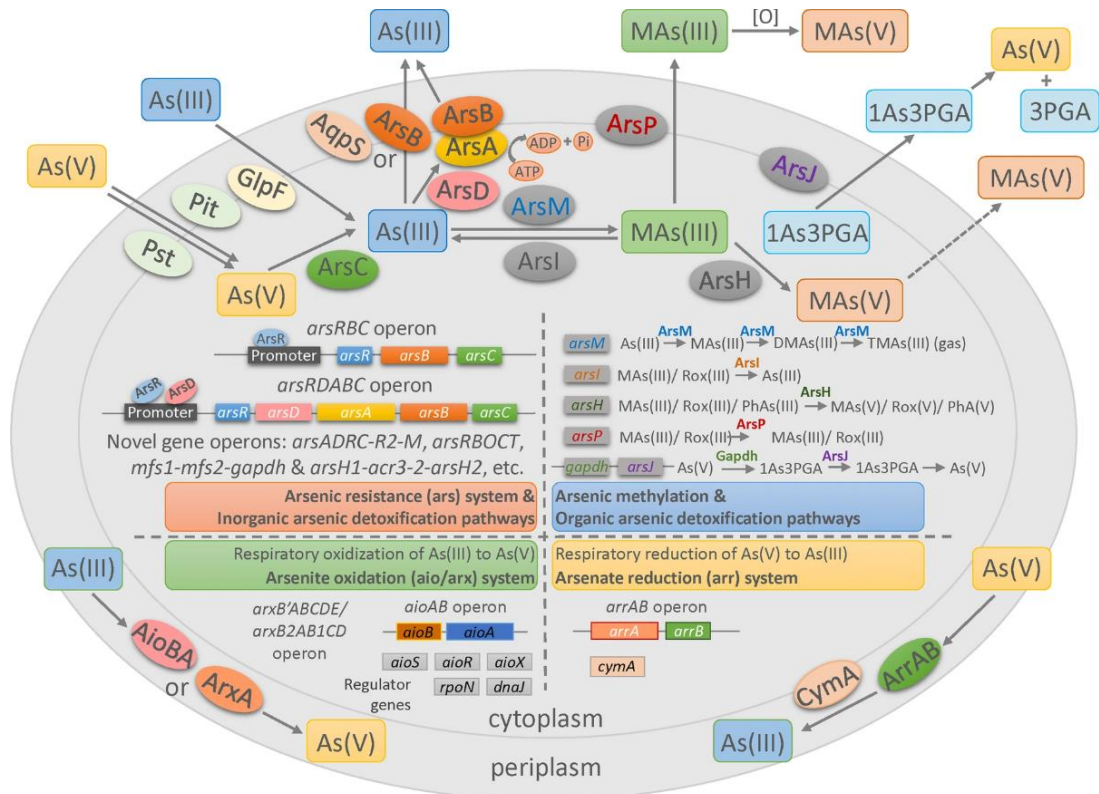


Figura 11. Mecanismos de detoxificación de arsénico y metabolismo en bacterias, evidenciándose los 4 principales mecanismos: (de izquierda a derecha y desde la parte superior a la inferior) reducción y expulsión de As(III), metilación, oxidación disimilativa de As(III) y reducción disimilativa de As(V). MAs(III) y MAs(V) refiere a todo compuesto metilado de arsenito y arseniato respectivamente (Yan, G. *et al.*, 2019).

a) Resistencia y Detoxificación (*ars*)

El principal mecanismo para la resistencia al arsénico, evidenciado en diversos organismos, consiste en la detoxificación de As mediado por el operón *ars* (William, V. y Magpantay, H., 2024), con el objetivo de la expulsión de este contaminante con el gasto energético asociado (Yan, G. *et al.*, 2019).

El operón *ars* fue aislado de manera indirecta mientras se estudiaba la resistencia a antibióticos en *Straphylococcus aureus*, evidenciando que el plásmido pI258 logra conferir resistencia a estos y a metales pesados, incluyendo al arsénico (Novick, R. y Roth, C., 1968). Usando técnicas similares, la aislación del plásmido R773 de *Escherichia coli* (Hedges, R. y Baumberg, S., 1973) derivó en

la descripción del mecanismo principal de resistencia al arsénico, el clúster de genes *ars* (Rosen, B. *et al.*, 1992).

El sistema de resistencia al arsénico mediada por el operón *ars* es la vía de desintoxicación de arsénico más estudiada en bacterias encontrándose en cromosomas o plásmidos de procariontas (Fekih, I. *et al.*, 2018), tanto bacterias grampositivas o gramnegativas como también en arqueas (Jackson, C. y Dugas, S., 2003), siendo el operón más común el *arsRDABC* (Yang, G. *et al.*, 2015).

Cada componente del clúster de genes *arsRDABC* codifica para distintas estructuras proteicas. El mecanismo básico de la detoxificación consiste en la expulsión del As(III) de la célula a través de la bomba de eflujo *ArsAB* (Figura 12) (William, V. y Magpantay, H., 2024) consistente en dos subunidades (Rosen, B. *et al.*, 1992): *ArsB*, una proteína de membrana interna miembro de la superfamilia de transportadores de iones, que forma una vía de conducción de aniones, expulsando As(III) o Sb(III) a cambio del ingreso de protones H^+ , y que sirve como ancla de membrana para la segunda subunidad *ArsA*, una ATPasa que hidroliza ATP para suministrar el potencial requerido para la actividad de *ArsB*.

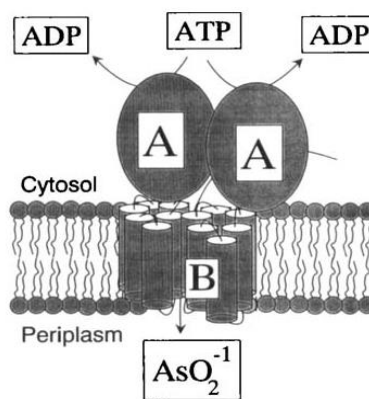


Figura 12. Funcionamiento de la bomba de eflujo de arsenito *ArsAB* (Rosen, B. *et al.*, 1992).

Homologo a *arsB*, ampliamente distribuido en bacterias, arqueas y hongos que la familia *ArsB* (Fu *et al.*, 2010) se encuentra el gen *acr3* evidenciado en levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* (Wysocki, R. *et al.*, 1997) o en la familia *Geobacter* (Dang, Y. *et al.*, 2017), codifica la proteína *ACR3*, una bomba de eflujo de As(III) miembro de la super familia *BART* (por las siglas en ingles de transportador de Bilis, arsenito y riboflavina) que, a diferencia de la primera, *arsAB*, depende de la diferencia de potencial proveído por el flujo de protones y es específica para arsenito (no logra transportar antimonito) (Fu, H. *et al.*, 2010).

También, (Yang, H. *et al.*, 2005) descubren en el operón *ars* de *Sinorhizobium meliloti*, una bacteria gran positiva simbiote de plantas leguminosas, una acuagliceroporina *aqpS* que, a través del gradiente de concentración de As(III), logra expulsar este contaminante de la célula al periplasma. Sin embargo, como el motor es el gradiente de concentración, solo permite la detoxificación de

As(V), ya que altas concentraciones de arsenito en el ambiente no permitirá la eliminación de este desde la célula.

Otros gene importante del operón ars son el arsR, que codifica un represor transcripcional de unión al ADN que controla su propia expresión y la del operón ars (Wu, J. y Rosen, B., 1991) aunque también se ha encontrado evidencia de su influencia no solo en la resistencia al arsénico sino también en la adquisición/metabolismo del fosfato, el transporte de azúcares, la quimiotaxis, la tolerancia al cobre, la homeostasis del hierro y muchas otras (Rawle, R. *et al.*, 2021); y el gen arsD, que codifica para una metalochaperona ArsD con la capacidad de unirse a As(III) y transportarlo hacia la ATPasa ArsA, aumentando su afinidad al arsenito. Se considera que ArsR y ArsD son responsables del control de los niveles de expresión basal y máxima del ars (Yan, G. *et al.*, 2019). Según el modelo propuesto por Yang, J. *et al.* (2010) (Figura 13), el As(III) citosólico se une a glutatión reducido (GSH) para formar As(GS)₃, el cual incrementa la afinidad del arsenito a ArsD y con ello, al realizarse la transferencia de As(III) entre ArsD y ArsA, aumentar la eficiencia de la expulsión del contaminante.

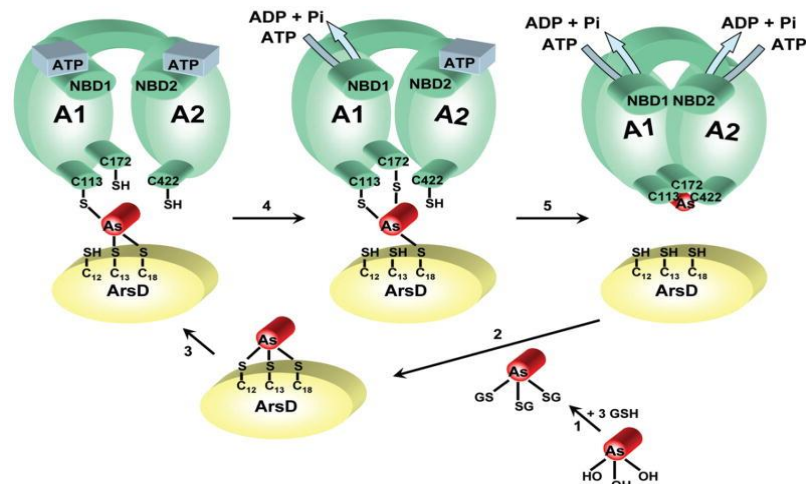


Figura 13. Modelo de transferencia de As(III) entre ArsD y ArsA (Yang, J. *et al.*, 2010).

Por último y eje principal del mecanismo de detoxificación de arsénico, el gen arsC que codifica para una pequeña arseniato reductasa citoplasmática ArsC, que cataliza la reducción de As(V) a As(III) (Ji, G. y Silver, S., 1992). Para realizar esta actividad metabólica, es requerido un equivalente reductor quien done electrones, por lo que esta proteína puede categorizarse en cuatro familias que distan enormemente al pertenecer a clados distintos en el árbol filogenético (Figura 14), 2 primeras en procariontes y las 2 segundas en eucariontes (Zhang, J. *et al.*, 2022): familia de la ArsC_{ec}, reducción de As(III) acoplada a la oxidación de glutarredoxina (GSH) (Figura 15) regida por la Ecuación (1), en donde GSH se oxida a disulfuro de glutatión (GSSH), evidenciada en el plásmido R773 de *Escherichia coli* (Gladysheva, T. *et al.*, 1994); la familia de la ArsC_{sa}, que acopla la reducción de arsenito acoplada a la oxidación de tiorredoxina (Trx) y regida por la Ecuación (2) (Figura 16) (Ji, G. *et al.*, 1994), evidenciado en el plásmido pI258 de *Straphylococcus aureus* (Martin, P. *et al.*, 2001); la arseniato reductasa Acr2p, la primera enzima en eucariontes descrita, evidenciada en *Saccharomyces cerevisiae* (Mukhopadhyay, R. *et al.*, 2000) y con distintos

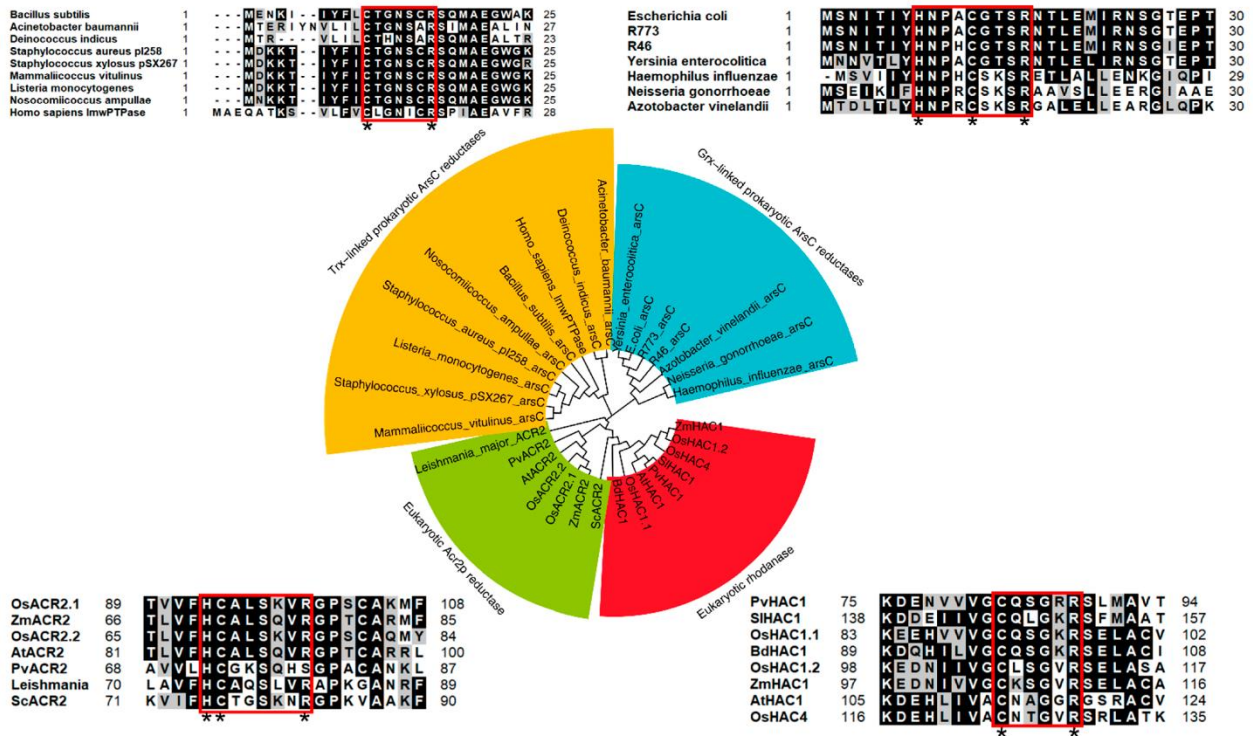


Figura 14. Árbol filogenético evidenciando los 4 clados diferenciados de la Arseniato Reductasa ArsC, en donde se evidencian los principales homólogos enmarcando en rojo los sitios activos (Zhang, J. *et al.*, 2022).

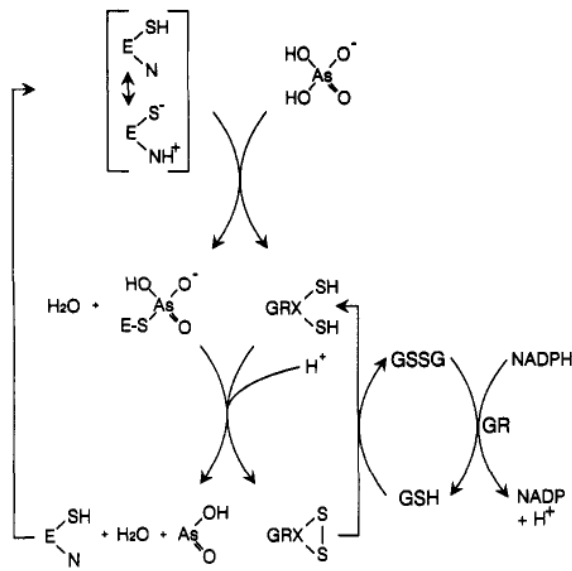


Figura 15. Modelo propuesto por Gladysheva, T. *et al.* (1994) de reducción de As(V) a As(III) mediante la arseniato reductasa ArsC acoplada a la oxidación de glutatión (GSH).

homólogos en plantas (Zhang, J. *et al.*, 2022), que, aunque se rige bajo la misma reacción del primer caso, es decir, acopla GSH a la reacción, el camino enzimático difiere en gran medida; y la familia

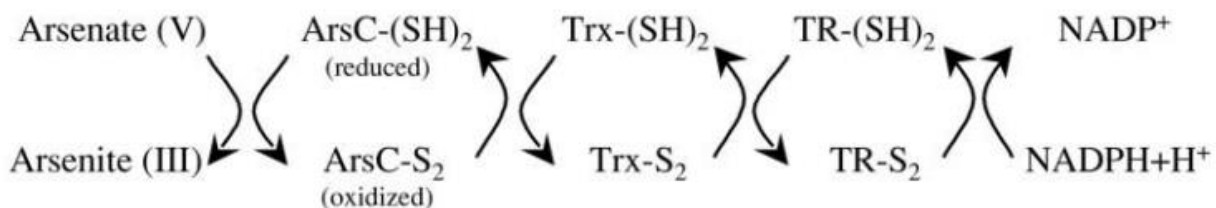
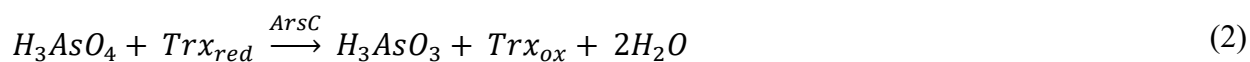
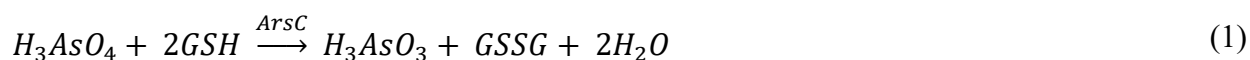


Figura 16. Cascada de reacciones en el modelo propuesto por Messens *et al.* (2002), de la reducción de As(V) a As(III) mediante la arseniato reductasa ArsC acoplada a la oxidación de Tiorredoxina (Trx).

de HAC1/ARQ1 con un dominio similar a la rodanasa, evidenciadas en plantas como *Pteris vittata* (Li, X. *et al.*, 2020).



b) Metilación (*arsM*)

La biometilación de metales y metaloides es también conocida como biovolatilización por la conversión biológica a compuestos volátiles, aunque también no volátiles, y corresponde a un proceso bastante generalizado no solo en microorganismos (tanto aerobios como anaerobios), sino también en algas, plantas, animales y humanos, aunque no universal, ya que existen especies que no presentan este mecanismo (Bentley, R. y Chasteen, T., 2002).

Para la metilación del arsénico, el paso previo de la reducción del As(V) a As(III) es necesario (William, V. y Magpantay, H., 2024). Luego, el proceso es mediado por la enzima arsenito S-adenosilmetionina metiltransferasa (*arsM*), que convierte el As(III) a especies mono-, di- y trimetilado de As(III) (Ajees, A. y Rosen, B., 2015), en donde el donador del grupo metilo es la S-adenosilmetionina (SAM), que a su vez se convierte en a S-adenosilhomocisteína (SAH) (Bentley, R. y Chasteen, T., 2002), y generando especies intermediarias de MAs(V) inestables que permanecen unidas a *ArsM* y que se reducen a MAs(III) estables mediante la donación de electrones de un enlace disulfuro de la enzima (Packianathan, C. *et al.*, 2018), como es posible ver en la (Figura 17). El monometilarsenito MMA(III) formado es ampliamente más tóxico que su versión inorgánica por lo que no puede ser acumulado (Qin, J. *et al.*, 2006), sin embargo, las sucesivas metilaciones, a través del mecanismo de Challenger (Figura 18), generan como producto trimetilarsina, igualmente tóxico pero de mayor difusión producto de su volatilidad como gas (Bentley, R. y Chasteen, T., 2002), y fácilmente oxidado por el oxígeno atmosférico a MAs(V), notablemente menos tóxico (Chen, J. *et al.*, 2015a).

El MMA(III) también puede ser expulsado de la célula a través de la permeasa de flujo ArsP, la que otorga resistencia a MMA(III) y otros organoarsénicos trivalentes como Roxarsona (Rox(III)) y fenilarsenito (PhAs(III)), pero no a As(III) inorgánico como organoarsénicos pentavalentes (Chen, J. *et al.*, 2015b).

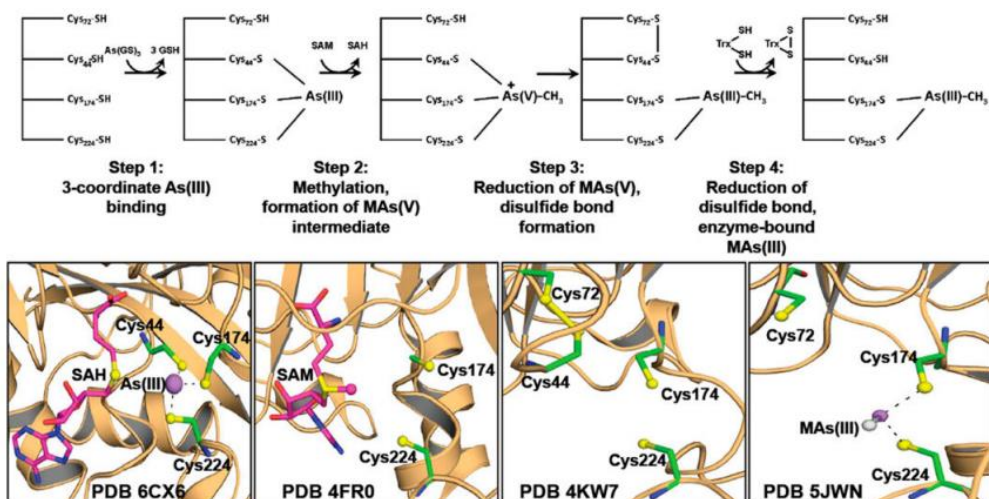


Figura 17. Pasos de la Biometilación de As(III) en la estructura proteica de la ArsM, en donde se indica la zona activa. En verde se denotan las cadenas de carbono de cisteína, en amarillo los grupos tioles y en morado As (Packianathan, C. *et al.*, 2018).

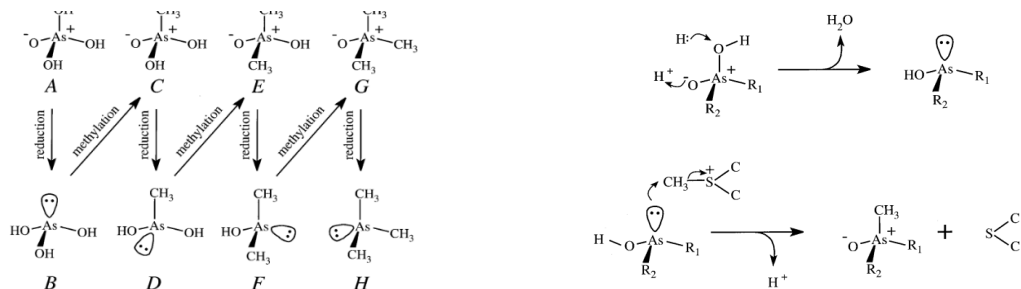


Figura 18. Mecanismo de Challenger para la conversión de arseniato (A) a trimetilarsina (H)(izquierda) y reacciones típicas de este mecanismo (derecha), donde la S-adenosilmetionina (SAM) es abreviada como CH₃-S⁺-(C)₂ y convertida en el proceso de metilación a S-adenosilhomocisteína (SAH) abreviada como S-(C)₂ (Bentley, R. y Chasteen, T., 2002).

Chen, J. *et al.*, (2015a) proponen que, producto de la toxicidad de MAs(III) frente a su versión inorgánica, los organismos producían este compuesto como un antibiótico primitivo antes de que la atmósfera se volviera oxidante, explicando así la posible presión selectiva en la generación de genes de resistencia para este. Las estructuras que permiten dicha resistencia a MAs(III) son la liasa de enlaces C-As, Arsl, evidenciada en organismos aerobios y presente en el operón ars aunque no asociado a un gen específico (Yoshinaga, M. y Rosen, B., 2014); y la oxidorreductasa dependiente de mononucleótido NADPH-flavina (FMN) ArsH capaz de reducir MAs(III) a MAs(V) menos tóxico y más volátil, estructura la cual, aunque tiene la capacidad de reducir los colorantes azoicos, Cr(V) a Cr(III), Fe(III) a Fe(II), O₂ a H₂O₂ y quinonas (Yan, G. *et al.*, 2019), su gen codificante arsH solo se encuentra en el operón ars, observándose solo actividad en la resistencia de MAs(III) (Chen, J. *et al.*, 2015b).

Chen, J. *et al.* (2016) reportaron la existencia de dos genes presentes en el operón ars de *P. aeruginosa* DK2 y evidenciados juntos en el genoma de diversas especies, principalmente gamma

proteobacterias, que codifican un sistema de eflujo de As(V), estos son *gapdh* y al que llamaron *arsJ*. El primero genera una gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) dependiente de NAD^+ , presente universalmente en los organismos y que desempeña un papel importante en la glucólisis y la gluconeogénesis (Fothergill-Gilmore, L. y Michels, P., 1993); mientras que la segunda corresponde a una bomba de eflujo de la superfamilia de facilitadores mayores (MFS por sus siglas en inglés) (Chen, J. *et al.*, 2016). En el mismo estudio (Chen, J. *et al.*, 2016), demuestran que, por la similitud del arseniato con los sustratos de la GAPDH, como el fosfato inorgánico, este interrumpe el proceso de glucólisis sustituyendo el fosfato y formando un organoarsénico altamente inestable, de tan solo 2,5 segundos de vida media, llamado 1-arseno-3-fosfoglicerato (1As3PGA), el cual es lo suficientemente estable para ser expulsado de la célula a través de la permeasa de eflujo *ArsJ* e hidrolizada en el exterior de esta, a As(V) y 3-fosfoglicerato (3PGA) (Figura 19).

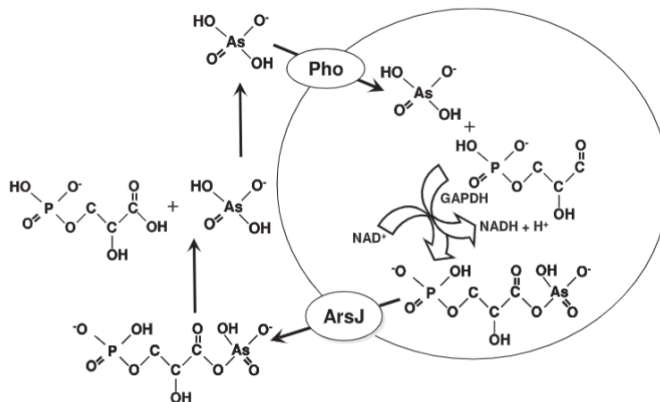


Figura 19. Mecanismo de acción conjunta entre la enzima GAPDH y la bomba de eflujo *ArsJ* (Chen, J. *et al.*, 2015a).

c) Reducción disimilativa (*arr*)

La reacción de reducción de As(V) a As(III) es energéticamente favorable al acoplarla a la oxidación de materia orgánica, ya que el potencial de oxido reducción es de +135 mV (Oremland, R. y Stolz, J., 2003), por lo que no es inusual encontrar microorganismos capaces de reducir disimilatoriamente As(V), utilizándolo como aceptor final de electrones (William, V. y Magpantay, H., 2024). Es así como en el año 1994, Ahmann, D. *et al.* logra aislar al primer microorganismo con la capacidad de crecer con As(V) como único aceptor de electrones, posteriormente llamada *Sulfurospirillum arsenophilum* MIT-13 (Stolz, J. *et al.*, 1999), probando así la existencia de la reducción disimilativa de arsénico.

El operón *arr* codifica la heterodímera As(V) reductasa respiratoria ArrAB, compuesta por una subunidad grande y una pequeña codificadas por *arrA* y *arrB*, respectivamente (William, V. y Magpantay, H., 2024). La subunidad ArrA está compuesta por un cofactor dinucleótido de guanina bismolibdopterina y un [4Fe-4S], que actúan como sitio de unión y catalítico de As(V). Mientras tanto, la subunidad pequeña ArrB contiene cuatro grupos [4Fe-4S] (Krafft, T. y Macy, J., 1998), destacando en ambas el sitio activo del grupo M=O, tal como se puede observar en la (Figura 20).

Esta arsenito oxidasa, finalmente transfiere los electrones a azurina, una cuproproteína bacteriana involucrada en procesos redox y en la transferencia electrónica, o a citocromos tipo C (Ellis, P. *et al.*, 2001), así continuando con la cadena de transferencia de electrones y sirviendo así el As(III) como dador de estos (Lebrun, E. *et al.*, 2003).

Se han identificado secuencias homólogas del gen aioBA en algunas especies, incluidas α -, β -, γ -*Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Aquificae*, *Bacteroidetes*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Crenarchaeota*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes* y *Nitrospira* (De Francisco, P. *et al.*, 2021), como también un gen de similar función, que oxida As(III) acoplado a la reducción disimilativa de nitrato identificada en la especie quimiolitautótrofa *Alkalilimnicola ehrlichii* MLHE-1 (Zargar, K. *et al.*, 2010).

2.3 METABOLISMO MICROBIANO

El metabolismo microbiano corresponde al conjunto de todas las reacciones bioquímicas llevadas a cabo dentro de un microorganismos. Estas reacciones permiten la obtención de energía y nutrientes esenciales para su crecimiento, reproducción y supervivencia (Madigan, M. *et al.*, 2015). La gran adaptabilidad y flexibilidad metabólica de los microorganismos han valido para el éxito ecológico de estas especies (Grimbergen, A. *et al.*, 2015). Las distintas especies pueden clasificarse según la conversión de energía, la fuente de dadores de electrones y de carbono (Tabla 2). El metabolismo puede dividirse en dos sistemas interconectados: el anabolismo y el catabolismo.

Tabla 2. Tipos de mecanismos según la conversión de energía, la fuente del dador de electrones y la fuente dadora de carbono, y la tipología de cada uno (Barton, L. y Fauque, G., 2022).

Mecanismo de conversión de energía	Fuentes de dadores de electrones	Fuentes de dador de carbono
Reacciones químicas (Quimio-)	Compuestos orgánicos (Lito-)	CO ₂ (Auto-)
Luz (Foto-)	Compuestos inorgánicos (Organo-)	Carbono orgánico (Hetero-)

Por un lado, el anabolismo, en donde a partir de moléculas simples, las células catalizan una serie de reacciones para formar moléculas complejas como proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos o lípidos, los que permite la generación de biomasa a través del crecimiento y replicación celular (Barton, L. y Fauque, G., 2022).

Mientras que, por el contrario, el catabolismo se caracteriza por la degradación de compuestos complejos, como azúcares, lípidos, proteínas u compuestos inorgánicos, a otros más simples, con el fin de generar energía en forma de ATP adenosín trifosfato, molécula que es finalmente utilizada en las reacciones endergónicas de la célula (Barton, L. y Fauque, G., 2022).

El piruvato es una importante fuente de energía para microorganismos sulfato reductores, y una etapa crucial para el catabolismo celular (Barton, L. y Fauque, G., 2022) que se desencadena tras la glucólisis, donde la glucosa es convertida a piruvato.

El piruvato es metabolizado a través de la piruvato: ferredoxina oxidorreductasa, piruvato formatoliasa, piruvato sintasa, y/o una ácido oxo-orgánico oxidorreductasa. La primera, produce Acetil-CoA, que conduce a una vía productora ATP. La piruvato: formato liasa es una enzima alternativa que produce formato, el cual puede ser, a su vez, metabolizado con la producción de NADH (Jin, Q., 2012). La piruvato sintasa, asociada comúnmente con la producción de piruvato, se revierte fácilmente con la catálisis del piruvato; mientras que la última, la ácido oxo-orgánico oxidorreductasa, fue anotado en el genoma de *D. vulgaris Hildenborough* pero sus características bioquímicas no han sido establecidas (Barton, L. y Fauque, G., 2022).

En la oxidación de lactato, con la producción de acetato como producto final, la oxidación de piruvato es llevada a cabo a través de la piruvato: ferredoxina oxidorreductasa, que produce el complejo Acetil-CoA y CO₂ (Barton, L. y Fauque, G., 2022). La reacción continua con el accionar de una fosfotransacetilasa que adiciona un grupo fosfato al acetil-CoA, formando Acetil-P para luego, con una acetioquinasa y ADP, producir finalmente acetato y ATP (Figura 22).

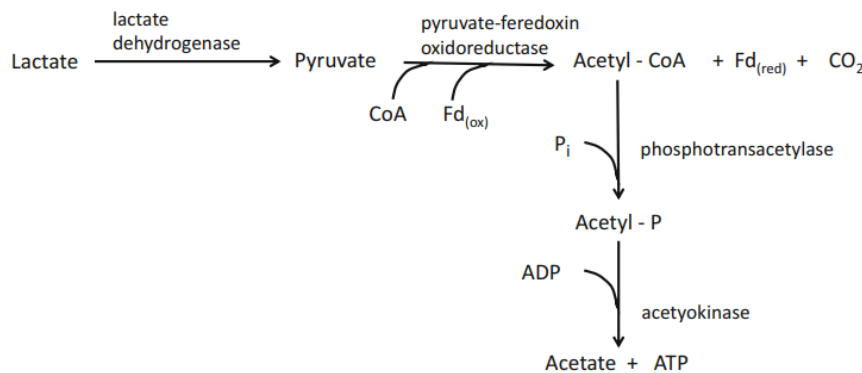


Figura 22. Metabolismo del lactato y piruvato por *Desulfovibrio* (Barton, L. y Fauque, G., 2022).

Por otro lado, la respuesta de los microorganismos a la disminuida concentración de nutrientes en diversos ambientes se ha dado a través de la adaptación para la utilizar distintos aceptores finales de electrones (Grimbergen, A. *et al.*, 2015). Al transferir electrones desde un donador con un potencial redox bajo a un aceptor con un potencial redox más alto, a través de una cadena de transporte de electrones, se libera una cantidad de energía libre (ΔG^{0r}) que es utilizada para la síntesis de ATP mediante fosforilación oxidativa (Barton, L. y Fauque, G., 2022). La magnitud de la energía recuperable es directamente proporcional a la diferencia de potencial entre el donador y el aceptor (Muyzer, G. y Stams, A., 2008). En ausencia de oxígeno molecular, algunas bacterias pueden respirar aceptores de electrones alternativos como nitrato, manganeso, óxidos de hierro y

sulfato (Figura 23), lo que altera la geoquímica de los subsuelos y sedimentos, tanto como la geoquímica del agua superficial y subsuperficial (Lovley, D., 1993).

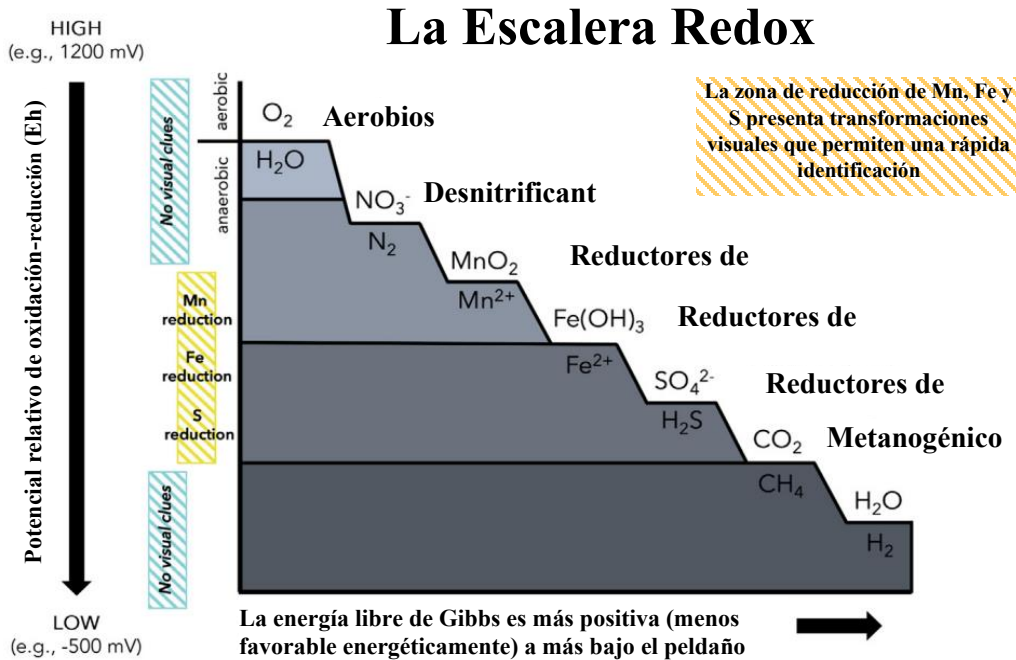


Figura 23. Escalera redox evidenciando la progresión de transformaciones redox como también el descenso del potencial relativo oxido-reductor (Sapkota, Y. *et al.*, 2022).

Dentro de estos pares redox disponible se destaca la ferro-reducción y la sulfato-reducción. En la primera, microorganismos utilizan Fe(III) sólido como aceptor final de electrones, reduciéndolos a Fe(II) acuoso, mecanismo evidenciado en el ambiente a un potencial reductor estándar menores a +200 mV (Fe(III)/Fe(II)) (Sapkota, Y. *et al.*, 2022) (Figura 24), caracterizado por la formación de magnetita y otros minerales ferrosos como siderita y vivianita (Lovley, D., 1993), destacándose bacterias del género *Geobacter* y *Shewanella* (Jin, Q., 2012); mientras que, en el segundo, utilizan

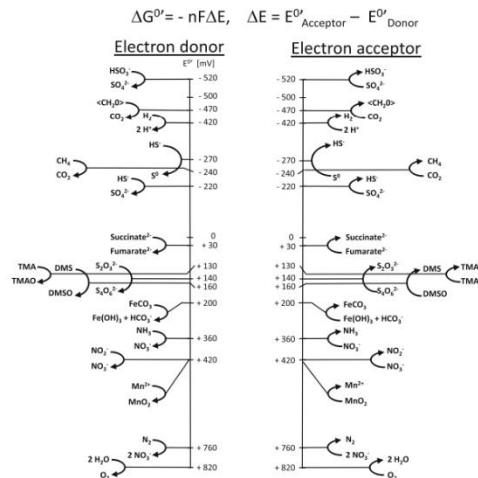


Figura 24. Potencial redox de procesos de oxido reducción mediado por microorganismos (Spormann, A., 2023).

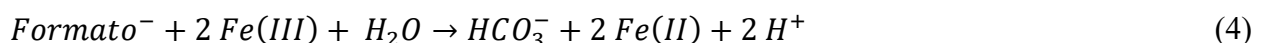
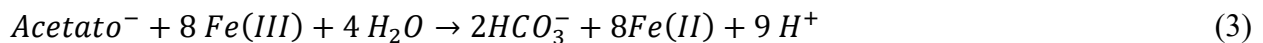
SO₄²⁻ como aceptor final de electrones, reduciéndolo a H₂S con un potencial redox estándar alrededor de -260mV (Jin, Q., 2012), evidenciándose en el color negro de los precipitados de sulfuros, destacándose bacterias del género *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum* (Barton, L. y Fauque, G., 2022).

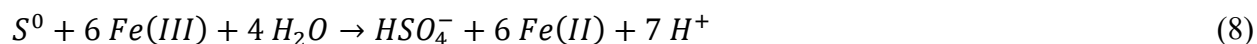
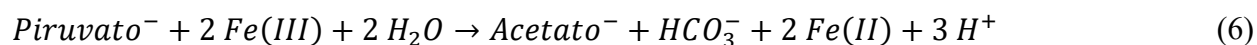
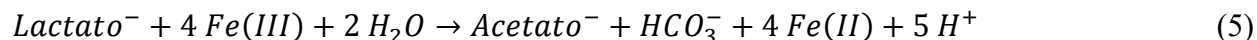
2.3.1 Ferro reducción

El hierro (Fe) es el cuarto elemento más abundante de la corteza terrestre, con un 6,3% y solo por debajo del oxígeno (47%), silicio (26%), aluminio (8,1%), y por sobre de otros como el calcio (5,0%), magnesio (2,9%), sodio (2,3%) y el potasio (1,5%) (Frey, P. y Reed, G., 2012). Su abundancia natural, en combinación con su versatilidad química, dieron el paso a su incorporación biológica a través del tiempo, en donde los organismos primitivos evolucionaron para incorporar y utilizar este elemento en sus vías metabólicas, sea como cofactores de proteínas, como donante o aceptor de electrones (Salgueiro, C. *et al.*, 2022). También, debido a que el potencial estándar de reducción de Fe(III) a Fe(II) es de +0,77 V, este elemento se convierte en uno de los más abundantes aceptores potenciales de electrones (Lovley, D., 1993).

Por ello, el uso del hierro como aceptor de electrones por bacterias y archeas se convierte en un proceso biogeoquímico fundamental en ambientes anóxicos y oligotróficos (Frey, P. y Reed, G., 2012), es decir, en ambientes caracterizados por la ausencia de oxígeno como también por presentar muy bajas concentraciones de recursos necesarios para la vida. Las Bacterias Ferro Reductoras (BFR) utilizan este proceso para la obtención de energía, acoplando la oxidación de materia orgánica o hidrogeno a la reducción del Fe(III), reduciendo este último a Fe(II) (Pepper, I. *et al.*, 2015).

Ejemplos de BFR son las especies de *Geobacter*, como *G. metallireducens*, la primera bacteria descubierta en acoplar la oxidación de acetato (Ecuación (3)) como también varios otros ácidos grasos volátiles y alcoholes simples, con la reducción del hierro para la obtención de energía (Lovley, D., 1993), similar a lo evidenciado en *Desulforomonas acetoxidans* (Roden, E. y Lovley, D., 1993). *Shewanella putrefaciens* logra conservar energía para apoyar su crecimiento acoplando la oxidación de materia orgánica con la reducción de Fe(III), oxidando completamente formato (Ecuación (4)) e incompletamente lactato (Ecuación (5)) y piruvato (Ecuación (6)), donde la oxidación de formato es un proceso potencialmente importante en sedimentos si el formiato reemplaza al H₂ como producto de fermentación importante en ambientes reductores de Fe(III) (Lovley, D. *et al.*, 1989). *Shewanella putrefaciens* y *Pseudomonas sp.* como también diversas especies de *Desulfovibrios* acoplan la oxidación de H₂ (Ecuación (7)) a la reducción de Fe(III) (Lovley, D., 1993). Mientras, que en ambientes ácidos, el azufre elemental puede usarse como dador de electrones acoplándolo a este proceso de reducción (Ecuación (8)), como lo observado en *Thiobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus thiooxidans* y *Sulfolobus acidocaldarius* (Brock y Gustafson, 1976).





Para lograr este proceso de obtención de energía, el hierro debe estar presente como complejos solubles que entran en la célula, complejos insolubles como minerales, y acero inoxidable (Salgueiro, C. *et al.*, 2022), que requieren la transferencia de electrones al exterior de la célula, en un proceso denominado transferencia extracelular de electrones (TEE) (Lovley, D. *et al.*, 2011), para lo cual, estructuras proteicas denominadas citocromos, son de vital importancia (Salgueiro, C. *et al.*, 2022).

Esta capacidad para transferir electrones al exterior de la célula a minerales, genera que la ferro reducción microbiana tenga una implicación directa y significativa en la movilización del arsénico en ambientes acuáticos y terrestres (Cummings, D. *et al.*, 1999). El arsénico, un metaloide tóxico, a menudo se encuentra adsorbido o co-precipitado con óxidos e hidróxidos de Fe (III) (Panagiotaras, D. *et al.*, 2012), los que pierden la estructura cristalina ante la reducción a Fe (II) acuoso (Lovley, D., 1993), liberando el arsénico a la fase acuosa, proceso explicado en detalle en la 2.2.1.

Por presentar esta capacidad como BFR y por ser la primera especie de *Geobacter* en tener su genoma completamente secuenciado, *Geobacter sulfurreducens* es ampliamente utilizada como una BFR modelo (Frühauß-Wyllie, H. y Holtmann, D., 2022), como también para estudios de los mecanismos de acción de las bacterias frente a la exposición de arsénico en el ambiente (Ohtsuka, T. *et al.*, 2013), siendo las especies de *Geobacter* las principales involucradas en la liberación de As en suelos inundados y sedimentos anóxicos (Dang, Y. *et al.*, 2017).

Geobacter sulfurreducens

G. sulfurreducens es una bacteria anaeróbica facultativa (Lin, W. *et al.*, 2004), gramnegativa, con forma de bacilo y flagelo, con la capacidad de generar estructuras proteicas llamadas pili (Figura 25) que participa en la transferencia de electrones a elementos solidos externos como minerales de hierro (Malvankar, N. *et al.*, 2011). Pertenece a la familia *Geobacteraceae* dentro de las *delta-Proteobacteria* (Figura D - 2), llamada por su capacidad de reducir azufre (Caccavo, F. *et al.*, 1994). Esta fue aislada por primera vez en 1994 por Caccavo, F. *et al.* en sedimentos superficiales de una zanja contaminada en Norman, Oklahoma, Estados Unidos. En este mismo estudio, se determina que *G. sulfurreducens* crece utilizando como dadores de electrones acetato acoplado a la reducción disimilatoria de Fe(III) (analizado en formato de fosfato férrico, oxihidróxido férrico, citrato férrico), azufre elemental, Co(III)-EDTA, fumarato o malato (Figura 26), como únicos aceptores de electrones. También, se determinó que acopló la oxidación de hidrógeno molecular a la reducción de Fe(III), pero no redujo Fe(III) con azufre, glucosa, lactato, fumarato, propionato, butirato, isobutirato, isovalerato, succinato, extracto de levadura, fenol, benzoato, etanol, propanol o butanol como donadores de electrones. Tampoco logró reducir Mn(IV), U(VI), nitrato, sulfato,

sulfito ni tiosulfato u oxígeno con acetato como donador de electrones, aunque, años más tarde, en el 2004, Lin, W. *et al.* determino que *Geobacter sulfurreducens* tolera y lograba crecer a bajas concentraciones de oxígeno (menores a 10%) demostrando así la capacidad y dominancia de las especies de *Geobacter* en zonas carentes de oxígeno.

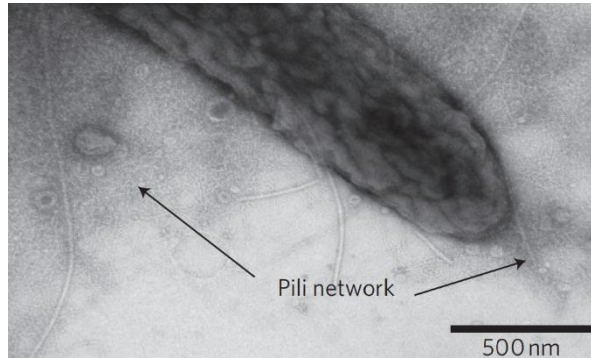


Figura 25. Imagen de Microscopia de Transferencia de Electrones de *Geobacter sulfurreducens* asociado a un ánodo (Malvankar, N. *et al.*, 2011).

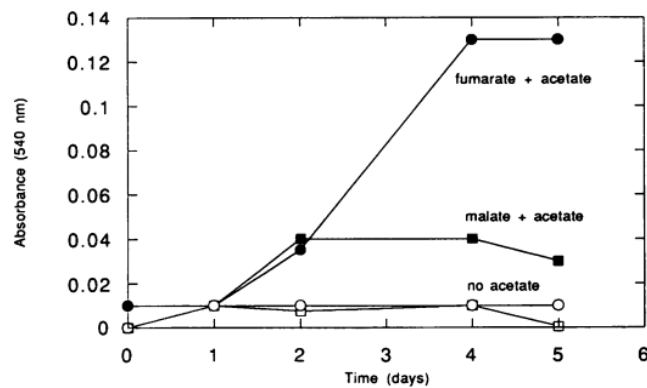


Figura 26. Crecimiento de *Geobacter sulfurreducens* con distintas combinaciones de dador y aceptor de electrones (Caccavo, F. *et al.*, 1994).

En el estudio realizado por (Dang, Y. *et al.*, 2017), se reconocen en las 14 especies de *Geobacter* estudiadas (Tabla 3) incluyendo a *G. sulfurreducens*, los genes asociados a la detoxificación de arsenico, en donde destacan la bomba de eflujo de As(III) *acr3* o su versión transportador ABC con una permeasa proteica *ArsA* y su proteína de unión de ATP *ArsB*, o la arseniato reductasa *ArsC*, estructuras importantes para la reducción y expulsión de arsénico de la célula. Por el contrario, los mecanismos de metilación de arsénico fueron evidenciadas a través de los genes para la As-metiltransferasa *arsM*, en las especies *G. uraniireducens*, *G. metallireducens* y *Trichlorobacter lovleyi* (antigua *Geobacter*, (Waite, D. *et al.*, 2020)), mientras que para la reducción disimilativa de As(V), a través de una As(V) reductasa, a través de los genes *arrA* y *arrB*, la oxidoreductasa y la proteína de unión a hierro-azufre ferredoxina 4Fe-4S respectivamente, solo en *G. uraniireducens*, *G. lovleyi* y *G. cepa OR-1*. Así, *G. sulfurreducens*, solo presenta los mecanismos necesarios para la detoxificación del arsénico, no así para su volatilización por metilación o la

obtención de energía por la reducción disimilativa de As(V), lo que puede repercutir fuertemente en su crecimiento en presencia de este contaminante.

Tabla 3. Indicación de los posibles mecanismos de acción contra As en especies de Geobacter según los genes asociados a estos. Elaboración propia en base a datos de Dang, Y. *et al.* (2017).

Especies de Geobacter	Mecanismos de acción contra As		
	Detoxificación	Respiración Reducción de As (V)	Metilación
<i>G. sulfurreducens</i>	✓		
<i>G. sp. strain M21</i>	✓		
<i>G. sp. strain M18</i>	✓		
<i>G. bemidjiensis</i>	✓		
<i>G. uraniireducens</i>	✓	✓	✓
<i>G. metallireducens</i>	✓		✓
<i>G. lovleyi (actual Trichlorobacter)</i>	✓	✓	✓
<i>G. bremensis</i>	✓		
<i>G. daltonii</i>	✓		
<i>G. sp. strain OR-1</i>	✓	✓	
<i>G. pickeringii</i>	✓		
<i>G. argillaceus</i>	✓		
<i>G. soli</i>	✓		
<i>G. anodireducens</i>	✓		

2.3.2 Sulfato reducción

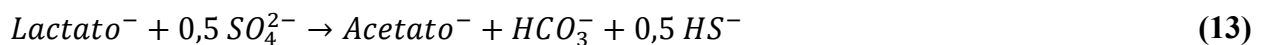
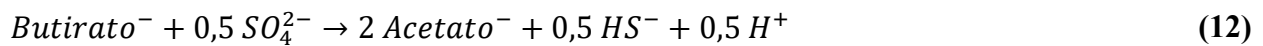
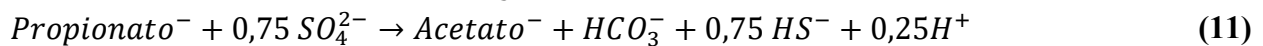
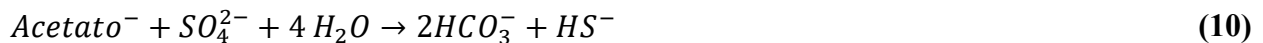
La sulfato reducción es un proceso metabólico anaeróbico llevado a cabo por un grupo diverso de microorganismos, como bacterias y arqueas sulfato-reductoras (BSR/ASR), y ampliamente estudiada (Barton, L. y Fauque, G., 2022). En ambientes carentes de oxígeno, estos microorganismos utilizan el sulfato (SO_4^{2-}) como aceptor final de electrones, reduciéndolo a sulfuro de hidrógeno (H_2S), el que puede a su vez precipitar con metales, formando sulfuros metálicos, o re-oxidarse por acción de otras comunidades microbianas (Muyzer, G. y Stams, A., 2008).

Se ha estimado que la reducción de sulfato puede ser responsable de más del 50% de la mineralización de carbono orgánico en los sedimentos marinos (Jørgensen, B., 1977). Miembros de los géneros *Desulfovibrio* y *Desulfobulbus* tienden a ser igualmente comunes en aguas frescas, marinas y otros tipos salinas (Widdel, F. y Bak, F., 1992). Esto demuestra la importancia de las bacterias sulfato-reductoras (BSR) tanto en el ciclo del azufre como en el ciclo del carbono y, en consecuencia, explica por qué las BSR han sido estudiadas tan extensamente (Barton, L. y Fauque, G., 2022).

Las BSR son notablemente versátiles en la elección de sus dadores de electrones. Los dadores comunes incluyen compuestos orgánicos de bajo peso molecular como etanol, formato, lactato, piruvato, malato y succinato, los que pueden oxidar tanto complemente a CO_2 o incompletamente

a acetato (Keller, K. *et al.*, 2014). También, el hidrógeno molecular es usualmente utilizado como dador de electrones, donde el género *Desulfovibrio* demuestra su máximo rendimiento de crecimiento con este (Widdel, F. y Bak, F., 1992). Sin embargo, lo que las hace de particular interés ambiental es su capacidad para utilizar un amplio rango de compuestos, incluyendo contaminantes, como dadores de electrones (Barton, L. y Fauque, G., 2022). Se ha observado que algunas BSR pueden oxidar completamente hidrocarburos a dióxido de carbono (CO₂) (Muyzer, G. y Stams, A., 2008), inclusive más allá, el metabolismo de estas puede acoplarse a la reducción de otros elementos como el arsénico (As) (Ahmann, D. *et al.*, 1994), el selenio (Se) (Blum, J. *et al.*, 1998) y el uranio (U) (You *et al.*, 2021), convirtiéndolos en especies menos tóxicas o inmovilizándolos. La salinidad, la temperatura, el pH y la disponibilidad de otros nutrientes también influyen significativamente en la actividad y diversidad de las BSR (Barton, L. y Fauque, G., 2022).

Algunas de las reacciones de oxidación acoplada a la reducción disimilativa de sulfato son descritas a continuación (Muyzer, G. y Stams, A., 2008):



Desde un punto de vista químico, el sulfato es un aceptor de electrones desfavorable para los microorganismos (Muyzer, G. y Stams, A., 2008). Y es que, el E^{0'} del par redox sulfato-sulfito es de -516 mV, un valor demasiado negativo para permitir su reducción por los mediadores de electrones intracelulares ferredoxina o NADH (cuyos E^{0'} son de -398 mV y -314 mV, respectivamente), que están presentes en las bacterias sulfato-reductoras (Barton, L. y Fauque, G., 2022). Es por ello por lo que, antes de la reducción, el sulfato es activado por una ATP sulfurilasa, lo que resulta en la formación de adenosín-fosfosulfato (APS) y pirofosfato, el cual es hidrolizado por la pirofosfatasa a 2-fosfato (Keller, K. *et al.*, 2014). El E^{0'} del par redox APS-sulfito más AMP es de -60 mV, lo que permite la reducción de APS con ferredoxina o NADH reducidos. El AMP, que se forma por la reducción de APS, es convertido por una adenilato quinasa dependiente de ATP en dos moléculas de ADP. Así, la activación del sulfato ocurre a expensas de dos moléculas de ATP (Keller, K. *et al.*, 2014). El sulfito se reduce posteriormente a sulfuro, donde el E^{0'} del par redox sulfito-sulfuro es de -116 mV (Muyzer, G. y Stams, A., 2008), a través de la protonación espontánea del sulfito a bisulfito que, a su vez, es reducido finalmente a sulfuro de hidrogeno (Figura 27). Las reacciones respectivas son presentadas en la Tabla 4:

Tabla 4. Reacciones, enzimas y energía libre de Gibbs involucradas en la reducción disimilativa de sulfato a sulfuro de hidrogeno (Barton, L. y Fauque, G., 2022).

Reacción	Enzima	$\Delta G^{0'}$ kJ/mol
$ATP + SO_4^{2-} = APS + PP_i$	ATP Sulfurilasa	+46,0
$PP_i + H_2O \rightarrow 2P_i$	Pirofosfatasa Inorgánica	-21,9
$APS + H_2 \rightarrow AMP + HSO_3^- + H^+$	APS Reductasa	-68,6
$HSO_3^- + 3H_2 + H^+ \rightarrow H_2S + 3H_2O$	Bisulfito Reductasa	-171,7

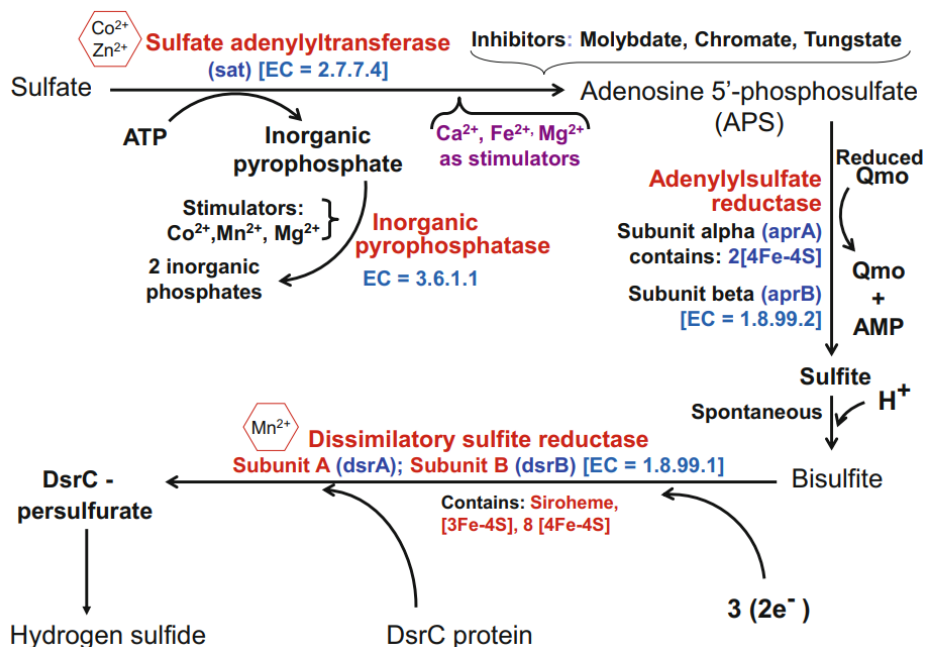


Figura 27. Vía de producción de sulfuros a partir de la reducción disimilatoria de sulfatos por especies de *Desulfovibrio* (Barton, L. y Fauque, G., 2022).

Entre las BSR, miembros de la especie de *Desulfovibrio* se han convertido en modelos para evaluaciones genéticas debido a su extensa caracterización (Barton, L. y Fauque, G., 2022). *Desulfovibrio desulfuricans* la primera bacteria descubierta capaz de reducir sulfato a H₂S y llamada inicialmente como *Spirillum desulfuricans* (Beijerinck, 1895), es una de las más estudiadas debido a que su genoma ha sido completamente secuenciado, lo que ha permitido comprender en detalle las vías metabólicas y los mecanismos de transferencia de electrones (Muyzer, G. y Stams, A., 2008). Estos organismos modelo han sido cruciales para desentrañar la bioquímica y la genética subyacente a la sulfato reducción.

La actividad de las BSR tiene una profunda importancia en el ciclaje de algunos de estos elementos (Tabla 5) (Barton, L. y Fauque, G., 2022), siendo fundamental especialmente en el ciclo del arsénico (Aurillo, A. *et al.*, 1994). En ambientes donde el sulfato y el arsénico coexisten, las BSR pueden reducir especies de arseniato (As(V)), a arsenito (As(III)), que puede permite su movilidad fuera de matrices solidas (Babechuk, M. *et al.* 2009) o que logra inmovilizarse a través de la co-precipitación con sulfuros de hierro (Burton, E. *et al.*, 2013), reduciendo su biodisponibilidad y toxicidad en la matriz acuosa, como lo observado con *Desulfotomaculum auripigmentum* (Newman, D. *et al.*, 1997b), que efectivamente precipita trisulfuro de arsénico, de color amarillo, de manera intra y extracelular, permitiendo su decantación y separación.

En este contexto, la bacteria *Halodesulfovibrio aestuarii* se destaca por ser una BSR halófila que ha sido objeto de estudio (Postgate, J., y Campbell, L., 1966; Shivani, Y. *et al.*, 2017; van der Maarel, M. *et al.*, 1996). Si bien la investigación directa sobre su metabolismo específico del arsénico es incipiente, estudios en otras bacterias sulfato-reductoras filogenéticamente cercanas, como algunas especies de *Desulfovibrio*, como *D. vulgaris* (Burton, E. *et al.*, 2013; Jiang, Y. *et al.*,

2024), especies de *Bacillus* (Blum, J. *et al.*, 1998; Cai, X. *et al.*, 2016) o especies de *Desulfotomaculum* (Newman, D. *et al.*, 1997a), han demostrado la capacidad de reducir arsénico, o la existencia de genes relacionados con el metabolismo de este elemento. La comprensión de la fisiología de *Halodesulfovibrio aestuarii* y sus parientes cercanos es vital para desentrañar el papel de las BSR en la biogeoquímica del arsénico, especialmente en ambientes salinos donde la sulfato reducción es un proceso dominante (Barton, L. y Fauque, G., 2022). Futuras investigaciones que profundicen en la interacción de *Halodesulfovibrio aestuarii* y otras BSR halófilas con el arsénico son fundamentales para desarrollar estrategias de biorremediación más efectivas.

Tabla 5. Termodinámica de las reducciones de metales disimilatorios por BSR (Barton, L. y Fauque, G., 2022).

Reacción	ΔG^0 , (k · j mol ⁻¹ dador de electrones)
<i>Butirato</i> + 4Fe ³⁺ + 2H ₂ O → 2 <i>acetate</i> + 4 Fe ²⁺ + 5H ⁺	-400
<i>Butirato</i> + 2/3 Cr ₂ O ₇ ²⁻ + 4/3 H ₂ O + 1/3 H ⁺ → 2 <i>acetate</i> + 4/3 Cr(OH) ₃	-333
<i>Butirato</i> + 2 MnO ₂ + 3H ⁺ → 2 <i>acetate</i> + 2 Mn ²⁺ + 2H ₂ O	-291
<i>Butirato</i> + 2 UO ₂ ²⁺ + 2H ₂ O → 2 <i>acetate</i> + 2 UO ₂ + 5 H ⁺	-130
<i>Lactato</i> + 2 HAsO ₄ ²⁻ + H ⁺ → 3 <i>acetate</i> ⁻ + 2H ₂ AsO ₃ + HCO ₃ ⁻	-140

Halodesulfovibrio aestuarii

H. aestuarii es una bacteria anaeróbica obligada, gramnegativa y no esporulante, es decir, no forma esporas, con forma de vara a vibrio, con un tamaño desde los 1,5 a 4,0 μm de largo y 0,5 a 0,8 μm de ancho (Shivani, Y. *et al.*, 2017), denotando múltiples flagelos en uno de los polos (Figura 28.A). Pertenece al género *Desulfovibrio*, nombre derivado de “vibrio que reduce compuestos de azufre”, dentro de las δ -*Proteobacteria* (Figura D - 2), aislada desde un banco de arena en Alemania por Postgate, J., y Campbell, L. en el 1966, quienes la nombraron como *Desulfovibrio desulfuricans* subespecie *aestuarii*. En 1996 se aisló una bacteria similar a la que se llamó *Desulfovibrio acrylicus* por van der Maarel, M. *et al.*, que luego se determinó que esta y la mencionada por Postgate, J., y Campbell, L., (1966) correspondían a la misma especie, determinado en el análisis de Shivani, Y. *et al.*, (2017) en donde se analizaron 5 *Desulfovibrios* en contraste con un aislado bacteriano,

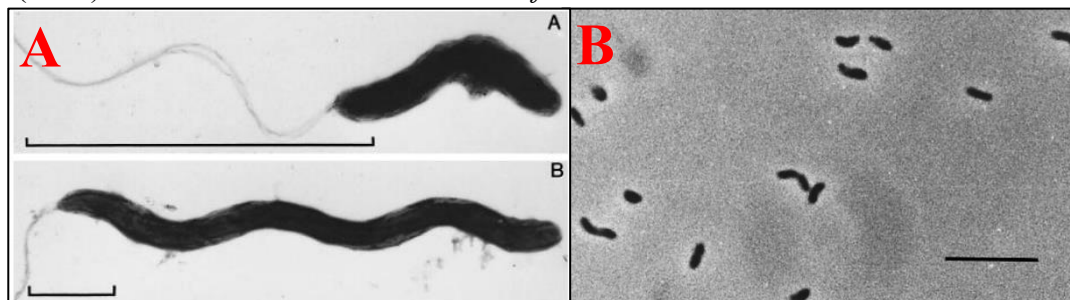


Figura 28. Micrografía electrónica de tinción negativa (izquierda, barras de 5 μm) y micrografía de contraste de fase (derecha, barra de 10 μm) de *Desulfovibrio acrylicus* (*Halodesulfovibrio aestuarii*). A y B diferencian el crecimiento con (A) lactato/sulfato contra (B) lactato/acrilato. Extraído de van der Maarel *et al.* (1996).

determinando el nuevo género *Halodesulfovibrio* y renombrando así a la actual *Halodesulfovibrio aestuarii*. van der Maarel, M. *et al.* (1996) también detectaron, mediante el análisis de los espectros de absorción del extracto celular oxidado por aire y reducido con ditionito, picos a 422, 524 y 553 nm, que son indicativos de citocromos de tipo c, esenciales en la transferencia de electrones a sistemas de aceptores finales, como arseniato (González, V. *et al.*, 2024).

En condiciones de laboratorio, Postgate, J., y Campbell, L., (1966) determinan que, como sulfato reductora, requiere un potencial reductor menor a -100mV para crecer a un pH de 7,2, temperaturas entre 28 y 44°C y condiciones anóxicas, no forma gas derivado de carbohidratos y genera colonias negras con un exceso de sal ferrosa y sulfuro de hierro. También, como bacteria halófila aislada de entornos marinos, requiere de altas concentraciones de Cloruro de Sodio y no crece en agua dulce. Utiliza lactato, malato, piruvato y colina, pero no oxamato, oxalato, acetato, propionato ni butirato como dadores de electrones, siendo favorecido el crecimiento con la presencia de malato (si hay sulfato), colina y piruvato (con o sin presencia de sulfato). Igualmente, no utiliza cisteína como dador de electrones (Shivani, Y. *et al.*, 2017) al contrario de otras BSR (Madigan, M. *et al.*, 2015). El acetato, producto derivado de la oxidación de la mayoría de las fuentes de carbono (Thauer, R. *et al.*, 1989), se acumula en el medio a la vez que el sulfato es reducido disimilatoriamente, al ser utilizado como aceptor de electrones, produciendo a su vez ácido sulfhídrico. Denota un claro mayor tamaño ante el par dador/aceptor de electrones lactato/acrilato respecto de lactato/sulfato, tendiendo a adquirir forma de espiral (Figura 28.B).

Aunque no se encontraron estudios que indiquen alguna capacidad de *H. aestuarii* para sobrevivir y/o adaptarse a arsénico en cualquiera de sus formas, si existen estudios de BSR cercanas filogenéticamente que presentan diversos mecanismos contra este contaminante, lo que ha sido abordado en la sección anterior.

2.3.3 Cultivo de Microorganismos

El cultivo de microorganismos es una herramienta fundamental en la microbiología para el estudio, aislamiento y la identificación de diversas especies microbianas en un entorno controlado. Este proceso es crucial para comprender cómo funcionan los microorganismos, desde su crecimiento y reproducción hasta sus interacciones con el medio ambiente, contaminantes y otros organismos (Plugge, C., 2005).

Un aspecto clave para el éxito del cultivo es conocer el tipo de proceso metabólico principal que estos los microorganismos realizan, siendo importante conocer si estos son, por ejemplo sulfato-reductor, ferro-reductor, manganeso-reductor (Figura 23), o si tiene otras vías metabólicas específicas, que permita diseñar las condiciones de cultivo adecuadas (Spormann, A., 2023). Esto incluye la selección de medios de cultivo con los donadores y aceptores de electrones correctos, así como el control de parámetros ambientales como la presencia o ausencia de oxígeno. Comprender el metabolismo es esencial no solo para el crecimiento óptimo del cultivo, bajo condiciones controladas, sino también para desentrañar el papel de estos microorganismos en ciclos biogeoquímicos vitales, la biotecnología y la salud (Epstein, S., 2009).

Aunque una gran proporción de la carga microbiana en una muestra ambiental no es cultivable, alrededor del 99% (Epstein, S., 2009) producto de su permanencia en un estado latente, es decir, a la espera de las condiciones necesarias para su activación (Puspita, I. *et al.*, 2012), o simplemente corresponden a células muertas, el aislamiento, cultivo y análisis ha sido ampliamente estudiado y robustecido a lo largo de los años (Plugge, C., 2005).

Para ello, es necesario conocer el comportamiento general de los microorganismos como también las estrategias requeridas para el análisis de su metabolismo.

a) **Crecimiento Microbiano**

Tradicionalmente, el crecimiento microbiano es dividido en 6 etapas: latencia, aceleración, crecimiento exponencial, desaceleración, estacionaria y muerte, en donde generalmente se obvian las etapas de aceleración y desaceleración (Figura 29) (Madigan, M. *et al.*, 2015). Estas etapas que no han sido estudiadas totalmente a cabalidad producto del análisis de ciertos aspectos de estas etapas (Álvarez, J. *et al.*, 2019), aunque se han elaborado modelos que representen de manera empírica el crecimiento y la etapa estacionaria (Kumakura, D. *et al.*, 2023).

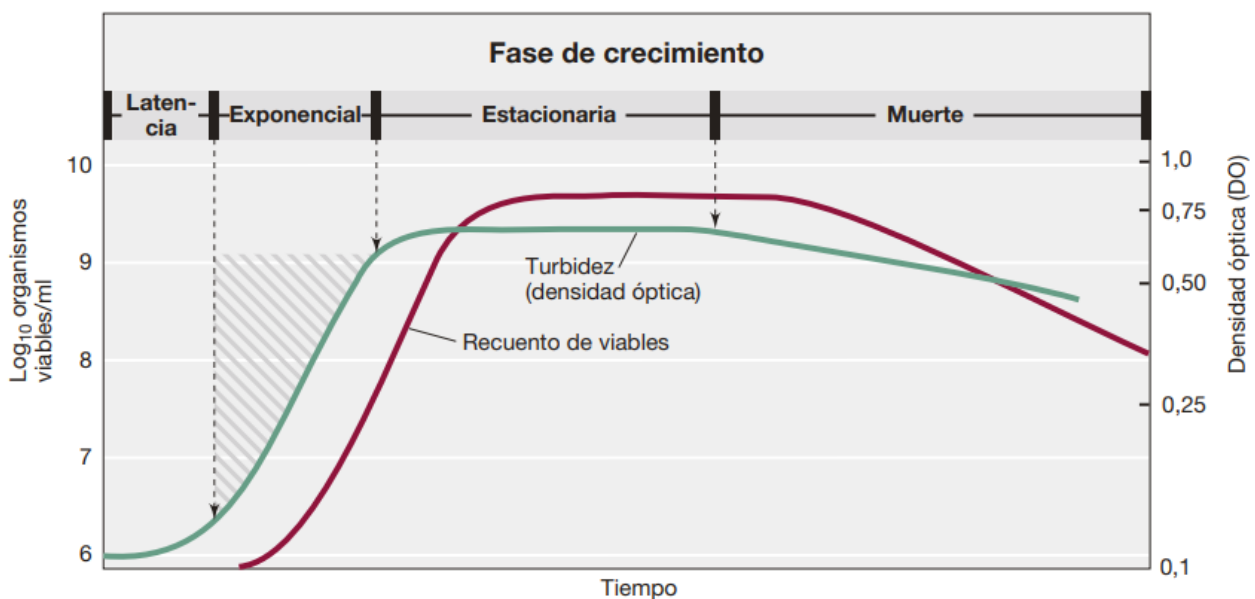


Figura 29. Curva de crecimiento microbiano típico, evidenciando la similitud entre la densidad óptica del cultivo y el recuento de células viables, y las distintas etapas del cultivo (Madigan, M. *et al.*, 2015).

Los microorganismos pueden usar la energía obtenida desde el sustrato para distintas funciones, como la división celular, producto de metabolitos secundarios, locomoción flagelar, bioluminiscencia, y formación de biopelícula (Spormann, A., 2023). Por ello, el comportamiento depende del organismo, del sustrato y de los factores de inhibición, en donde contaminantes pueden afectar drásticamente dicho comportamiento respecto del metabolismo normal (Kumakura, D. *et al.*, 2023). También, se ha demostrado que el mismo microorganismo puede diferir en su comportamiento en el mismo sustrato, incluso bajo las mismas condiciones de cultivo, correspondiendo con la plasticidad fenotípica (Grimbergen, A. *et al.*, 2015).

Sin embargo, el registro preciso de la tasa de crecimiento específica de un organismo es la mejor manera de establecer y validar el estado fisiológico de un cultivo en estudio (Fernández, L. *et al.*, 2024), siendo necesaria la medición directa del crecimiento del microorganismo, en donde la densidad óptica corresponde a una técnica con un buen acercamiento al crecimiento microbiano (Mira, P. *et al.*, 2022).

b) Espectrofotometría

La espectrofotometría es una técnica fundamental y ampliamente utilizada para analizar el crecimiento de microorganismos en cultivos líquidos y su principio se basa directamente en la Ley de Lambert-Beer (Ecuación (14)). Esta ley establece una relación lineal entre la absorbancia (A) de una solución, la concentración del analito (c) y la longitud del camino óptico (l) a través de la solución, y se relacionan con la densidad óptica (OD del inglés Optical Density) mediante la siguiente ecuación (Madigan, M. *et al.*, 2015):

$$OD = A = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (14)$$

donde ϵ es la absorptividad molar, una constante característica del analito a una longitud de onda específica, el factor I/I_0 corresponde a la transmitancia, es decir, la razón entre la intensidad del haz de luz emitida y recibida finalmente por el equipo.

En el crecimiento de microorganismos, las células en suspensión actúan como partículas que dispersan la luz, generando que la concentración celular o biomasa, sea directamente proporcional a la absorbancia medida. Así, al aumentar la población microbiana, la turbidez del medio se incrementa, lo que provoca una mayor dispersión de la luz incidente y, por lo tanto, una mayor absorbancia (Beal, J. *et al.*, 2020).

La linealidad de la Ley de Lambert-Beer se mantiene generalmente en cultivos microbianos hasta que la absorbancia alcanza un valor aproximado de 1 (Myers, J. *et al.*, 2013). En este rango, un aumento en la concentración celular se traduce directamente en un aumento proporcional de la absorbancia. Esto permite construir curvas de calibración confiables donde la absorbancia se correlaciona linealmente con la densidad celular. Sin embargo, cuando la absorbancia supera el valor de 1, la relación lineal entre la absorbancia y la concentración celular comienza a perderse (Figura 30).

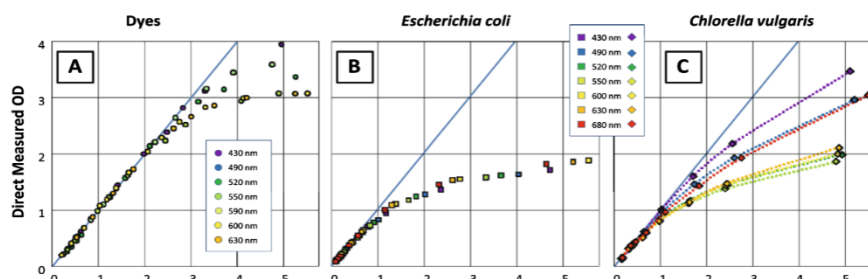


Figura 30. Aplicabilidad de la Ley de Lambert-Beer para diferentes tipos de muestras, de izquierda a derecha, (A) diferentes colorantes, (B) *Escherichia coli* y (C) cultivo del alga *Chlorella vulgaris* (Myers, J. *et al.*, 2013).

Como resultado de esta pérdida de linealidad, las lecturas de absorbancia superiores a 1 no reflejan con precisión la verdadera concentración celular (Beal, J. *et al.*, 2020), por lo que, para cuantificar el crecimiento en estas etapas más densas del cultivo o ante la presencia de precipitados, es necesario recurrir a diluciones de la muestra para obtener lecturas dentro del rango lineal ($DO < 1$) o emplear métodos alternativos de cuantificación celular.

Típicamente se utiliza a valores de longitud de onda de 600 nm (Mira, P. *et al.*, 2022), valor utilizado como estándar (Truong, V. *et al.*, 1994) debido a que reduce el ruido de fondo y mejora la precisión de las mediciones de concentración bacteriana (Wacogne, B. *et al.*, 2024), como es posible observar en la (Figura 31), donde el ruido de las mediciones, producto de la interacción del medio de cultivo con la luz, es mínimo entre 600 y 700 nm para distintos microorganismos.

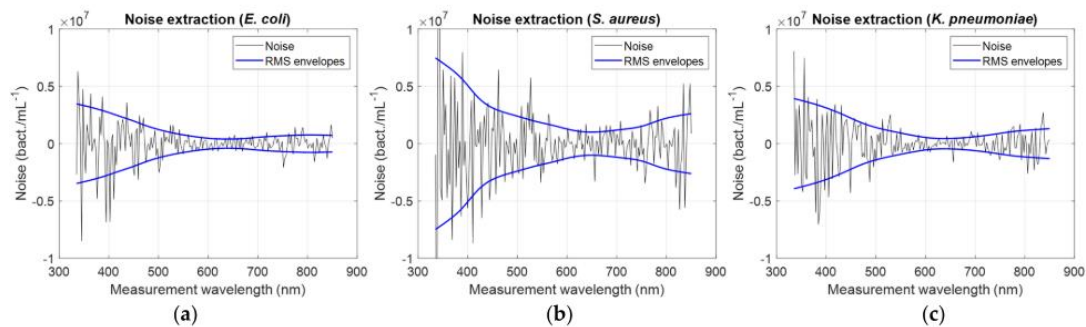


Figura 31. Extracción de ruido para tres cultivos bacterianos distintos. (A) *Echerichia coli*, (B) *Staphylococcus aureus* y (C) *Klebsiella pneumoniae* (Wacogne, B. *et al.*, 2024).

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1 MICROORGANISMOS Y MEDIOS DE CULTIVO

Para la realización del presente trabajo, se emplearon 2 microorganismos, *Geobacter sulfurreducens* PCA (DSMZ 12127) y *Halodesulfobivrio aestuarii* Sylt3 (DSMZ 17919) de stock de DSMZ proveídas por el Dr. Roberto Orellana, reconstituidas en medio de cultivo DSMZ 826: *Geobacter sulfurreducens* Medium y DSMZ 195c: *Desulfobacter sp.* Medium (Lactate) respectivamente, e incubadas a 30°C en oscuridad.

A partir de las cepas ya reconstituidas, se procedió a inocular 1 mL de cada una en tubos estériles, anóxicos, con una atmosfera de 80%:20% N₂:CO₂ y sellados con un tapón de goma y un sello de aluminio (Figura C - 2), en DSMZ M826 y DSMZ M195c para *G. sulfurreducens* y *H. aestuarii* respectivamente. Se realizaron transferencias consecutivas, al menos 3 veces durante la etapa de crecimiento exponencial (alrededor de una OD de 0,300 y 0,500 para *H. aestuarii* y *G. sulfurreducens* respectivamente), con el fin de activar adecuadamente el sistema metabólico de las bacterias previo a la inoculación del medio correspondiente para los análisis pertinentes.

3.1.1 Preparación de Medios de Cultivo

a) Medio de cultivo DSMZ 826

Para el cultivo de *Geobacter sulfurreducens*, el medio de cultivo utilizado fue el estipulado por DSMZ, el 826 Medium (DSMZ, 2022b), consistente en: 1,50 g de NH₄Cl (99,5%, Sigma-Aldrich), 0,60 g de KH₂HPO₄ (99% Sigma-Aldrich), 0,10 g de KCl (>99%, Sigma Aldrich), disuelto en 1000 mL de agua destilada, saturado con una mezcla gaseosa compuesta por 80% de N₂ y 20% de CO₂ por al menos 40 minutos y esterilizado por autoclave. A esta solución, se le adicionan las siguientes soluciones de manera anóxica y estériles: 20 mM (2,5 g/L) de Bicarbonato de Sodio como solución tampón, 20 mM (1,64 g/L) Acetato de Sodio como dador de electrones, 40 mM (6,4 g/L) de Fumarato de Sodio como aceptor de electrones, 10 mL de Solución Mineral Modificada de Wolin (Tabla 6) y 10 mL de Solución de Vitaminas de Wolin (Tabla 7), ajustando el pH a 7 con una solución de NaOH 1M.

Tabla 6. Solución Mineral de Wolin modificada (DSMZ, 2022b)

Compuesto químico	Cantidad	Unidad	Especificación
Ácido Nitrilotriacético (NTA)	1,50	g	99% Sigma-Aldrich
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	3,00	g	>98% Sigma-Aldrich
MnSO ₄ · H ₂ O	0,50	g	>99% Sigma-Aldrich
NaCl	1,00	g	>99% Merck
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,10	g	>99% Winkler
CoSO ₄ · 7 H ₂ O	0,18	g	>99% Sigma-Aldrich
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,10	g	>99% CDH
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,18	g	99,5% CDH

Compuesto químico	Cantidad	Unidad	Especificación
CuSO₄x 5 H₂O	0,01	g	>98% Sigma-Aldrich
AlK(SO₄)₂ · 12 H₂O	0,02	g	99% Loba Chemie
H₃BO₃	0,01	g	>99,50% Sigma-Aldrich
Na₂MoO₄ · 2 H₂O	0,01	g	99,50% Sigma-Aldrich
NiCl₂ · 6 H₂O	0,03	g	98% Loba Chemie
Na₂SeO₃ · 5 H₂O	0,30	mg	99% Loba Chemie
Na₂WO₄ · 2 H₂O	0,40	mg	99% Loba Chemie
Agua Destilada	1000,00	mL	

Tabla 7. Solución de Vitaminas de Wolin (DSMZ, 2022b)

Compuesto químico	Cantidad	Unidad	Especificación
Biotina	2,00	mg	97% Loba Chemie
Ácido Fólico	2,00	mg	97% Sigma-Aldrich
Clorhidrato de Piridoxina	10,00	mg	99,50% Loba Chemie
Tiamina - HCl	5,00	mg	>98% Sigma-Aldrich
Riboflavina	5,00	mg	>98% Sigma-Aldrich
Acido nicotínico	5,00	mg	>98% Sigma-Aldrich
Pantotenato D-(+)-Calcio	5,00	mg	99% Sigma-Aldrich
Vitamina B12	0,10	mg	98% Sigma-Aldrich
Acido p-Aminobenzoico	5,00	mg	99% Sigma-Aldrich
Ácido (DL)-alfa-lipoico	5,00	mg	99% Sigma-Aldrich
Agua destilada	1000,00	mL	

La solución de Bicarbonato de Sodio es preparada disolviendo lentamente NaHCO₃ (99,7% Loba Chemie) en agua destilada. La solución de Acetato de Sodio igualmente se prepara mediante la disolución de CH₃COONa (>99% Emsure) lentamente en agua destilada. El Fumarato de Sodio es preparado a través de la neutralización con 2N NaOH (98% Applichem Panreac) de Ácido Fumárico C₄H₄O₄ (99% Sigma-Aldrich) en agua destilada, hasta lograr un pH neutro. Estas soluciones son posteriormente saturadas con una mezcla gaseosa compuesta por 80% de N₂ y 20% de CO₂ por al menos 40 minutos, para luego ser esterilizadas mediante autoclave a 121°C por 30 minutos.

Por otro lado, la Solución Mineral de Wolin modificada se prepara mediante la dilución de NTA y su neutralización mediante KOH, para luego agregar los demás minerales y ajustar el pH a 7,0. Mientras que, la Solución de Vitaminas de Wolin se prepara disolviendo en agua destilada todos los componentes directamente. Ambas soluciones son posteriormente esterilizadas mediante filtrado por filtro pirinola estéril con tamaño de poro 0,22µm bajo cámara de flujo laminar, y saturado con una mezcla gaseosa compuesta por 80% de N₂ y 20% de CO₂ por al menos 40 minutos y de manera estéril. Estas soluciones son finalmente almacenadas entre 2 a 4°C.

b) Medio de cultivo DSMZ 195c

Para el cultivo de *Halodesulfobivrio aestuarii*, el medio de cultivo utilizado fue el estipulado por DSMZ, el 195c Medium (DSMZ, 2022a), consistente en: 3,00 g de Na₂SO₄ (>99% Sigma-Aldrich), 0,20 g de KH₂PO₄ (99% Sigma-Aldrich), 0,30 g NH₄Cl (99,5% Sigma-Aldrich), 21,00 g de NaCl (>99% Merck), 3,00 g de MgCl₂ · 6 H₂O (99% CDH), 0,50 g de KCl (>99% Sigma-Aldrich), 0,15 g de CaCl₂ · 2 H₂O (>99% CDH) disueltos en 1000,00 mL de agua destilada. Esta solución es saturada con una mezcla gaseosa compuesta por 80% de N₂ y 20% de CO₂ por al menos 40 minutos y esterilizado por autoclave. A ésta, se le adicionan las siguientes soluciones de manera anóxica y estériles: 14,15 mM (1,5 g/L) de Carbonato de sodio (99,9% Merck) como tampón, 22,31 mM (2,5 g/L) de Lactato de Sodio (solución al 60% m/m Sigma-Aldrich) como dador de electrones, 10mL por litro de solución base de Solución de Vitaminas de Wolin, sulfuro de sodio como agente reductor (c.3. Sulfuro de Sodio), 1 mL por litro de solución base de Solución de Selenito-Tungstato y de Solución de Elementos Traza SL-10 (Tabla 8).

Tabla 8. Solución de Elementos Traza SL-10 (DSMZ, 2022a)

Compuesto químico	Cantidad	Unidad	Especificación
HCl (25%)	10,00	mL	37% CDH
FeCl ₂ · 4 H ₂ O	1,50	g	98% Sigma-Aldrich
ZnCl ₂	70,00	mg	>98% Sigma-Aldrich
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	100,00	mg	>99% Sigma-Aldrich
H ₃ BO ₃	6,00	mg	99,5% Sigma-Aldrich
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	190,00	mg	>99% CDH
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	2,00	mg	>99% Sigma-Aldrich
NiCl ₂ · 6 H ₂ O	24,00	mg	98% Loba Chemie
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	36,00	mg	99,50% Sigma-Aldrich
Agua Destilada	990,00	mL	

Las soluciones mencionadas son preparadas disolviendo sus componentes en agua destiladas de tal manera de generar un stock concentrado, para luego ser saturadas con una mezcla gaseosa compuesta por 80% de N₂ y 20% de CO₂ por al menos 40 minutos, y esterilizadas en autoclave por 30 minutos a 121°C. La solución de Selenito-Tungstato se prepara con la disolución de 0,50 g de NaOH (98% Applichem Panreac), 3,00 mg de Na₂SeO₃ · 5 H₂O y 4,00 mg de Na₂WO₄ · 2 H₂O en 1000 mL de agua destilada.

Por otro lado, la Solución Mineral de Wolin modificada, se prepara según lo especificado en la sección anterior (3.1.1 a) Medio de cultivo DSMZ 826). Mientras que, la Solución de Elementos Traza SL-10 se prepara disolviendo FeCl₂ · 4 H₂O en HCl, luego diluir con agua destilada y adicionar los demás componentes de la solución, aforando a 1000 mL, e igualmente se esteriliza mediante filtrado y se acondiciona a atmosfera anóxica.

c) Otros reactivos

Para el análisis del metabolismo de microorganismos en medios que contienen arsénico, es requerido la producción de soluciones stock de As(III) y As(V) de manera anóxica y estéril:

c.1 Arsenito de Sodio

Se disuelve NaAsO_2 (>90% Aldrich) en agua destilada para generar stock de 10 mM (1,30 g/L) y 100 mM (12 g/L).

c.2. Arseniato de Sodio

Se disuelve $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (>98,00% Sigma-Aldrich) en agua destilada para generar stock de 100 mM (31,25 g/L) y 500 mM (156,00 g/L).

Por otro lado, los agentes reductores son requeridos en el medio de cultivo para generar las condiciones de potencial oxidoreductor suficiente para favorecer los procesos metabólicos principales de los microorganismos en estudio. Para el análisis en *Halodesulfobivrio aestuarii*, se requirió el uso de los siguientes agentes reductores:

c.3. Sulfuro de Sodio

Agente reductor original del medio de cultivo DSMZ 195c, con un potencial reductor estándar para el par reductor $\text{S}^0/\text{H}_2\text{S}$ de -0.243 V (Widdel, F. y Bak, F., 1992). Se disuelve $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (>98%, Sigma-Aldrich) en agua destilada, se expone a atmosfera de 100% N_2 , ya que la alcalinidad de la solución disuelve CO_2 generando vacío y la posible contaminación con oxígeno (Hungate, R., 1969).

Al medio de cultivo M195c se le adicionan 1,66 mM (0,4 g/L) como agente reductor.

c.3. Citrato de titanio (III)

Zehnder, A. y Wurhmann, K. (1975) proponen la utilización de Citrato de Titanio (III) como agente reductor, evidenciando que dicho compuesto logra generar un potencial de equilibrio a pH 7 de $E^0_{\text{H}} = -480$ mV, suficiente para eliminar el oxígeno del medio de cultivo con una reacción de primer orden con una constante de equilibrio de $k = 11,4 \pm 0,8 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ a 25°C.

Para la preparación de Citrato de Titanio (III) se realiza el procedimiento descrito por Zehnder, A. y Wurhmann, K. (1975). Para esto, se mezclan 50mL de solución a 0,20 M de Citrato de Tri Sodio dihidratado, preparado con la dilución de 5,912 gramos $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (99% Loba Chemie) en 100 mL de agua destilada, con 5 mL de solución de Tri Cloruro de Titanio (III) (12% Merck), neutralizado a pH 7 con solución de Carbonato de Sodio 1 M (11,2 mL utilizados). Posterior a su esterilización por autoclave, parte del carbonato se precipita, generando turbidez previo a su uso (Figura C - 4).

El medio M195c es modificado adicionando el volumen correspondiente para obtener una concentración de 1mM de esta solución.

c.4. Cisteína-HCl

Blum, J. *et al.*, (1998) presentan el descubrimiento de 2 nuevas especies capaces de respirar oxianiones de arsénico y selenio, en donde, la utilización de HCl-Cisteína como agente reductor fue eficiente para el cultivo de este tipo de especies. Con un potencial reductor estándar de -0.325 V, es usada generalmente para especies metanogénicas, aunque con

buenos resultados en bacterias sulfato reductoras (Widdel, F. y Bak, F., 1992). Pese a que se indican interacciones entre las distintas especies de arsénico con grupos funcionales (Chillé, D. *et al.*, 2022), Zhou, X. *et al.*, (2021) indica que estos oxianiones no generan un enlace significativo con la cisteína libre.

La preparación de una solución stock de HCl-Cisteína es descrito en detalle en O'Brien, J. y Malvankar, N. (2016). Se disuelve Cisteína C₃H₇SNO (98%, CDH) en agua destilada, se ajusta el pH con HCl 1M, hasta pH neutro y se afora a 1000 ml para lograr una concentración de 100 mM.

El medio 195c es modificado con la adición de HCl-Cisteína según lo especificado por Blum, J. *et al.*, (1998) para bacterias sulfato reductoras, con una concentración recomendada de 0,25 g/L, es decir, de 1,42 mM.

Todos los reactivos anteriores fueron preparados según lo especificado en cada uno, para posteriormente ajustar a atmosfera anóxica con una mezcla de gases mezcla gaseosa compuesta por 80% de N₂ y 20% de CO₂ (excepto por cuales se indican) por al menos 40 minutos y esterilizado por autoclave a 121°C por 30 minutos.

3.1.2 Preparación Inóculos Microbianos

Ambos microorganismos estudiados, tanto *Geobacter sulfurreducens* como *Halodesulfobivrio aestuarii* corresponden a bacterias anaerobias obligadas, por lo que su cultivo debe realizarse bajo condiciones anóxicas y estériles, evitando así la contaminación con otros microorganismo.

Para ello, se utilizan a tubos de ensayo sellados con un sello de goma y aluminio a los que se les induce una atmosfera anóxica a través de una estación de gasificación (Figura C - 3) de 80% de N₂ y 20% de CO₂ por 15 minutos (Figura C - 2), para luego esterilizar mediante autoclave a 121°C por 30 minutos. A estos, una vez enfriados a temperatura ambiente, se les adicionan 10 ml del medio de cultivo e inoculan con el microorganismo correspondiente.

Para el cultivo de ambas especies en estudio, se consideran principalmente las descritas por el Instituto Leibniz DSMZ Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH (En su idioma original, alemán, “*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*”) producto de que las cepas respectivas fueron originalmente compradas a dicho proveedor.

Para el cultivo de *Geobacter sulfurreducens*, se utilizan principalmente dos medios de cultivo: NBAF (siglas en ingles de “Non-Buffered Acetate Fumarate”) y FWF (siglas en ingles de “Fresh Water Acetate Fumarate”). El primero se caracteriza por presentar una mayor concentración de sales y minerales que podrían interferir en el análisis de la afección del crecimiento de *Geobacter sulfurreducens* por las posibles interacciones con el arsénico (Burford, N. *et al.*, 2011), por lo que, para dichos análisis, se utilizó el segundo, en específico el detallado por el Instituto Leibniz DSMZ en su apartado “DSMZ 826 *Geobacter sulfurreducens* Medium”.

Por otro lado, para el cultivo de *H. aestuarii*, se utilizan principalmente dos medios de cultivo descritos por el Instituto Leibniz DSMZ, el medio M163 y M195c. El primero se caracteriza por presentar una mayor hierro a través de la adición de sulfato de hierro, que podría interferir en el análisis de la afección del crecimiento de *H. aestuarii* por las precipitación de sulfuros de hierro por la interacción entre este y el ácido sulfhídrico, que dificultan la toma de datos a través de espectroscopia, y la adsorción de arsénico en estos que podría disminuir la biodisponibilidad de este contaminante (Couture, R. y van Cappellen, P., 2011), por lo que, para dichos análisis, se utilizó el segundo medio de cultivo, en específico el detallado por “DSMZ 195c Desulfobacter sp. Medium (Lactate)”.

Se extrae inóculo cuando la OD alcanza alrededor de 0,500 y 0,300 para *G. sulfurreducens* y *H. aestuarii* (etapa exponencial tardía) respectivamente de cada muestra para su transferencia al nuevo tubo. Pasadas 3 generaciones y de la activación metabólica del microorganismo, se inoculan medio de cultivo para los experimentos correspondientes.

3.2 CÁLCULO DE PARÁMETROS CINÉTICOS DEL CRECIMIENTO MICROBIANO

El crecimiento microbiano exponencial puede modelarse a partir de la división celular (Madigan, M. *et al.*, 2015):

$$N = 2^n \cdot N_0 \quad (15)$$

Donde n corresponde al número de la generación, es decir, la cantidad de veces que se han dividido las células, expresado como la razón entre el tiempo transcurrido “t” y el tiempo de duplicación “t_D”, y N₀ a la población inicial.

De esta manera y a partir de la Ecuación (15), la función respecto al tiempo del crecimiento de la población es:

$$N(t) = 2^{t/t_D} \cdot N_0 \rightarrow \frac{N(t)}{N_0} = 2^{t/t_D} \quad (16)$$

Aplicando logaritmo natural en ambos lados de la Ecuación (16):

$$\ln\left(\frac{N(t)}{N_0}\right) = \ln(2) \cdot \frac{t}{t_D} \rightarrow N(t) = N_0 \cdot e^{\frac{\ln(2)}{t_D} \cdot t} \quad (17)$$

Con ello, se define la velocidad específica de crecimiento “μ” como la razón entre el logaritmo natural de 2 y el tiempo de duplicación (Madigan, M. *et al.*, 2015), quedando la Ecuación (17) de la siguiente forma:

$$N(t) = N_0 \cdot e^{\frac{\ln(2)}{t_D} \cdot t} = N_0 \cdot e^{\mu \cdot t} \quad (18)$$

De la Ecuación (18) se extraen los parámetros que permiten modelar la cinética de crecimiento microbiano, que pueden ser estimados a partir de la linealización de la ecuación anterior a través de la aplicación del logaritmo natural:

$$\ln\left(\frac{N(t)}{N_0}\right) = \ln(e^{\mu \cdot t}) \rightarrow \ln(N(t)) = \mu \cdot t + \ln(N_0) \quad (19)$$

Debido a la relación directamente proporcional entre la absorbancia y la concentración celular en el medio, la Ecuación (19) puede ser descrita también como:

$$\ln(ABS(t)) = \mu \cdot t + \ln(ABS_0) \quad (20)$$

Donde ABS_0 corresponde a la absorbancia inicial y $ABS(t)$ a la absorbancia medida en un espectrofotómetro a 600 nm a través del tiempo. La pendiente de esta recta (Ecuación (20)) generada corresponderá a la velocidad específica de crecimiento “ μ ”, que a su vez, por definición, se logra estimar el valor del tiempo de duplicación, expresada en la Ecuación (21):

$$\mu = \frac{\ln(2)}{t_D} \rightarrow t_D = \frac{\ln(2)}{\mu} \quad (21)$$

3.2.1 Otros Parámetros

a) Tiempo de Latencia t_{Lag}

Se considero como tiempo de latencia al tiempo que transcurre entre la inoculación del microorganismo hasta el comienzo de aceleración del crecimiento en la etapa exponencial.

b) Máximo Crecimiento OD_{MAX}

Se consideró como máximo crecimiento al valor máximo de OD alcanzado en la etapa exponencial tardía, valor en el cual fluctúan las mediciones posteriores en la etapa estacionaria.

c) Tiempo para Máximo Crecimiento t_{OD-MAX}

Se consideró como tiempo para máximo crecimiento al tiempo ocurrido entre la inoculación del medio de cultivo hasta que este alcanza la máxima OD, en la etapa exponencial tardía.

3.3 ANÁLISIS DEL MEDIO DE CULTIVO Y MEJORAS

Se ha evidenciado en la literatura (Couture, R. y van Cappellen, P., 2011; Wolthers, M. *et al.*, 2007) que el arsénico puede interactuar con diversos minerales, metales, carbonatos, vitaminas y agentes reductores, por lo que es requerido una revisión de las mejores condiciones requeridas para el análisis del efecto del arsénico en microorganismos, principalmente con el agente reductor.

Para ello, se realizan pruebas abióticas, es decir, en medio de cultivo estéril y anóxico, de esta interacción modificando el agente reductor utilizado como la especie de arsénico. Según Widdel, F. y Bak, F. (1992) es necesario mantener un potencial reductor bajo los -100mV, ya que la reducción de sulfato a sulfuro ocurre alrededor de los -220 mV a pH 7 (Madigan, M. *et al.*, 2015), por lo que se tomaron en cuenta algunos de los agentes reductores propuestos por Wagner *et al.* (2019), como el sulfuro de sodio (Na₂S) y la HCl-Cisteína, como también el Citrato de Titanio (III) propuesto por Zehnder, A. y Wurhmann, K. (1975).

A medio de cultivo M195c para *Halodesulfovibrio aestuarii*, se le añadió el agente reductor especificado, resazurina de sodio como indicador del potencial reductor (Figura 32) y concentraciones de As(III) o As(V), de manera anóxica y estéril.

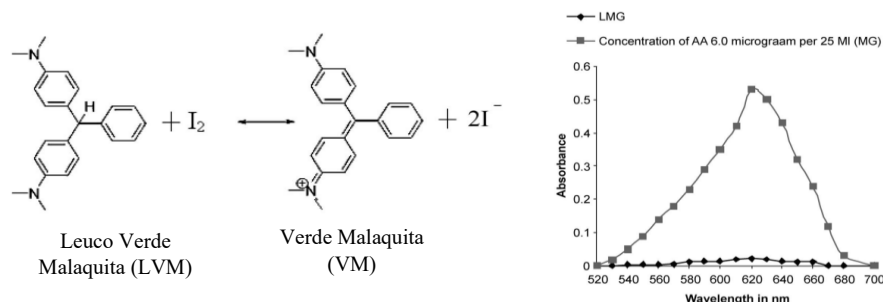


Figura 32. (A) Reacción de LVM, incoloro, con I₂ a VM, de color verde cian. (B) Longitud de onda de ambos compuestos, LVM y VM evidenciando una alta absorbancia a una longitud de 617 nm en este último (Tiwari, K., 2010).

La resazurina, azul en dilución, se reduce a resorufina (rosada) en presencia de oxígeno, la que a su vez se reduce a dihidroresorufina (incolora) en un medio reductor, con un potencial reductor entre -30 y -40 mV (Widdel, F. y Bak, F., 1992), siendo esta última reacción reversible (Wagner *et al.*, 2019), y la indicativa del cambio del potencial reductor en el medio (Figura 33 y Figura C - 4).

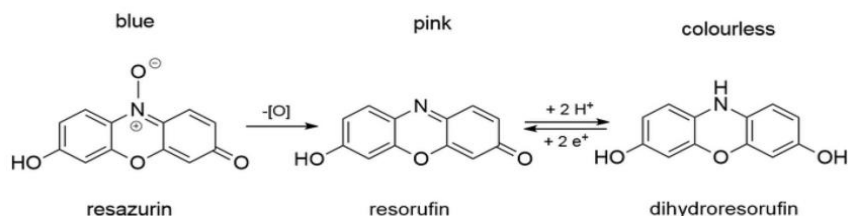
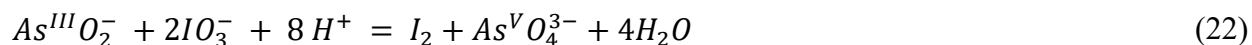


Figura 33. Reducción de Resazurina (azul) a Resorufina (rosada) y posteriormente a dihidroresorufina (incolora) en un medio reductor (Wagner, A. et al., 2019).

3.4 ANÁLISIS ARSÉNICO EN MUESTRAS DE CULTIVO

3.4.1 Metodología Cuantitativa: Medición espectrofotométrica

Para el análisis espectrofotométrico de arsénico en muestras de cultivo, se utilizó una modificación del método planteado por Stancheva, K. y Pasha, C. (2016) en base a lo observado en el análisis de Tiwari, K. (2010), en donde se utiliza la generación de I₂ que reacciona con Leuco Verde Malaquita (LVM), que al oxidarse a Verde Malaquita el color de la solución pasa a ser verde cian (Ecuación (22)):



3.4.1.1 Procedimiento

a) Medición de As (III)

- 1) A 5 ml de muestra previamente filtrada o estándar de arsénico, se le adicionan 1 ml de KIO₃ 0,3% m/v y 0,5 ml de HCl 1M, agitando suavemente por 2 minutos.
- 2) De colorearse marrón la solución, es necesario la adición de algunas gotas de ácido ascórbico.

- 3) Continuar con la adición de 0,5 ml de LVM 0,005 % m/v y 2ml de solución Buffer de Acetato (1,35 g/L de acetato de sodio ajustado a pH 4,5 con ácido acético glacial).
- 4) Las muestras son calentadas en baño maría a 40°C por 5 minutos.
- 5) Luego de enfriar las muestras a temperatura ambiente, se mide la absorbancia a 617 nm.

b) Medición As (V)

- 1) La medición de As (V) se basa en la sustracción entre el arsénico total y el valor obtenido de As(III), por lo que se mide el arsénico total mediante la reducción de todo el As(V) con la adición de 0,5 ml de KI 0,5% p/p y 0,5 ml de HCl 1M, a muestras previamente filtradas. La reducción de As(V) a As(III) sigue la siguiente ecuación (Ecuación (23)):



Se realizó una curva de calibración (Figura B - 1) con muestras de As (III) diluido en agua doblemente destilada (MiliQ) (Tabla B - 1) y con medio M195c diluido 1:500 (Tabla B - 2), con concentraciones conocidas (en $\mu\text{g mL}^{-1}$). La regresión lineal de los datos generados permite interpolar la señal generada por muestras de concentración desconocidas. La concentración calculada (en $\mu\text{g mL}^{-1}$) debe ser convertida a las unidades de medida correspondiente a través del peso molecular del arseniato de sodio ($129,91 \text{ g mol}^{-1}$) y luego aplicar el factor de dilución estimado.

Los interferentes de la metodología según Stancheva, K. y Pasha, C. (2016) son especificados en la Tabla 9, indicando la concentración máxima de tolerancia del método según los dos colorantes utilizados en dicho estudio, indicándose también en esta las concentraciones del medio de cultivo M195c.

Tabla 9. Contraste entre las concentraciones en M195c y el límite de tolerancia para distintos iones interferentes en la metodología descrita por Stancheva, K. y Pasha, C. (2016) para safranina y fucsina y por Tiwari, K. (2010) para Leuco Verde Malaquita.

Iones	Límite de tolerancia ¹ mg L ⁻¹ Stancheva, K. y Pasha, C. (2016)		Límite de tolerancia ¹ mg L ⁻¹ Tiwari, K. (2010)	Concentraciones en M195c ² mg L ⁻¹	
	Safranina O	Fucsina	Leuco Verde Malaquita	Sin dilución	1:500
<i>Fe</i> ³⁺	100	150	400	1,5	0,003
<i>Ni</i> ²⁺	100	100	-	0,024	0,000048
<i>Ca</i> ²⁺	300	400	3400	0,15	0,0003
<i>Co</i> ²⁺	150	100	400	0,15	0,00038
<i>Zn</i> ²⁺	1000	1000	400	0,07	0,00014
<i>Na</i> ⁺	-	-	3400	21000	420
<i>K</i> ⁺	-	-	3400	0,7	0,0014
<i>Mg</i> ²⁺	-	-	1000	3000	6
<i>Cu</i> ²⁺	-	-	400	0,002	0,000004
<i>Cl</i> ⁻	-	-	2300	28100	56,2
Acetato	-	-	1000	- ³	- ³
Fosfato	1000	1100	2300	200	0,4
Sulfato	1000	1200	2000	3000	6

1. Concentración requerida para generar un error del $\pm 2\%$ en la medición de la absorbancia
2. Calculado según las cantidades de sales de cloruro adicionadas al medio M195c
3. Producto del metabolismo de *Halodesulfobivrio aestuarii*. Desconocida concentración exacta.

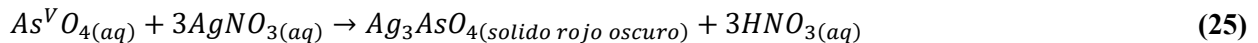
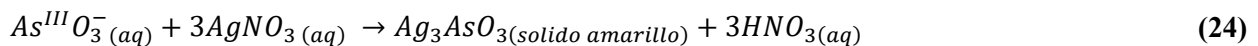
De las muestras realizadas para el análisis del efecto del arsénico en el crecimiento de *Halodesulfobivrio aestuarii* (sección 4.2) se extraen 0,1 ml en etapa de cese de actividad metabólica y muerte celular (disminución drástica de OD hasta alcanzar alrededor de 0,050), y de medio de cultivo estéril con las concentraciones de arsénico correspondientes, diluyéndose a una razón de 1:500.

El cálculo de la concentración de As(III) en las muestras diluidas, con las absorbancias obtenidas, datan de una concentración sobreestimada (Tabla B - 3), por lo que la absorbancia se corrigieron con el valor obtenido en el control.

3.4.2 Metodología Cualitativa: Precipitación con Nitrato de Plata

Se toma como referencia el estudio realizado por Lett, M. *et al.* (2001) para el análisis de muestras con arsénico mediante la aplicación de nitrato de plata ($AgNO_3$, Bioquímica S.A.) 0,1 M. En este se adicionan 150 μL de $AgNO_3$ a 150 μL de estándar de arseniato y arsenito, visualizando el color del precipitado, amarillo y rojo oscuro respectivamente y naranja oscuro a una mezcla de estos. El análisis del metabolismo de arsénico de especies en análisis es realizado mediante la inundación de colonias en medio sólidos.

La reacción de precipitación ocurre según las siguientes ecuaciones (Ecuaciones (24) y (25)):



El procedimiento es modificado para el trabajo con muestras líquidas, adicionando el mismo volumen de muestra que lo explicitado para los estándares.

Ante la aparición de colores no acordes a lo esperado por la precipitación de otros compuestos, se dejó decantar por al menos 30 minutos, para posteriormente tomar 150 μL de líquido sobrenadante y adicionarle 150 μL de $AgNO_3$ extra, proceso que se repitió una vez más.

La presencia de otros compuestos e iones podrían interferir en la metodología ante la precipitación de compuestos con una menor constante de solubilidad (Tabla 10).

Tabla 10. Algunos compuestos iónicos sólidos generados por la reacción de precipitación con nitrato de plata, color del precipitado, reacción y constante de solubilidad. Elaborado a partir de datos de Haynes, W *et al.* (2017).

Compuesto (formula)	Reacción	Color	Ksp
Acetato de plata ($AgC_2H_3O_2$)	$Ag^+ + C_2H_3O_2 \leftrightarrow AgC_2H_3O_2 (s)$	Blanco	$1,94 \cdot 10^{-3}$
Arseniato de plata [As(V)] ⁽¹⁾ (Ag_3AsO_4)	$3Ag^+ + AsO_4^{3-} \leftrightarrow Ag_3AsO_4 (s)$	Rojo marrón (amarillo con As(III))	$1,03 \cdot 10^{-22}$
Carbonato de plata (Ag_2CO_3)	$2Ag^+ + CO_3^{2-} \leftrightarrow Ag_2CO_3 (s)$	Amarillo	$8,46 \cdot 10^{-12}$
Cloruro de plata ($AgCl$)	$Ag^+ + Cl^- \leftrightarrow AgCl (s)$	Blanco	$1,77 \cdot 10^{-10}$

Compuesto (formula)	Reacción	Color	Ksp
Fosfato de plata (Ag_3PO_4)	$3Ag^+ + PO_4^{3-} \leftrightarrow Ag_3PO_4(s)$	Amarillo	$8,89 \cdot 10^{-17}$
Sulfato de plata (Ag_2SO_4)	$2Ag^+ + SO_4^{2-} \leftrightarrow Ag_2SO_4(s)$	Blanco	$1,20 \cdot 10^{-5}$
Sulfuro de plata ² (Ag_2S)	$2Ag^+ + S^{2-} \leftrightarrow Ag_2S(s)$	Gris/Negro	$6 \cdot 10^{-30(2)}$
<ol style="list-style-type: none"> 1. No se evidencian valores de Ksp para arsenito de plata [As(III)]. 2. En base a la reacción $M_mS_{n(s)} + 2H^+ \rightleftharpoons mM^+ + nH_2S_{(aq)}$ 			

3.5 SECUENCIACIÓN Y ANOTACIÓN DEL GENOMA DE *HALODESULFOVIBRIO AESTUARII*

El ADN de 100 ml de cultivo de *Halodesulfovibrio aestuarii* fue extraído utilizando FastDNATM SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Solon, OH, USA), según el protocolo del fabricante. A continuación, el producto se diluyó en un volumen final de 100 μ L y el genoma fue amplificado a través de MiSeq Illumina (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) protocolo de obtención de lecturas del tipo 2×300 bp paired-end.

Se realizó la revisión manual de las anotaciones del genoma de *H. aestuarii*, base de datos realizada y compartida cortesía del Dr. Roberto Orellana y de la Dra(c) Josefina Abarca. Esta base de datos fue elaborada a través del ensamblador de genoma SPAdes y anotadas mediante DRAM (de las siglas en ingles de “Distilled and Refined Annotation of Metabolism”), el cual a su vez utiliza como base de datos la proveída por KEGG (de las siglas en ingles “Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes”), y presentadas a través de la plataforma KBase.

La revisión de las anotaciones consistió en la ubicación de las estructuras principales de los metabolismos del azufre y del piruvato, como también del arsénico, ubicando la enzima y su número EC respectivo (según el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular sobre la Nomenclatura y Clasificación de Enzimas según las Reacciones que Catalizan), su ubicación en la base de datos del genoma y la reacción que cataliza.

Las estructuras que no son encontradas directamente a través de la revisión del genoma, indicado por la plataforma KBase, son revisadas a través de una búsqueda retrospectiva por cada una de estas en el metabolismo señalado, para lo cual se utiliza la base de datos de KEGG.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 PRUEBAS ABIÓTICAS: EFECTO DEL AS EN MEDIO DE CULTIVO ESTÉRIL

Halodesulfobrio aestuarii, como bacteria sulfato reductora halófila (Postgate, J., y Campbell, L., 1966), requiere de un potencial reductor altamente negativo, menor a -100mV (Madigan, M. *et al.*, 2015), para la activación del proceso de reducción del sulfato a sulfuro. Para ello, la adición de agentes reductores al medio de cultivo que provean las condiciones anóxicas requeridas es de gran importancia (Widdel, F. y Bak, F., 1992; Wagner, A. *et al.*, 2019).

Debido a su alta reactividad, algunos compuestos presentes en los medios de cultivo de bacterias sulfato reductoras pueden reaccionar entre sí afectando su solubilidad. Un ejemplo de esto corresponde sulfuro de sodio del medio 195C de *Halodesulfobrio aestuarii*, que reacciona rápidamente con arsénico trivalente (Lewis, A., 2010), generando un precipitado amarillo característico de trisulfuro de arsénico (Xu, H. *et al.*, 2023).

Estas reacciones de precipitación inducen una baja en la biodisponibilidad de los compuestos y sales del medio de cultivo, como también imposibilitan la toma de datos espectroscópicos para el monitoreo del crecimiento, metodología clave, de alto rendimiento y bajo costo (Wacogne, B. *et al.*, 2024) para el seguimiento del crecimiento de bacterias anaeróbicas. Debido a esto, previo al trabajo con *H. aestuarii*, se realizó una evaluación de ajustes en medio de cultivo DSMZ 195c enmendado con concentraciones crecientes de As(III) o As(V) en una serie de pruebas abióticas, y con esto, evaluar la realización de ajustes y mejoras técnicas que permitan evaluar el efecto de As en el crecimiento de *H. aestuarii*.

Otros agentes reductores usualmente utilizados para BSR (Widdel, F. y Bak, F., 1992), fueron evaluados pero no utilizados. El ascorbato de sodio (dehidroascorbato/ascorbato, $E^0 = +0,058$ V) presenta un potencial reductor demasiado alto para generar el ambiente reductor necesario para *H. aestuarii*. El Tioglicolato de sodio (disulfuro de tioglicolato/tiogricolato, $E^0 = -0,14$ V) presenta un grupo tiol que podría interactuar con el arsénico del medio y disminuir su biodisponibilidad (Chillé, D. *et al.*, 2022), además de que las soluciones de este son oxidadas con facilidad. El ditionito de sodio ($2\text{SO}_3^{2-}/\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$, $E^0 = -0.29\text{V}$) también es ampliamente utilizado, sin embargo, su relativa toxicidad y rápida oxidación genera que deba usarse en adición de otros agentes reductores, por lo que en estudios extensos perderá rápidamente su capacidad reductora (Widdel, F. y Bak, F., 1992). También, su par redox, el sulfito, puede ser utilizado como dador de electrones por *H. aestuarii* (Shivani, Y. *et al.*, 2017).

Todas las pruebas se realizaron en condiciones anaeróbicas y de esterilidad, manteniendo un número de replicas que permita equilibrio entre precisión y variabilidad con el costo de los ensayos salvo aquellas que influyeron la adición de cisteína. Las pruebas abióticas realizadas fueron las siguientes:

4.1.1 M195c tradicional

a) *Arsenito de Sodio [As(III)]*

La enmienda de arsenito de sodio a 0,5, 1 y 2 mM, pero no a 0,1 mM (Figura 34) en medio 195C tradicional, incluyendo Na₂S como agente reductor y resazurina de sodio como indicador de potencial reductor, generó la formación de un precipitado abundante de manera inmediata de sulfuro de arsénico, en menos de 10 segundos de haber sido incorporado (Figura 35). Dicho precipitado imposibilita el seguimiento de crecimiento microbiano a través de espectrofotometría. De acuerdo a estudios previos realizados en medios de cultivos similares, es muy probable que este precipitado corresponda a trisulfuro de arsénico, compuesto que se ha encontrado luego de la reacción de arsénico con S(-II), lo que compromete la solubilidad y biodisponibilidad del As en el medio de cultivo (Xu, H. *et al.*, 2023).

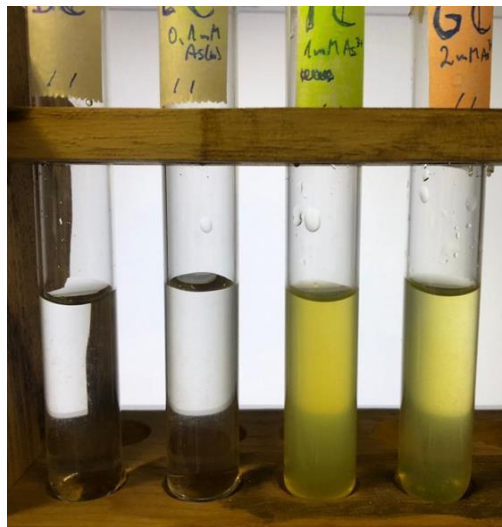


Figura 34. M195c con Na₂S como agente reductor, sin inoculación y con As(III). De izquierda a derecha: blanco sin arsénico, 0,1, 1 y 2mM de As(III).

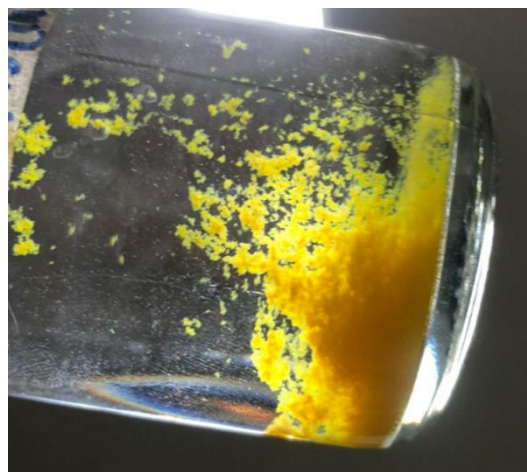


Figura 35. Precipitado amarillo en M195c con Sulfuro de Sodio como agente reductor, ante la adición de As(III). La reacción es rápida, de tan solo 10 segundos para que le medio de cultivo se torne totalmente amarillo, y pasados unos minutos, sedimente el precipitado.

Con el objetivo de evaluar la estabilidad de este precipitado ante condiciones ambientales variables, se realizó en paralelo un experimento de generación de este precipitado con el posterior ingreso de aire (y por ende oxígeno) al sistema (Figura 36). Se observó que a mayor concentración de As (III), ya sea en forma de precipitado o en su forma soluble, hay mayores cambios en el potencial redox evidenciado por los mayores cambios de color de la resazurina (oxidación a resorufina rosada), los que podrían sugerir un estado de oxidación mayor en dichos tubos (Figura 37). La fracción de As(III) precipitado se solubilizó después de 5 días posterior a la apertura y exposición a la atmosfera de los tubos, sugiriendo el rol relevante que posee las condiciones de oxidorreducción en las propiedades fisicoquímicas y biodisponibilidad en el ambiente de los compuestos que contienen As. El pH no resulta ser responsable del cambio en el potencial redox ya que se mantuvo sin cambios significantes durante todo el experimento.



Figura 36. Medio de cultivo M195c, con 1,66mM de Na₂S como agente reductor y 0,5, 1 y 2 mM de As(III) en duplicado, y con precipitado de sulfuro de arsénico. Tubos de la izquierda corresponden a condición anóxica, y a la derecha abiertos a la atmosfera. A, B, C y D corresponden a 0, 24, 72 y 120 horas desde comenzado el experimento, evidenciándose la total disolución del precipitado en condiciones aerobias a las 120 horas.



Figura 37. Efecto de la adición de As(III) a M195c con 1,66 mM de Na₂S y resazurina como indicador de potencial oxido reducción. Notar que el precipitado es rápidamente solubilizado a bajas concentraciones de As(III) (derecha), y que a mayores concentraciones, el potencial aumenta en mayor parte del volumen, generando una diferencia notoria en la coloración de la resazurina producto de la difusión del O₂ en el medio y dicho aumento del potencial.

b) Arseniato de Sodio Heptahidratado [As(V)]

Se realizó una adición de concentraciones incrementales de 0,5, 1, 3, 5, 10 y 20 mM de As (V) en medio M195C. Al contrario de lo observado con la adición de As (III), la adición de As(V) no presentó formación de precipitados después de una semana, sugiriendo que el As(V) se mantiene de forma soluble en el medio (Tabla 11). Al igual que el caso anterior, el pH se mantuvo sin cambios significativos durante todo el experimento.

Tabla 11. Densidad óptica, variación final de OD y pH final de M195c con 1,66 mM de Na₂S y concentraciones variables de As(V).

Muestra	0 horas	48 horas (2 días)	168 horas (7 días)	336 horas (14 días)	pH final
Control	0,000	0,000	0,000	0,000	~7
0,5 mM	- 0,005	- 0,007	- 0,013	- 0,015	~7
1 mM	- 0,007	- 0,010	- 0,021	- 0,026	~7
3 mM	- 0,008	- 0,005	- 0,033	- 0,028	~7
5 mM	- 0,005	- 0,003	- 0,038	- 0,029	~7
10 mM	- 0,005	- 0,001	- 0,029	- 0,018	~7
20 mM	- 0,002	- 0,028	- 0,035	- 0,028	~7

Al contrario que en su contraparte, después de las 168 horas se registró un cambio de estado de oxidorreducción leve de los tubos, sugiriendo un posible ingreso de aire. Mientras los tubos con adición de As(III), con la presencia de precipitados, no sufrieron un cambio en sus condiciones redox (no se evidencia cambio de color), los tubos con As(V) si presentaron cambio de color (Figura 38).

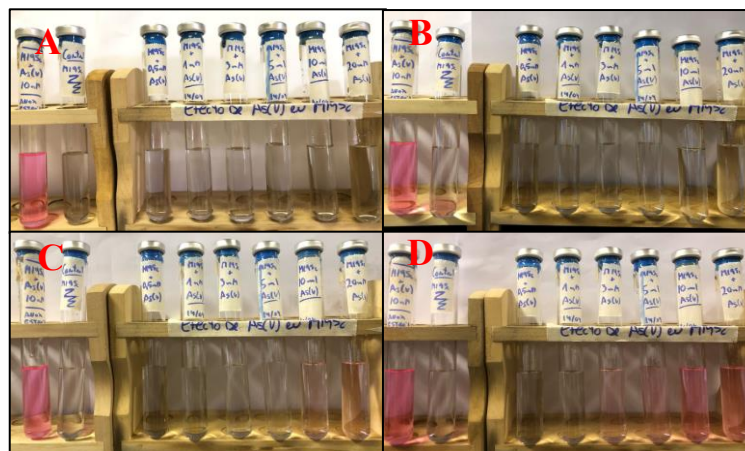


Figura 38. Cambios evidenciados en el medio de cultivo M195c 1,66 mM de Na₂S a diferentes concentraciones de As(V). A, B C y D corresponden a 0, 48, 168 y 336 horas (2 semanas). En todos los registros, de izquierda a derecha, las concentraciones de As(V) son: 0 (blanco-control), 0,5, 1, 3, 4, 10 y 20 mM. A la izquierda de cada registro, tubo con mismas condiciones y 10 mM de As(V) que motivo la prueba de análisis al volverse rosado en solo 72 horas.

4.1.2 M195c modificado con Ci-Ti (III)

Según Zehnder, A. y Wurhmann, K. (1975), el citrato de titanio (III) (Ci-Ti(III)) logra generar un ambiente reductor con un potencial redox estándar de -480mV a pH circumneutral.

Concentraciones ascendentes de arsenito de sodio (0,5, 1 y 5 mM) fueron suplementadas a medio M195c modificado con Citrato de Titanio (III) como agente reductor. Al cabo de 24 horas, se evidencia la formación de abundante precipitado marrón en todos los tratamientos, inclusive los que no poseen adición de arsénico (Tabla 12) lo que imposibilita el seguimiento del crecimiento microbiano a través de espectrofotometría (Figura 39). Adicionalmente esta formación podría comprometer la biodisponibilidad del As en el medio ya que podría haber sido adsorbido o co-precipitado. El pH se mantuvo próximo a la neutralidad durante el experimento.

Tabla 12. Densidad óptica, variación final de OD y pH final de M195c con 1,0 mM de Ci-Ti(III) y concentraciones variables de As(III).

Muestra	0 horas	24 horas (1 día)	48 horas (2 días)	96 horas (4 días)	Variación	pH final
M195c Na ₂ S	0,000	0,000	0,000	0,000	-	~7
M195c Ci-Ti(III)	0,149	0,169	0,170	0,175	17%	~7
0,5 mM A	0,206	0,250	0,271	0,291	41%	~7
0,5 mM B	0,202	0,262	0,279	0,308	52%	~7
1,0 mM A	0,230	0,296	0,305	0,325	41%	~7
1,0 mM B	0,237	0,292	0,301	0,321	35%	~7
5,0 mM	0,360	0,376	0,392	0,398	11%	~7



Figura 39. Cambios evidenciados durante una semana en M195c con 1 mM de Ci-Ti (III) como agente reductor, anóxico y estéril, a concentraciones variables de As(III). Tubos ordenados de izquierda a derecha: M195c con Na₂S, M195c con Ci-Ti (III) en ausencia de arsénico, duplicados de M195c con Ci-Ti(III) con 0,5 mM, 1,0 mM de As(III) y ultimo con 5 mM de As(III). Imágenes A, B C y D son para: medios recién preparados (0 horas), 24 horas, 48 horas y 96 horas respectivamente. Es de notar que a las 72 horas no se evidencian cambios de la condición predecesora.

Debido a estos resultados, se decidió no proceder con experimentos basados en la adición de As(V) a este medio de cultivo.

4.1.3 M195c modificado con HCl-Cisteína

La HCl-Cisteína es utilizado como agente reductor para el estudio de bacterias metanogénicas (Widdel, F. y Bak, F., 1992), aunque también ha dado buenos resultados en BSR (Blum, J. *et al.*, 1998). En algunas BSR, la cisteína podría ser utilizada como dador de electrones (Barton, L. y Fauque, G., 2022), sin embargo, *H. aestuarii* no (Shivani, Y. *et al.*, 2017).

a) Arsenito de Sodio [As(III)]

La enmienda de arsenito de sodio a concentraciones crecientes de 0,1, 0,5, 1, 2, y 5mM en medio M195c modificado con HCl-Cisteína como agente reductor, no generó aparentemente cambios en el potencial redox al no presentar coloración alguna en 30 días (Figura 40). La OD medida se mantuvo estable al igual que el pH circumneutral hasta terminada la observación (Tabla 13).



Figura 40. Medio de cultivo M195c con 1,44 mM de HCl-Cisteína como agente reductor, a diferentes concentraciones de As(III). A la izquierda (A) registro de la primera observación (0 horas) y a la derecha (B) luego de 30 días. En ambas fotografías, las concentraciones de As(III) son, de izquierda a derecha: 0 (blanco-control), 0,1, 0,5, 1, 2, 5 mM.

Tabla 13. Densidad óptica, variación final de OD y pH final de M195c con 1,42 mM de HCl-Cisteína y concentraciones variables de As(III).

Muestra	0 días	9 días	19 días	30 días	pH final
Control	0,000	0,000	0,000	0,000	~7
0,1 mM	0,006	0,002	0,000	0,001	~7
0,5 mM	-0,001	0,001	0,000	0,003	~7
1 mM	0,004	0,004	0,004	0,002	~7
2 mM	0,005	0,005	0,004	0,003	~7
5 mM	0,001	0,004	0,003	0,004	~7

b) Arseniato de Sodio Heptahidratado [As(V)]

De manera similar al experimento anterior, la adición de 0,5, 1, 3, 5, 10 y 20 mM de As(III) al medio M195c modificado con HCl-Cisteína no generó precipitado (Figura 41) durante 30 días de observación (Tabla 14). Similar a los experimentos previos, durante este tratamiento el pH se mantuvo circumneutral.



Figura 41 . Medio de cultivo M195c con 1,44 mM de HCl-Cisteína como agente reductor, a diferentes concentraciones de As(V). (A) corresponde al registro de la primera observación (0 horas), (B) luego de 21 días y (C) al día número 32. En las 3 fotografías, las concentraciones de As(III) son, de izquierda a derecha: 0 (blanco-control), 0,5, 1, 3, 5, 10 y 20 mM.

Tabla 14. Densidad óptica, variación final de OD y pH final de M195c con 1,42 mM de HCl-Cisteína y concentraciones variables de As(V).

Muestra	0 horas	11 días	21 días	32 días	pH final
Control	0,000	0,000	0,000	0,000	~7
0,5 mM	- 0,002	-0,002	-0,002	-0,004	~7
1 mM	- 0,001	0,000	0,000	0,000	~7
3 mM	- 0,003	-0,003	-0,002	-0,003	~7
5 mM	- 0,001	0,000	0,001	0,001	~7
10 mM	- 0,001	0,001	0,001	0,003	~7
20 mM	0,001	0,002	0,006	0,012	~7

Aunque no se evidenciaron cambios en el potencial redox (indicado por la oxidación de la resazurina) ni presencia de precipitado, lo que contrasta enormemente con los anteriores agentes reductores y los análisis espectrofotométricos, (Chillé, D. *et al.*, 2022) indican que este contaminante logra interactuar con distintos grupos funcionales de las proteínas, en especial con los grupos tioles de la cisteína. Esto podría dar cuenta de que es requerido un análisis intensivo respecto al efecto que podría tener dicha interacción en la biodisponibilidad del arsénico y, por lo tanto, sobreestimar la tolerancia de *Halodesulfobivrio aestuarii*.

4.2 PRUEBAS BIÓTICAS: EFECTO DEL AS EN MEDIOS INOCULADOS

Halodesulfovibrio aestuarii es una bacteria sulfato reductora halófila y anaerobia estricta, aislada de agua marina o salobre, en particular de aguas contaminadas que presenten ennegrecimiento y formación de sulfuros, y no crece en agua dulce (Postgate, J., y Campbell, L., 1966).

El estudio del metabolismo microbiano de *Halodesulfovibrio aestuarii*, como BSR que por su predisposición en ambientes con presiones selectivas y factores estresantes, como la presencia de metales pesados, contaminantes y la alta salinidad (Steger *et al.*, 2002), es relevante para comprender la biogeoquímica de contaminantes en diversos ecosistemas, especialmente en aquellos impactados por arsénico por el posible rol en el ciclaje de este contaminante como BSR (Mukhopadhyay *et al.*, 2000). Por ello, el estudio del efecto en el crecimiento de dicha especie es información relevante para mejorar el entendimiento de su rol en el ciclo del arsénico.

Como proceso complementario a la selección de medios de cultivos adecuados para experimentos que evalúan el efecto de As en el crecimiento de *H. aestuarii*, los medios 195c modificados (según lo planteado en la sección 4.1) fueron inoculados y enmendados con concentraciones de arsénico a niveles ambientales (concentraciones menores a 0,5 y 5 mM de As(III) y As(V) respectivamente). Luego, el crecimiento de la *H. aestuarii* en estas condiciones fue analizado por espectrofotometría.

Posteriormente, se llevaron a cabo curvas de crecimiento en presencia de concentraciones ascendentes de As. Estos resultados fueron contrastados con curvas de crecimiento realizadas con *G. sulfurreducens*, una especie de bacteria ferro reductora que ha sido utilizada como modelo de estudio (Lovley, D. *et al.*, 2011). Diversas cepas de *Geobacter* presentan mecanismos de detoxificación de arsénico a través de la reducción de As(V) a As(III) y su expulsión a través de la bomba de eflujo Acr3 (Dang, Y. *et al.*, 2017). Debido a su relativa cercanía evolutiva resulta pertinente el contraste con *H. aestuarii* como control positivo de dichos mecanismos.

El análisis fue realizado en base a As (III) y As(V) que son las formas de arsénico inorgánico predominantes en la naturaleza:

4.2.1 Arsenito de Sodio [As(III)]

4.2.1.1 *Halodesulfovibrio aestuarii*

a) M195c tradicional

En medio 195c tradicional y enmendado con 0,1 mM de arsenito de sodio, fue inoculado *Halodesulfovibrio aestuarii*. Esta demostró un rápido crecimiento en condiciones de ausencia de arsénico (Figura 42), con una etapa de latencia que no sobrepasa las 10 horas y alcanzando rápidamente la máxima OD de 0,402 alrededor de las 35 horas. El crecimiento de esta se identifica por la formación de una abundante y marcada biopelícula de color gris a negro, característico de BSR y la generación de sulfuros de hierro por el sulfhídrico producido de la actividad metabólica (Figura 43.A).

Halodesulfovibrio aestuarii
M195c 1.67mM Na₂S
As (III)

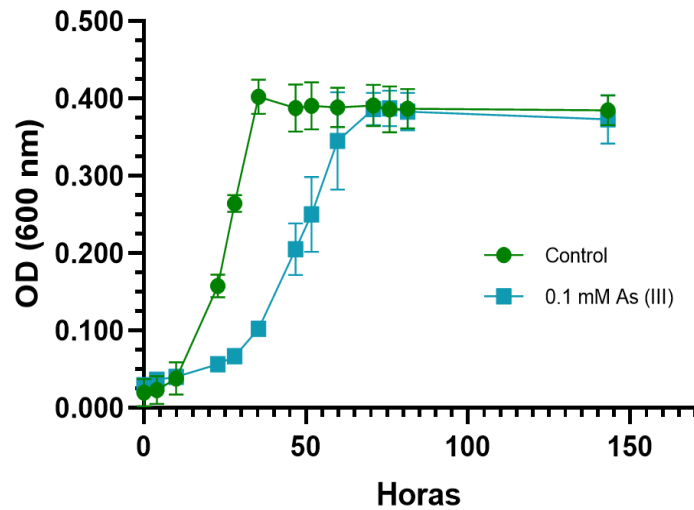


Figura 42. OD de curva de crecimiento de *Halodesulfovibrio aestuarii* en medio DSMZ 195c tradicional (1,67 mM de Na₂S como agente reductor), a distintas concentraciones de Arsenito de Sodio [As(II)]: Control 0mM, 0,1 mM, en triplicado.

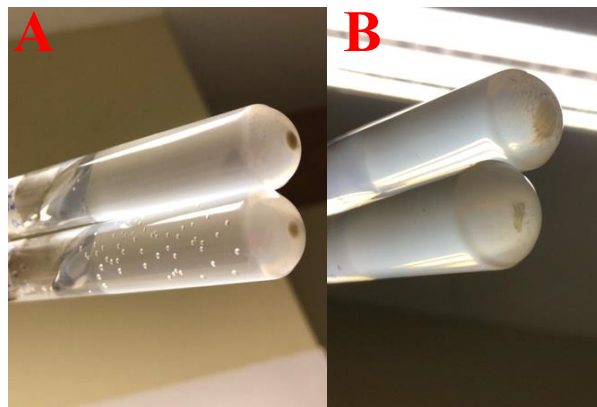


Figura 43. Comparativa entre la biopelícula de *Halodesulfovibrio aestuarii* con y sin 0,1 mM de arsenito de sodio. A la izquierda, inoculo sin arsénico, mientras que a la derecha, inoculo con arsénico. Aunque se denota una diferencia en la morfología macroscópica de la biopelícula, al cabo de dos días, ambas biopelículas son similares entre sí, con biopelículas claramente delimitadas y de un color grisáceo oscuro.

A 0,1 mM de As(III), el crecimiento se ve ralentizado, alcanzando OD máximas similares a su contraparte sin arsénico al doble del tiempo. La biopelícula generada es similar a su contraparte (Figura 43.B), aunque débil a la remoción mecánica. Esto podría dar cuenta del estrés biológico generado por el contaminante, que desvía parte del balance energético utilizado para el crecimiento y reproducción celular a la adaptación y sobrevivencia ante dicho estrés. Igualmente, el arsenito podría estar interfiriendo con la síntesis o secreción de sustancias poliméricas extracelulares de la biopelícula, lo que puede llevar a una biopelícula estructuralmente más débil y menos adhesiva.

Los parámetros cinéticos calculados a través de la linealización de la OD (Figura E - 3) presentados en la Tabla 15.

Tabla 15. Parámetros cinéticos de crecimiento para *Halodesulfovibrio aestuarii* en M195c con Na₂S como agente reductor, en ausencia y presencia de As(III). Gráfico de linealización presentado en Anexos E.

Muestras Na ₂ S	m = μ (h ⁻¹)	t _D (h)	Lag (h)	OD _{Max}	Hora de OD _{max}
Control (Sin As)	0,0954	7,27	10	0,402	35,3
Con As 0,1 mM	0,0500	13,86	28	0,387	75,8

En ningún caso se logra evidenciar precipitado amarillo de sulfuros de arsénico, lo que indica que la concentración de As(III) es suficientemente baja para no ser termodinámicamente favorable la precipitación o que este proceso se genera a baja producción y es enmascarado ante la presencia de sulfuros de hierro y/o co-precipitados de sulfuros de hierro y arsénico de color negro.

b) M195c modificado con Ci-Ti(III)

En este medio de cultivo, *H. aestuarii* demostró un rápido crecimiento en condiciones de ausencia de arsénico (Figura E - 1), con una etapa de latencia que no sobrepasa las 5 horas, alcanzando rápidamente la máxima OD de 0,552 alrededor de las 36 horas (Figura 44), siendo levemente más rápida que en M195c tradicional pero alcanzando una mayor OD. La biopelícula generada se

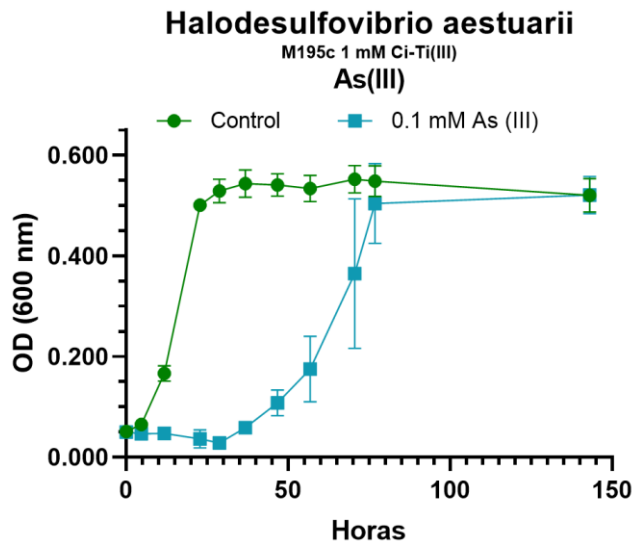


Figura 44. OD de curva de crecimiento de *Halodesulfovibrio aestuarii* en medio DSMZ 195c con 1 mM de Ci-Ti(III) como agente reductor, a distintas concentraciones de Arsenito de Sodio [As(II)]: Control 0mM, 0,1 mM y 1,0 mM, en triplicado.

diferencia del caso anterior, con sulfuro de sodio, al ser marrón en todos los casos (sin y con arsénico) evidenciándose mayormente dicha diferencia en muestras con arsénico (Figura 45).



Figura 45. Precipitado marrón en M195c modificado con 1mM Citrato de Titanio (III) como agente reductor, emendado con 0,1 mM de As(III). A la izquierda, biopelícula de *Halodesulfobivrio aestuarii* en tubos con y sin arsénico (primer tubo de la izquierda). A la derecha, control abiótico. Notar que este último, además demuestra un aumento del potencial reductor indicado por el cambio de color de la resazurina a rosado (resorufina).

La enmienda de 0,1 mM de arsenito de sodio en el medio genera que el crecimiento de *Halodesulfobivrio aestuarii* se vea perjudicado, aumentando drásticamente el tiempo de latencia, aunque igualmente alcanza rangos de OD similares a su contraparte sin arsénico.

Al igual que en medio 195c tradicional, la inoculación con adición de mayores concentraciones a 0,5 mM de As(III), incluyendo esta cantidad, produce precipitación de sulfuros de arsénico amarillo (Figura 46).

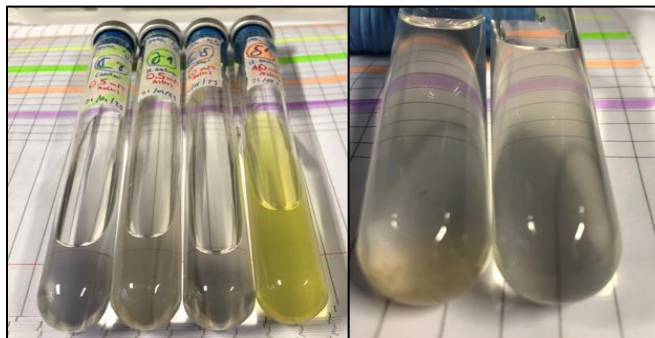


Figura 46. Precipitado en muestras de M195c con 1 mM de Citrato de Titanio. A) En orden de izquierda a derecha: control 0,5 mM As(III), muestra 0,5 mM As(III) inoculada, control abiótico con 1 mM de As(III) y muestra de 1 mM As(III) inoculado. B) Acercamiento a muestras con 0,5 mM de As(III), inoculado y control abiótico a la izquierda y derecha respectivamente.

Los parámetros cinéticos calculados a través de la linealización de la OD (Figura E - 1) presentados en la Tabla 16.

Tabla 16. Parámetros cinéticos de crecimiento para *Halodesulfovibrio aestuarii* en M195c con Ci-Ti(III) como agente reductor, en ausencia y presencia de As(III). Linealización de absorbancia en Anexos E.

Muestras Ci-Ti(III)	$m = \mu$ (h ⁻¹)	t_D (h)	Lag (h)	OD _{Max}	Hora de OD _{max}
Control (Sin As)	0,1114	6,22	4,67	0,552	36,8
Con As 0,1 mM	0,0514	13,49	46,67	0,521	76,8

Citrato de titanio (III) como agente reductor en cultivo puro de *Halodesulfovibrio aestuarii* generó un presumiblemente mayor crecimiento microbiano que, sin embargo, podría haber sido sobreestimado por la presencia del precipitado descrito.

c) M195c modificado con HCl-Cisteína

Halodesulfovibrio aestuarii, en Medio 195c modificado con HCl-Cisteína como agente reductor demostró un rápido crecimiento en condiciones de ausencia de arsénico, con una etapa de latencia que no sobrepasa las 6 horas y alcanzando rápidamente la máxima OD de 0,470 alrededor de las 48 horas (Figura 47). Igual que en los casos anteriores, su biopelícula es abundante de color negro (Figura 48). Sin embargo, la abundancia de dicha biopelícula es inversamente proporcional a la

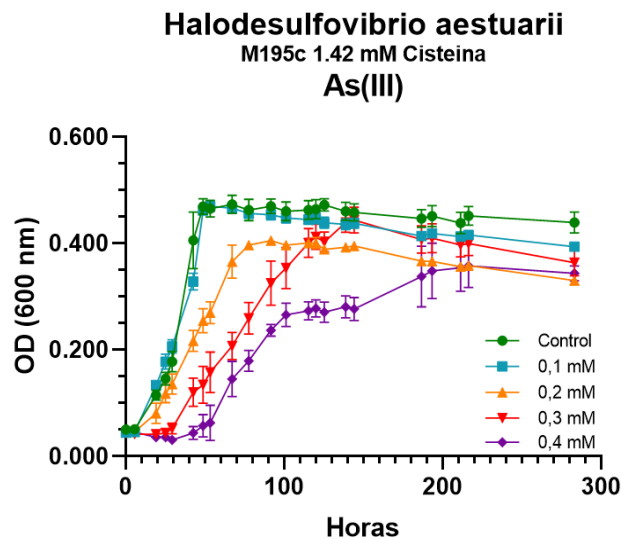


Figura 47. OD de curva de crecimiento de *Halodesulfovibrio aestuarii* en medio DSMZ 195c con 1,42 mM de HCl-Cisteína como agente reductor, a distintas concentraciones de Arsenito de Sodio [As(II)]: Control sin As y 0,1, 0,2, 0,3 y 0,4 mM en triplicado.

concentración de As (III).



Figura 48. Diferencias en la formación de biopelícula de *Halodesulfobivrio aestuarii* en presencia y sin arsenito de sodio As(III). A la izquierda, inóculos sin arsénico, a la derecha réplicas de inóculos con 0,1 mM de As(III) en contraste con control sin inoculo.

Enmendar el medio con concentraciones crecientes de As (III) genera un gradiente en las curvas de crecimientos, aumentando la fase de latencia y el tiempo de duplicación a mayores concentraciones. Igualmente, la OD máxima alcanzada y la velocidad específica de crecimiento disminuyen paulatinamente bajo el mismo régimen, sin evidenciar un cambio drástico entre una u otra condición (Tabla 17). Esto da evidencia de la adaptación de la especie a As(III) a un coste energético.

Tabla 17. Parámetros cinéticos de crecimiento para *Halodesulfobivrio aestuarii* en M195c con HCl-Cisteína como agente reductor, en ausencia y presencia de As(III).

Muestras Cisteína – As(III)	$m = \mu (h^{-1})$	$t_D (h)$	Lag (h)	OD _{Max}	Hora de OD _{max}
Control (Sin As)	0,0504	13,75	5,50	0,470	48,8
0,1 mM	0,0398	17,42	5,50	0,470	53,3
0,2 mM	0,0306	22,65	5,50	0,405	91,5
0,3 mM	0,0172	40,30	29,33	0,444	144,0
0,4 mM	0,0181	38,30	53,33	0,358	211,2

La nula presencia de precipitado de sulfuros de arsénico amarillos ninguna condición estudiada, indica que, pese a ser una sulfato reductora, su principal mecanismo de acción no corresponde a la precipitación de este compuesto. La precipitación de sulfuros de arsénico es algo que se ha observado en otras BSR como *Desulfotomaculum auripigmentum* (Newman, D. *et al.*, 1997a) y *Desulfovibrio vulgaris* (Burton, E. *et al.*, 2013) o que esta especie presenta no solo un mecanismo de detoxificación (expulsión de As(III) a través de una bomba de eflujo) sino que abate As(III) del medio con otro mecanismo, por ejemplo, la metilación y volatilización de este. La biometilación de As(III), podría estar disminuyendo la concentración de As(III) hasta un punto desfavorable termodinámicamente para la generación de As₂S₃, ya que estos compuestos tienden a ser volátiles (Bentley, R. y Chasteen, T., 2002). También (Newman, D. *et al.*, 1997a) indica que las altas concentraciones de S(-II) que produce *Desulfotomaculum auripigmentum* en su metabolismo

provoca la formación de la especie acuosa $\text{HAS}_3\text{S}_6^{2-}$ en lugar de As_2S_3 y, por lo tanto, la dilución del precipitado a concentraciones cercanas a 1 mM de sulfuro, algo que podría ocurrir con *Halodesulfobivrio aestuarii*.

Tampoco se evidencian otro tipo de precipitados, como los observados en la sección anterior, que afecten la calidad de las mediciones espectrofotométricas. Con ello, HCl-Cisteína se posiciona como el mejor agente reductor de los 3 examinados para el análisis del efecto en el metabolismo de *Halodesulfobivrio aestuarii* ante la exposición de As en M195c.

Los parámetros cinéticos calculados a través de la linealización de la OD (Figura E - 2) presentados en la (Tabla 17).

4.2.1.1 *Geobacter sulfurreducens*

Geobacter sulfurreducens, como BFR, es un principal vector de la liberación de As adherido a minerales de hierro (Ohtsuka *et al.*, 2013).

En medio DSMZ 826 *Geobacter sulfurreducens* fue inoculado. Esta especie demostró un rápido crecimiento en condiciones de ausencia de arsénico (Figura 49), con una etapa de latencia que no sobrepasa las 8 horas y alcanzando rápidamente la máxima OD de 0,743 alrededor de las 70 horas. La abundante biopelícula generada presentó un característico color naranja, propia de la especie y de su alto contenido de citocromos extracelulares de hierro (Figura 50), de acuerdo con lo expuesto por Howley, E. *et al.* (2022).

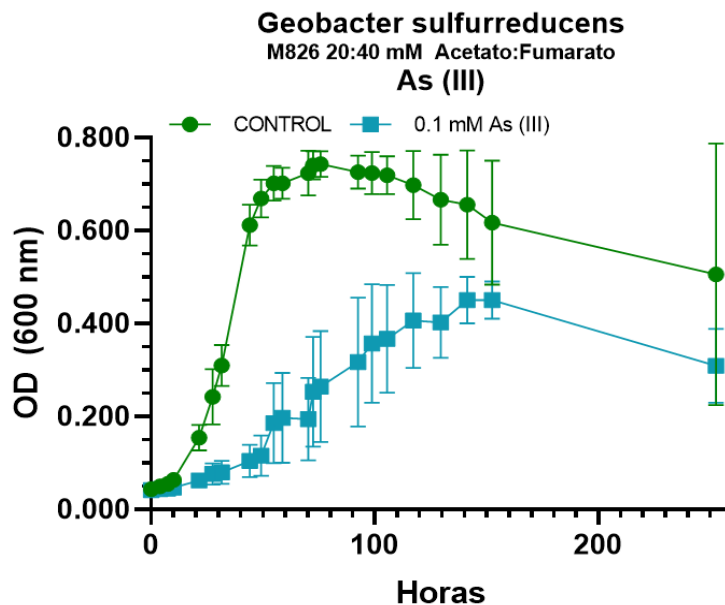


Figura 49. OD de curva de crecimiento de *Geobacter sulfurreducens* en medio DSMZ 826 con 20mM de Acetato de Sodio y 40 mM de Fumarato de Sodio, a distintas concentraciones de Arsenito de Sodio [As(III)]: Control 0mM, 0,1 mM y 1,0 mM, en triplicado.



Figura 50. Biopelícula *Geobacter sulfurreducens* en M826 de muestras con y sin As(III). A la izquierda, inóculos sin arsénico, a la derecha muestras con 0,1mM de As(III).

Enmendar el medio con 0,1 mM de As (III) generó un drástico cambio en el metabolismo de *Geobacter sulfurreducens*, en donde esta alcanzó su OD máxima lentamente posterior a las 140 horas y alcanza solo un 60% del valor de su contraparte sin arsénico. La biopelícula es escasa pero con mayor resistencia a la remoción mecánica, indicando una clara adaptación al estrés a través de la generación de exopolisacáridos que aumentan la adherencia y viscosidad de esta.

La afección en el crecimiento de *Geobacter sulfurreducens* con As(III) desvela una posible estrategia adaptativa como BFR. Si bien la bacteria reduce As(V) a As(III) para movilizarlo y liberarlo de su entorno directo, esta acción tiene consecuencias. La presencia de As(III), producto de su propia actividad, afecta negativamente su crecimiento celular. Aunque, bajo dicho entorno, la biopelícula generada es menos abundante, su resistencia mecánica aumenta notoriamente. Esta mayor fortaleza podría corresponder a una adaptación crucial que permite a *G. sulfurreducens* mantenerse firmemente adherida al mineral de hierro del cual obtiene su energía, mientras el As(III) tóxico es movilizado, mitigando el impacto negativo del arsénico, en un ambiente que ella misma ha hecho más desafiante.

En contraste, *H. aestuarii*, una BSR, no requiere mantenerse unida a minerales de hierro, y por lo tanto, ante las mismas condiciones, su biopelícula es menos resistente mecánicamente, abatiendo As(III) a través de la sulfuración o la volatilización de este a través de su metilación.

Los parámetros cinéticos calculados a través de la linealización de la OD (Figura E - 4) presentados en la Tabla 18.

Tabla 18. Parámetros cinéticos de crecimiento para *Geobacter sulfurreducens* en M826 en ausencia y presencia de NaAsO₂.

Muestras As (III)	$m = \mu$ (h ⁻¹)	td (h)	Lag (h)	OD _{Max}	Hora de Odmax
Control (Sin As)	0,0597	11,61	7,5	0,743	75,8
Con As 0,1 mM	0,0189	36,67	55	0,451	141,3

Según Dang, Y. *et al.*, (2017), *G. sulfurreducens* presenta el mecanismo de detoxificación de arsénico en su genoma, por lo que podría tener una cierta tolerancia a este contaminante. En dicho estudio, a 0,1 mM de As(III) alcanza una OD máxima de alrededor de 0,500 de absorbancia en contraste con el valor de aproximadamente 0,850 en el control sin arsénico, significando una reducción de alrededor del 41,2%, similar a lo obtenido con una reducción del 40% bajo la misma concentración de arsenito.

4.2.2 Arseniato de Sodio Heptahidratado [As(V)]

a) *Halodesulfovibrio aestuarii*

En medio 195c enmendado con concentraciones crecientes de As(V) (0,5, 1, 3, 5 mM) fue inoculado *Halodesulfovibrio aestuarii*. El metabolismo de esta especie es drásticamente afectado ante la presencia de este contaminante (Figura 51) disminuyendo la OD máxima desde un 50% hasta el 22% de su valor original en las concentraciones extremas respectivamente (0,5 y 5 mM). Sin embargo, la fase de latencia solo incrementa a concentraciones altas de arseniato, y la velocidad específica de crecimiento no presenta variaciones marcadas en comparación al valor original (0,0561 h⁻¹).

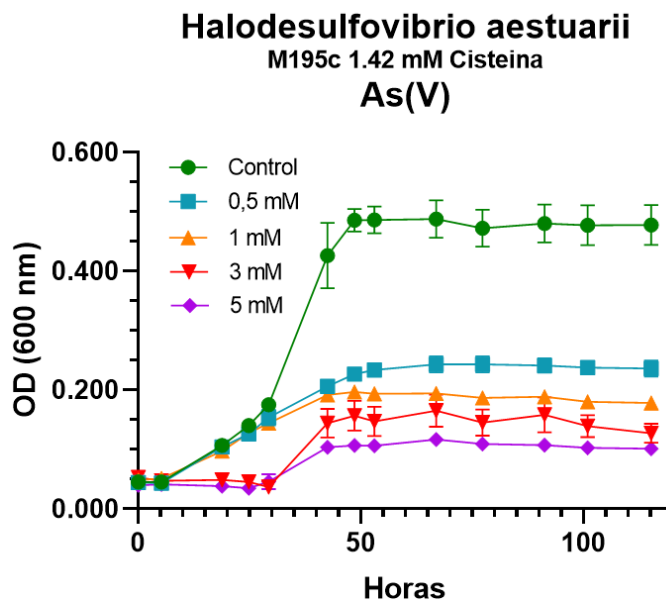


Figura 51 . OD de curva de crecimiento de *Halodesulfovibrio aestuarii* en medio DSMZ 195c con 1,42 mM de HCl-Cisteína como agente reductor, a distintas concentraciones de Arseniato de Sodio [As(V)]: Control 0mM, 0,5, 1, 3 y 5 mM en triplicado.

El cambio drástico de los parámetros cinéticos de las curvas de crecimientos de *Halodesulfovibrio aestuarii* (Figura E - 6) ante la presencia de As (V) (Tabla 19) indican su sensibilidad a dicho contaminante y que existe un gasto energético que la especie realiza para su supervivencia bajo dicho estrés. La reducción de As(V) a As(III) requiere de ATP para su realización. Además, el aumento constante de la concentración de arsenito en el medio producto de la reducción de As(V),

podría alcanzar valores tales que inhiban el crecimiento y reproducción de *Halodesulfovibrio aestuarii*.

Tabla 19. Parámetros cinéticos de crecimiento para *Halodesulfovibrio aestuarii* en M195c con HCl-Cisteína como agente reductor, en ausencia y presencia de As(V).

Muestras Cisteína – As(V)	$m = \mu$ (h ⁻¹)	td (h)	Lag (h)	OD _{Max}	Hora de OD _{max}
Control (Sin As)	0,0561	12,36	5,25	0,486	48,6
0,5 mM	0,0261	26,56	5,25	0,243	66,9
1 mM	0,0357	19,42	5,25	0,197	48,6
3 mM	0,0800	8,66	29,33	0,157	48,6
5 mM	0,0621	11,16	29,33	0,107	48,6

La biopelícula generada es abundante y de color negro, no evidenciándose en ningún momento precipitado amarillo de sulfuro de arsénico. Por otro lado, transcurridas 2 semanas de la inoculación, se evidencia en las muestras de 0,5 mM y 1 mM de As(V) un “crecimiento vertical”, por las paredes de los tubos, revelando también una sección de la biopelícula en suspensión al centro de estos (Figura 52).



Figura 52. Crecimiento de biopelícula de *Halodesulfovibrio aestuarii* por paredes de los tubos de ensayo, solo evidenciado en muestras con As(V) 0,5 y 1mM y en las 3 réplicas respectivas.

La formación de un compuesto menos denso que el medio acuoso podría suspender dicha película o generar la presión ascendente necesaria para que esta crezca de dicha manera. De ser así, As(III) metilado, el cual es altamente volátil, podría ser un promotor de dicha condición, además de que podría acumularse en los intersticios de la biopelícula, disminuyendo así la densidad promedio de esta. Sin embargo, se requiere un análisis minucioso de la generación de este compuesto como del efecto que podría tener en la formación de la biopelícula de *Halodesulfovibrio aestuarii*.

Por otro lado, al igual que anteriormente, no se observa la precipitado de sulfuros de arsénico amarillo u otros precipitados que puedan perjudicar la toma de datos espectrofotométricos.

b) *Geobacter sulfurreducens*

Enmendar medio 826 con arseniato de sodio [As(V)] a 1, 2, 4, 5 mM generó la disminución drástica del metabolismo de *Geobacter sulfurreducens* (Figura 53), aumentando cuantiosamente el tiempo de latencia y adaptación.

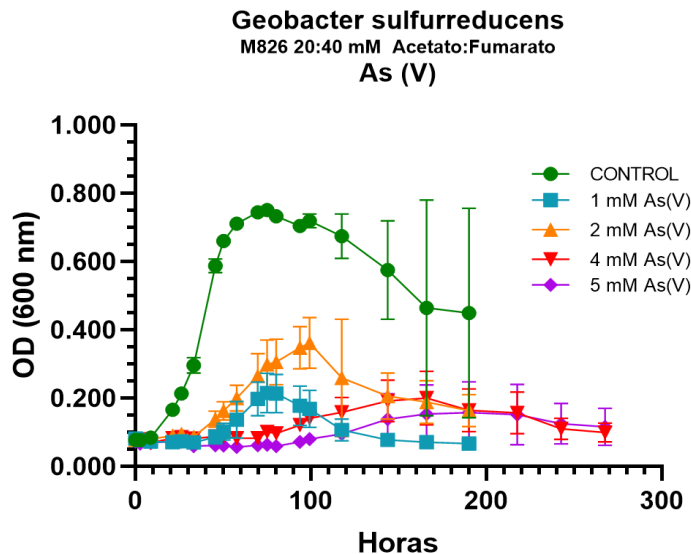


Figura 53. OD de curva de crecimiento de *Geobacter sulfurreducens* en medio DSMZ 826 con 20mM de Acetato de Sodio y 40 mM de Fumarato de Sodio, a distintas concentraciones de Arseniato de Sodio [As(V)]: Control 0mM, 1, 2,4 y 5 mM, en triplicado.

También, la disminución drástica de la OD registrada posterior a que se alcanza la OD máxima (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) podrían ser indicio de que, ante la reducción de As(V) a As(III) aumentó las concentraciones de este último en el medio hasta una condición letal. También, el tratamiento de 2 mM alcanzó mayores rango de OD que la condición a 1 mM, lo que podría ser indicio de que el mecanismo de detoxificación de arsénico requiere de un cierto rango de concentración de arsénico para activarse de manera más rápida y eficiente, que permita la adaptación y supervivencia de la especie ante dicha fuente de estrés.

Los parámetros cinéticos son calculados a través de la linealización de la OD (Figura E - 5) presentados en la Tabla 20.

Tabla 20. Parámetros cinéticos de crecimiento para *Geobacter sulfurreducens* en M826 en ausencia y presencia de As(V).

Muestras As(V)	$m = \mu$ (h ⁻¹)	td (h)	Lag (h)	OD _{Max}	Hora de OD _{max}
Control (Sin As)	0,0492	14,09	8,83	0,751	80,3
1 mM	0,0290	23,90	45,50	0,215	80,3

2 mM	0,0290	23,90	33,33	0,362	99,2
4 mM	0,0102	67,96	80,33	0,201	165,9
5 mM	0,0103	67,30	99,17	0,158	190,1

La biopelícula generada (Figura 54), al igual que en medio 826 emendado con As(III), es escasa y delgada pero más resistente mecánicamente que su versión sin este contaminante como también de la generada por *Halodesulfobivrio aestuarii*, dando cuenta de un posible mecanismo de acción contra el estrés generado y la necesidad de mantenerse adherido a la superficie de minerales de hierro (Lovley, D. *et al.*, 2011), principal sustrato de esta especie. Por el contrario, *Halodesulfobivrio aestuarii*, como bacteria sulfato reductora, y considerando que su principal aceptor de electrones (sulfato) se mantiene en forma acuosa (Schultze-Lam *et al.*, 1996), no requiere mantenerse adherida a un sustrato solido para asegurar la supervivencia ante la exposición a arsénico, considerando además que este compuesto puede ser volatilizado a través de su metilación o precipitado como sulfuro (Bentley, R. y Chasteen, T., 2002).



Figura 54. Biopelícula de *Geobacter sulfurreducens* en presencia de As(V). En ambas imágenes se exponen las muestras de izquierda a derecha con 1, 2, 4 y 5 mM de As(V), pero distintas replicas. En la imagen de la derecha, el ultimo tubo corresponde a solo medio 826 sin inculo o arsénico.

4.2.2 Genómica en *Halodesulfobivrio aestuarii*

Desde la base de datos generada por la secuenciación del genoma de *Halodesulfobivrio aestuarii* y posteriores anotaciones, se obtuvieron una serie de secciones codificantes de proteínas para el metabolismo central de la bacteria como para el metabolismo del arsénico del medio:

4.2.4.1 Metabolismo central

El metabolismo central esta caracterizado por la oxidación de materia orgánica a través del metabolismo del piruvato, y del proceso de respiración mediante la reducción disimilativa de sulfato a sulfuro.

Se realizo una revisión de las anotaciones del genoma de *Halodesulfobivrio aestuarii*, en específico del metabolismo del piruvato y del azufre como ejes centrales en el metabolismo de oxidación de materia orgánica y del proceso de respiración anaerobia con sulfato como aceptor de electrones respectivamente.

Nº EC	Enzima	Nº GENOMA	Reacción
1.8.1.4	Proteína-N6-(dihidrolipoil)Lisina: NAD ⁺ oxidoreductasa	188.988171_534	Proteína N6-(dihidrolipoil)Lisina + NAD ⁺ = Proteína N6-(Lipoil)Lisina + NADH + H ⁺
4.2.1.2	(S)-malato hidroliasa (formadora de fumarato)	190.641564_29	(S)-Malato = Fumarato + H ₂ O
2.3.1.8	Acetil-CoA: Fosfato acetiltransferasa	190.641565_46	Acetil-CoA + Fosfato = CoA + Acetil Fosfato
2.7.2.1	ATP: Acetato Fosfotransferasa	190.641565_45	ATP + Acetato = ADP + Acetil Fosfato
1.2.1.10	Acetaldehído:NAD ⁺ Oxidoreductasa (CoA-Acetilante)	188.988171_556	Acetaldehído + CoA + NAD ⁺ = Acetil-CoA + NADH + H ⁺
2.3.3.13	Acetil-CoA:3-methyl-2-oxobutanoato C-acetiltransferasa (tioester-hidrolisis, carboximetil-formador)	186.802132_511	acetyl-CoA + 3-methyl-2-oxobutanoate + H ₂ O = (2S)-2-isopropylmalate + CoA
2.7.9.2	ATP: Piruvato, agua fosfotransferasa	186.802132_664 180.667903_94 193.467439_245	ATP + Piruvato + H ₂ O = AMP + Fosfoenolpiruvato + Fosfato
5.1.2.1	Lactato Racemasa	180.667903_244	(S)-Lactato = (R)- Lactato
1.1.1.38	(S)-malato: NAD ⁺ oxidoreductasa (oxaloacetato-decarboxilante)	188.988171_312 193.467439_348 194.355657_66	(1) (S)-Malato + NAD ⁺ = Piruvato + CO ₂ + NADH (2) Oxaloacetato = Piruvato + CO ₂
1.3.5.1 (1.3.5.4)	Succinato: Quinona oxidoreductasa	193.467439_345 197.486982_49	Quinona + Succinato <=> Hidroquinona + Fumarato
6.2.1.1	Acetato: CoA ligasa (AMP-formadora)	188.988171_294 188.988171_608	ATP + Acetato + CoA = AMP + Difosfato + Acetil-CoA
3.6.1.7	Acil-fosfato fosfohidrolasa	186.802132_110	Acil Fosfato + H ₂ O <=> Carboxilato + Ortofosfato

Tabla 22. Enzimas evidenciadas en *D. desulfuricans* (dds00620 *Pyruvate Metabolism*) que no fueron encontradas en las anotaciones del genoma de *Halodesulfobivrio aestuarii*.

Nº EC	Código	Enzima	Reacción
Dld (1.1.99.6)	Ddes_1546	(R)-2-hidroxi-acido: Aceptor 2-Oxidoreductasa	(R)-Lactato + Aceptor <=> Piruvato + Aceptor Reducido
1.2.7.1	Ddes_0298	Piruvato-Ferredoxina/Flavodoxina Oxidoreductasa	Piruvato + CoA + 2 Ferredoxina oxidada = acetil-CoA + CO ₂ + 2 Ferredoxina reducida + 2 H ⁺
1.2.1.3	Ddes_1981	Acetaldehído: NAD ⁺ Oxidoreductasa	Aldehído + NAD ⁺ + H ₂ O <=> Acetato + NADH + H ⁺

Halodesulfovibrio aestuarii, según la anotación generada del genoma, no cuenta con 3 enzimas del metabolismo del piruvato que si están presentes en *Desulfovibrio desulfuricans*: una (R)-2-hidroxi-acido: Aceptor 2-Oxidoreductasa, encargada de la oxidación de lactato a piruvato, aunque si tiene una D-Lactato dehidrogenasa con la misma función; una Piruvato-Ferredoxina/Flavodoxina oxidoreductasa que llevaría desde Piruvato a Acetil-CoA sin intermediarios; y una Aldehído: NAD⁺ oxidoreductasa, encargada de reducir lactato a aldehído.

El genoma de *Halodesulfovibrio aestuarii* revela un metabolismo del piruvato altamente adaptado a la vida anaeróbica en un ambiente halófilo, centrado en la oxidación incompleta de sustratos como el lactato a acetato para la conservación de energía vía fosforilación a nivel de sustrato, y apoyado por vías anapleróticas encargadas de la regeneración de intermediarios reductores (Jin, Q., 2012). La presencia de las enzimas para la conversión de acetil-CoA a acetato y ATP (EC 2.3.1.8 y 2.7.2.1) sugiere fuertemente que *Halodesulfovibrio aestuarii* opera como un oxidante incompleto de sustratos orgánicos, al igual que otras BSR (Barton, L. y Fauque, G., 2022). La Hidroxiacilglutación Hidrolasa (3.1.2.6) está involucrada en el metabolismo del glutatión, importante para la protección contra el estrés oxidativo o el manejo de subproductos tóxicos del metabolismo (Smirnova, G. y Oktyabrsky, O., 2005). Esto podría ser relevante en un ambiente estuarino donde pueden ocurrir fluctuaciones en las condiciones como también ante la presencia de agentes altamente reactivos y tóxicos como lo es el arsénico (Del Razo, L. *et al.*, 2001).

b) Metabolismo del Azufre

En el metabolismo del sulfato, a través de KBase se evidencian solo 3 estructuras (Figura 56), sin embargo, la búsqueda retroactiva arroja la presencia de 6 estructuras proteicas más que son parte del metabolismo. Todas estas son listadas en la Tabla 23. Por su parte, existen algunas enzimas y estructuras que están presentes en *Desulfovibrio desulfuricans* pero que no fueron evidenciadas en las anotaciones del genoma de *Halodesulfovibrio aestuarii*, las que son enlistadas en la Tabla 24.

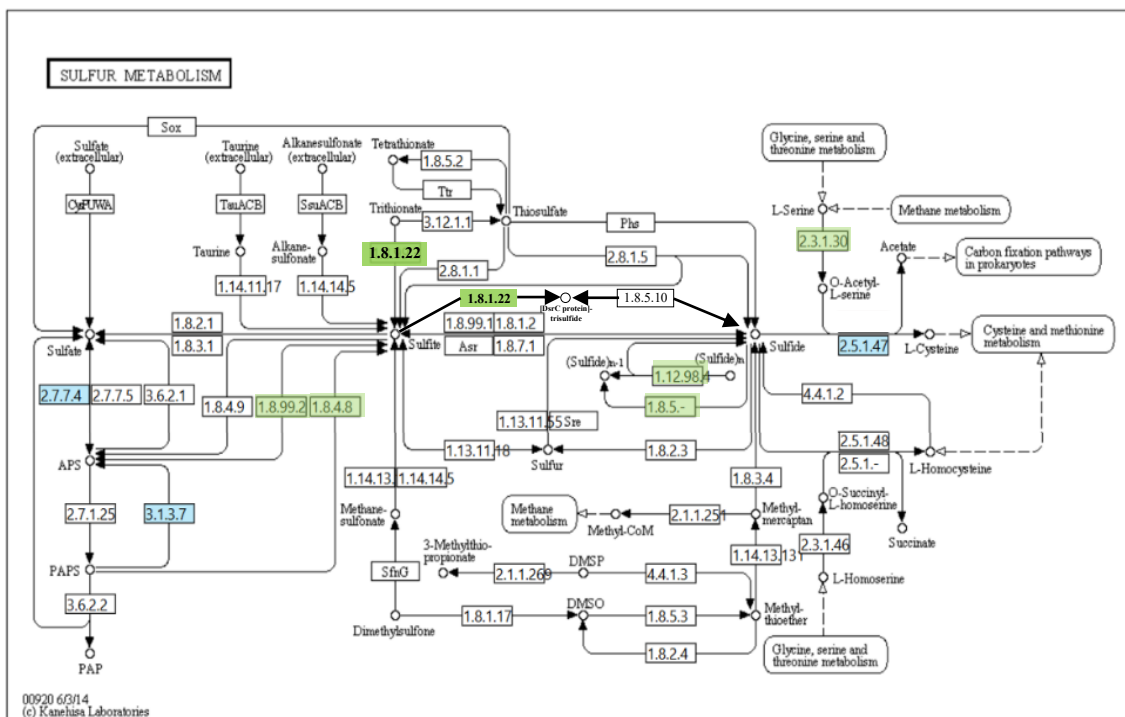


Figura 56. Metabolismo del Sulfato y enzimas encontradas en las anotaciones del genoma de *Halodesulfovibrio aestuarii* a través de KBase (indicadas en celeste) y encontradas a través de una búsqueda directa (verde). Diagrama extraído de KEGG – Kanehisa Laboratories (2014).

Tabla 23. Resumen de enzimas encontradas en las anotaciones del genoma de *Halodesulfovibrio aestuarii* involucradas en el metabolismo del azufre.

Nº EC	Enzima	Nº GENOMA	Reacción
2.7.7.4	Sulfato Adenilil Transferasa	186.802132_269	ATP + Sulfato → PP _i + APS
3.1.3.7	3' fosfo 5-Adenilil sulfato 3' fosfo hidrolasa	188.988171_322	H ₂ O + PAPS → Fosfato + APS
2.5.1.47	3-acetil-L-serina hidrogeno de sulfuro 2 amino-2-carboxi etil transferasa	188.988171_588	O-Acetil-L-Serina → L-Cisteína
1.8.99.2	Oxidoreductasa	Subunidad A: 193.467439_94 Subunidad B: 193.467439_95	AMP + Sulfito + FAD → Adenilil sulfato + FADH ₂
1.8.5.4	Oxidoreductasa Quinona	186.802132_544	nHS ⁻ + n Quinona → Polisulfuro + n Hidroquinona
2.3.1.30	Serina O-Acetil transferasa	188.988171_587	L-Serina + Acetil-CoA → O-Acetil-L-Serina + CoA

1.8.1.22	[proteína DsrC]- trisulfuro NAD ⁺ Oxidoreductasa Tritionato, NAD ⁺ Oxidoreductasa	188.988171_268	Proteína-trisulfuro + NAD ⁺ + 3H ₂ O → Proteína-ditiol + sulfuro + NADH + H ⁺ Tritionato + HO ⁻ + NAD ⁺ + 2 H ₂ O <=> 3 HSO ₃ ⁻ + NADH + H ⁺
1.8.4.8	PAPS reductasa, tioredoxina- dependiente	180.667903_531	Adenosina 3',5'-Bisfosfato + Sulfito + Tioredoxina disulfuro = 3'-Fosfoadenilil Sulfato + Tioredoxina
1.12.98.4	H ₂ :polisulfuro oxidoreductasa	Subunidad β: 186.802132_160 Subunidad γ: 186.802132_161	H ₂ + (Sulfuro) _n = H ₂ S + (Sulfuro) _{n-1}

Tabla 24. Enzimas evidenciadas en *D. desulfuricans* (dds00920 Sulfur Metabolism) que no fueron encontradas en las anotaciones del genoma de *Halodesulfovibrio aestuarii*.

Nº EC	Código	Enzima	Reacción
SsuaACB (7.6.2.14)	Ddes_0572	Proteína de Unión a ATP del Sistema de Transporte de Sulfonato	ATP + H ₂ O + Sulfonato alifático-[proteína de unión a sulfonato][lado 1] = ADP + Fosfato + Sulfonato alifático [lado 2] + [proteína de unión a sulfonato][lado 2]
2.7.1.25	Ddes_0122	Adenililsulfato Quinasa	ATP + Adenilil Sulfato = ADP + 3'-Fosfoadenilil Sulfato
1.8.5.10	Ddes_0447 Ddes_0448 Ddes_0449 Ddes_0450 Ddes_0451	H ₂ S: [DsrC proteína]-ditiol Oxidoreductasa (Formadora de trisulfuro)	H ₂ S + a [DsrC Proteína]-ditiol + 2 Quinona = a [DsrC Proteína]-Trisulfuro + 2 Quinol
2.3.1.46	Ddes_1078	Succinil-CoA: L-Homoserina O-Succiniltransferasa	Succinil-CoA + L-Homoserina = CoA + O-Succinil-L-Homoserina

El perfil enzimático del metabolismo del azufre en *Halodesulfovibrio aestuarii* confirma su rol como una bacteria sulfato reductora estricta anaerobia. Se evidencia claramente las vías para la reducción disimilatoria de sulfato (activación de sulfato a APS y el sistema Dsr para la reducción posterior a H₂S), que es su principal mecanismo de obtención de energía (Barton, L. y Fauque, G., 2022). Además, posee las vías para la reducción asimilatoria de sulfato y la síntesis de cisteína, esenciales para su crecimiento y biosíntesis (Jin, Q., 2012). La capacidad de utilizar hidrógeno como donador de electrones, a través de la H₂:Polisulfuro Oxidoreductasa (EC 1.12.98.4), también es un rasgo notable y algo común en especies de BSR (Muyzer, G. y Stams, A., 2008).

Sin embargo, la ausencia explícita de la APS reductasa (que reduce APS a sulfito) es un punto relevante a revisar en detalle. Dada la presencia de la sulfato adenilil transferasa y las enzimas Dsr, sería bioenergéticamente inexplicable que esta enzima no estuviera presente. Esto podría deberse a una anotación genérica o a la existencia de una enzima con una especificidad diferente pero una función similar.

4.2.4.2 Metabolismo del arsénico

El metabolismo del arsénico se caracteriza por ser una extensa red con múltiples caminos dependiendo de las especies en estudio (Figura 11). En las anotaciones del genoma de *Halodesulfovibrio aestuarii* se evidenciaron estructuras asociadas a los mecanismos de supervivencia y control ante la presencia de arsénico, las que son presentadas en la Tabla 25.

En base a estas estructuras evidenciadas en las anotaciones del genoma, es representado en la Figura 57 el mecanismo hipotético de *Halodesulfovibrio aestuarii* frente al estrés generado por la presencia de As(III) y As(V) en el medio.

Tabla 25. Estructuras evidenciadas en la base de datos de las anotaciones del genoma de *H. aestuarii* provistas por el Dr. R. Orellana.

Ortología Kegg (EC)	Posición del gen	Detección
K03892	- 186.802132_213 - 188.988171_261 - 188.988171_572	Regulador transcripcional de la familia ArsR , represor transcripcional sensible a arseniato/arsenito/antimonio
K03325	- 188.988171_262	Transportador de arsenito de la familia de simportadores de ácidos biliares de sodio (ACR3/ArsB)
K07755 (2.1.1.137)	- 188.988171_441	Arsenito metiltransferasa (ArsM)
K03741 (1.20.4.1)	- 188.988171_571	Arsenato reductasa (tiorredoxina) (ArsC)
K13993	- 180.667903_542 - 180.667903_597 - 193.467439_296	Proteína de la familia HSP20 (dominio encontrado en ArsA)

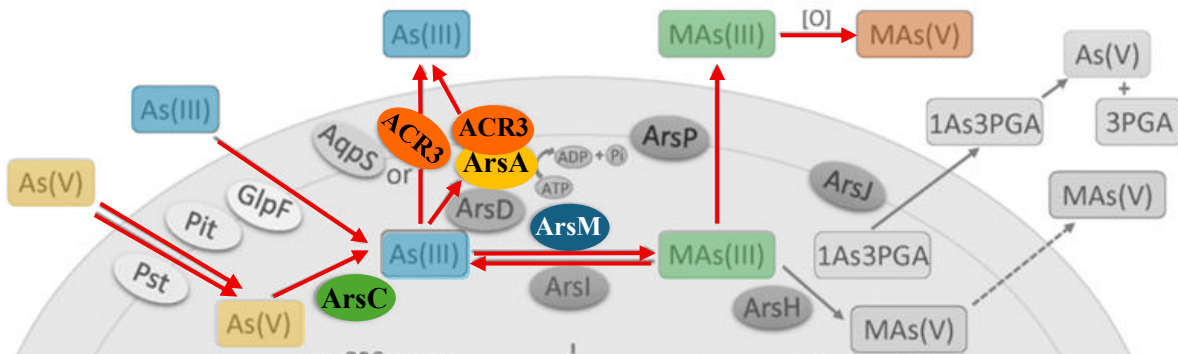


Figura 57. Diagrama del mecanismo de acción hipotético (coloreado) de *Halodesulfovibrio aestuarii* frente al estrés de la presencia de As(III) y As(V), en base al diagrama descrito por Yan et al. (2019b) y a las observaciones de la base de datos de anotaciones del genoma de dicha especie.

Generalmente, las BSR habitan entornos geoquímicos ricos en metales y metaloides, como estuarios, sedimentos marinos y acuíferos contaminados (William y Magpantay, 2024) donde el

arsénico puede ser prevalente (Burton, E. *et al.*, 2013), por lo que, la capacidad para metabolizar este elemento es una adaptación crítica para su supervivencia.

El genoma de *Halodesulfobivrio aestuarii* indica claramente que este microorganismo ha desarrollado mecanismos robustos para la resistencia y posiblemente el metabolismo del arsénico. ArsR es una proteína reguladora que controla la expresión de los operones de resistencia al arsénico, en respuesta a la presencia de arsenito, arseniato y/o antimonito (Rawle, R. *et al.*, 2021). Esto significa que *H. aestuarii* presenta un sistema de detección y respuesta inducible al arsénico, permitiéndole activar sus mecanismos de detoxificación solo cuando es necesario, lo que le confiere una ventaja energética (Dhuldhaj, U. *et al.*, 2012).

También, la presencia de un transportador de arsenito de la familia de simportadores de ácidos biliares de sodio indica la capacidad de extruir As(III) fuera de la célula, mecanismo ampliamente presente en BSR (William y Magpantay, 2024). Sin embargo la familia de simportadores de ácidos biliares indica esta corresponde a una *acr3* y no a una *ArsB* (H. C. Yang *et al.*, 2012).

Igualmente, la arseniato reductasa (*ArsC*) corresponde a uno de los principales mecanismos de detoxificación contra el arsénico (Martin *et al.*, 2001), catalizando la reducción de As(V) a As(III) más tóxico pero de mayor movilidad (William y Magpantay, 2024). Esta estructura puede utilizar glutarredoxina o tiorredoxina, siendo esta última la evidenciada en las anotaciones del genoma.

Las proteínas de choque térmico HSP20 (Heat Shock Protein 20kDa), están relacionadas con la respuesta ante estrés físico-químicos, actuando como chaperonas moleculares que previenen de agregaciones proteicas y malformaciones de proteínas (Sato *et al.*, 2024). En *Halodesulfobivrio aestuarii*, podrían tener un importante rol ante el estrés de concentraciones crecientes de arsénico, y es que su estructura, según es mencionado por la base de datos de InterPro (registro PF17886.4) es similar a la encontrada en la *ArsA* (Blum, M. *et al.*, 2025), una ATPasa que hidroliza ATP para suministrar el potencial requerido para la actividad de *ArsB* (Rosen *et al.*, 1992).

Finalmente, la presencia de una arsenito metiltransferasa indica la capacidad de *Halodesulfobivrio aestuarii* para metilación del arsenito (As(III)) produciendo compuestos orgánicos de arsénico (como mono-, di- y trimetilarsinas) (Packianathan, C. *et al.*, 2018). La metilación es otra estrategia de detoxificación en muchos organismos, ya que los compuestos metilados de arsénico suelen ser menos tóxicos y más volátiles, lo que facilita su eliminación del sistema celular (Dhuldhaj, U. *et al.*, 2012). Esto indica una estrategia de resistencia más sofisticada que la simple extrusión de arsénico al ambiente.

4.3 MEDICIÓN DE AS EN MUESTRAS DE CULTIVO

Para examinar la especiación del arsénico en el medio de cultivo con un inóculo de *Halodesulfobivrio aestuarii* y, de esta manera, tener evidencias de la expresión de los mecanismos de defensa contra este contaminante de dicha especie, se probaron modificaciones de dos metodologías de análisis de rápida y fácil reproducción, uno cuantitativo mediante uso de espectrofotómetro, y otro cualitativo mediante la precipitación de sales de plata.

4.3.1 Metodología Cuantitativa: Medición espectrofotométrica

Se realizó el procedimiento descrito en la sección 3.4.1 con estándar de arsenito de sodio, generando las curvas de calibración entregadas en la Figura B - 1 y Tabla B - 2, y el resultado de las muestras son indicadas en la Tabla 26 (en detalle en la Tabla B - 4).

Tabla 26. Resultados de absorbancia de muestras con inoculo de *Halodesulfobivrio aestuarii* (I) y control sin inoculo (C) con 0, 0,1, 0,2, 0,3 y 0,4 mM de As(III). La absorbancia corregida es obtenida restando el valor generado en el control 0 mM respectivo (I o C).

Muestra As(III)	I_0	I_0,1	I_0,2	I_0,3	I_0,4	C_0	C_0,1	C_0,2	C_0,3	C_0,4
ABS	0,511	0,515	0,480	0,475	0,595	0,351	0,357	0,395	0,392	0,3395
ABS corregida	0,000	0,004	-0,031	-0,036	0,084	0,000	0,006	0,044	0,041	-0,0115
[As(III)] mM muestra	0	0,113	-0,874	-1,015	2,369	0	0,169	1,241	1,156	-0,324

Realizar el procedimiento para arsénico total (con la adición de KI) en M195c sin diluir genera un fuerte color amarillo ámbar, además de un característico precipitado negro ante la adición de yodato y HCl (Figura 58.A). Dicho color es indicado por Stancheva, K. y Pasha, C. (2016) y por Tiwari, K. (2010) como una coloración tenue que no influye en la posterior medición, y que corresponde a la formación de I₂. Sin embargo, la presencia de precipitado negro podría indicar la formación de otros compuestos insolubles de sulfuro (Lewis, A., 2010). Este sólido es solubilizado ante la adición de LVM y solución buffer, pero la solución es coloreada con un denso verde oscuro (Figura 58.B) que, al medir la absorbancia, estas dan valores mayores a 3 (valores no mostrados) en todas las concentraciones de As(III) trabajadas (0 a 5 µg L⁻¹).

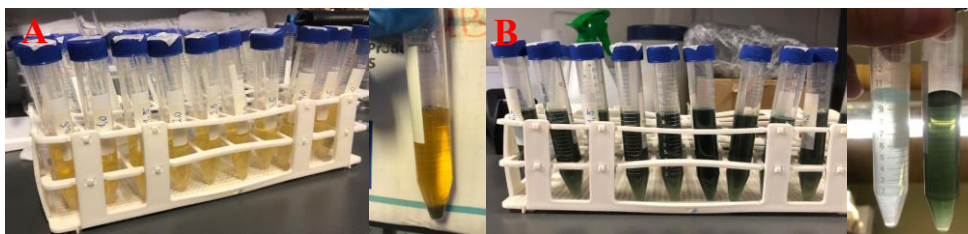


Figura 58. Muestras de medio M195c con concentraciones desde 0 a 5 µg L⁻¹ de As(III) bajo procedimiento con KI. Notar precipitado negro y coloración amarilla (A), que al adicionar la LVM con la solución buffer, se torna de un verde negro (B).

Las muestras diluidas 1:500, durante el procedimiento, se caracterizan por un fuerte color cian, similar a lo apreciado en las soluciones estándar concentradas (Figura 59.A). Sin embargo, al aplicar el procedimiento para la medición de arsénico total (con la adición de KI), estos se tornan a un color verde oscuro (Figura 59.B) (valores de absorbancia en Tabla B - 3).



Figura 59. Diferencia de color de muestras con (I) y sin inoculo (C) en el tratamiento con KI previo al procedimiento con LVM (derecha) y sin este (izquierda).

Las concentraciones de las muestras estimadas bajo la corrección con el control sin arsénico no representan la cantidad adicionada en los tubos originalmente, estando altamente sobreestimadas o resultando en valores negativos. Esto podría indicar que, pese a una alta dilución, la influencia de compuestos interferentes indicados en la metodología, como SO_4^{-2} , Na^+ , Mg^+ y Cl^- , sigue siendo importante. El primero, sin embargo, disminuye notoriamente ante el metabolismo de una BSR como *Halodesulfobivrio aestuarii* (Steger, J. *et al.*, 2002).

El acetato y el sulfhídrico son algunos de los productos de la actividad metabólica de sulfato reductoras (Barton, L. y Fauque, G., 2022), en donde solo el primero es indicado como un interferente. El sulfhídrico es un compuesto altamente reactivo, que logra precipitar sulfuros insolubles de color negro a bajas concentraciones, aunque es volátil (Lewis, A., 2010).

Pese a lo expuesto, y ante la sobrestimación de arsénico en las muestras, se requieren análisis de mayor rigurosidad para estimar con certeza los interferentes y posibles interacciones entre los distintos compuestos e iones del medio de cultivo con los reactivos de la metodología, que están afectando las mediciones y la estimación de las concentraciones de arsénico en estas.

4.3.2 Metodología Cualitativa: Precipitación con Nitrato de Plata

Se realiza el procedimiento de descrito en la sección 3.4.2. para el análisis cualitativo de arsénico en muestras de estándares (As disuelto en agua destilada) y en muestras de cultivo con *Halodesulfobivrio aestuarii* y en medio de cultivo M195c con concentraciones de arsénico respectivos (Tabla 27, Figura 60).

Lett, M. *et al.* (2001) indican la precipitación de arsénico con los colores característicos para las dos especies en estudio (amarillo con arsenito y marrón rojizo en presencia de arseniato), tanto en agua como en el medio de cultivo que exponen, emendado con 1,33 mM de As(III). El análisis realizado en este estudio respecto a la precipitación de arsénico disuelto en agua destilada indico que a concentraciones menores a 0,1 mM en ambas especies no precipita (Figura 61).

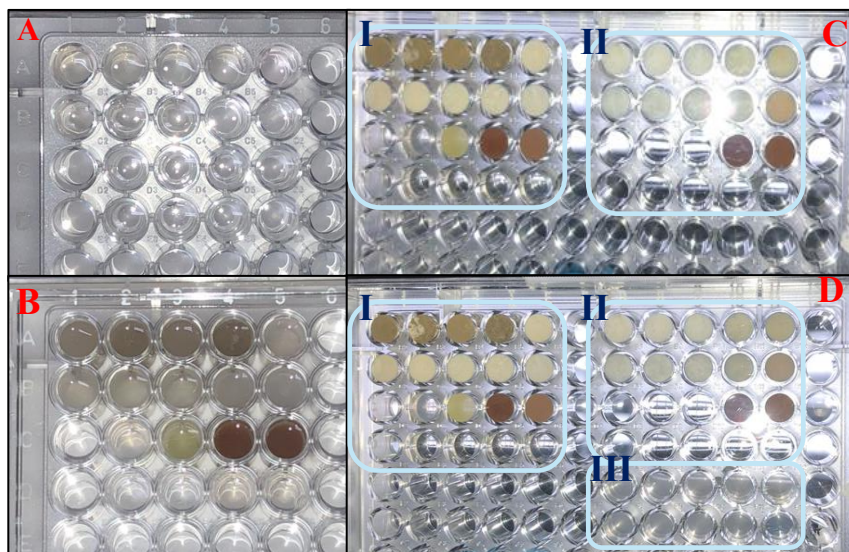


Figura 60. Muestras de análisis de la viabilidad de la metodología de análisis de arsénico con nitrato de plata. (A) Muestras depositadas en la placa, (B) muestras precipitadas con AgNO_3 . C y D muestran la precipitación con AgNO_3 en el líquido sobrenadante de las muestras: II líquido sobrenadante de I, III líquido sobrenadante de II.

Tabla 27. Detalle de muestras y estándares utilizados para el análisis de la viabilidad de la metodología de precipitación de arsénico con nitrato de plata. Cada cuadro representa uno de los pozos de la placa múltiple utilizada.

I 0,4 mM As(III)	I 0,1 mM As(III)	I sin As	I 0,5 mM As(V)	I 5 mM As(V)
C 0,4 mM As(III)	C 0,1 mM As(III)	C sin As	C 0,5 mM As(V)	C 5 mM As(V)
	M195c 1:500	Estándar 10 mM As(III)	75 μL 10 mM/100 mM As(III)/As(V)	Estándar 100 mM As(V)
	Agua MiliQ	Estándar 0,1 mM As(III)	75 μL 0,1 mM/0,1 mM As(III)/As(V)	Estándar 0,1 mM As(V)

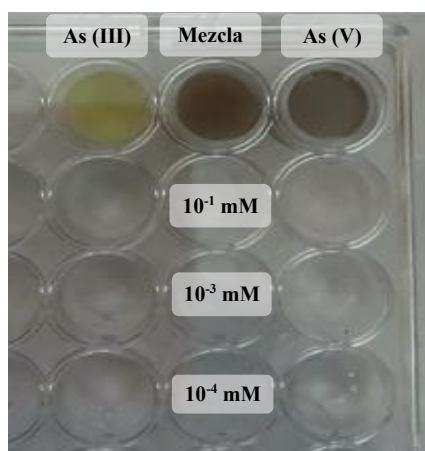


Figura 61. Análisis de estándares de As(III) y As(V) a distintas diluciones según se indica. En la primera línea, 10 mM As(III), mezcla 1:1 v/v, 100 mM As(V).

El análisis de la precipitación de arsénico en estándares de arsénico (tri y pentavalente), solo mostraron un color visible a altas concentraciones (10 y 100 mM), mientras que a menores concentraciones el color fue imperceptible (Figura 61). Por otro lado, todas las muestras con medio M195c, tanto controles como aquellas con *Halodesulfobrio aestuarii*, precipitaron con un color blanco inicial que luego se tornó marrón oscuro al agregar nitrato de plata. La precipitación de otras sales, como pueden ser sulfuro, fosfato, carbonato, cloruro, sulfato y acetato (en orden creciente de su constante de solubilidad K_{sp}) (Haynes, W *et al.*, 2017) pueden en mascarar la precipitación de arsénico. Los análisis del sobrenadante de estas muestras mostraron que la precipitación era casi completa, a excepción de las muestras con 5 mM de As(V), que permanecieron ligeramente anaranjadas (Figura 62). La precipitación en una etapa anterior, previo al análisis del sobrenadante de las muestras precipitadas podrían haberse reducido en gran medida la concentración de arsénico previo a la adición del nitrato de plata.

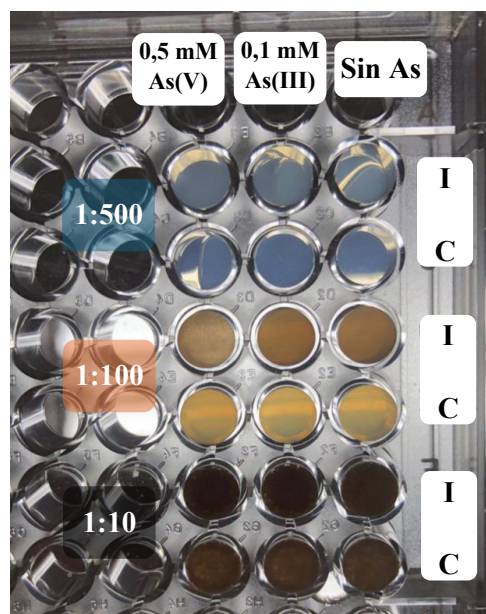


Figura 62. Efecto de la dilución de las muestras en la abundancia y color del precipitado. Precipitados de plata en medio M195c a diluciones 1:10, 1:100 y 1:500; muestras con inoculo (I) y estériles (C); y con concentraciones de 0,5 mM As(V), 0,1 mM As(III) o sin arsénico.

La dilución de las muestras redujo la intensidad del color, sin embargo, no presento los resultados esperados (rojo oscuro y amarillo para As(V) y As(III) respectivamente o una mezcla de estos) (Figura 62). Finalmente, se confirmó que la percepción del color es solo posible a altas concentraciones de arsénico, siendo imperceptible a concentraciones menores.

Estos resultados podrían indicar una precipitación de otros compuestos que puedan enmascarar el precipitado de arsénico. El medio de cultivo presenta altas concentraciones de cloruro (Cl^- , alrededor de 28,1 g L^{-1}), carbonato (CO_3^- , alrededor de 1,5 g L^{-1}), fosfato (PO_4^- , alrededor de 0,2 g L^{-1}) y sulfato (SO_4^{2-} , alrededor de 3,0 g L^{-1}), los que pueden precipitar con nitrato de plata, con los colores señalados en la (Tabla 10). La precipitación de arsénico en etapas anteriores del análisis pudo ser enmascarado por la intensa precipitación de otros compuestos iónicos insolubles.

La presencia de sulfuro, producto de la actividad metabólica de la BSR podría haber precipitado una cantidad suficiente de sulfuro de arsénico ($K_{sp} 2,1 \cdot 10^{-21}$) para que el color característico de este no sea perceptible según la Ecuación (26):



Este sólido podría haberse enmascarado con la biopelícula de *H. aestuarii* y haber sido filtrado en la toma de muestras, significando que las concentraciones de este contaminante podrían haberse reducido en gran medida previo a la adición del nitrato de plata.

Igualmente, la interacción entre el arsénico libre con los precipitados de otros compuestos (Panagiotaras, D. *et al.*, 2012), podrían disminuir la disponibilidad de este contaminante y, por lo tanto, la predominancia del color esperado.

Esto genera que el método no sea adecuado para cultivos líquidos con alta concentración de interferentes y baja concentración de arsénico, como el sistema en que es estudiado el metabolismo de *Halodesulfovibrio aestuarii*.

4.4 PROYECCIONES

Dado la amplia aplicación de la revisión del genoma, es requerido una revisión con mayor detalle y rigurosidad, en donde se contrasten algunas de las proteínas hipotéticas y proteínas sin función asignadas, con proteínas evidenciadas en otros clados microbianos para generar una anotación de mayor calidad.

Igualmente, se recomiendan análisis exhaustivos para determinar la tolerancia específica de *Halodesulfovibrio aestuarii* ante la exposición de arsénico. Se requieren metodologías cuantitativas de mayor resolución para generar una estequiometría del metabolismo del arsénico, como por ejemplo una espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) con la separación de las especies a través de cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC)

La movilización del arsénico desde relaves mineros se ve favorecida por el accionar de los microorganismos que puedan transformarlo a su forma más móvil (arsenito), que se filtra fácilmente a suministros de agua y, por lo tanto, supone un riesgo a la población circundante. *Halodesulfovibrio aestuarii*, como bacteria sulfato reductora presenta los mecanismos que pueden promover su liberación, a través de la reducción de As(V) a As(III), más móvil a la vez que tóxico, a la vez de generar la metilación de este último, compuesto volátil que se logra oxidar ante su exposición a la atmósfera a compuestos orgánicos de arsénico menos tóxicos que sus predecesores inorgánicos.

Por ello, tener una mejor comprensión del metabolismo de esta especie como modelo de BSR ayudará a generar el conocimiento base para desarrollar métodos de control de la liberación desde relaves mineros como de la biorremediación de zonas afectadas con arsénico.

5. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos y de las observaciones realizadas, se plantean las siguientes conclusiones:

- El medio de cultivo de *Halodesulfobivrio aestuarii*, DSMZ 195c no es adecuado para el estudio de la especie con arsénico producto de la precipitación abundante de sulfuros de arsénico de manera abiótica
- Modificar el medio 195c con Citrato de Titanio (III) como agente reductor y en presencia de As(III) genera un precipitado marrón que podría sobreestimar mediciones espectrofotométricas, sin embargo, modificado con HCl-Cisteína no genera cambios en el potencial reductor o visuales (color o precipitación), por lo que este es un buen candidato para el estudio de la especie bajo la exposición de arsénico inorgánico.
- *H. aestuarii* presenta tolerancia moderada a As(III) y As(V), lo que data de la presencia de algún mecanismo de tolerancia y supervivencia a la exposición a estos. Por su lado, la biopelícula de *H. aestuarii* no presenta cambios visibles ante la exposición con As, indicando que no se ha precipitado sulfuros de As o no lo suficientemente para ser apreciado el color característico. La biopelícula es débil mecánicamente ante la exposición a arsénico, en comparación con la de *G. sulfurreducens* que se mantiene fuertemente adherida al fondo de los tubos.
- La precipitación de arsénico con nitrato de plata como método cualitativo y el análisis cuantitativo a través de leuco verde malaquita para la estimación de arsénico en medio 195c con *H. aestuarii* no fueron concluyentes al presentar una alta concentración de compuestos e iones interferentes, que precipitaron o tornaron el medio a colores no especificados en la metodología.
- Las anotaciones del genoma confirman el rol como BSR de *H. aestuarii*. Sin embargo, enzimas importantes dentro del metabolismo, ampliamente relevantes y presentes en el genoma de otras BSR, no fueron encontradas.
- *H. aestuarii* presenta en el genoma estructuras asociadas a la detoxificación de arsénico, incluyendo ArsR, ArsC, acr3, ArsM y proteínas HSP20 de estructura asociada a ArsA. Esto podría explicar la nula evidencia de precipitación de sulfuros al reducir el As(III) del medio ante su volatilización, como también la resistencia evidenciada en el crecimiento.
- El presente estudio revela el potencial de *Halodesulfobivrio aestuarii* como BSR modelo ante la exposición de arsénico, sugiriendo que su metabolismo podría entregar las directrices para la generación de tecnologías para el control y abatimiento de este contaminante en entornos sulfidogénicos.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2007). Toxicological Profile for Arsenic. <https://doi.org/10.15620/cdc:11481>
2. Ahmann, D., Roberts, A. L., Krumholz, L. R., y Morel, F. M. M. (1994). Microbe grows by reducing arsenic. *Nature*, 371, 750. <https://doi.org/10.1038/371750a0>
3. Ajees, A. A., y Rosen, B. P. (2015). As(III) S-Adenosylmethionine Methyltransferases and Other Arsenic Binding Proteins. *Geomicrobiology Journal*, 32(7), 570–576. <https://doi.org/10.1080/01490451.2014.908983>
4. Akhavan, A., y Golchin, A. (2021). Estimation of arsenic leaching from Zn–Pb mine tailings under environmental conditions. *Journal of Cleaner Production*, 295. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126477>
5. Alvarez-Ramirez, J., Meraz, M., y Jaime Vernon-Carter, E. (2019). A theoretical derivation of the monod equation with a kinetics sense. *Biochemical Engineering Journal*, 150. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107305>
6. Aurillo, A. C., Mason, R. P., y Hemond, H. F. (1994). Speciation and Fate of Arsenic in Three Lakes of the Aberjona Watershed. *Environ. Sci. Technol*, 28, 577–585. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
7. Babechuk, M. G., Weisener, C. G., Fryer, B. J., Paktunc, D., y Maunders, C. (2009). Microbial reduction of ferrous arsenate: Biogeochemical implications for arsenic mobilization. *Applied Geochemistry*, 24(12), 2332–2341. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2009.09.006>
8. Barton, L. L., y Fauque, G. D. (2022). *Sulfate-Reducing Bacteria and Archaea* (1st ed., Vol. 1). Springer Cham. <https://doi.org/978-3-030-96703-1>
9. Beal, J., Farny, N. G., Haddock-Angelli, T., Selvarajah, V., Baldwin, G. S., Buckley-Taylor, R., Gershater, M., Kiga, D., Marken, J., Sanchania, V., Sison, A., Workman, C. T., Pehlivan, M., Roige, B. B., Aarnio, T., Kivisto, S., Koski, J., Lehtonen, L., Pezzutto, D., ... Zhou, J. (2020). Robust estimation of bacterial cell count from optical density. *Communications Biology*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01127-5>
10. Beijerinck, W. M. (1895). *Spirillum desulfuricans* as the cause of sulfate reduction. In *Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde* (pp. 49–59). Jena : Gustav Fischer.
11. Bentley, R., y Chasteen, T. G. (2002). Microbial Methylation of Metalloids: Arsenic, Antimony, and Bismuth. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(2), 250–271. <https://doi.org/10.1128/mmbr.66.2.250-271.2002>
12. Blum, J. S., Bindi, A. B., Buzzelli, J., Stolz, J. F., y Oremland, R. S. (1998). *Bacillus arsenicoselenatis* sp. nov. and *Bacillus selenitireducens* sp. nov. two haloalkaliphiles from Mono Lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic. *Archives of Microbiology*, 171, 19–30. <https://doi.org/10.1007/s002030050673>
13. Blum, M., Andreeva, A., Florentino, L. C., Chuguransky, S. R., Grego, T., Hobbs, E., Pinto, B. L., Orr, A., Paysan-Lafosse, T., Ponamareva, I., Salazar, G. A., Bordin, N., Bork, P., Bridge, A., Colwell, L., Gough, J., Haft, D. H., Letunic, I., Llinares-López, F., ... Bateman, A. (2025). InterPro: the protein sequence classification resource in 2025. *Nucleic Acids Research*, 53(D1), D444–D456. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1082>
14. Boyd, C. E. (2020). *Water Quality - An Introduction* (3rd ed.). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-23335-8>

15. Brock, T. D., y Gustafson, J. (1976). Ferric Iron Reduction by Sulfur-and Iron-Oxidizing Bacteria. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 32(4), 567–571. <https://doi.org/10.1128/aem.32.4.567-571.1976>
16. Bruno Venditti. (2022, December 12). Which countries produce the most copper? Visual Capitalist. <https://www.weforum.org/stories/2022/12/which-countries-produce-the-most-copper/>
17. Burford, N., Carpenter, Y.-Y., Conrad, E., y Saunders, C. D. L. (2011). The Chemistry of Arsenic, Antimony and Bismuth. In Hongzhe Sun (Ed.), *Biological Chemistry of Arsenic, Antimony and Bismuth*. John Wiley y Sons, Ltd.
18. Burton, E. D., Johnston, S. G., y Planer-Friedrich, B. (2013). Coupling of arsenic mobility to sulfur transformations during microbial sulfate reduction in the presence and absence of humic acid. *Chemical Geology*, 343, 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2013.02.005>
19. Byrne, S., Amarasiriwardena, D., Bandak, B., Bartkus, L., Kane, J., Jones, J., Yañez, J., Arriaza, B., y Cornejo, L. (2010). Were Chinchorros exposed to arsenic? Arsenic determination in Chinchorro mummies' hair by laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Microchemical Journal*, 94(1), 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2009.08.006>
20. Caccavo, F., Lonergan, D. J., Lovley, D. R., Davis, M., Stolz, J. F., y Mcinerneyl, M. J. (1994). *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a Hydrogen-and Acetate-Oxidizing Dissimilatory Metal-Reducing Microorganism. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 60(10), 3752–3759. <https://doi.org/10.1128/aem.60.10.3752-3759.1994>
21. Cai, X., Zhang, Z., Yin, N., Du, H., Li, Z., y Cui, Y. (2016). Comparison of arsenate reduction and release by three As(V)-reducing bacteria isolated from arsenic-contaminated soil of Inner Mongolia, China. *Chemosphere*, 161, 200–207. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.06.102>
22. Castillo Devoto, G. A. (2021). Climate risk and adaptation management in mine closure planning in mountainous watersheds [DOCTOR OF PHILOSOPHY, University of British Columbia]. <https://doi.org/10.14288/1.0404425>
23. Charlet, L., Morin, G., Rose, J., Wang, Y., Auffan, M., Burnol, A., y Fernandez-Martinez, A. (2011). Réactivité aux interfaces nano(particule)-solution, processus redox et transport de l'arsenic dans l'environnement. *Comptes Rendus - Geoscience*, 343(2–3), 123–139. <https://doi.org/10.1016/j.crte.2010.11.005>
24. Chen, J., Bhattacharjee, H., y Rosen, B. P. (2015). ArsH is an organoarsenical oxidase that confers resistance to trivalent forms of the herbicide monosodium methylarsenate and the poultry growth promoter roxarsone. *Molecular Microbiology*, 96(5), 1042–1052. <https://doi.org/10.1111/mmi.12988>
25. Chen, J., Madegowda, M., Bhattacharjee, H., y Rosen, B. P. (2015b). ArsP: A methylarsenite efflux permease. *Molecular Microbiology*, 98(4), 625–635. <https://doi.org/10.1111/mmi.13145>
26. Chen, J., Yoshinaga, M., Garbinski, L. D., y Rosen, B. P. (2016). Synergistic interaction of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase and ArsJ, a novel organoarsenical efflux permease, confers arsenate resistance. *Molecular Microbiology*, 100(6), 945–953. <https://doi.org/10.1111/mmi.13371>
27. Chen, S.-C., Sun, G.-X., Yan, Y., Konstantinidis, K. T., Zhang, S.-Y., Deng, Y., Li, X.-M., Cui, H.-L., Musat, F., Popp, D., Rosen, B. P., Zhu, Y.-G., y by Donald Canfield, E. E. (2020). The Great Oxidation Event expanded the genetic repertoire of arsenic metabolism and cycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117, 10414–10421. <https://doi.org/10.1073/pnas.2001063117>
28. Chillé, D., Mollica-Nardo, V., Giuffrè, O., Ponterio, R. C., Saija, F., Sponer, J., Trusso, S., Cassone, G., y Foti, C. (2022). Binding of Arsenic by Common Functional Groups: An Experimental and Quantum-Mechanical Study. *Applied Sciences (Switzerland)*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/app12063210>

29. Consejo Minero. (2025). Cifras actualizadas de la minería. <https://consejominero.cl/wp-content/uploads/2025/03/20250311-CAM-febrero-2025.pdf>
30. Couture, R. M., y Van Cappellen, P. (2011). Reassessing the role of sulfur geochemistry on arsenic speciation in reducing environments. *Journal of Hazardous Materials*, 189(3), 647–652. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.02.029>
31. Cummings, D. E., Caccavo, F., Fendorf, S., y Rosenzweig, R. F. (1999). Arsenic mobilization by the dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium *Shewanella* alga BrY. *Environmental Science and Technology*, 33(5), 723–729. <https://doi.org/10.1021/es980541c>
32. Dang, Y., Walker, D. J. F., Vautour, K. E., Dixon, S., y Holmes, D. E. (2017). Arsenic detoxification by *Geobacter* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(4). <https://doi.org/10.1128/AEM.02689-16>
33. De Francisco, P., Martín-González, A., Rodríguez-Martín, D., y Díaz, S. (2021). Interactions with arsenic: Mechanisms of toxicity and cellular resistance in eukaryotic microorganisms. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 18, Issue 22). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijerph182212226>
34. Del Razo, L. M., Quintanilla-Vega, B., Brambila-Colombres, E., Calderón-Aranda, E. S., Manno, M., y Albores, A. (2001). Stress proteins induced by arsenic. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 177(2), 132–148. <https://doi.org/10.1006/taap.2001.9291>
35. DeVore, C. L., Rodríguez-Freire, L., Mehdi-Ali, A., Ducheneaux, C., Artyushkova, K., Zhou, Z., Latta, D. E., Lueth, V. W., Gonzales, M., Lewis, J., y Cerrato, J. M. (2019). Effect of bicarbonate and phosphate on arsenic release from mining-impacted sediments in the Cheyenne River watershed, South Dakota, USA. *Environmental Science: Processes and Impacts*, 21(3), 456–468. <https://doi.org/10.1039/c8em00461g>
36. Dhuldhaj, U. P., Yadav, I. C., Singh, S., y Sharma, N. K. (2012). Microbial Interactions in the Arsenic Cycle: Adoptive Strategies and Applications in Environmental Management. In David M. Whitacre (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (Vol. 224, pp. 2–28). <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5882-1>
37. Dirección de estudios y políticas públicas. (2022). Monitoreo del estado de los relaves mineros en Chile - DEPP 29/2022. <https://doi.org/N°2022-A-10665>
38. División de Desarrollo Sostenible del Ministerio de Minería. (2019). Plan Nacional de Depósitos de Relaves para una Minería Sostenible. https://www.minmineria.gob.cl/media/2021/05/Plan_Nacional_de_Despositos_de_Relaves_para_una_Mineria_Sostenible_2021.pdf
39. Division de Normas. (1978). NCh1333/1978 - Requisitos de calidad del agua para diferentes usos. https://ciperchile.cl/pdfs/11-2013/norovirus/NCh1333-1978_Mod-1987.pdf
40. Division de Normas. (2005). NCh409/2005 - Agua potable Parte 1 Requisitos. <https://ciperchile.cl/pdfs/11-2013/norovirus/NCh409.pdf>
41. Dong, D. T., Yamaguchi, N., Makino, T., y Amachi, S. (2014). Effect of soil microorganisms on arsenite oxidation in paddy soils under oxic conditions. *Soil Science and Plant Nutrition*, 60(3), 377–383. <https://doi.org/10.1080/00380768.2014.897924>
42. DSMZ (2022a). 195c: *Desulfobacter* sp. Medium (lactate). Recuperado de https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium195c.pdf
43. DSMZ (2022b). 826: *Geobacter sulfurreducens* medium. Recuperado de https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium826.pdf

44. Ecometales. (2016). ECOMETALES Reporte de sustentabilidad 2016. https://www.ecometales.cl/ecometales/site/docs/20191105/20191105184355/reporte_ecm_2016.pdf
45. Ellis, P. J., Conrads, T., Hille, R., y Kuhn, P. (2001). Crystal Structure of the 100 kDa Arsenite Oxidase from *Alcaligenes faecalis* in Two Crystal Forms at 1.64 Å and 2.03 Å. *Structure*, 9(2), 125–132. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00566-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00566-4)
46. Epstein, S. S. (2009). Microbiology Monographs - Uncultivated Microorganisms. In A. Steinbüchel (Ed.), *Microbiology Monographs* (Vol. 10). Springer Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-85465-4>
47. Erhart, S., y Erhart, K. (2023). Environmental ranking of European industrial facilities by toxicity and global warming potentials. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25750-w>
48. Fakhreddine, S., y Fendorf, S. (2021). The effect of porewater ionic composition on arsenate adsorption to clay minerals. *Science of the Total Environment*, 785. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147096>
49. Fares, A., y Singh, S. K. (2020). Arsenic Water Resources Contamination - Challenges and Solutions. Springer Nature Switzerland. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-21258-2>
50. Fekih, I. Ben, Zhang, C., Li, Y. P., Zhao, Y., Alwathnani, H. A., Saquib, Q., Rensing, C., y Cervantes, C. (2018). Distribution of arsenic resistance genes in prokaryotes. *Frontiers in Microbiology*, 9(OCT). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02473>
51. Fendorf, S., Nico, P. S., Kocar, B. D., Masue, Y., y Tufano, K. J. (2010). Arsenic chemistry in soils and sediments. In B. Singh y M. Gräfe (Eds.), *Developments in Soil Science* (Vol. 34, pp. 357–378). [https://doi.org/10.1016/s0166-2481\(10\)34012-8](https://doi.org/10.1016/s0166-2481(10)34012-8)
52. Fernández-Martínez, L. T., Javelle, A., y Hoskisson, P. A. (2024). Microbial Primer: Bacterial growth kinetics. *Microbiology (United Kingdom)*, 170(2). <https://doi.org/10.1099/mic.0.001428>
53. Fleming, H.-C. (1995). Sorption sites in biofilms. *Water Science and Technology*, 32(8), 27–33. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(96\)00004-2](https://doi.org/10.1016/0273-1223(96)00004-2)
54. Flora, S. J. S. (2015). Arsenicals: Toxicity, Their Use as Chemical Warfare Agents, and Possible Remedial Measures. In *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents: Second Edition* (pp. 171–191). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800159-2.00015-4>
55. Fothergill-Gilmore, L. A., y Michels, P. A. M. (1993). Evolution of glycolysis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 59, 105–235. [https://doi.org/10.1016/0079-6107\(93\)90001-Z](https://doi.org/10.1016/0079-6107(93)90001-Z)
56. Frey, P. A., y Reed, G. H. (2012). The ubiquity of iron. *ACS Chemical Biology*, 7(9), 1477–1481. <https://doi.org/10.1021/cb300323q>
57. Frith, J. (2013). Arsenic-the “Poison of Kings” and the “Saviour of Syphilis” Original Articles. *Journal of Military and Veterans’ Health*, 21(4), 11–17. <https://doi.org/11.2021-24161982>
58. Frühauf-Wyllie, H. M., y Holtmann, D. (2022). *Geobacter sulfurreducens* metabolism at different donor/acceptor ratios. *MicrobiologyOpen*, 11(5). <https://doi.org/10.1002/mbo3.1322>
59. Fu, H. L., Rosen, B. P., y Bhattacharjee, H. (2010). Biochemical characterization of a novel ArsA ATPase complex from *Alkaliphilus metalliredigens* QYMF. *FEBS Letters*, 584(14), 3089–3094. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.05.044>
60. Giloteaux, L., Holmes, D. E., Williams, K. H., Wrighton, K. C., Wilkins, M. J., Montgomery, A. P., Smith, J. A., Orellana, R., Thompson, C. A., Roper, T. J., Long, P. E., y Lovley, D. R. (2013). Characterization and transcription of arsenic respiration and resistance genes during in situ uranium bioremediation. *ISME Journal*, 7(2), 370–383. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.109>

61. Gladysheva, T. B., Oden, K. L., y Rosen, B. P. (1994). Properties of the Arsenate Reductase of Plasmid R773. *Biochemistry*, 33, 7288–7293. <https://doi.org/10.1021/bi00189a033>
62. González, V., Abarca-Hurtado, J., Arancibia, A., Claverías, F., Guevara, M. R., y Orellana, R. (2024). Novel Insights on Extracellular Electron Transfer Networks in the Desulfovibrionaceae Family: Unveiling the Potential Significance of Horizontal Gene Transfer. *Microorganisms*, 12(9), 1796. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12091796>
63. Grimbergen, A. J., Siebring, J., Solopova, A., y Kuipers, O. P. (2015). Microbial bet-hedging: The power of being different. *Current Opinion in Microbiology*, 25, 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.04.008>
64. Hassan, S., Bhadwal, S. S., Khan, M., Sabreena, Nissa, K. U., Shah, R. A., Bhat, H. M., Bhat, S. A., Lone, I. M., y Ganai, B. A. (2024). Revitalizing contaminated lands: A state-of-the-art review on the remediation of mine-tailings using phytoremediation and genomic approaches. *Chemosphere*, 356. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.141889>
65. Haynes, W. M., Lide, D. R., y Bruno, T. J. (2017). *CRC Handbook of Chemistry and Physics* (97th ed.). CRC Press.
66. Hedges, R. W., y Baumberg, S. (1973). Resistance to Arsenic Compounds Conferred by a Plasmid Transmissible Between Strains of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 115(1), 459–460. <https://doi.org/10.1128/jb.115.1.459-460.1973>
67. Howley, E., Ki, D., Krajmalnik-Brown, R., y Torres, C. I. (2022). *Geobacter sulfurreducens*' Unique Metabolism Results in Cells with a High Iron and Lipid Content. *Microbiology Spectrum*, 10(6). <https://doi.org/10.1128/spectrum.02593-22>
68. Hughes, M. F. (2002). Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology Letters*, 133, 1–16. [https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(02\)00084-x](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(02)00084-x)
69. Hungate, R. E. (1969). A Roll Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes. In J. R. Norris y D. W. Ribbons (Eds.), *Methods in Microbiology* (Vol. 3, pp. 117–132). [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70503-8](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70503-8)
70. Jackson, C. R., y Dugas, S. L. (2003). Phylogenetic analysis of bacterial and archaeal *arsC* gene sequences suggests an ancient, common origin for arsenate reductase. *BMC Evolutionary Biology*, 3(18). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-3-18>
71. Jacob, H. S. (2008, November 10). Arsenic: medicinal double-edge sword. <https://www.healio.com/news/hematology-oncology/20120325/arsenic-medicinal-double-edged-sword>
72. Ji, G., E Garber, E. A., Gene Armes, M. L., Chen, C.-M., Fuchs, J. A., y Silver, S. (1994). Arsenate Reductase of *Staphylococcus aureus* Plasmid pI258. *Biochemistry*, 33(1), 7294–7299. <https://doi.org/10.1021/bi00189a034>
73. Ji, G., y Silver, S. (1992). Reduction of arsenate to arsenite by the *ArsC* protein of the arsenic resistance operon of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *Biochemistry*, 89, 9474–9478. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.20.9474>
74. Jiang, X., Liu, W., Xu, H., Cui, X., Li, J., Chen, J., y Zheng, B. (2021). Characterizations of heavy metal contamination, microbial community, and resistance genes in a tailing of the largest copper mine in China. *Environmental Pollution*, 280. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116947>
75. Jiang, X., Peng, C., Fu, D., Chen, Z., Shen, L., Li, Q., Ouyang, T., y Wang, Y. (2015). Removal of arsenate by ferrihydrite via surface complexation and surface precipitation. *Applied Surface Science*, 353, 1087–1094. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.06.190>

76. Jiang, Y., Gao, X., Yang, X., Gong, P., Pan, Z., Yi, L., Ma, S., Li, C., Kong, S., y Wang, Y. (2024). Sulfate-reducing bacteria (SRB) mediated carbonate dissolution and arsenic release: Behavior and mechanisms. *Science of the Total Environment*, 929. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.172572>
77. Jin, Q. (2012). Energy conservation of anaerobic respiration. *American Journal of Science*, 312(6), 573–628. <https://doi.org/10.2475/06.2012.01>
78. Jørgensen, B. B. (1977). The sulfur cycle of a coastal marine sediment (Limfjorden, Denmark). *Limnology and Oceanography*, 22(5), 814–832. <https://doi.org/10.4319/lo.1977.22.5.0814>
79. Keim, C. N., Serna, J. D. P., Acosta-Avalos, D., Neumann, R., Silva, A. S., Jurelevicius, D. A., Pereira, R. S., de Souza, P. M., Seldin, L., y Farina, M. (2021). Dissimilatory iron-reducing microorganisms are present and active in the sediments of the doce river and tributaries impacted by iron mine tailings from the collapsed fundão dam (Mariana, mg, brazil). *Minerals*, 11(3), 1–23. <https://doi.org/10.3390/min11030244>
80. Keller, K. L., Rapp-Giles, B. J., Semkiw, E. S., Porat, I., Brown, S. D., y Wall, J. D. (2014). New model for electron flow for sulfate reduction in *Desulfovibrio alaskensis* G20. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(3), 855–868. <https://doi.org/10.1128/AEM.02963-13>
81. Khademi, H., Abbaspour, A., Martínez-Martínez, S., Gabarrón, M., Shahrokh, V., Faz, A., y Acosta, J. A. (2018). Provenance and environmental risk of windblown materials from mine tailing ponds, Murcia, Spain. *Environmental Pollution*, 241, 432–440. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.084>
82. Kovaliova, A., Kadnikov, V. V., Antsiferov, D. V., Beletsky, A. V., Danilova, E. V., Avakyan, M. R., Mardanov, A. V., y Karnachuk, O. V. (2017). Genome sequence of the acid-tolerant *Desulfovibrio* sp. DV isolated from the sediments of a Pb-Zn mine tailings dam in the Chita region, Russia. *Genomics Data*, 11, 125–127. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2017.01.007>
83. Krafft, T., y Macy, J. M. (1998). Purification and characterization of the respiratory arsenate reductase of *Chrysiogenes arsenatis*. *European Journal of Biochemistry*, 255(3), 647–653. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2550647.x>
84. Krause, E., Ettel, V. A., y Roy, J. (1989). Solubilities and Stabilities of Ferric Arsenate Compounds. *Hydrometallurgy*, 22, 311–337.
85. Kumakura, D., Yamaguchi, R., Hara, A., y Nakaoka, S. (2023). Disentangling the growth curve of microbial culture. *Journal of Theoretical Biology*, 573. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2023.111597>
86. Lafferty, B. J., Ginder-Vogel, M., y Sparks, D. L. (2010). Arsenite oxidation by a poorly crystalline manganese-oxide 1. stirred-flow experiments. *Environmental Science and Technology*, 44(22), 8460–8466. <https://doi.org/10.1021/es102013p>
87. Lebrun, E., Brugna, M., Baymann, F., Muller, D., Lièvremon, D., Lett, M. C., y Nitschke, W. (2003). Arsenite oxidase, an ancient bioenergetic enzyme. *Molecular Biology and Evolution*, 20(5), 686–693. <https://doi.org/10.1093/molbev/msg071>
88. Lett, M.-C., Lièvremon, D., y Paknikar, K. M. (2001). A simple and rapid method for arsenite and arsenate speciation. In V. S. T. Ciminello y O. Garcia Jr. (Eds.), *Biohydrometallurgy: Fundamentals, Technology and Sustainable Development, Part B* (pp. 541–546). *Elvesier Science B*. V. <https://www.researchgate.net/publication/237134688>
89. Lewis, A. E. (2010). Review of metal sulphide precipitation. *Hydrometallurgy*, 104(2), 222–234. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2010.06.010>
90. Li, W., Deng, Y., Wang, H., Hu, Y., y Cheng, H. (2024). Potential risk, leaching behavior and mechanism of heavy metals from mine tailings under acid rain. *Chemosphere*, 350. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.140995>

91. Li, X., Sun, D., Feng, H., Chen, J., Chen, Y., Li, H., Cao, Y., y Ma, L. Q. (2020). Efficient arsenate reduction in As-hyperaccumulator *Pteris vittata* are mediated by novel arsenate reductases PvHAC1 and PvHAC2. *Journal of Hazardous Materials*, 399. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122895>
92. Lin, W. C., Coppi, M. V., y Lovley, D. R. (2004). *Geobacter sulfurreducens* Can Grow with Oxygen as a Terminal Electron Acceptor. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), 2525–2528. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2525-2528.2004>
93. Lovley, D. R. (1993). Dissimilatory Metal Reduction. *Annual Review of Microbiology*, 47(1), 263–290. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev.mi.47.100193.001403>
94. Lovley, D. R., Phillips, ' And, E. J. P., y Lonergan, D. J. (1989). Hydrogen and Formate Oxidation Coupled to Dissimilatory Reduction of Iron or Manganese by *Alteromonas putrefaciens*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 55(3), 700–706. <https://doi.org/10.1128/aem.55.3.700-706.1989>
95. Lovley, D. R., Ueki, T., Zhang, T., Malvankar, N. S., Shrestha, P. M., Flanagan, K. A., Aklujkar, M., Butler, J. E., Giloteaux, L., Rotaru, A. E., Holmes, D. E., Franks, A. E., Orellana, R., Risso, C., y Nevin, K. P. (2011). *Geobacter*. The Microbe Electric's Physiology, Ecology, and Practical Applications. In R. K. Poole (Ed.), *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 59, pp. 1–100). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387661-4.00004-5>
96. Mabuchi, K., Lilienfeld, A. M., y Snell, L. M. (1979). Lung cancer among pesticide workers exposed to inorganic arsenicals. *Archives of Environmental Health*, 34(5), 312–320. <https://doi.org/10.1080/00039896.1979.10667423>
97. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., y Stahl, D. A. (2015). *Brock Biología de los Microorganismo* (C. Barrachina, M. Berlanga, G. Claros, C. Garcia, M. Gacto, I. Gibert, D. Yero, I. Moriyón, R. Conde, M. Iriarte, A. Prats, C. Rodríguez, F. Ruiz, y V. Tarrida, Trans.; 14th ed.). Pearson Education S.A.
98. Malvankar, N. S., Vargas, M., Nevin, K. P., Franks, A. E., Leang, C., Kim, B. C., Inoue, K., Mester, T., Covalla, S. F., Johnson, J. P., Rotello, V. M., Tuominen, M. T., y Lovley, D. R. (2011). Tunable metallic-like conductivity in microbial nanowire networks. *Nature Nanotechnology*, 6(9), 573–579. <https://doi.org/10.1038/nnano.2011.119>
99. Martin, P., Demel, S., Shi, J., Gladysheva, T., Gatti, D. L., Rosen, B. P., y Edwards, B. F. P. (2001). Insights into the Structure, Solvation, and Mechanism of ArsC Arsenate Reductase, a Novel Arsenic Detoxification Enzyme. *Structure*, 9, 1071–1081. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00672-4](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00672-4)
100. Martíñá-Prieto, D., Canelo-González, J., y Barral, M. T. (2018). Arsenic mobility in as-containing soils from geogenic origin: Fractionation and leachability. *Journal of Chemistry*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7328203>
101. Meng, X., Dupont, R. R., Sorensen, D. L., Jacobson, A. R., y McLean, J. E. (2016). Arsenic solubilization and redistribution under anoxic conditions in three aquifer sediments from a basin-fill aquifer in Northern Utah: The role of natural organic carbon and carbonate minerals. *Applied Geochemistry*, 66, 250–263. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2016.01.004>
102. Messens, J., Martins, J. C., Brosens, E., Van Belle, K., Jacobs, D. M., Willem, R., y Wyns, L. (2002). Kinetics and active site dynamics of *Staphylococcus aureus* arsenate reductase. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 7(1–2), 146–156. <https://doi.org/10.1007/s007750100282>
103. Ministerio de Minería de Chile. (2007). Decreto Supremo No 248 - Reglamento para la Aprobación de Proyectos de Diseño, Construcción, Operación y Cierre de los Depósitos de Relave. https://www.sernageomin.cl/wp-content/uploads/2023/07/DS248_Reglamento_DepositosRelave.pdf

104. Ministerio de Salud de Chile. (1997). Decreto 106 del 1997 - Aprueba Reglamento de Aguas Minerales. In Decreto (Vol. 106). <https://www.bcn.cl/leychile/navegar?idNorma=73577>
105. Ministerio del Medio Ambiente de Chile. (2013). Decreto 40 - Aprueba Reglamento del Sistema de Evaluación de Impacto Ambiental. <https://bcn.cl/3l8bc>
106. Ministero Della Giustizia Italiano. (2006). Decreto Legislativo N°152 - Norme in Materia Ambientale.
107. Ministerio Secretaria General de la Presidencia de Chile. (2000). Decreto 90 del 2000 - Establece Norma de Emisión para la Regulación de Contaminantes Asociados a las Descargas de Residuos Líquidos a Aguas Marinas y Continentales Superficiales. <https://www.bcn.cl/leychile/navegar?idNorma=182637>
108. Mira, P., Yeh, P., y Hall, B. G. (2022). Estimating microbial population data from optical density. *PLoS ONE*, 17(10 October). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0276040>
109. Mirazimi, M., Mohammadi, M., y Liu, W. (2021). Kinetics and mechanisms of arsenic and sulfur release from crystalline orpiment. *Minerals Engineering*, 170. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2021.107032>
110. Mukhopadhyay, R., Shi, J., y Rosen, B. P. (2000). Purification and characterization of Acr2p, the *Saccharomyces cerevisiae* arsenate reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(28), 21149–21157. <https://doi.org/10.1074/jbc.M910401199>
111. Muller, D., Lièvremon, D., Simeonova, D. D., Hubert, J. C., y Lett, M. C. (2003). Arsenite oxidase aox genes from a metal-resistant β -proteobacterium. *Journal of Bacteriology*, 185(1), 135–141. <https://doi.org/10.1128/JB.185.1.135-141.2003>
112. Muyzer, G., y Stams, A. J. M. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 6(6), 441–454. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1892>
113. Myers, J. A., Curtis, B. S., y Curtis, W. R. (2013). Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density. *BMC Biophysics*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/2046-1682-6-4>
114. Nazari, A. M., Radzinski, R., y Ghahreman, A. (2017). Review of arsenic metallurgy: Treatment of arsenical minerals and the immobilization of arsenic. *Hydrometallurgy*, 174, 258–281. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2016.10.011>
115. Neaman, A. (2022). Metales en los suelos. *Revista de Agricultura En Zonas Aridas*, 40(2), 2–6. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292022000200002>
116. Neff, J. M. (1997). Ecotoxicology of arsenic in the marine environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(5), 917–927. <https://doi.org/10.1002/etc.5620160511>
117. Newman, D. K., Beveridge, T. J., Ois, F., y Morel, M. M. (1997). Precipitation of Arsenic Trisulfide by *Desulfotomaculum auripigmentum*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 63(5), 2022–2028. <https://journals.asm.org/journal/aem>
118. Newman, D. K., Kennedy, E. K., Coates, J. D., Ahmann, D., Ellis, D. J., Lovley, D. R., y Morel, F. M. M. (1997). Dissimilatory arsenate and sulfate reduction in *Desulfotomaculum auripigmentum* sp. nov. *Arch Microbiol*, 380–388.
119. Nordberg, G. F., Fowler, B. A., Nordberg, M., y Friberg, L. T. (2007). Handbook on the Toxicology of Metals (3rd ed.). Academic Press/Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369413-3.X5052-6>
120. Novick, R. P., y Roth, C. (1968). Plasmid-linked Resistance to Inorganic Salts in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 94(1), 1335–1342. <https://doi.org/10.1128/jb.95.4.1335-1342.1968>

121. O'Brien, J. P., y Malvankar, N. S. (2016). A simple and low-cost procedure for growing geobacter *Sulfurreducens* cell cultures and biofilms in bioelectrochemical systems. *Current Protocols in Microbiology*, 2016, A.4K.1-A.4K.27. <https://doi.org/10.1002/cpmc.20>
122. Ohtsuka, T., Yamaguchi, N., Makino, T., Sakurai, K., Kimura, K., Kudo, K., Homma, E., Dong, D. T., y Amachi, S. (2013). Arsenic dissolution from Japanese paddy soil by a dissimilatory arsenate-reducing bacterium *geobacter* sp. OR-1. *Environmental Science and Technology*, 47(12), 6263–6271. <https://doi.org/10.1021/es400231x>
123. Oremland, R. S., y Stolz, J. F. (2003). The ecology of arsenic. *Science*, 300(5621), 939–944. <https://doi.org/10.1126/science.1081903>
124. Ortiz Letechipia, J., González-Trinidad, J., Júnez-Ferreira, H. E., Bautista-Capetillo, C., Robles-Rovelo, C. O., Contreras Rodríguez, A. R., y Dávila-Hernández, S. (2022). Aqueous Arsenic Speciation with Hydrogeochemical Modeling and Correlation with Fluorine in Groundwater in a Semiarid Region of Mexico. *Water (Switzerland)*, 14(4). <https://doi.org/10.3390/w14040519>
125. Osborne, T. H., McArthur, J. M., Sikdar, P. K., y Santini, J. M. (2015). Isolation of an arsenate-respiring bacterium from a redox front in an arsenic-polluted aquifer in West Bengal, Bengal basin. *Environmental Science and Technology*, 49(7), 4193–4199. <https://doi.org/10.1021/es504707x>
126. Oscarson, D. W., Huang, P. M., y Liaw, W. K. (1981). Role of Manganese in the Oxidation of Arsenite by Freshwater Lake Sediments. *Clays and Clay Minerals*, 29(3), 219–225. <https://doi.org/10.1346/CCMN.1981.0290308>
127. Packianathan, C., Kandavelu, P., y Rosen, B. P. (2018). The Structure of an As(III) S-Adenosylmethionine Methyltransferase with 3-Coordinate Bound As(III) Depicts the First Step in Catalysis Graphical abstract HHS Public Access. *Biochemistry*, 57(28), 4083–4092. <https://doi.org/10.1021/acs.bio-chem.8b00457>
128. Panagiotaras, D., Panagopoulos, G., Papoulis, D., y Avramidis, P. (2012). Arsenic Geochemistry in Groundwater System. *Geochemistry - Earth's System Processes*, 27–38. <https://doi.org/10.5772/39384>
129. Pepper, I. L., Gerba, C. P., y Gentry, T. J. (2015). Introduction to Environmental Microbiology. In *Environmental Microbiology: Third Edition (3rd ed.)*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394626-3.00001-6>
130. Plugge, C. M. (2005). Anoxic media design, preparation, and considerations. *Methods in Enzymology*, 397, 3–16. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)97001-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)97001-8)
131. Postgate, J. R., y Campbell, L. L. (1966). Classification of *Desulfovibrio* Species, the Nonsporulating Sulfate-reducing Bacteria. *Bacteriological Reviews*, 30(4), 732–738. <https://doi.org/10.1128/br.30.4.732-738.1966>
132. Puspita, I. D., Kamagata, Y., Tanaka, M., Asano, K., y Nakatsu, C. H. (2012). Are uncultivated bacteria really uncultivable? *Microbes and Environments*, 27(4), 356–366. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME12092>
133. Qin, J., Rosen, B. P., Zhang, Y., Wang, G., Franke, S., y Rensing, C. (2006). Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase. *PNAS*, 103(7), 2075–2080. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506836103>
134. Rawle, R., Saley, T. C., Kang, Y. S., Wang, Q., Walk, S., Bothner, B., y McDermott, T. R. (2021). Introducing the *ArsR*-Regulated Arsenic Stimulon. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.630562>
135. Retief, F. P., y Cilliers, L. (2000). Poisoning during the Renaissance: The Medicis and the Borgias. *The Southern African Society for Medieval and Renaissance Studies (SASMARS)*.

136. Roden, E. E., y Lovley, D. R. (1993). Dissimilatory Fe(III) Reduction by the Marine Microorganism *Desulfuromonas acetoxidans*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 59(3), 734–742. [https://doi.org/0099-2240/93/030734-09\\$02.00/](https://doi.org/0099-2240/93/030734-09$02.00/)
137. Rosen, B. P., Dey, S., Dou, D., Ji, G., Kaur, P., Ksenzenko, M. Y., Silver, S., y Wu, J. (1992). Evolution of an Ion-Translocating ATPase. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 671(1), 257–272. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb43801.x>
138. Rosen, B. P., y Tamás, M. J. (2010). Arsenic Transport in Prokaryotes and Eukaryotic Microbes. In T. P. Jahn y G. P. Bienert (Eds.), *Advances in Experimental Medicine and Biology - MIPs and Their Role in the Exchange of Metalloids* (Vol. 679). Springer, New York, NY. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6315-4_4
139. Roussel, C., Bril, H., y Fernandez Angel. (2000). Heavy Metals in the Environment. *Journal of Environmental Quality*, 29(1), 182–188. <https://doi.org/https://doi.org/10.2134/jeq2000.00472425002900010023x>
140. Saalfeld, S. L., y Bostick, B. C. (2009). Changes in iron, sulfur, and arsenic speciation associated with bacterial sulfate reduction in ferrihydrite-rich systems. *Environmental Science and Technology*, 43(23), 8787–8793. <https://doi.org/10.1021/es901651k>
141. Salgueiro, C. A., Morgado, L., Silva, M. A., Ferreira, M. R., Fernandes, T. M., y Portela, P. C. (2022). From iron to bacterial electroconductive filaments: Exploring cytochrome diversity using *Geobacter* bacteria. *Coordination Chemistry Reviews*, 452. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.214284>
142. Sapkota, Y., Duball, C., Vaughan, K., Rabenhorst, M. C., y Berkowitz, J. F. (2022). Indicator of Reduction in Soil (IRIS) devices: A review. *Science of the Total Environment*, 852. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158419>
143. Sato, Y., Okano, K., y Honda, K. (2024). Effects of small heat shock proteins from thermotolerant bacteria on the stress resistance of *Escherichia coli* to temperature, pH, and hyperosmolarity. *Extremophiles*, 28(1). <https://doi.org/10.1007/s00792-023-01326-y>
144. Schultze-Lam, S., Fortin, D., Davis, B. S., y Beveridge, T. J. (1996). Mineralization of bacterial surfaces. *Chemical Geology*, 132, 171–181. [https://doi.org/10.1016/S0009-2541\(96\)00053-8](https://doi.org/10.1016/S0009-2541(96)00053-8)
145. SERNAGEOMIN - Subdirección de Minería. (2023). *Geoquímica de Superficie de Depósitos de Relaves de Chile*.
146. Shaw, D. (2006). Mobility of arsenic in saturated, laboratory test sediments under varying pH conditions. *Engineering Geology*, 85(1–2), 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.enggeo.2005.09.035>
147. Shivani, Y., Subhash, Y., Sasikala, C., y Ramana, C. H. V. (2017). *Halodesulfovibrio spirochaetisodalis* gen. nov. sp. nov. and reclassification of four *Desulfovibrio* spp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(1), 87–93. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001574>
148. Silva, L. G. (2013). Arsenic, the unclassifiable element. *Educación Química*, 24(2), 495–500. [https://doi.org/10.1016/s0187-893x\(13\)72519-9](https://doi.org/10.1016/s0187-893x(13)72519-9)
149. Silver, S., y Phung, L. T. (2005). Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. In *Applied and Environmental Microbiology* (Vol. 71, Issue 2, pp. 599–608). <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.599-608.2005>
150. Smedley, P. L., y Kinniburgh, D. G. (2002). A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry*, 17(5), 517–568. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(02\)00018-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0883-2927(02)00018-5)

151. Smirnova, G. V., y Oktyabrsky, O. N. (2005). Properties and Metabolism of Glutathione. *Biochemistry (Moscow)*, 70(11), 1199–1211. <https://doi.org/00062979/05/70111199>
152. Spormann, A. M. (2023). *Principles of Microbial Metabolism and Metabolic Ecology* (1st ed.). Springer Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-031-28218-8>
153. Stackebrandt, E., Schumann, P., Schüler, E., y Hippe, H. (2003). Reclassification of *Desulfotomaculum auripigmentum* as *Desulfosporosinus auripigmenti corrig.*, comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(5), 1439–1443. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02526-0>
154. Stancheva, K., y Pasha, C. (2016). Spectrophotometric Determinations of Trace Amounts of Arsenic(III) and Arsenic(V) Using Safranin O and Fuchsin as New Reagents. *Oxidation Communications*, 39(2), 1538–1546. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4957.0804>
155. Steger, J. L., Vincent, C., Ballard, J. D., y Krumholz, L. R. (2002). *Desulfovibrio* sp. genes involved in the respiration of sulfate during metabolism of hydrogen and lactate. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1932–1937. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1932-1937.2002>
156. Stolz, J. F., Ellis, D. J., Blum, J. S., Ahmann, D., Lovley, D. R., y Oremland, R. S. (1999). *Sulfurospirillum barnesii* sp. nov. and *Sulfurospirillum arsenophilum* sp. nov., new members of the *Sulfurospirillum* clade of the ϵ Proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 1177–1180. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-3-1177>
157. Stovern, M., Guzmán, H., Rine, K. P., Felix, O., King, M., Ela, W. P., Betterton, E. A., y Sáez, A. E. (2016). Windblown dust deposition forecasting and spread of contamination around mine tailings. *Atmosphere*, 7(2). <https://doi.org/10.3390/atmos7020016>
158. Sultan, M. W., Qureshi, F., Ahmed, S., Kamyab, H., Rajendran, S., Ibrahim, H., y Yusuf, M. (2025). A comprehensive review on arsenic contamination in groundwater: Sources, detection, mitigation strategies and cost analysis. In *Environmental Research* (Vol. 265). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.120457>
159. Sun, R., Gao, Y., y Yang, Y. (2022). Leaching of heavy metals from lead-zinc mine tailings and the subsequent migration and transformation characteristics in paddy soil. *Chemosphere*, 291. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132792>
160. Swash, P. M., y Monhemius, A. J. (1998). The Scorodite Process: a technology for the disposal of arsenic in the 21st century. In Castro S.H., Vergara F., y Sánchez M.A. (Eds.), *Effluent Treatment in the Mining Industry* (pp. 119–161). University of Concepción. https://www.researchgate.net/publication/266134986_The_Scorodite_Process_a_technology_for_the_disposal_of_arsenic_in_the_21st_century
161. Taschereau, C., y Fytas, K. (2000). Arsenic in mine tailings - The Chimo mine case study. *International Journal of Surface Mining, Reclamation and Environment*, 14(4), 337–347. <https://doi.org/10.1080/13895260008953341>
162. Tchernitchin, A. N., y Herrera, L. (2006). Relaves Mineros y sus Efectos en Salud, Medio Ambiente y Desarrollo Económico. Ejemplo de Relave en el Valle de Chacabuco-Polpaico. *Cuadernos Médicos Sociales (Chile)*, 46(1), 22–43.
163. Thauer, R. K., Moller-Zinkhan, D., y Spormann, A. M. (1989). Biochemistry of acetate catabolism in anaerobic chemotrophic bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 43(1), 43–67. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.43.100189>
164. Thompson, D. J. (1993). A chemical hypothesis for arsenic methylation in mammals. *Chemico-Biological Interactions*, 88(2–3), 89–114. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0009-2797\(93\)90086-E](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0009-2797(93)90086-E)

165. Tiwari, K. K. (2010). A New Spectrophotometric Method for the Determination of Ascorbic Acid Using Leuco Malachite Green. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 57(1), 105–110. <https://doi.org/10.1002/jccs.201000017>
166. Torres Peters, J. C. (2002). *Cobre, medio ambiente y salud : una conexión vital* (Comisión Chilena del Cobre, Ed.; 1st ed.).
167. Truong, V. K., Chapman, J., y Cozzolino, D. (1994). Monitoring the Bacterial Response to Antibiotic and Time Growth Using Near-infrared Spectroscopy Combined with Machine Learning. <https://doi.org/10.1007/s12161-021-01994-6/Published>
168. van der Maarel, M. J. E. C., Bergeijk, S. van, Werkhoven, A. F. van, Laverman, A. M., Meijer, W. G., Stam, W. T., y Hansen, T. A. (1996). Cleavage of dimethylsulfoniopropionate and reduction of acrylate by *Desulfovibrio acrylicus* sp. nov. *Arch Microbiol*, 109. <https://doi.org/10.1007/s002030050363>
169. Wacogne, B., Belinger Podevin, M., Vaccari, N., Koubevi, C., Codjiová, C., Gutierrez, E., Davoine, L., Robert-Nicoud, M., Rouleau, A., y Frelet-Barrand, A. (2024). Concentration vs. Optical Density of ESKAPEE Bacteria: A Method to Determine the Optimum Measurement Wavelength. *Sensors*, 24(24). <https://doi.org/10.3390/s24248160>
170. Wagner, A. O., Markt, R., Mutschlechner, M., Lackner, N., Prem, E. M., Praeg, N., y Illmer, P. (2019). Medium Preparation for the Cultivation of Microorganisms under Strictly Anaerobic/Anoxic Conditions. *Journal of Visualized Experiments*, 150. <https://doi.org/10.3791/60155>
171. Waite, D. W., Chuvochina, M., Pelikan, C., Parks, D. H., Yilmaz, P., Wagner, M., Loy, A., Naganuma, T., Nakai, R., Whitman, W. B., Hahn, M. W., Kuever, J., y Hugenholtz, P. (2020). Proposal to reclassify the proteobacterial classes *deltaproteobacteria* and *oligoflexia*, and the phylum *thermodesulfobacteria* into four phyla reflecting major functional capabilities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(11), 5972–6016. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004213>
172. Widdel, F., y Bak, F. (1992). Gram-Negative Mesophilic Sulfate-Reducing Bacteria. In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, y KH. Schleifer (Eds.), *The Prokaryotes* (2nd ed., pp. 3352–3378). Springer, New York, NY. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2191-1_21
173. William, V. U., y Magpantay, H. D. (2024). Arsenic and Microorganisms: Genes, Molecular Mechanisms, and Recent Advances in Microbial Arsenic Bioremediation. *Microorganisms*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms12010074>
174. Wolthers, M., Butler, I. B., y Rickard, D. (2007). Influence of arsenic on iron sulfide transformations. *Chemical Geology*, 236(3–4), 217–227. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2006.09.010>
175. World Health Organization. (2024). *Guidelines for drinking-water quality: small water supplies*.
176. Wu, J., y Rosen, B. P. (1991). The *ArsR* protein is a trans-acWng regulatory protein. *Molecular Microbiology*, 5(6), 1331–1336. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb00779.x>
177. Wysocki, R., Bobrowicz, P., Aw, S., y Aszewski, U. (1997). The *Saccharomyces cerevisiae* ACR3 Gene Encodes a Putative Membrane Protein Involved in Arsenite Transport. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(48), 30061–30061. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.48.30061>
178. Xu, H., Wang, Y., Yao, L., Ke, Y., Luo, Y., Zhang, L., Du, J., Yu, L., Cao, J., y Min, X. (2023). Treatment of Acidic Solutions Containing As(III) and As(V) by Sulfide Precipitation: Comparison of Precipitates and Sulfurization Process. *Metals*, 13(4). <https://doi.org/10.3390/met13040794>
179. Yan, G., Chen, X., Du, S., Deng, Z., Wang, L., y Chen, S. (2019a). Genetic mechanisms of arsenic detoxification and metabolism in bacteria. *Current Genetics*, 65(2), 329–338. <https://doi.org/10.1007/s00294-018-0894-9>

180. Yang, G., Chen, S., Zhou, S., y Liu, Y. (2015). Genome sequence of a dissimilatory Fe(III)- reducing bacterium *Geobacter soli* type strain GSS01T. *Standards in Genomic Sciences*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s40793-015-0117-7>
181. Yang, H. C., Cheng, J., Finan, T. M., Rosen, B. P., y Bhattacharjee, H. (2005). Novel pathway for arsenic detoxification in the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 187(20), 6991–6997. <https://doi.org/10.1128/JB.187.20.6991-6997.2005>
182. Yang, H. C., Fu, H. L., Lin, Y. F., y Rosen, B. P. (2012). Pathways of Arsenic Uptake and Efflux. *Current Topics in Membranes*, 69, 325–358. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394390-3.00012-4>
183. Yang, J., Rawat, S., Stemmler, T. L., y Rosen, B. P. (2010). Arsenic binding and transfer by the ArsD as (III) metallochaperone. *Biochemistry*, 49(17), 3658–3666. <https://doi.org/10.1021/bi100026a>
184. Yoshinaga, M., y Rosen, B. P. (2014). A C·As lyase for degradation of environmental organoarsenical herbicides and animal husbandry growth promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(21), 7701–7706. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403057111>
185. You, W., Peng, W., Tian, Z., y Zheng, M. (2021). Uranium bioremediation with U(VI)-reducing bacteria. *Science of the Total Environment*, 798. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149107>
186. Yu, H., Zahidi, I., y Fai, C. M. (2023). Reclaiming abandoned mine tailings ponds for agricultural use: Opportunities and challenges. *Environmental Research*, 232. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116336>
187. Yuan, C., Li, Q., Sun, Z., Zhang, W., Chen, J., Chen, Z., Na, S., y Sun, H. (2023). Chemical oxidation of arsenic in the environment and its application in remediation: A mini review. *Pedosphere*, 33(1), 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.pedsph.2022.06.033>
188. Zargar, K., Hoefft, S., Oremland, R., y Saltikov, C. W. (2010). Identification of a novel arsenite oxidase gene, *arxA*, in the haloalkaliphilic, arsenite-oxidizing bacterium *Alkalilimnicola ehrlichii* strain MLHE-1. *Journal of Bacteriology*, 192(14), 3755–3762. <https://doi.org/10.1128/JB.00244-10>
189. Zehnder, A. J. B., y Wuhrmann, K. (1975). Titanium(al) Citrate as a Nontoxic Oxidation-Reduction Buffering System for the Culture of Obligate Anaerobes. *Science*, 194(4270), 1165–1166. <https://doi.org/10.1126/science.793008>
190. Zhang, J., Liu, J., Zheng, F., Yu, M., Shabala, S., y Song, W. Y. (2022). Comparative Analysis of Arsenic Transport and Tolerance Mechanisms: Evolution from Prokaryote to Higher Plants. *Cells*, 11(17). <https://doi.org/10.3390/cells11172741>
191. Zhang, M., Wang, J., Liu, X., Lv, Y., Yu, B., Gao, B., y Yan, X. (2022). Mine tailings remediation via sulfate-reducing bacteria and iron-reducing bacteria: heavy metals immobilization and biological sealing. *Chemistry and Ecology*, 38(8), 706–719. <https://doi.org/10.1080/02757540.2022.2112182>
192. Zhou, X., Speer, R. M., Volk, L., Hudson, L. G., y Liu, K. J. (2021). Arsenic co-carcinogenesis: Inhibition of DNA repair and interaction with zinc finger proteins. *Seminars in Cancer Biology*, 76, 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.05.009>
193. Zhu, X., Wang, R., Lu, X., Liu, H., Li, J., Ouyang, B., y Lu, J. (2015). Secondary minerals of weathered orpiment-realgar-bearing tailings in Shimen carbonate-type realgar mine, Changde, Central China. *Mineralogy and Petrology*, 109(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s00710-014-0344-4>

ANEXOS

A. DATOS DE CONCENTRACIÓN DE AS Y MARCO LEGAL

Tabla A - 1. Concentraciones límites de contaminación de suelos (superficial y profundo) en relación al destino específico de uso de los sitios en remediación. Traducción del artículo 186 de la Norma Ambiental Italiana (Ministerio Della Giustizia Italiano, 2006)

Compuestos inorgánicos	Sitios de uso verde público, privado y residencial (mg kg-1 expresados como suelo seco)	Sitios comerciales e industriales (mg kg-1 expresado como suelo seco)
1.- Antimonio	10	30
2.- Arsénico	20	50
3.- Berilio	2	10
4.- Cadmio	2	15
5.- Cobalto	20	250
6.- Cromo total	150	800
7.- Cromo VI	2	15
8.- Mercurio	1	5
9.- Níquel	120	500
10.- Plomo	100	1000
11.- Cobre	120	600
12.- Selenio	3	15
13.- Estaño	1	350
14.- Talio	1	10
15.- Vanadio	90	250
16.- Zinc	150	1500
17.- Cianuros (libres)	1	100
18.- Fluoruros	100	2000

Tabla A - 2. Principales minerales de As evidenciados en la naturaleza (Panagiotaras. D. *et al.*, 2012).

Mineral	Composición	Ocurrencia
Arsénico nativo	As	Vetas hidrotermales
Niquelina	NiAs	Depósitos de vetas y norita
Rejalgar	As ₂ S ₂	Depósitos de vetas, asociado a oropimente, arcilla y caliza. También en depósitos de fuentes termales

Mineral	Composición	Ocurrencia
Oropimente	As ₂ S ₃	Vetas hidrotermales, fuentes termales y productos de sublimación volcánica
Cobaltita	CoAsS	Depósitos de alta temperatura, dominante en vetas minerales
Arsenopirita	FeAsS	Mineral de As mas abundante, dominante en vetas minerales
Tennantita	(Cu,Fe) ₁₂ As ₄ S ₁₃	Vetas hidrotermales
Enargita	Cu ₃ AsS ₄	Vetas hidrotermales
Arsenolita	As ₂ O ₃	Mineral secundario formado por la oxidación de arsenopirita, arsénico nativo y otros minerales de As
Claudetita	As ₂ O ₃	Mineral secundario formado por la oxidación de rejalgar, arsenopirita y otros minerales de As.
Escorodita	FeAsO ₄ · 2H ₂ O	Mineral secundario
Annabergita	(Ni,Co) ₃ (AsO ₄) ₂ · 8H ₂ O	Mineral secundario
Hoernesita	Mg ₃ (AsO ₄) ₂ · 8H ₂ O	Mineral secundario y desechos de fundición
Hematolita	(Mn,Mg) ₄ Al(AsO ₄)(OH) ₈	Mineral secundario
Conicalcita	CaCu(AsO ₄)(OH)	Mineral secundario
Farmacosiderita	Fe ₃ (AsO ₄) ₂ (OH) ₃ · 5H ₂ O	Productos de la oxidación de arsenopirita y otros minerales de As

Tabla A - 3. Minerales formadores de roca comunes y concentraciones de As encontrados. Traducido y modificada desde (Smedley y Kinniburgh, 2002).

Tipo de Mineral	Mineral	Composición	Concentraciones de As en mg kg ⁻¹
Sulfuros	Pirita	FeS ₂	100 – 77.000
	Pirrotita	Fe _(1-x) S (x = 0 - 0,2)	5 – 100
	Marcasita	FeS ₂	20 – 126.000
	Galena	PbS	5 – 10.000
	Esfalerita	ZnS	5 – 17.000
	Calcopirita	CuFeS ₂	10 – 5.000
	Óxidos minerales	Hematita	Fe ₂ O ₃
Óxidos de Fe		Fe ^(II) O – Fe ^(III) ₂ O ₃	< 2000
Oxihidróxido de Fe(III)		FeO (OH)	< 76.000
Magnetita		Fe ^(II) Fe ^(III) ₂ O ₄	2,7 - 41
Ilmenita		FeTiO ₃	< 1
Minerales silicatos	Cuarzo	SiO ₂	0,4 – 1,3
	Feldespato	(K,Na,Ca,Ba,NH ₄)(Si,Al) ₄ O ₈	< 0,1 – 2,1
	Biotita	K(Mg,Fe) ₃ AlSi ₃ O ₁₀ (OH,F) ₂	1,4
	Anfibol	Complejo	1,1 – 2,3

Tipo de Mineral	Mineral	Composición	Concentraciones de As en mg kg ⁻¹
	Olivino	(Mg,Fe) ₂ SiO ₄	0,08 – 0,17
	Piroxeno	(Ca,Mg,Fe,Mn,Na,Li)(Al, Mg, Fe, Mn,Cr,Sc,Ti)(Si, Al) ₂ O ₆	0,05 – 0,8
Minerales carbonatados	Calcita	CaCO ₃	1 – 8
	Dolomita	CaMg(CO ₃) ₂	< 3
	Siderita	FeCO ₃	< 3
Minerales sulfatados	Yeso / Anhidrita	CaSO ₄ · 2H ₂ O	< 1 – 6
	Barita	BaSO ₄	< 1 – 12
	Jarosita	KFe ₃ (SO ₄) ₂ (OH) ₆	34 – 1000
Otros Minerales	Apatita	Ca ₅ (PO ₄) ₃ (F,Cl,OH)	< 1 – 1000
	Halita	NaCl	< 3 – 30
	Fluorita	CaF ₂	< 2

Tabla A - 4. Concentración de arsénico en rocas y sedimento. Traducido desde (Smedley y Kinniburgh, 2002).

Tipo de Roca o Sedimento	Roca o sedimento	Concentración de As promedio y/o rango en mg kg ⁻¹
Rocas Ígneas	Rocas ultra básicas (peridotita, dunita, kimberlita, otros)	1,5 (0,03 - 15,8)
	Rocas Básicas (basalto)	2,3 (0,18 - 113)
	Rocas Básicas (gabro, dolerita)	1,5 (0,06 - 28)
	Intermedia (andesita, traquito, latita)	2,7 (0,5 - 5,8)
	Intermedia (diorita, granodiorita, sienita)	1,0 (0,09 - 13,4)
	Rocas ácidas (riolita)	4,3 (3,2 - 5,4)
	Rocas ácidas (granito, aplita)	1,3 (0,2 - 15)
	Rocas ácidas (piedra de brea)	1,7 (0,5 - 3,3)
	Vidrios volcánicos	5,9 (2,2 - 12,2)
	Rocas metamórficas	Cuarcita
Hornfels		5,5 (0,7 - 11)
Filita/pizarra		18 (0,5 - 143)
Esquisto/gneis		1,1 (<0,1 - 18,5)
Anfibolita y piedra verde		6,3 (0,4 - 45)
Rocas Sedimentarias	Lutita/lodolita marina	3 - 15 (< 490)
	Lutita (Cordillera Mesoatlántica)	174 (48 - 361)

Tipo de Roca o Sedimento	Roca o sedimento	Concentración de As promedio y/o rango en mg kg⁻¹
	Lutita/lodolita no marina	3,0 – 12
	Arenisca	4,1 (0,6 - 120)
	Caliza/dolomita	2,6 (0,1 - 20,1)
	Fosforita	21 (0,4 - 188)
	Formaciones de hierro y sedimentos ricos en Fe	1 – 2900
	Evaporitas (yeso/anhidrita)	3,5 (0,1 - 10)
	Carbones	0,3 – 35.000
	Esquisto bituminoso (Kupferschiefer, Alemania)	100 – 900
Sedimentos No Consolidados	Varios	3 (0,6 - 50)
	Arena aluvial (Bangladesh)	2,9 (1,0 - 6,2)
	Lodo/arcilla aluvial (Bangladesh)	6,5 (2,7 - 14,7)
	Sedimentos del lecho fluvial (Bangladesh)	1,2 - 5,9
	Sedimentos lacustres, Superior Lake (Canadá)	2,0 (0,5 - 8,0)
	Sedimentos lacustres, British Columbia (Canadá)	5,5 (0,9 - 44)
	Till glacial, British Columbia (Canadá)	9,2 (1,9 - 170)
	Promedio mundial de sedimentos fluviales	5
	Limos de arroyos y lagos (Canadá)	6 (< 1 - 72)
	Limo de loess (Argentina)	5,4 – 18
	Sedimentos del margen continental (arcilloso, algo anóxico)	2,3 – 8,2
Suelos	Varios	7,2 (0,1 - 55)
	Suelos de turba y turberas	13 (2 - 36)
	Suelos sulfatados ácidos (Vietnam)	6 – 41
	Suelos sulfatados ácidos (Canadá)	1,5 – 45
	Suelos cerca de depósitos de sulfuros	126 (2 – 8000)
Depósitos superficiales contaminados	Sedimentos lacustres contaminados por minería, British Columbia (Canadá)	342 (80 – 1104)
	Sedimentos de embalse contaminados por la minería, Montana (EE. UU.)	100 – 800
	Relaves mineros, British Columbia (Canadá)	903 (396 - 2000)

Tipo de Roca o Sedimento	Roca o sedimento	Concentración de As promedio y/o rango en mg kg ⁻¹
	Suelos y relaves contaminados (Reino Unido)	120 – 52.600
	Suelo contaminado con relaves, Montana (EE. UU.)	< 1100
	Sedimentos intermareales contaminados industrialmente (EE. UU.)	0,38 - 1260
	Suelos debajo de una fábrica de productos químicos (EE. UU.)	1,3 - 4770
	Lodos de depuradora	9,8 (2,4 - 39,6)

Tabla A - 5. Concentración máximas de arsénico reportadas en aguas subterráneas alrededor del mundo. Extraído de Ortiz Letechipia *et al.* (2022).

País o lugar	Concentración As µg L ⁻¹
Afganistán	100
África	1760
Argentina	3810
Bangladesh	>1000
Chile	770
China	850
Chipre	64
Finlandia	980
Grecia	>1000
Hungría	68
India	50
México	241
EE.UU.	210

Tabla A - 6. Límites máximos permitidos de As según el destino de descarga de líquidos a cuerpos de agua superficiales o respecto al tipo/uso del agua. Elaboración propia en base a la legislación chilena.

Destino de descarga líquidos a cuerpos de agua o uso de agua	Límite máximo en mg L ⁻¹	Normativa
• Descarga a cuerpos de agua fluviales	0,5	Decreto 90 (2000)
• Descarga a cuerpos de agua fluviales (considerando capacidad de dilución del receptor)	1	Decreto 90 (2000)
• Descarga a cuerpos de agua lacustres	0,1	Decreto 90 (2000)

Destino de descarga líquidos a cuerpos de agua o uso de agua	Límite máximo en mg L ⁻¹	Normativa
• Descarga a cuerpos de agua marinos dentro de la zona de protección litoral	0,2	Decreto 90 (2000)
• Descarga a cuerpos de agua marinos fuera de la zona de protección litoral	0,5	Decreto 90 (2000)
• Agua mineral	0,01	Decreto 106 (1997)
• Agua potable	0,01	NCh 409 (2005)
• Agua para riego	0,1	NCh 1333 (1978)

B. DATOS COMPLEMENTARIOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE AS

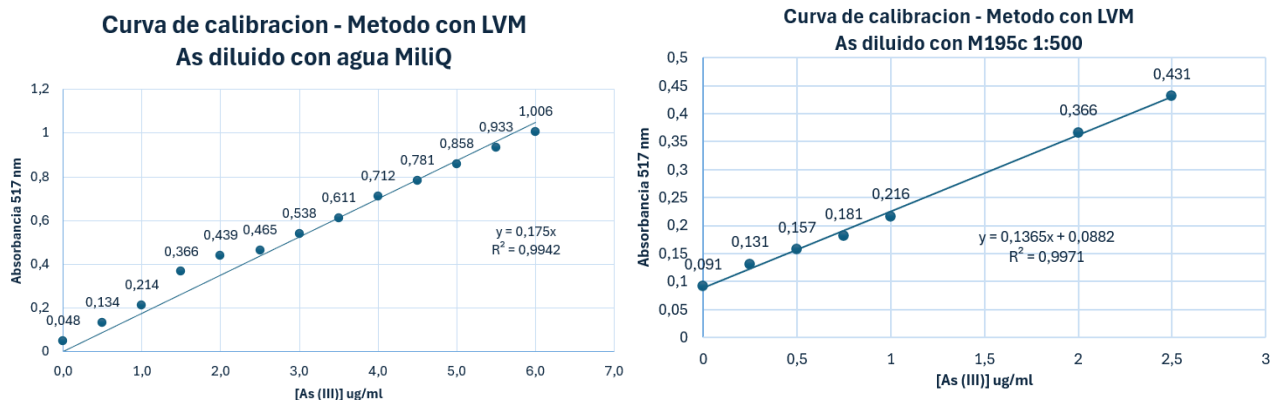


Figura B - 1. Curvas de calibración para metodología de medición de As con LVM. A la izquierda, estándar de arsénico diluido con agua MiliQ, mientras que a la derecha, estándar de arsénico diluido con M195c a su vez diluido a una razón de 1:500.

Tabla B – 1. Curva de calibración para medición de arsénico con LVM. Dilución arsénico en agua MiliQ.

[As(III)] µg/mL	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6
ABS 617 nm	0,048	0,134	0,214	0,366	0,439	0,465	0,538	0,611	0,712	0,781	0,858	0,933	1,006

Tabla B - 2. Curva de calibración para medición de arsénico con LVM. Dilución de arsénico en M195c diluido 1:500.

[As(III)] µg/mL	0	0,25	0,5	0,75	1	2	2,5
ABS 617 nm	0,091	0,131	0,157	0,181	0,216	0,366	0,431

Tabla B - 3. Prueba de medición de arsénico total en M195c diluido 1:500 con LVM, con procedimiento previo de reducción de As(V) a As(III) con KI.

[As(III)] µg/mL	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
ABS 617 nm	0,002	0,002	0,001	0,001	0,002	0,004	0,003	0,000	0,002	0,001	0,002

Tabla B - 4. Detalle del análisis espectrofotométrico con LVM de muestras inoculadas con *Halodesulfobrio aestuarii* (I) y medio estéril (C) a 0,1, 0,2, 0,3 y 0,4 mM de As(III).

Muestra As(III)	I_0	I_0,1	I_0,2	I_0,3	I_0,4	C_0	C_0,1	C_0,2	C_0,3	C_0,4
ABS	0,511	0,515	0,480	0,475	0,595	0,351	0,357	0,395	0,392	0,3395
[As(III)] mM muestra (sin ajuste)	14,41	14,52	13,53	13,39	16,78	9,90	10,07	11,14	11,05	9,57
ABS corregida	0,000	0,004	-0,031	-0,036	0,084	0,000	0,006	0,044	0,041	-0,0115
[As (III)] µg/ml	-	0,03	-0,23	-0,26	0,62	-	0,04	0,32	0,30	-0,08
[As(III)] mM dilución	-	2,E-04	-2,E-03	-2,E-03	5,E-03	-	3,E-04	2,E-03	2,E-03	-6,E-04
[As(III)] mM muestra	-	0,113	-0,874	-1,015	2,369	-	0,169	1,241	1,156	-0,324

C. REGISTROS DE PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES



Figura C - 1. Relave Petronila Diaz, ubicado a una cuadra del centro de Petorca, Región de Valparaíso, Chile. En amarillo, sección del relave, respecto a la ciudad de Petorca. Según datos del SERNAGEOMIN - Subdirección de Minería (2023) , en promedio se encuentran 400 mg de arsénico por kg de relave Imágenes tomadas desde Google Earth Pro, Image @ 2025 Airbus.

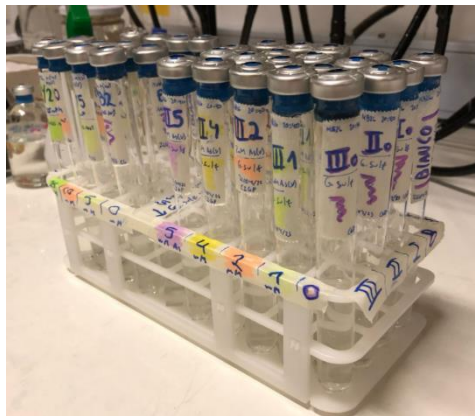


Figura C - 2. Tubos sellados con tapón de goma y sello de aluminio, anóxicos e inoculados con microorganismo correspondiente.

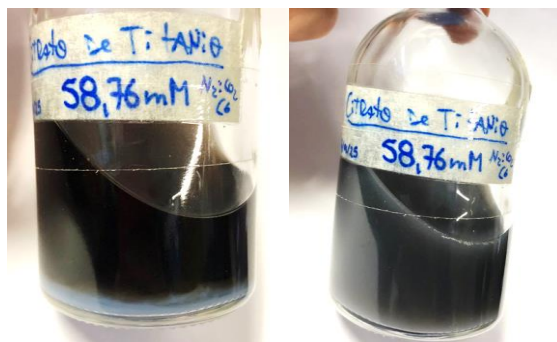


Figura C - 3. Citrato de Titanio (III) con precipitado de carbonato. A la derecha, sin agitar, mientras que a la izquierda se muestra luego de su agitación.



Figura C - 4. Figura C - 4. Proceso de gasificación en tubos (izquierda) y en botellas (derecha). Notar además que al gasificar con una atmosfera 80%:20% de N₂:CO₂, la resazurina acuosa (violeta) se reduce a resorufina (rosada).

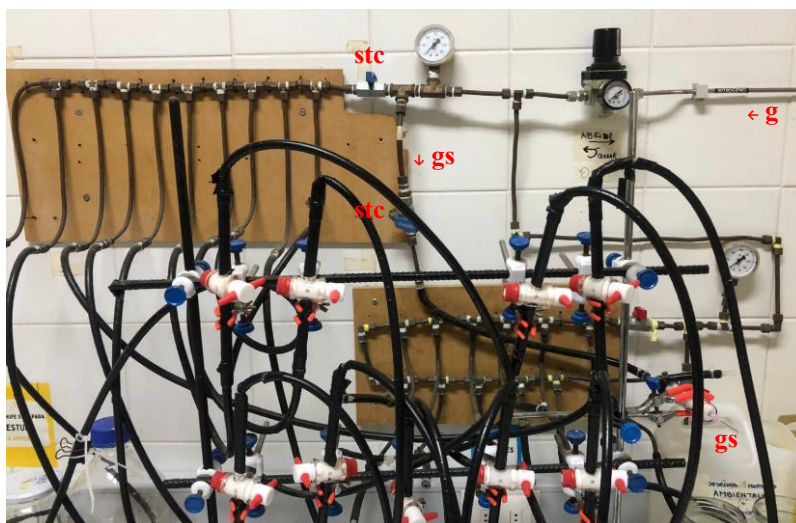
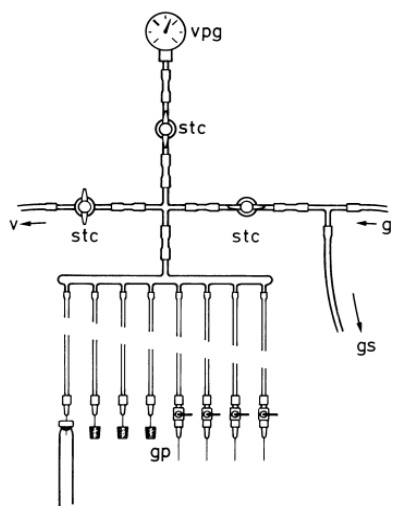


Figura C - 5. Diagrama de la estación gasificadora (Widdel, F. y Bak, F., 1992) (izquierda) y estación utilizada (derecha). Se indican en rojo el ingreso del gas anóxico (g) consistente en 80%:20% de N₂ y CO₂, las válvulas de paso (stc), la salida de gas a través de la jeringa estéril (gs) y la salida a los brazos flexibles para la gasificación de tubos y botellas.

D. INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA DE MICROORGANISMOS ESTUDIADOS

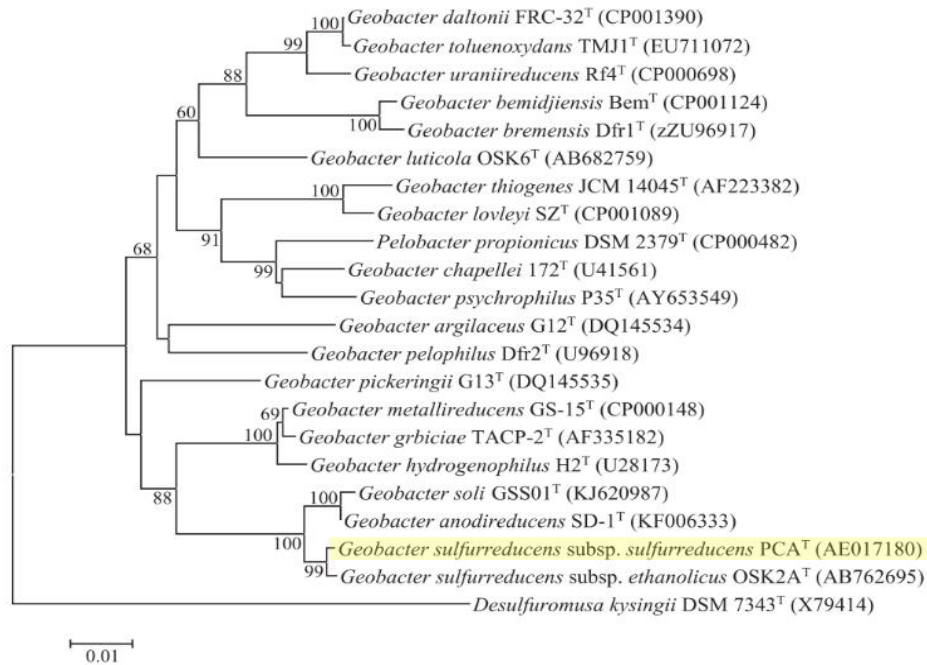


Figura D - 2. Árbol filogenético basado en la secuenciación del gen 16S rRNA evidenciando ubicación de *Geobacter sulfurreducens*. Extraído de G. Yang et al. (2015).

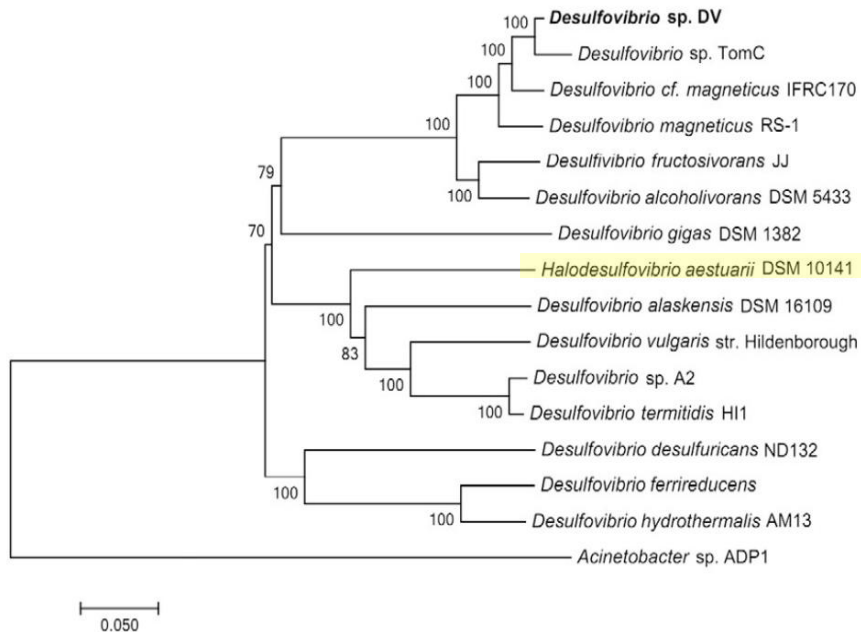


Figura D - 1. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen 16s de rRNA evidenciando la ubicación de *Halodesulfovibrio aestuarii*. Extraído de Kovaliova et al. (2017).

E. RESUMEN DE OBJETIVOS, ACTIVIDADES Y RESULTADOS

Tabla E - 1. Resumen de los parámetros cinéticos obtenidas con ambos microorganismos, *Geobacter sulfurreducens* como *Halodesulfovibrio aestuarii*, para las distintas especiaciones de arsénico como también en los distintos agentes reductores utilizados (solo la segunda especie).

Microorganismo	As	Agente Reductor	Condición	μ (h ⁻¹)	td (h)	Lag (h)	OD _{Max}	Hora OD _{Max}
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	As (III)	-	Control	0,0597	11,61	7,5	0,743	75,8
		-	0,1 mM	0,0189	36,67	55	0,451	141,3
	As (V)	-	Control	0,0492	14,09	8,83	0,751	80,3
		-	1 mM	0,0290	23,90	45,50	0,215	80,3
		-	2 mM	0,0290	23,90	33,33	0,362	99,2
		-	4 mM	0,0102	67,96	80,33	0,201	165,9
-	5 mM	0,0103	67,30	99,17	0,158	190,1		
<i>Halodesulfovibrio aestuarii</i>	As (III)	Na ₂ S	Control	0,0954	7,27	10	0,402	35,3
			0,1	0,0500	13,86	28	0,387	75,8
		Ci-Ti(III)	Control	0,1114	6,22	4,67	0,552	36,8
			0,1 mM	0,0514	13,49	46,67	0,521	76,8
		Cisteína	Control	0,0504	13,75	5,50	0,470	48,8
			0,1 mM	0,0398	17,42	5,50	0,470	53,3
	0,2 mM		0,0306	22,65	5,50	0,405	91,5	
	0,3 mM		0,0172	40,30	29,33	0,444	144,0	
	0,4 mM	0,0181	38,30	53,33	0,358	211,2		
	As (V)	Cisteína	Control	0,0561	12,36	5,25	0,486	48,6
			0,5 mM	0,0261	26,56	5,25	0,243	66,9
			1 mM	0,0357	19,42	5,25	0,197	48,6
3 mM			0,0800	8,66	29,33	0,157	48,6	
5 mM			0,0621	11,16	29,33	0,107	48,6	

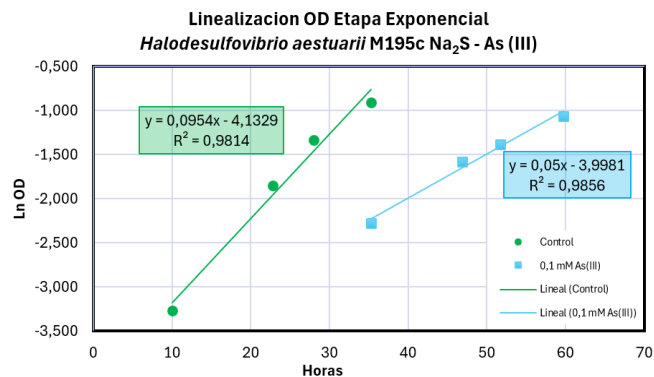


Figura E - 1. Linealización etapa exponencial para *Halodesulfovibrio aestuarii* en M195c con Na₂S como agente reductor y As(III). Control (sin As) en verde, en azul muestra con 0,1 mM de NaAsO₂.

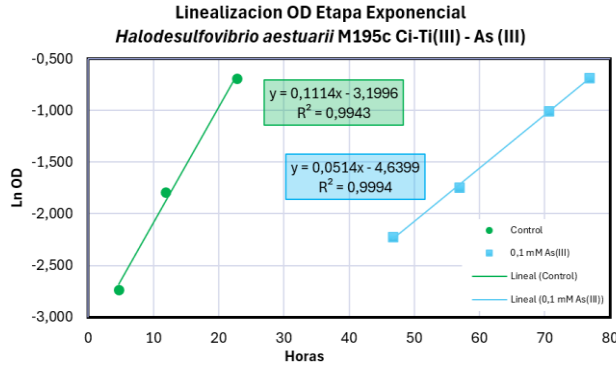


Figura E - 3. Linealización etapa exponencial para *Halodesulfovibrio aestuarii* en M195c con Ci-Ti(III) como agente reductor y As(III). Control (sin As) en verde, en azul muestra con 0,1 mM de NaAsO₂.

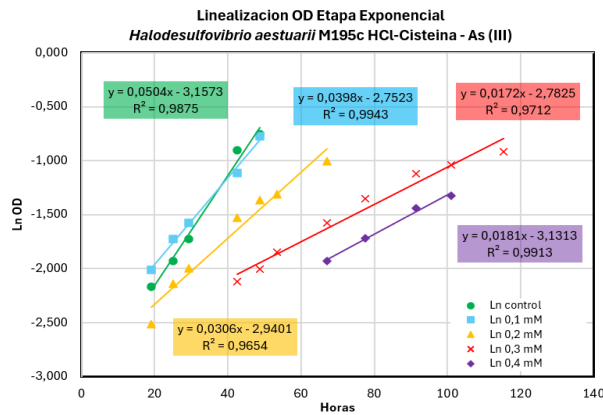


Figura E - 2. Linealización etapa exponencial para *Halodesulfovibrio aestuarii* en M195c con HCl-Cisteína como agente reductor y As(III). Control (sin As) en verde, celeste, naranja, rojo y morado corresponden a muestras con 0,1, 0,2, 0,3 y 0,4 mM de As(III) respectivamente.

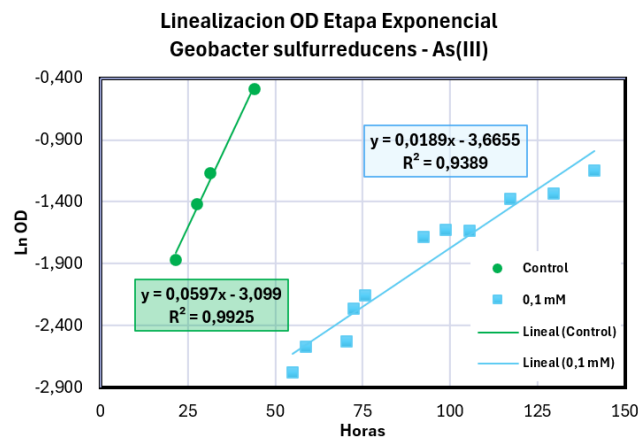


Figura E - 4. Linealización etapa exponencial para *Geobacter sulfurreducens* en M826 c/NaAsO₂. Control sin As en verde, en azul muestra con 0,1 mM de NaAsO₂.

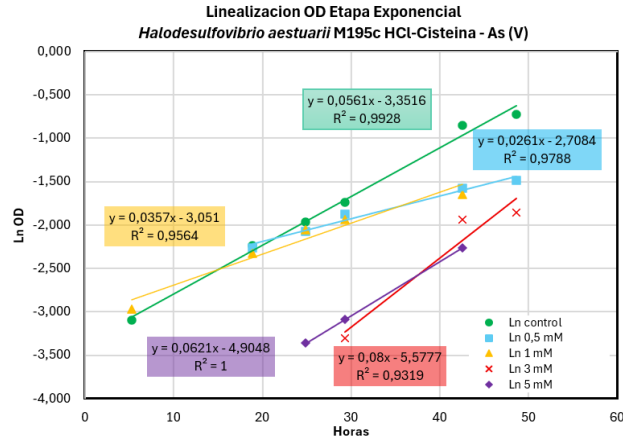


Figura E - 6. Linealización etapa exponencial para *Halodesulfobivrio aestuarii* en M195c con HCl-Cisteína como agente reductor y As(III). Control (sin As) en verde, celeste, naranja, rojo y morado corresponden a muestras con 0,5, 1, 3 y 5 mM de As(V) respectivamente.

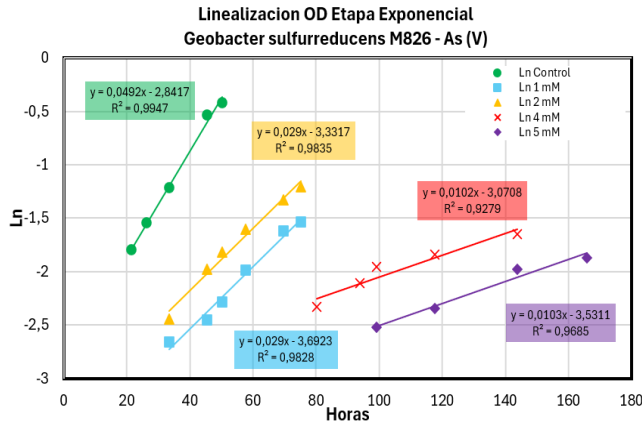


Figura E - 5. Linealización etapa exponencial para *Geobacter sulfurreducens* en M826 con As(V). Control sin As en verde, en celeste, naranja, rojo y morado muestras con concentraciones de 1, 2, 4, 5 mM de As(V) respectivamente.

Tabla E - 2. Resumen de actividades, resultados y principales conclusiones por objetivo planteado.

<i>Objetivo</i>	<i>Actividad</i>	<i>Resultado</i>	<i>Conclusión</i>
<i>Evaluación de mejoras para análisis de As</i>	Prueba abiótica de interacción entre agente reductor con As.	<p>Na₂S: En M195c con As(III), generó precipitado amarillo inmediato (~10 segundos desde adición de As), gránulos suficientemente grandes para generar una variación de ± 0.100 en la OD. No se evidencia cambio de color por oxidación de resazurina. Con As(V), no se evidencia precipitado ni cambios visuales hasta las 168 horas, a lo cual se evidencia leve color rosado de resorufina.</p> <p>Ci-Ti(III): Generación de precipitado Marrón a las 24h, alta OD inicial y cambio de color de resazurina a rosa fuerte a las 48h.</p> <p>HCl-Cisteína: No se evidencian cambios visibles dentro de 30 días. No hay precipitado o color de resorufina (rosado). OD estable sin variaciones importantes. Mismos resultados con As(V).</p>	<p>Na₂S: Precipitado abiótico de posiblemente As₂S₃, podría reducir la biodisponibilidad de As en el medio, subestimando el efecto de este contaminante en el microorganismo; imposibilitar toma de datos espectrofotométricos ante el tamaño de los gránulos generados; y podría enmascarar el crecimiento microbiano.</p> <p>Ci-Ti(III): Precipitado abiótico podría sobreestimar crecimiento microbiano o disminuir As biodisponible, generando un error asociado importante.</p> <p>HCl-Cisteína: Al no presentar efectos visibles de la interacción de As, es un importante candidato como agente reductor. Requerido análisis molecular de su interacción con As.</p>
	Estabilidad de precipitado abiótico de As ₂ S ₃	Precipitado se mantiene estable a condiciones reductoras (anóxico). Abierto a la atmosfera, este es disuelto alrededor de 120h.	El precipitado que podrían generar BSR, puede ser soluble a condiciones aerobias, movilizándolo el As precipitado.
	Análisis Cuantitativo de presencia de As con LVM.	Coloración inusual al medir As(III) (verde oscuro frente a color cian en muestras comunes) y ~0,500 de OD a diluciones de 1:500, calculándose concentraciones hasta 2 órdenes de magnitud	Alta concentración de interferentes (como sulfato, sulfuro y cloruro) podrían afectar equilibrio LVM – VM, como también generar precipitados que afecten al color final, y así sobreestimar la concentración.

Objetivo	Actividad	Resultado	Conclusión
<p data-bbox="233 1671 391 1734"><i>Análisis del Metabolismo</i></p>		<p data-bbox="748 226 1062 491">superiores a valor real. Mediciones de As total cercanas a OD 0 a dilución 1:500, mientras que a mayor dilución se genera precipitado negro y coloración ámbar en muestras.</p>	
	<p data-bbox="444 968 724 1062">Análisis Cualitativa de presencia de As con AgNO₃.</p>	<p data-bbox="748 527 1062 827">Estándares de As: Coloración correspondiente solo a 10 mM y 100 mM de As(III) y As(V) respectivamente, como también ante mezcla de ambos. A menor concentración no se evidencia color.</p> <p data-bbox="748 827 1062 1127">M195c diluido (muestras 0,5mM As(V), 0,1 mM As(III) y Control, todas con y sin inoculo): Precipitación negro a marrón dependiendo de la dilución. 1:10 negro; 1:100 marrón; 1:500 leve turbidez blanca.</p> <p data-bbox="748 1163 1062 1499">M195c sobrenadante (muestras 5 y 0,5 mM As(V), 0,4 y 0,1 mM As(III) y control): Precipitación marrón aun en primer sobrenadante. Segundo sobrenadante se enturbia con coloración blanca, que no cambia adición extra de AgNO₃.</p>	<p data-bbox="1084 779 1451 911">Precipitación de cloruros y sulfuros, con un Ksp importante, enmascaran la precipitación de arsénico.</p> <p data-bbox="1084 947 1451 1178">Mayor dilución elimina % de interferentes, pero disminuye concentración de As a niveles no perceptibles por la metodología, enmascarados por la rápida precipitación de cloruros.</p>
	<p data-bbox="444 1619 724 1787">Curva de crecimiento: <i>Halodesulfovibrio aestuarii</i> con Na₂S como gente reductor en M195c con As(III).</p>	<p data-bbox="748 1499 1062 1896">Crecimiento levemente ralentizado a 0,1 mM As(III) (menor μ y leve mayor t_D), alcanzando igual OD máxima (~0,400) a su contraparte sin arsénico. Biopelícula negra débil a la remoción mecánica. No se evidencia precipitado de sulfuro de arsénico amarillo a 0,1 mM de As(III).</p>	<p data-bbox="1084 1583 1451 1814"><i>Halodesulfovibrio aestuarii</i> tolera concentraciones de 0,1 mM de As(III) al presentar algún mecanismo de resistencia a un coste energético que ralentiza su crecimiento.</p>

Objetivo	Actividad	Resultado	Conclusión
	<p>Curva de crecimiento: <i>Halodesulfovibrio aestuarii</i> con Ci-Ti(III) como gente reductor en M195c con As(III).</p>	<p>Crecimiento ralentizado drásticamente a 0,1 mM As(III) (menor μ y mayor t_D), sin embargo alcanza igual OD máxima (~0,400) a su contraparte sin arsénico. Se evidencia precipitado marrón que enmascara biomasa a mayores concentraciones de As(III). Se alcanza una mayor OD máxima que en M195c tradicional y modificado con cisteína.</p>	<p><i>Halodesulfovibrio aestuarii</i> ralentiza su crecimiento en presencia de As(III) indicando mecanismo de detoxificación. Podría tener un crecimiento potenciado (mayor OD máxima) por la presencia de Ci-Ti(III), sin embargo, precipitado en todas las muestras podrían indicar un valor sobreestimado y/o generar una menor biodisponibilidad de As que permite dicho comportamiento.</p>
	<p>Curva de crecimiento: <i>Halodesulfovibrio aestuarii</i> con HCl-Cisteína como gente reductor en M195c con As(III).</p>	<p>Crecimiento sin efectos a 0,1 mM As(III) (símil a control). Concentraciones crecientes de As(III). Mayores concentraciones ralentizan crecientemente el crecimiento de <i>Halodesulfovibrio aestuarii</i>. No se evidencia precipitado de sulfuro de arsénico en ningún caso. Tampoco, de otros precipitados que afecten notoriamente la medición espectrofotométrica.</p>	<p><i>Halodesulfovibrio aestuarii</i> ralentiza su crecimiento en presencia de As(III), tolerando incluso 0,4 mM, indicando mecanismo de detoxificación, a un coste energético. La no precipitación de sulfuros de arsénico amarillos indican que no se alcanzan las concentraciones requeridas para desencadenar la reacción, por lo que existe otro mecanismo que abate As(III) o la cantidad de H₂S generado es bajo. Cisteína como agente reductor resulta la mejor opción para mediciones espectrofotométricas.</p>
	<p>Curva de crecimiento: <i>Halodesulfovibrio aestuarii</i> con HCl-Cisteína como gente reductor en M195c con As(V).</p>	<p>Disminución paulatina del crecimiento a mayor concentración de As(V). La velocidad específica no varía en demasía, manteniéndose dentro de un rango alrededor del valor original sin arsénico. No se evidencian precipitados de sulfuro de arsénico y otros que impidan un registro espectrofotométrico. Se observan biopelícula abundante que crece de</p>	<p><i>Halodesulfovibrio aestuarii</i> presenta mecanismo para reducir As(V) a As(III) y resistir a la toxicidad del arsénico, sin embargo, sin la precipitación de sulfuros de As. El crecimiento a través de las paredes de los tubos darían cuenta de una presión ascendente en la biopelícula o de la disminución de la densidad en esta provocado por la producción de un compuesto de menor densidad que el medio acuoso, siendo un candidato, por lo expuesto</p>

Objetivo	Actividad	Resultado	Conclusión
		manera vertical, por las paredes de los tubos.	anteriormente, compuestos metilados de As(III) volátiles.
	Curva de crecimiento: <i>Geobacter sulfurreducens</i> en M826 con As(III).	Crecimiento drásticamente afectado a 0,1 mM As(III), OD máxima se reduce un 40%. Biopelícula notoriamente más resistente a la remoción mecánica.	Geobacter sulfurreducens tolera As(III) en menor medida que Halodesulfovibrio aestuarii. La Biopelícula resistente podría indicar adaptación al estrés que puede generarse a si misma al liberar As desde minerales de hierro, a los que se mantiene unidos por requerirlos como fuente de aceptor de electrones, movilizándolo al reducirlo As(III) y expulsarlo de las células. Halodesulfovibrio aestuarii no requiere mantenerse adherida a un sustrato sólido ya que su principal aceptor de electrones, sulfato, se mantiene en fase acuosa, por lo que su biopelícula será más débil mecánicamente que la de Geobacter sulfurreducens.
	Curva de crecimiento: <i>Geobacter sulfurreducens</i> en M826 con As(V).	Crecimiento drásticamente afectado con As(V). Mayor crecimiento con 2mM que con 1mM. Biopelícula resistente mecánicamente	Crecimiento a 2 mM podría indicar que es requerido una cierta concentración de As(V) o As(III) para desencadenar respuesta eficiente contra el arsénico.
Análisis anotaciones del genoma – metabolismo Central (piruvato y azufre)		Metabolismo en gran parte completo. No encontradas estructuras del metabolismo del piruvato presentes en BSR como (R)-2-hidroxi-acido: Aceptor 2-Oxidoreductasa (1.1.99.6), Piruvato-ferredoxina oxidoreductasa (1.2.7.1), y Acetaldehído NAD ⁺ Oxidoreductasa (1.2.1.3). No encontradas estructuras del metabolismo del azufre	Metabolismo del piruvato altamente adaptado a la vida anaeróbica en un ambiente halófilo. Demuestra metabolismo oxidativo incompleto desde lactato a acetato. Metabolismo del azufre acorde a BSR, pero con estructuras importantes faltantes, que podrían no haber sido encontradas ante una revisión manual o que estas hayan sido determinadas como una enzima con una especificidad diferente pero una función similar. Se evidencian

Objetivo	Actividad	Resultado	Conclusión
		<p>presentes en BSR como: proteína de unión a ATP del sistema de transporte de sulfonato (7.6.2.14), Adenililsulfato quinasa (2.7.1.25), H₂S: [DsrC proteína]-ditiol oxidorreductasa (1.8.5.10) y Succinil-CoA: L-homoserina O-succiniltransferasa (2.3.1.46).</p>	<p>estructuras asociadas a la utilización de H₂ como aceptor de electrones, acorde con lo estipulado en la descripción de la especie.</p>
	<p>Análisis anotaciones del genoma – Metabolismo del As</p>	<p>Presencia de ArsC (reductasa) (Represor), ArsM (metiltransferasa) y Bomba Eflujo (posible ArsB)</p>	<p><i>Halodesulfobivrio aestuarii</i> tiene el potencial de desencadenar el proceso de detoxificación de As a través de la reducción de As(V) a As(III) y expulsión de este a través de una acr3. También con la capacidad de metilación de As(III) mediante una ArsM.</p>