



**IPICYT**

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**Bioprospección de microorganismos con resistencia a  
metales de sitios contaminados con arsénico**

Tesis que presenta

**Luis Augusto Rodarte Gómez**

Para obtener el grado de

**Maestría en Ciencias Ambientales**

Directora de la Tesis:

**Dra. María de Lourdes Berenice Celis García**

San Luis Potosí, S.L.P., Octubre de 2017



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Bioprospección de microorganismos con resistencia a metales de sitios contaminados con arsénico**" presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Luis Augusto Rodarte Gómez** y aprobada el veinte de octubre del dos mil diecisiete por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

**Dra. María de Lourdes Berenice Celis García**  
Directora de la tesis

**Dr. Elías Razo Flores**  
Miembro del Comité Tutorial

**Dr. Cesar Nieto Delgado**  
Miembro del Comité Tutorial



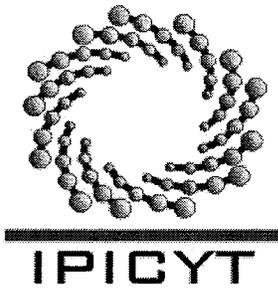
## **Créditos institucionales**

La presente tesis “Bioprospección de microorganismos con resistencia a metales de sitios contaminados con arsénico” fue elaborada por el alumno Luis Augusto Rodarte Gómez, estudiante del Posgrado en Ciencias Ambientales.

El trabajo experimental de esta tesis se realizó en los laboratorios de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Berenice Celis García.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT- 592082)

Este trabajo de investigación fue financiado por el proyecto de Ciencia Básica SEP-CONACYT 181809 “Comunidades microbianas sulfatorreductoras de ambientes extremos: función y estructura a pH ácido” asignado a la Dra. María de Lourdes Berenice Celis García y por el proyecto No. 32 del Consorcio Binacional para el Desarrollo Científico e Innovación Universidad de Arizona-CONACYT (Consorcio para las Zonas Áridas Arizona-México, CAZMEX).



# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 047 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 20 días del mes de octubre del año 2017, se reunió a las 17:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Elías Razo Flores</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Cesar Nieto Delgado</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. María de Lourdes Berenice Celis García</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

sustentó el C.

**Luis Augusto Rodarte Gómez**

sobre la Tesis intitulada:

*Bioprospección de microorganismos con resistencia a metales de sitios contaminados con arsénico*

que se desarrolló bajo la dirección de

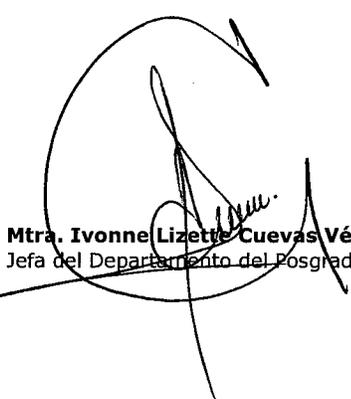
**Dra. María de Lourdes Berenice Celis García**

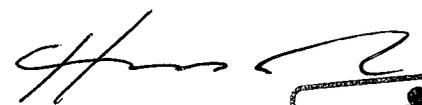
El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLO**

Dándose por terminado el acto a las 19:15 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 20 días del mes de octubre de 2017.

  
**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado

  
**Dr. Horacio Flores Zúñiga**  
Secretario Académico





## **Agradecimientos Institucionales**

Agradezco al IPICYT por la infraestructura y facilidades para realizar mi maestría.

Agradezco al CONACYT por la beca otorgada.

Se agradece a la M. en C. Dulce Partida, al M. en C. Guillermo Vidriales, al M. en C. Juan Pablo Rodas, a la M. en C. Elizabeth Cortés, a la M. en C. Alejandra Colunga, al M. en C. Mario Delgado, por su apoyo técnico brindado durante la realización de este trabajo de Tesis.

Se agradece a la Dra. Ma. Guadalupe Gutiérrez Escobedo por su apoyo técnico en el ensayo de concentración mínima inhibitoria de metales, asimismo se agradece a la Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro y al Dr. Alejandro de las Peñas Nava por las facilidades prestadas para hacer uso de las instalaciones del Laboratorio de Microbiología Molecular de Hongos de la División de Biología Molecular del IPICYT.

Se agradece a la técnico Verónica Zarate por su apoyo con la secuenciación de las muestras de ADN realizada en las instalaciones del Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA).



## Dedicatorias

A mis padres, por todo su cariño, apoyo incondicional y aliento.

A mis hermanos por todos sus ánimos.

A mis abuelas por ser mi motor y por todo el ejemplo de vida y fuerza que me han otorgado.

†A mi primo Héctor, y mis tíos Abe y José de Jesús “Pajarito”, por sus vívidos ejemplos de alegría y humildad.

A Ana Paula, bienvenida a la familia.

A Erika Ríos, por toda su paciencia, enseñanzas y consejos.

## Agradecimientos

Agradezco a la Dra. Berenice Celis de manera muy especial, primeramente por permitirme trabajar bajo su dirección, por compartir su conocimiento y experiencia, pero sobre todo, agradezco sus buenos consejos y apoyo durante esta dura etapa y por ayudarme a crecer como estudiante y como persona, así como por su gran calidez como persona. También deseo agradecer a mi comité tutorial, al Dr. Elías Razo y al Dr. César Nieto, por sus acertados consejos, aportaciones y críticas constructivas a este trabajo y a mi persona.

Agradezco de manera especial a la M. en C. Elizabeth Cortés Cedillo por todo su apoyo para realizar este proyecto, por sus sabios consejos, pero sobre todo por su enorme amistad.

Gracias al Dr. Ernesto Badano por su impulso y apoyo desde que llegué, y por abrirme las puertas a esta institución.

A la Dra. Esmeralda López Lozano por sus aportaciones a este trabajo.

Quisiera agradecer de manera especial al grupo de trabajo de la Dra. Berenice Celis, Erika Ríos, Nohemí Campos Quevedo, Tonatiuh Moreno, por su enorme paciencia, consejos, apoyo y amistad durante toda mi maestría, y con quienes pude compartir excelentes momentos dentro y fuera del ámbito académico.

A mis compañeros de generación y amigos: Ricardo, Hugo, Andy, Javier, Karen, Toño, Pancho, Ale, Ángel, Betsa, Bety, Lupita y Moni, por todos los momentos, buenos y malos, que compartimos juntos, por su calidez como personas, y por todo el apoyo y aliento que me brindaron en todo este proceso y quienes fungieron como mi familia.

Quisiera agradecer a personas con quienes entablé una buena amistad: Denny, Pao, Lupita Cortés, Miguel, Pepe, Cruz, Fabi, Iván, Neto, Saúl, Mayra, Mariana, Emily, Gerardo, Adrián, Ale Ramírez, Ayrton, Chris, espero no olvidar a ninguno.

A toda mi Familia y amistades en Aguascalientes, especialmente a José Juan, Edgar, Víctor, Memo, Abelardo, Gonzalo, Paulina, Zapata, Helga, Nancy, Rodo & J. Carlos, quienes estuvieron siempre al pendiente durante todo este trayecto.

A mis profesores y amigos la Dra. Samanta Ramos y el Dr. Juan Antonio Lozano, y la Ing. Laurita Yamamoto por todas sus enseñanzas e introducirme a la investigación.

Finalmente quisiera agradecer a alguien muy especial, Yael, quién me apoyó durante gran parte de esta etapa de mi vida, por todo su cariño e impulso durante momentos realmente difíciles y por hacerme crecer enormemente como persona y ser un parteaguas en mi vida.

## Tabla de contenido

Constancia de aprobación de la tesis.....	ii
Créditos Institucionales.....	iii
Agradecimientos Institucionales.....	iv
Acta de examen.....	v
Dedicatorias.....	vi
Agradecimientos.....	vii
Índice de tablas.....	xi
Índice de figuras.....	xii
Índice de Anexos.....	xiv
Resumen.....	xv
Abstract.....	xvi
<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Marco Teórico.....</b>	<b>2</b>
2.1 Química del arsénico.....	2
2.2 Minerales del arsénico.....	3
2.3 Energética del arsénico.....	5
2.4 Metabolismo celular de los microorganismos arseniato-reductores.....	8
2.5 Diversidad arseniato-reductora.....	11
2.6 Resistencia de microorganismos a metales pesados.....	12
2.7 Bioprospección y cultivo de microorganismos.....	14
2.8 Estado del arte de la Bioprospección de microorganismos arseniato-reductores.....	14
<b>3. Justificación, Hipótesis y objetivos.....</b>	<b>19</b>
3.1 Justificación.....	19
3.2 Hipótesis.....	20
3.3 Objetivos.....	20
3.3.1 Objetivos específicos.....	20

<b>4. Materiales y Métodos</b> .....	21
4.1 Fuente de microorganismos.....	21
<b>4.2 Medios de cultivo</b> .....	21
4.2.1 Medio Líquido para Enriquecimiento .....	21
4.2.2 Medio sólido para aislar .....	22
4.2.3 Solución de vitaminas en CaCl <sub>2</sub> .....	22
4.2.4 Solución salina isotónica.....	22
4.2.5 Medio para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias para metales.....	22
4.2.6 Medio para los ensayos con diferentes aceptores de electrones .....	22
4.2.7 Solución salina con buffer de fosfatos (PBS).....	23
<b>4.3 Métodos</b> .....	23
4.3.1 Enriquecimiento y aislamiento.....	23
4.3.2 Número Más Probable.....	23
4.3.3 Prueba cualitativa de arseniato-respiración.....	24
4.3.4 Ensayo con diferentes Aceptores de Electrones.....	24
4.3.5 Pruebas de concentraciones de metales mínimas inhibitorias.....	25
<b>4.4 Pruebas Moleculares</b> .....	26
4.4.1 Extracción del ADN del cultivo y amplificación por PCR.....	26
4.4.2 Secuenciación y afiliación filogenética.....	26
<b>4.5 Técnicas analíticas</b> .....	27
4.5.1 Cuantificación de la concentración de sulfato, lactato y acetato.....	27
4.5.2 Cuantificación de sulfuro disuelto.....	27
4.5.3 Cuantificación de Nitrato.....	27

<b>5. Resultados y Discusión</b> .....	<b>28</b>
5.1 Enriquecimientos.....	28
5.1.1 Formación del precipitado de $As_2S_3$ .....	29
5.2 Prueba Arseniato-Reducción.....	30
5.4 Número Más Probable.....	31
5.5 Resiembra.....	32
5.6 Aislados.....	33
5.7 Amplificación por PCR.....	34
5.8. Secuencias Analizadas.....	35
5.9. Tinción Gram.....	38
5.10 Ensayos con diferentes aceptores de electrones.....	39
5.11 Pruebas de resistencia a toxicidad por metales.....	43
<b>6. Conclusiones y Perspectivas</b> .....	<b>50</b>
6.1 Conclusiones.....	50
6.2 Perspectivas.....	51
<b>Bibliografía</b> .....	<b>52</b>
<b>Anexos</b> .....	<b>57</b>

## Índice de Tablas

<b>Tabla 2.1</b> Compuestos de arsénico y sus fórmulas químicas (Tomado y modificado de Barton et al, 2010).....	2
<b>Tabla 2.2</b> Lista de los minerales con arsénico más comunes encontrados en la naturaleza (Tomado y modificado de Nazari et al. 2016).....	4
<b>Tabla 2.3</b> Reacciones llevadas a cabo durante la arseniato reducción en conjunto de lactato o acetato como donador de electrones. (Niggemyer et al. 2001; Macy et al. 2000).....	7
<b>Tabla 2.4</b> Reacciones llevadas con $\text{SO}_4^{2-}$ y $\text{NO}_3^-$ como aceptores de electrones, acopladas a la oxidación de lactato y acetato (Lovley & Klug, 1983; Yoon et al., 2013).....	7
<b>Tabla 2.5</b> Ejemplos de microorganismos capaces de respirar arsénico.....	12
<b>Tabla 2.6</b> Consorcios y microorganismos arseniato-reductores cultivados.....	17
<b>Tabla 2.6 (Continuación).</b> Consorcios y microorganismos arseniato-reductores cultivados.....	18
<b>Tabla 4.1</b> Concentraciones de metales propuestas (Sarkar et al. 2012; Nies, 1999; Salmassi et al, 2002).....	26
<b>Tabla 5.1</b> Resultado de la prueba arseniato-reductora en las réplicas para NMP.....	32
<b>Tabla 5.2</b> Resultado de la técnica NMP.....	32
<b>Tabla 5.3</b> Datos obtenidos en la base de datos de la NCBI para las colonias arseniato-reductoras aisladas.....	37
<b>Tabla 5.4.</b> Resultados de los ensayos de microdilución por gota con distintas concentraciones de arsénico (5, 10 ó 50 mM) en placas con sulfato (10 mM) y lactato (10 mM). Se omite Cd y Zn debido a que no hubo ningún crecimiento en condiciones aerobias.....	44
<b>Tabla 5.5.</b> Resultados de los ensayos de microdilución por gota en placas con 10 mM lactato y 10 mM As(V), y con 2 mM $\text{Pb}^{2+}$ ó 1 mM $\text{Cd}^{2+}$ ó 3 mM $\text{Zn}^{2+}$ después de cuatro días de incubación en condiciones aeróbicas o anaeróbicas.....	46
<b>Tabla 5.6.</b> Resultados de los ensayos de microdilución por gota en placas con 10 mM lactato y 10 mM As(V), y con 2 mM $\text{Pb}^{2+}$ ó 1 mM $\text{Cd}^{2+}$ ó 3 mM $\text{Zn}^{2+}$ después de tres semanas de incubación en condiciones aeróbicas o anaeróbicas.....	47

## Índice de Figuras

<b>Figura 2.1.</b> Escala de potenciales redox encontrados en ambiente naturales. (Tomado de Borch et al., 2010 y Gorny et al. 2016).....	5
<b>Figura 2.2</b> Analogía entre la molécula de fosfato y de arseniato.....	9
<b>Figura 2.3</b> Esquema de la oxidación y reducción de As mediada por microorganismos. Se muestran las características principales de las especies inorgánicas del As.....	9
<b>Figura 2.4</b> Mecanismo de arseniato-reducción y arsenito-oxidación en microorganismos. Modificado de Hue et al., 2015 y Kruger M. 2013.....	11
<b>Figura 5.1.</b> Botellas de los consorcios y pases realizados para eliminar sedimento y seleccionar bacterias reductoras de arseniato. a) Consorcios iniciales con sedimento del sitio recolectado en CB y CT. b) Primer pase realizado. Se tomó 10% de los consorcios y se inoculó en un medio para fomentar su desarrollo. Tiempo de incubación: 1 semana, pH: 7, incubados a 30°C en oscuridad. Aún se observaba sedimento. c) Segundo pase realizado. Se tomó 10% del primer pase y se inoculó.....	29
<b>Figura 5.2.</b> a) y b) Micrografía en campo claro (100x), dentro de los círculos se pueden observar los microorganismos cerca del precipitado de arsénico (amarillo); c) Micrografía en contraste de fases (100x), se aprecia la forma bacilar de los microorganismos (dentro de los círculos).....	30
<b>Figura 5.3.</b> Prueba de arseniato reducción positiva. Se formó el precipitado amarillo instantáneamente para cada alícuota tomada.....	31
<b>Figura 5.4.</b> Aspecto macroscópico de las cajas con la resiembra 3 del sitio CB. Se logra observa colonias aisladas después de la tercera resiembra.....	33
<b>Figura 5.5.</b> Aspecto macroscópico de los “archivos” de los aislados de bacterias arseniato reductoras .....	34
<b>Figura 5.6.</b> Geles de electroforesis. Para ambos geles, los carriles 1 y 9 contienen el marcador de peso molecular, mientras que para el gel (a) en los carriles 11 y 12 corresponden al positivo y negativo, y para el gel (b) los carriles 15 y 16 corresponden al positivo y negativo, respectivamente. (a) Se amplificaron las colonias 3, 8, 9, 10, 14 y 16 después del choque térmico (carriles 2 – 6 respectivamente), dando negativo los carriles 4 y 5. En el carril 8 y 10 se encuentran las colonias 2 y 14 que no recibieron choque térmico previo; se puede observar que dichos carriles muestran solamente el DNA genómico. Carriles 13-16 vacíos. (b) Se amplificaron el resto de las colonias (1, 2,	

4, 5, 6, 7, 11, 12, 13, 15 y 17), todas con el tratamiento de choque térmico previo. ....35

**Figura 5.7.** Micrografías (100x) de los frotis de los aislados: a) aislado 6; b) aislado 12; c) aislado 13. Se puede observar el grado de pureza de los aislados 6 y 12 con presencia de células gram negativas y una sola morfología colonial (bacilos). Mientras que en el aislado 13 aún se pueden distinguir bacterias gram positivas (morado) y negativas (rojo claro). ....39

**Figura 5.8.** Perfiles de consumo de aceptor de electrones y de fuentes de carbono de los consorcios recuperados de los sitios a) CB y b) CT, utilizándose nitrato como aceptor final de electrones, se observa el consumo de lactato y producción de acetato (Rombo azul:  $\text{NO}_3^-$ , Cuadrado rojo: Lactato, Triángulo verde: Acetato). ....40

**Figura 5.9.** Perfiles de consumo de aceptor de electrones y de fuentes de carbono de los consorcios recuperados de los sitios a) CB y b) CT, utilizándose nitrato como aceptor final de electrones, se observa el consumo de lactato y producción de acetato (Rombo azul:  $\text{NO}_3^-$ , Cuadrado rojo: Lactato, Triángulo verde: Acetato). ....42

## Índice de Anexos

Anexo 1. Esquemas	
1.1 Esquema general experimental .....	56
1.2. Esquema Aislados.....	56
1.3 Esquema Microdilución por Goteo.....	57
Anexo 2. Micrografías Tinción Gram .....	58
Anexo 3. Concentraciones de metales mínima inhibitorias .....	59
3.1 Ensayo 1.....	59
3.2 Ensayo 2. Tiempo de incubación 4 días.....	60
3.3 Ensayo 3. Tiempo de incubación 3 semanas.....	61

## RESUMEN

---

**Rodarte Gómez Luis Augusto (2017). Bioprospección de microorganismos con resistencia a metales de sitios contaminados con arsénico. Tesis de Maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. México.**

Hoy en día podemos encontrar diversas formas de contaminación en el medio ambiente que repercuten en la salud humana. Muchas de ellas son debidas a la exposición de compuestos inorgánicos, como son los metales pesados y metaloides que encontramos en nuestro ambiente de manera natural o por actividades antropogénicas. Uno de estos compuestos es el arsénico (As), el cual es un elemento altamente tóxico y dañino para los organismos que se encuentran en contacto con él, a tal grado que está catalogado como un contaminante prioritario por su gran potencial ecotoxicológico. Debido a su amplia distribución y su movilidad en mantos freáticos y aguas superficiales, es de vital importancia implementar tecnologías que permitan la atenuación de este metaloide, entre las que destacan procesos fisicoquímicos y biológicos. Se sabe que ciertos microorganismos influyen en la movilidad y especiación del arsénico, ya que realizan procesos de óxido-reducción, es por ello que el estudio de microorganismos presentes en los sitios donde se encuentre este contaminante resulta relevante, ya que permitirá conocer en detalle sus capacidades metabólicas y así implementar procesos biotecnológicos para la remediación de sitios con arsénico. Dentro de este contexto, el presente trabajo se enfocó en realizar un estudio microbiológico de muestras de sedimentos recuperados de sitios con alta concentración de arsénico y otros metales, del estado de San Luis Potosí, México. Se realizaron ensayos en lote con inóculo de sedimentos de dos sitios altamente contaminados con arsénico ( $> 2263$  mg/Kg sedimento), para seleccionar microorganismos capaces de metabolizar o tolerar arsénico. Posteriormente se realizaron cultivos en placa para poder aislar organismos capaces de respirar este metaloide, en las cuales se colocaron arseniato, As(V), como aceptor de electrones a una concentración de 5 mM y lactato como donador de electrones a una concentración de 5 mM. Los consorcios recuperados fueron capaces de llevar a cabo la oxidación de lactato en presencia de arsénico, además se determinó que los consorcios pueden usar sulfato o nitrato, además del arsénico, como aceptores de electrones. A partir de estos consorcios se lograron aislar 14 aislados con capacidad de crecer en medio sólido con arsénico (5 mM). La caracterización de las cepas mediante secuenciación indicó que se lograron aislar microorganismos del género *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Peanibacillum* y *Bacteroides*, capaces de crecer en altas concentraciones de arsénico. Los géneros de bacterias identificados son de carácter facultativas, desarrollándose tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Así mismo, se demostró mediante un ensayo para evaluar concentraciones mínimas inhibitorias de metales, que tienen la capacidad de tolerar metales pesados como Pb (2mM), Cd (1mM), Zn (3mM), y mostrar una resistencia con As en concentraciones de hasta 50 mM, en condiciones aeróbicas. Mientras que, en contraparte, para las condiciones anaeróbicas, mostraron capacidad de crecer con arsénico pero con una velocidad de crecimiento diferente que para las condiciones aeróbicas; mostrando un metabolismo mucho más lento cuando se les adicionó los metales, tardando casi tres semanas en crecer, mostrando resistencia hacia Pb (2mM), Cd (1mM) y Zn (3mM).

## ABSTRACT

---

**Rodarte Gómez Luis Augusto (2017). Bioprospecting microorganisms with resistance to metals from sites contaminated with arsenic. Master's Thesis. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. Mexico.**

Today, in the environment we can find several forms of pollution that have an impact on human health. Many of them come from the exposure of inorganic compounds, as heavy metals and metalloids that we can find in our natural environment or due to anthropogenic activities. One of these compounds of major importance is arsenic (As), which is a highly toxic and harmful element for organisms that are in contact with it, being a priority pollutant due its great ecotoxicological potential. Due to its wide distribution and mobility in groundwater and surface waters, it is vital to implement technologies that allow the attenuation of this metalloid, such as physicochemical and biological processes. It is known that certain microorganisms influence the mobility and speciation of arsenic, performing oxidation-reduction processes; therefore, the study of microorganisms present in sites where this pollutant is located is relevant to know their metabolic capabilities in detail that allow to implement biotechnologies to deal with pollution problems caused by arsenic. In this context, the present work focuses on a microbiological study of sediments recovered from sites with high concentrations of arsenic (> 2263 mg/Kg sediment) and other metals, from the state of San Luis Potosí, Mexico. Experiments were carried out in batch trials with sediments as inoculum, in order to select microorganisms capable of respiring arsenate, As (V), as electron acceptor at a concentration of 5 mM and lactate as an electron donor at a concentration of 5 mM. The enrichments were cultured in solid media to isolate microorganisms able to respire arsenic. The enrichments performed arsenate reduction with lactate as substrate, and besides arsenic, the enrichments were also capable of using sulfate or nitrate as electron acceptors. Further, 14 isolates were retrieved from the enrichments able to growth in solid media with high arsenic concentration. The results demonstrated that successfully isolated microorganisms of the genus *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Peaenibacillum* and *Bacteroides*, had the ability to use different electron acceptors such as sulfate and nitrate. From the cultivation of the isolates it was observed that these bacteria are facultative, developing in both aerobic and anaerobic conditions. In addition, it was demonstrated, by an assay to evaluate minimum inhibitory concentrations of metals, that some of the isolates have the ability to withstand heavy metals such as Pb (2mM), Cd (1mM), Zn (3mM), and show As resistance in concentrations up to 50 mM, under aerobic conditions. Whereas, in their counterpart, under anaerobic conditions, they showed capacity to grow with arsenic but with a different growth rate than for aerobic conditions; showing a much slower metabolism when the metals were added, taking almost three weeks to grow, showing resistance to Pb (2mM), Cd (1mM) and Zn (3mM).

## 1. INTRODUCCIÓN

---

Actualmente se pueden observar distintas formas de exposición a metales siendo algunas de ellas el agua proveniente de mantos freáticos y los efluentes producidos por algunas actividades industriales como el curtido de pieles, y la minería (Leonard et al., 2004). Muchos metales, en cantidades traza, tienen un papel integral en los procesos biológicos; sin embargo, algunos de ellos pueden llegar a ser peligrosos para los organismos en concentraciones altas, requiriéndolos así, en cantidades mínimas (Leonard et al., 2004; Valko et al., 2005). El arsénico (As) es un componente natural de la corteza terrestre y constituyente de muchos minerales, y es uno de los elementos más ampliamente estudiados en el campo de la toxicidad por metales después del plomo (Pb) ya que el contacto continuo y a largo plazo (5-10 años) puede llegar a provocar arsenicosis. El término arsenicosis se refiere a los efectos en la salud provocados por este metaloide, que incluyen daños en la piel, cáncer, enfermedades en los vasos sanguíneos, posibilidad de desarrollar diabetes, presión alta, y desordenes reproductivos (Sharma et al., 2014). En este sentido, se han realizado estudios para determinar las concentraciones a las que se encuentra expuesta la población de distintos sitios contaminados con este metaloide en agua potable. Se han encontrado altos niveles de arsénico en el agua para consumo humano en países como Argentina (200 ppb), México (400 ppb), Taiwán (50-1980 ppb) y Bangladesh (800 ppb), siendo este último uno de los más contaminados. Estos niveles se han reportado por encima de los estándares de la WHO (Organización Mundial de la Salud, por sus siglas en inglés), que marcan como máximo permisible una concentración de 10 ppb (Flora, 2011; Satyanarayana et al., 2012).

En el estado de San Luis Potosí, México, se han detectado sitios con una elevada concentración de arsénico en agua que se encuentran en el distrito minero de Santa María de la Paz y Matehuala (Rios-Valenciana et al., 2017). Asimismo, se ha reportado la presencia de algunos microorganismos, que al encontrarse expuestos al arsénico, han desarrollado mecanismos de resistencia para evitar que el arsénico les cause algún daño; otros microorganismos pueden utilizarlo como aceptor final de electrones en su metabolismo. En este trabajo se exploró la capacidad de resistencia a metales de los microorganismos recuperados de consorcios microbianos de sedimentos y se analizó su capacidad metabólica al evaluar distintos aceptores de electrones, como el arsénico, sulfato y nitrato, con la finalidad de implementar una biotecnología que permita atenuar sitios contaminados con arsénico y otros metales.

## 2. MARCO TEÓRICO

---

### 2.1 Química del arsénico

El arsénico es un elemento ubicuo, relativamente abundante en suelo y agua, que se encuentra en muchos compartimentos en el ambiente, y sea cual sea su origen es responsable de la contaminación de suministros de agua, existiendo tanto en formas orgánicas como inorgánicas (Lièvremonet et al., 2009). En la naturaleza existen cuatro estados de valencia del arsénico, los cuales se muestran en la Tabla 2.1.

**Tabla 2.1** Compuestos de arsénico y sus fórmulas químicas.

<b>Nombre del compuesto</b>	<b>Estado de oxidación</b>	<b>Fórmula química</b>
<b>Inorgánicos</b>		
Arseniuro	-III	AsH <sub>3</sub>
Arsénico elemental	0	As
Arsenito	+ III	As(OH) <sub>3</sub>
Arseniato	+ V	AsO <sub>4</sub> H <sub>3</sub>
<b>Orgánicos</b>		
Metilarsina	+ III	CH <sub>3</sub> AsH <sub>2</sub>
Dimetilarsina	+ III	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> AsH
Trimetilarsina	+ III	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> As
Ácido Metiarsónico	+ V	CH <sub>3</sub> AsO(OH) <sub>2</sub>
Ácido Dimetilarsónico	+ V	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> AsO(OH)

Tomado y modificado de Barton et al. (2010)

Los arseniuros se encuentran principalmente en ambientes altamente reducidos y el arsénico elemental muy rara vez se observa en la naturaleza. Mientras que el arsenito y arseniato son las dos principales formas inorgánicas de arsénico que se encuentran en el medio ambiente. Las formas orgánicas de este elemento contienen grupos metilo, como se muestra en la Tabla 2.1 (Barton et al., 2010). En un medio oxidante, el arseniato es generalmente la forma dominante de arsénico. Este arsénico pentavalente de forma H<sub>3</sub>AsO<sub>4</sub> se encuentra a valores de pH por debajo de 2, en valores de pH mayores a 2 el H<sub>3</sub>AsO<sub>4</sub> se

disocia en  $\text{H}_2\text{AsO}_4^-$ , luego a  $\text{HAsO}_4^{2-}$  y posteriormente en  $\text{AsO}_4^{3-}$ . Mientras que en un medio reducido y a valores de pH mayores a 9, la forma dominante del arsénico será arsenito,  $\text{H}_3\text{AsO}_3$ ; así como el arseniato, el arsenito se disociará a  $\text{H}_2\text{As}_3^-$ ,  $\text{HAsO}_3^{2-}$  y posteriormente a  $\text{AsO}_3^{3-}$  a valores de pH por encima de 9.0 (Nazari et al., 2016).

Dependiendo de las características fisicoquímicas del ambiente en el que se encuentran, como el pH y el potencial redox, algunos compuestos de arsénico pueden ser altamente solubles, resultando en un alto nivel de biodisponibilidad para los organismos (Lièvremon et al., 2009). En un medio a condiciones estándar, el arseniato por lo regular se encuentra unido a óxidos de hierro en superficies minerales, mientras que el arsenito es mayormente soluble y por esta razón se considera más tóxico (Kruger et al., 2013; Matera et al., 2003; Rosen, 2002). Es por ello que tanto la química del arsénico como la del medio en el que se encuentra presente (concentración de As, pH, y Eh), juegan un papel importante en el efecto que produce a la biota del sitio en cuestión. A su vez, existen microorganismos que al encontrarse en contacto en un medio rico en arsénico, son capaces de realizar reacciones de óxido-reducción y fomentar las transformaciones de las especies orgánicas e inorgánicas de arsénico. De tal forma que las transformaciones del arsénico por medio de los microorganismos, en combinación con las condiciones fisicoquímicas del ambiente, pueden alterar el estado de oxidación y la movilidad de este metaloide (Oremland & Stolz, 2005; Stolz et al., 2006); dichas transformaciones son conocidas como el ciclo biogeoquímico del arsénico e involucran reacciones de óxido-reducción.

## **2.2 Minerales del arsénico**

El arsénico rara vez existe como elemento aislado en la naturaleza debido a que exhibe una alta afinidad a formar enlaces químicos con otros elementos y especies. Arsénico, arseniuros y arsenosulfuros se encuentran de manera típica en depósitos de minerales hidrotermales anóxicos. El arsenito y arseniato se forman cuando esos minerales se encuentran sujetos a condiciones ricas en oxígeno o en aguas superficiales, siendo la arsenopirita el mineral de arsénico más abundante. Los elementos que a menudo se encuentran formando minerales con arsénico son metales de transición, cadmio, plomo, plata, oro, antimonio, fósforo, tungsteno y molibdeno (Nazari et al., 2016). El arsénico,

siendo un elemento abundante en la corteza terrestre, forma parte de más de 300 minerales encontrados en la naturaleza, algunos de los cuales se enlistan en la Tabla 2.2.

**Tabla 2.2.** Lista de los minerales con arsénico más comunes encontrados en la naturaleza (Tomado y modificado de Nazari et al. 2016).

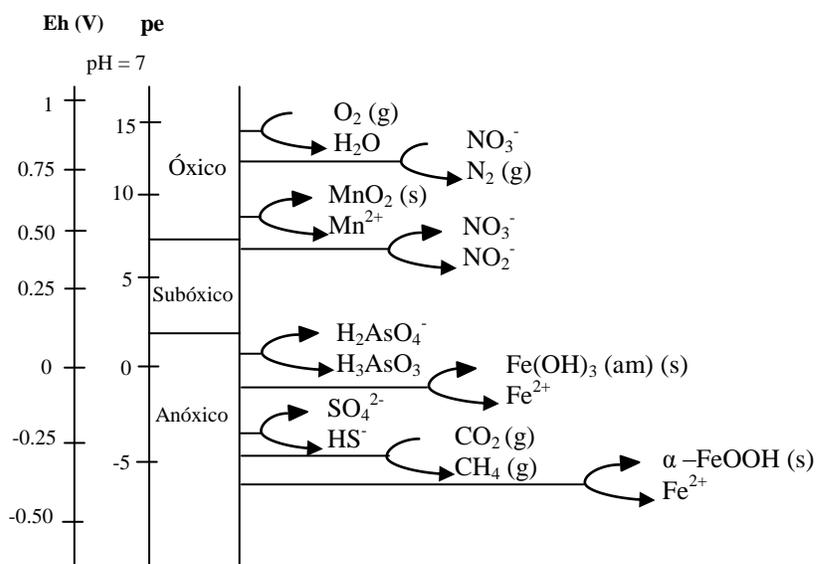
<b>Tipo</b>	<b>Mineral</b>	<b>Fórmula</b>
Sulfuros	Arsenopirita	FeAsS
	Pirita arsenical	Fe(AsS) <sub>2</sub>
	Cobaltita	CoAsS
	Oropimente	As <sub>2</sub> S <sub>3</sub>
	Rejalgar	As <sub>4</sub> S <sub>4</sub>
Arsinas	Domequita	Cu <sub>3</sub> As
	Löllingita	FeAs <sub>2</sub>
	Niquelina	NiAs
Óxidos de As (III)	Arsenolita	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
	Gebhardita	Pb <sub>8</sub> (As <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> OCl <sub>6</sub>
	Leiteita	ZnAs <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
	Reinerita	Zn <sub>3</sub> (AsO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
	Trippkeita	CuAs <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
Óxidos de As (V)	Austinita	CaZnAsO <sub>4</sub> OH
	Conichalcita	CaCuAsO <sub>4</sub> OH
	Hörnesita	Mg <sub>3</sub> (AsO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·8H <sub>2</sub> O
	Mansfieldita	AlAsO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O
	Escorodita	FeAsO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O

En sistemas acuáticos anóxicos y en el agua de poro, el Fe<sup>2+</sup> precipita rápidamente con sulfuros para producir sulfuros de hierro (ej. Troilita, mackinawita, greigita) y subsecuentemente transformarse a pirita (FeS<sub>2</sub>). Por lo que, el arseniato que se encuentra soluble en el medio, al adicionar Fe<sup>2+</sup>, puede ser sorbido y/o co-precipitado formando minerales con sulfuros de hierro, como es el caso de la arsenopirita (FeAsS). Así, el hecho de que el As (V) se encuentre mayormente en un medio, se puede atribuir a la oxidación de

sulfuros en un medio aeróbico, llevado a cabo por la formación de Fe(III) y la posible reoxidación parcial de As(III) durante la oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$  (Gorny et al., 2015).

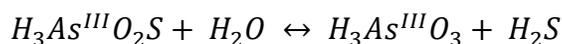
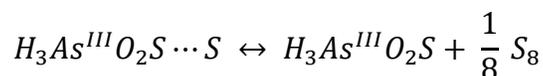
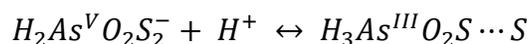
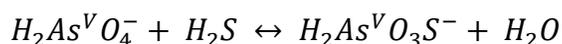
### 2.3 Energética del arsénico

El comportamiento del arsénico en sedimentos superficiales es parcialmente controlado por reacciones redox. Los principales pares redox que posiblemente se encuentren involucrados en la especiación del arsénico son:  $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ , Mn (IV)/Mn (II),  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ , Fe (III)/Fe (II),  $\text{SO}_4^{2-}/\text{HS}^-$  y  $\text{CO}_2/\text{CH}_4$  (Gorny et al., 2015), debido a su diferencia de potencial redox entre el aceptor y el donador de electrones, otorgándoles mayor rendimiento energético. En la Figura 2.1 se muestra que el potencial redox en el que el estado de oxidación del arsénico puede cambiar entre III y V es de +135mV. Se puede observar que en un ambiente óxico los principales oxidantes para el As(III) son  $\text{O}_2$ ,  $\text{MnO}_2$  y  $\text{NO}_3^-$ , mientras que en un medio anóxico los principales reductores de As(V) serían  $\text{HS}^-$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ .



**Figura. 2.1.** Escala de potencial redox y los pares redox relevantes que pueden encontrarse en ambientes naturales (Tomado de Borch et al., 2010 y Gorny et al. 2016).

La reducción del arsénico es un proceso donde el As (V) acepta dos electrones de un donador de electrones (p. ej. materia orgánica) para reducirse a As (III) y es principalmente efectivo en presencia de sulfuros y actividad bacteriana. Como se puede observar en la Figura 2.1, la presencia de sulfuro de hidrógeno disuelto en el medio puede reducir al As(V) en As(III) en condiciones anóxicas. Una vez que ocurre la formación de As(III), y dependiendo de las concentraciones de sulfuros que se encuentren disueltos, puede precipitar como oropimente ( $As_2S_3$ ) (Gorny et al., 2015). Estos mecanismos de transformación se muestran en las siguientes ecuaciones:



El par redox de As tiene una reacción energéticamente favorable cuando se acopla con la oxidación de materia orgánica, debido a que el potencial de oxidación/reducción de As(V)/As(III) es de +135 mV, mientras que la materia orgánica tendrá un potencial más electronegativo (Oremland & Stolz, 2005). Existen microorganismos capaces de reducir el As(V) hasta As(III) haciendo uso de una amplia variedad de donadores de electrones, entre ellos compuestos orgánicos e inorgánicos. De esta forma se lleva a cabo un proceso de respiración microbiana en el que el arseniato, As(V), se usa como aceptor final de electrones; cabe destacar que este proceso solo lo llevan a cabo procariotes y también se conoce como respiración no asimilativa de arsénico. Diversos autores han reportado la reducción de arseniato acoplado a la oxidación de lactato o acetato (Kruger et al., 2013; Macy et al., 2000; Newman et al., 1997; Niggemyer et al., 2001), dichas reacciones se muestran en la Tabla 2.3 junto con la energía libre de Gibbs de cada una, se observa que en ambos casos la reacción es favorable. Se ha descrito que el mecanismo de arseniato-

respiración no es un proceso obligado para el grupo de bacterias que pueden realizarla, ya que muchas especies que respiran arsénico también son capaces de usar otros aceptores finales de electrones como el oxígeno, nitrato, nitrito, Fe (III), fumarato, sulfato, tiosulfato, azufre, entre otros (Oremland & Stolz, 2003). En el caso del sulfato como aceptor de electrones, se ha observado que acoplado a la oxidación de lactato, produce -80.2 kJ/mol de energía durante la reacción de sulfatoreducción (Lovley & Klug, 1983). Mientras que para el nitrato, se han reportado bacterias del género *Shewanella* capaces de crecer utilizando lactato o acetato como donador de electrones mientras reducen nitrato para obtener energía (Yoon et al., 2013). En la Tabla 2.4 se describen las reacciones que se llevan a cabo en dichos procesos.

**Tabla 2.3.** Reacciones llevadas a cabo durante la arseniato reducción en conjunto de lactato o acetato como donador de electrones. (Niggemyer et al. 2001; Macy et al. 2000).

Donador	Reacción	$\Delta G'^{\circ}$
Lactato	$C_3H_5O_3^- + 2H^+ + HAsO_4^{2-} + H_2AsO_4^-$ $\rightarrow 2H_3AsO_3 + HCO_3^- + C_2H_3O_2^-$	-172 kJ/mol
Acetato	$C_2H_3O_2^- + 2HAsO_4^{2-} + 2H_2AsO_4^- + 5H^+ \rightarrow 4H_3AsO_3 + 2HCO_3^-$	-252 kJ/mol

**Tabla 2.4.** Reacciones llevadas con  $SO_4^{2-}$  y  $NO_3^-$  como aceptores de electrones, acopladas a la oxidación de lactato y acetato (Lovley & Klug, 1983; Yoon et al., 2013).

Aceptor	Reacción	$\Delta G'^{\circ}$
Sulfato	$C_3H_5O_3^- + 0.5SO_4^{2-} \rightarrow C_2H_3O_2^- + HCO_3^- + 0.5HS^-$	- 80.2 kJ/mol
Nitrato	$C_3H_5O_3^- + NO_3^- + H^+ \rightarrow 0.4 N_2 + C_2H_3O_2^- +$ $CO_2 + 0.07HCO_3^- + H_2O$	- 514.5 kJ/mol
Nitrato	$C_2H_3O_2^- + 2NO_3^- + 3H^+ \rightarrow 2CO_2 + N_2O + 3H_2O$	- 684.6 kJ/mol

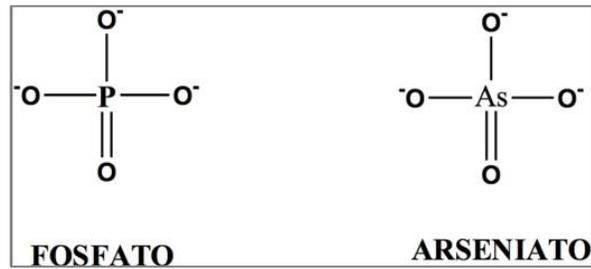
## 2.4 Metabolismo celular de microorganismos arseniato-reductores

Debido a las características fisicoquímicas del medio y a la química del arsénico, los microorganismos que se encuentran comúnmente expuestos a este metaloide llegan a sufrir efectos inhibitorios. Es por ello que han desarrollado mecanismos de respuesta para metabolizarlo, principalmente por la vía de reacciones de oxidación o reducción (Costa et al., 2014).

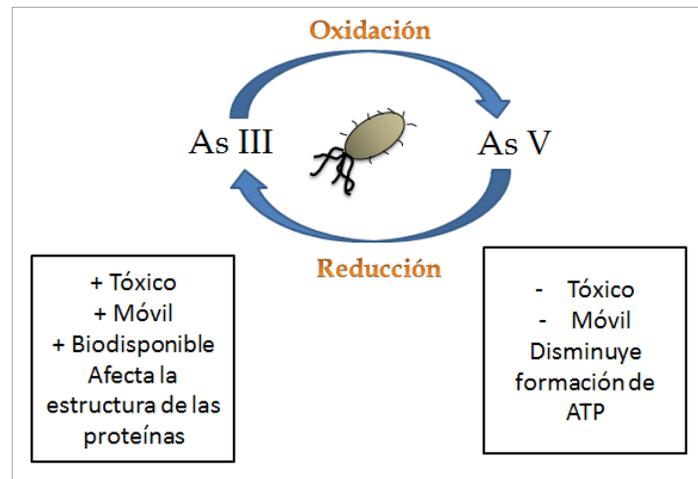
El proceso de arseniato-reducción en presencia de sulfuro puede conllevar a la formación de minerales arsénico-sulfurosos, como es el caso del oropimente y rejalgar ( $As_2S_3$  y  $As_4S_4$  respectivamente). Además de ello, la reducción de minerales (como por ejemplo óxidos de hierro) pueden liberar el arseniato que se encuentra unido a ellos, haciéndolo mayormente disponible para su reducción dentro del sistema (Lovley, 1993). De acuerdo con Gorny et al. (2015), la arsenopirita ( $FeAsS$ ) puede formarse por la adsorción de As (III) en precipitados de sulfuro, este mecanismo se muestra en la siguiente ecuación:



La toxicidad del arsénico dependerá del estado de oxidación en el que se encuentre. Como se muestra en la Figura 2.2, el arseniato es estructuralmente análogo al fosfato y compite con este ion en muchas reacciones enzimáticas, interrumpiendo de esta manera la fosforilación oxidativa (Gresser, 1981) y privando así a las células de su suministro energético. Por otra parte, el arsenito puede afectar reacciones metabólicas esenciales (Hughes, 2002). De acuerdo con Kruger et al. (2013) y Rosen (2002), el arsenito puede afectar las uniones Fe-S en las proteínas o los sitios activos de algunas proteínas e inhibir la actividad enzimática; debido a su biodisponibilidad en ambientes acuáticos a un pH ácido o neutral, el arsenito se considera más tóxico y peligroso que al arseniato. En la Figura 2.3 se muestra un esquema generalizado de la oxidación y reducción del arsénico realizada por microorganismos, donde se describen las características generales de estas especies inorgánicas comúnmente encontradas en un medio natural.



**Figura 2.2** Analogía entre la molécula de fosfato y de arseniato



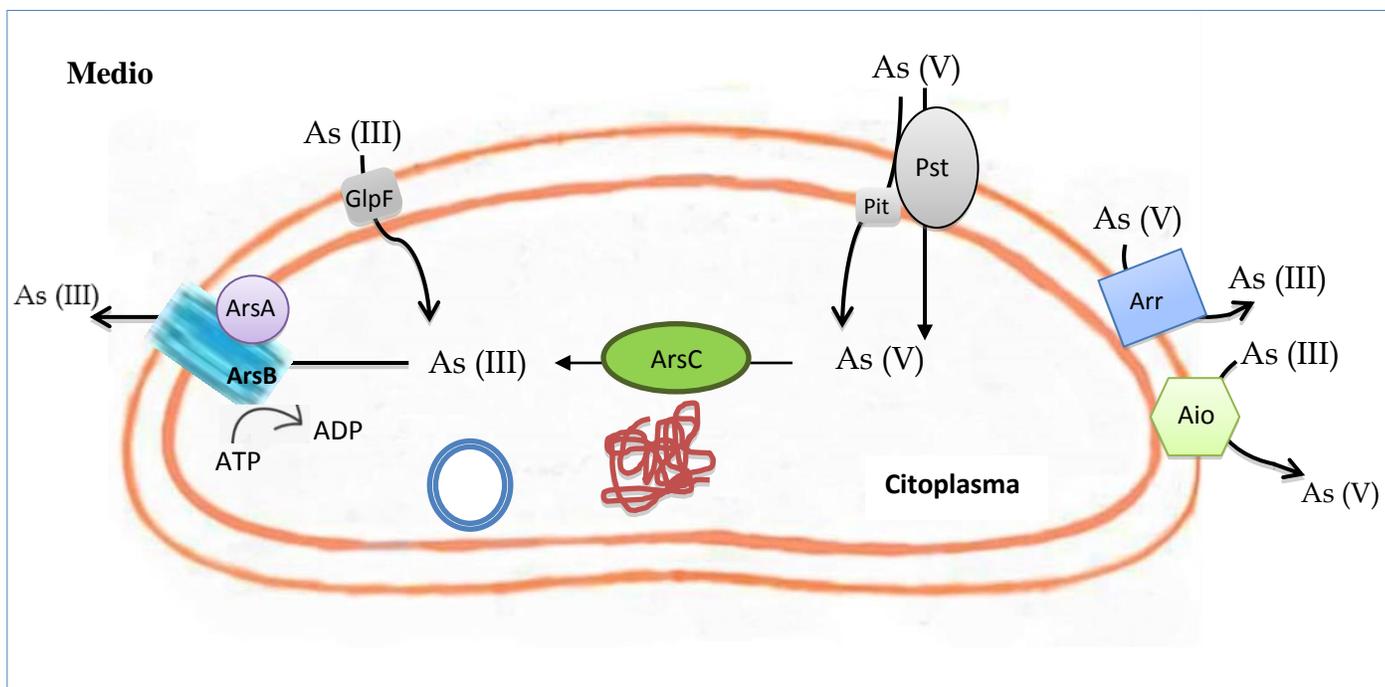
**Figura 2.3** Esquema de la oxidación y reducción de As mediada por microorganismos. Se muestran las características principales de las especies inorgánicas del As.

Podemos decir que en general las células eucariotas no pueden tolerar arsénico, siendo pocos estudios donde señalan que algunas de ellas contienen los genes de resistencia hacia este metal, como es el caso de *S. cerevisiae*, reportada por Mukhopadhyay et al. (2002). En contraste, muchos organismos procariotes han desarrollado el mecanismo necesario para manejar la toxicidad de este metaloide debido a que algunos se encuentran continuamente en contacto con él. En cuanto al arseniato, As(V), los microorganismos pueden controlar su toxicidad por medio de dos vías conocidas: 1) La respiración no asimilativa (la cual involucra los genes *arrA/B*), solo algunos microorganismos pueden realizarla y obtener energía para su metabolismo y reproducción, 2) la desintoxicación (que involucra el gen *arsC*) (Costa et al., 2014; Silver & Phung, 2005). En la respiración no asimilativa, los genes *arr A/B* codifican para la enzima periplasmática arseniato-reductasa que se emplea durante la respiración anaerobia cuando se usa arseniato como aceptor final de electrones para la generación de energía. Mientras que para el mecanismo de

desintoxicación, el gen *arsC* codifica para la enzima arseniato-reductasa, la cual es localizada en el citoplasma de la célula y es la responsable de la biotransformación de As(V) a As(III). Dicha enzima junto con la bomba de excreción transmembranal, codificada con los genes *arsA* y *arsB* del operon *ars*, conforman el mecanismo de transformación del arsénico que implica solo su reducción sin la producción de energía, éste se conoce como desintoxicación y es el más común en microorganismos (Costa et al., 2014; Ellis et al., 2001; Kruger et al., 2013; Stolz et al., 2002).

Otro mecanismo utilizado por algunas células procariotas para realizar la desintoxicación del arsénico es la metilación, e involucra una serie de pasos en donde la reducción del arseniato, As(V), es seguida por la adición oxidativa de grupos metilos. La adición de estos grupos resulta en la formación de distintos compuestos incluyendo arsenito de metilo, arseniato de dimetilo, y óxido de trimetilarsina (TMA<sub>3</sub>O) (Stolz et al., 2006). Aunque la metilación del arsénico es considerada como una forma de desintoxicación del mismo, no todos los productos metilados son menos tóxicos que las formas inorgánicas del arsénico (Kruger et al., 2013; Stolz et al., 2006).

En el caso de la oxidación del arsénico, la enzima arsenito-oxidasa es quien cataliza esta reacción y transforma al arsénico de su forma más tóxica, As(III), a la menos tóxica, As(V), usando al As(III) como donador de electrones en la respiración no asimilativa para la generación de energía. Sin embargo, también se puede llevar a cabo la oxidación de arsenito sin la obtención de energía, en tal caso se trata de un proceso de desintoxicación (Barton et al., 2010). La enzima arsenito-oxidasa está constituida por dos subunidades codificadas por los genes *asoA* y *asoB* para la unidad grande y pequeña respectivamente (Silver & Phung, 2005). Es importante resaltar que la nomenclatura de los genes que codifican para estas enzimas varían dependiendo del proceso específico que efectúan: *Aox* se refiere a la enzima oxidasa usada por organismos quimioheterótrofos, mientras que *Aro* se refiere a la enzima utilizada por quimiolitótrofos. Independientemente de las designaciones *Aso*, *Aox* o *Aro*, todas hacen referencia a la enzima arsenito-oxidasa, la cual puede ser utilizada para el proceso de respiración o desintoxicación del arsenito (Barton et al., 2010). En la Figura 2.4 se ilustran los mecanismos de respiración no asimilativa, así como los de desintoxicación del arsénico.



**Figura 2.4** Mecanismo de arseniato-reducción y arsenito-oxidación en microorganismos.

Modificado de Hue et al., 2015 y Kruger M. 2013.

## 2.5 Diversidad arseniato-reductora

Se ha encontrado una amplia variedad de microorganismos capaces de realizar el proceso de arseniato-reducción para evitar la toxicidad por este metaloide, y en menor número aquellas que pueden utilizarlo en su metabolismo como aceptor final de electrones. Se pueden identificar cuatro Filos principales de manera general que llevan cabo el mecanismo de desintoxicación: Proteobacterias, Firmicutes, Actinobacteria y Bacteroidetes (Drewniak et al., 2008). Mientras que a nivel de género se han reportado *Shewanella sp.* y *Aeromonas sp.*, capaces de llevar a cabo la reducción de arseniato de manera anaeróbica, así como *Pseudomonas sp.*, *Alcaligenes*, *Vibrio* y *Klebsiella* (Drewniak et al., 2012). A nivel de especie se reportan Proteobacterias como *E. coli* y Firmicutes como *Staphylococcus aureus*. El mecanismo de arseniato-reducción no es único de bacterias, ya que también se han encontrado organismos del dominio Archaea que pueden llevarlo a cabo tal como miembros del Filo Euryarchaeota donde se reporta a la especie *Ferroplasma acidiphilum*,

entre otras (Chang et al., 2008). Sin embargo, las bacterias arseniato-reductoras no asimilativas han sido descubiertas más recientemente, siendo al menos un total de 24 procariotas distintas, reportadas hasta ahora, que son capaces de utilizar al arseniato como aceptor final de electrones, algunas de ellas se muestran en la Tabla 2.5 (Oremland & Stolz, 2003, 2005; Stolz et al., 2006).

**Tabla 2.5.** Ejemplos de microorganismos capaces de respirar arsénico.

<b>Aislado</b>	<b>Fuente</b>	<b>Referencia</b>
<i>Bacillus arsenicoselanus</i> E1H	Sedimento	Blum et al. (1999)
<i>Shewanella</i> sp. ANA-3	Sedimento	Saltikov et al. (2003)
<i>Citrobacter</i> sp. TSA-1	Sedimento	Chang et al. (2011)
<i>Marinobacter santoniniensis</i> sp.	Sedimento hidrotermal	Handley et al. (2004)

## 2.6 Resistencia de microorganismos a metales pesados

Los metales pesados generalmente ejercen una acción inhibitoria en los microorganismos ya sea bloqueando grupos funcionales esenciales, desplazando iones metálicos esenciales, o bien, modificando la conformación de sitios activos en algunas moléculas; siendo actividades como la minería, fundición, procesos industriales y deposición de desechos, las que conllevan a un aumento en la concentración de metales en el ambiente. Particularmente, el drenado ácido de mina (DAM) y las descargas de aguas residuales son unas de las principales problemáticas de contaminación en sistemas acuáticos por metales, debido a las transformaciones redox que pueden ocurrir en ambientes acuosos (Borch et al., 2010). En ambientes de esta naturaleza, la respuesta de las comunidades microbianas hacia los metales pesados depende de la concentración y disponibilidad de estos y son dependientes del comportamiento de procesos complejos controlados por múltiples factores como el tipo de metal, la naturaleza del medio y las especies microbianas presentes. La mayoría de los metales pesados son elementos de transición con sus orbitales *d* incompletos; estos orbitales proveen al metal la habilidad de formar compuestos complejos mediados por reacciones redox, incluso muchos de estos cationes desempeñan un papel importante como “elementos traza” en las reacciones bioquímicas que ocurren en la naturaleza (Nies, 1999). Algunos metales traza, como Cr, Cu, Co, Ag, Tc, y Hg, existen en

distintos estados de oxidación, y su transformación puede ser mediada químicamente por  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{H}_2\text{S}$  si se encuentran en el medio, por características fisicoquímicas como el pH y el potencial redox del medio, o bien, pueden ser transformados por microorganismos presentes en el medio acuoso, afectando la movilidad y biodisponibilidad, así como la sorción y precipitación para la formación de minerales (Borch et al., 2010; Bourg A., 1995).

Algunos microorganismos, al estar en contacto con metales en su medio, han desarrollado sistemas de desintoxicación sobre estos, como es el caso de los que desintoxican As, quienes como ya se mencionó, tienen el gen *ars*, el cual les permite cambiar el estado de oxidación de este elemento y posteriormente expulsarlo del organismo. A su vez se ha observado que existen algunos microorganismos que contienen el gen *Czc*, el cual les permite desintoxicar de su sistema, según sea el caso, metales como el Zn, Cd o Co, cuando se encuentran en exceso dentro de ellos, ya que este gen codifica para la desintoxicación de estos tres metales, mediante una bomba de excreción, similar al *arsB* (Nies, 1999). El Zn, puede ser transportado hacia dentro de la célula por una variedad de proteínas transportadoras, siendo una de ellas la descrita como el sistema transportador de  $\text{Mg}^{2+}$ , y su toxicidad está relacionada con los efectos que produce el cobre, como la formación de radicales; uno de los mecanismos que hacen uso las bacterias para lidiar con este metal son las bombas de excreción ATPasas que permiten expulsar al Zn de su sistema cuando este metal les causa daños. Así como con el Zn, algunas bacterias tienen mecanismos de resistencia hacia el Cd, uno de los cuales es el descrito como el *cad operon* o el *czd operon*, que permiten bombear estos cationes hacia el exterior de la célula. Por otro lado, el plomo (Pb), se comporta de manera similar al  $\text{Zn}^{2+}$  o  $\text{Mn}^{2+}$  al entrar a los microorganismos por las mismas vías que estos dos metales utilizan, además, la toxicidad del Pb dependerá de la su biodisponibilidad en el medio (Jarosławiecka & Piotrowska-Seget, 2014).

## **2.7 Bioprospección y cultivo de microorganismos**

Hasta ahora el número de microorganismos aislados y cultivados capaces de realizar la respiración de arsénico es reducido, siendo menor a 50, debido principalmente a las dificultades producidas por las interacciones con su medio, haciendo así que el conocimiento y entendimiento de la fisiología, genética, y ecología microbiana de estos sea limitado (Amann et al., 1995; Schloss & Handelsman, 2006), por lo que es importante realizar una bioprospección de sitios ricos en arsénico para explorar capacidades metabólicas de la microbiota presente. El cultivo de microorganismos se refiere a tenerlos (sintéticamente) en condiciones suficientemente favorables para su crecimiento en laboratorio. Estas condiciones deben abarcar los parámetros fisicoquímicos y metabólicos necesarios para su desarrollo; es decir, la célula debe tener acceso a una fuente de energía y nutrientes. Durante el cultivo de una muestra, los microorganismos son colocados en un “nuevo ambiente”, un medio que contenga las características del ambiente natural de donde se extrajo y cualquiera que sea este medio (líquido o sólido), su elección es esencial para el correcto crecimiento de las bacterias. Así por ejemplo, como en cada ambiente específico, el medio de cultivo debe ser seleccionado adecuadamente dado que no todos los microorganismos pueden desarrollarse en él. Por esta razón, el medio de cultivo debe considerarse como específico debido a las capacidades metabólicas de cada microorganismo. Así, las características del medio de cultivo dependerán del objetivo del estudio y no del microorganismo en cuestión. Una vez que el medio ha sido seleccionado, los parámetros fisicoquímicos deben ser determinados (la temperatura de incubación, salinidad, pH), todo ello para emular en la medida de lo posible las condiciones del ambiente original donde fueron recolectados y con ello maximizar la oportunidad de éxito en el crecimiento de los microorganismos (Bertrand et al., 2011).

## **2.8 Estado del arte de la bioprospección de microorganismos arseniato-reductores**

Sólo algunos microorganismos capaces de realizar el proceso de arseniato-reducción han sido aislados de su medio natural y cultivados en condiciones sintéticas, para posteriormente reproducirlos en laboratorio y realizar estudios de interés. Por ejemplo, Saltikov y colaboradores (2003) lograron aislar bacterias del género *Shewanella* en un

medio sólido con lactato como fuente de carbono y aportando principalmente sales como nutrientes, con una concentración de 5 mM de arseniato. Por su parte, Switzer et al. (2012) aislaron y cultivaron *Desulfohalophilus alkaliarsenatis* en un medio líquido, a un pH alcalino de entre 8.8 – 9.5 y con condiciones salinas a temperatura de 20°C, con una concentración de As(V) de 5 mM y con lactato 3 mM como fuente de carbono. Así, como se mencionó anteriormente, el medio de cultivo dependerá mucho del objetivo del estudio más que del microorganismo en cuestión, pero sin pasar por alto las características principales de este último. Como por ejemplo, en estos casos, se trabajó en condiciones salinas y alcalinas para proveer las condiciones requeridas por esta bacteria para su correcto crecimiento (Saltikov et al., 2003; Switzer et al., 2012).

En 2009, López y colaboradores reportaron el aislamiento de *Sybechocystis sp.* en un medio sólido y en condiciones mesofílicas (30°C), con una concentración de 50 mM de arseniato en forma de  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ , en crecimiento fototrófico con iluminación fluorescente continua. Así también, en otro estudio en el que se usaron altas concentraciones de arseniato al cultivar una cepa de *Citrobacter sp.*, que utiliza glucosa como fuente de carbono, en condiciones anaerobias y con concentraciones de As(V) que varían desde 20 hasta 60 mM. (Chang & Nawata, 2012)

El aislamiento de microorganismos específicos no son un caso único ya que también hay estudios donde reportan el aislamiento de consorcios bacterianos capaces de realizar arseniato-reducción, como es el caso de un consorcio de bacterias sulfato-reductoras reportadas en un estudio realizado por Teclu et al. (2008) donde usaron concentraciones de 0.01 mM de arseniato a condiciones de pH neutras. Así también, Hoefft y colaboradores (2004) reportaron el cultivo de un consorcio de  $\delta$ -proteobacteria en un medio líquido (suspensión) trabajando con una concentración de arseniato de 10 mM en un enriquecimiento anaerobio a condiciones alcalinas (pH 9.8) y con la adición de sales minerales para su correcto crecimiento (Hoefft et al., 2004; Teclu et al., 2008).

El aislamiento y cultivo de microorganismos es un proceso difícil debido, principalmente, a que se requiere encontrar las condiciones idóneas para que el microorganismo crezca y además con las cuales se pueda realizar el objetivo del estudio que se plantea. Es por ello que es normal que se tenga un porcentaje bajo de

microorganismos reportados que se encuentren plenamente cultivados. Handley et al. (2004) reportaron el aislamiento exitoso de un microorganismo capaz de realizar la arseniato-respiración, *Marinobacter santoniniensis* sp. nov., obteniéndolo a partir de nueve resiembras implementando un enriquecimiento arseniato-reductor en placas con un medio sólido (medio marino mínimo), suplementado con arseniato a una concentración de 5 mM y lactato a 10 mM. Mientras que Liu et al. (2004) realizó el cultivo y aislamiento de un microorganismo del género *Desulfosporosinus*, logrando crecer al microorganismo utilizando compuestos aromáticos como substrato y utilizando arseniato como aceptor final de electrones. El aislamiento de este microorganismo se llevó a cabo primeramente por un enriquecimiento de cultivos, colocando medios anaeróbicos con 10 mM de arseniato y 10 mM de lactato y realizando diluciones del mismo cada dos semanas hasta el punto de que ya no se observaba ningún tipo de sedimento, inoculando con 10% del medio en cada pase a lo largo de 6 meses. Posteriormente, el inóculo se sembró en medio sólido, utilizando agar al 1.8%, incubándolo durante 4 semanas a 30°C.

En la Tabla 2.6 se enlistan los microorganismos cultivados capaces de realizar arseniato-reducción. La importancia de realizar estos procesos de aislamiento y cultivo de bacterias radica, como se ha mencionado anteriormente, en el entendimiento y conocimiento de su fisiología, genética y ecología microbiana, así como en comprender los procesos que pueden llevar a cabo para poder aprovecharlos en el desarrollo de procesos biotecnológicos. En el caso específico del arsénico, la biotecnología podría estar basada en la biotransformación del arsénico para lograr su inmovilización en compuestos menos tóxicos, específicamente en compuestos de sulfuro de arsénico.

**Tabla 2.6.** Consorcios y microorganismos arseniato-reductores que se han logrado cultivar a partir de diversas fuentes.

Microorganismo					Referencia
Nombre Científico	Fuente	Aislado	[Sustrato] mM	[As] mM	
-	BSR	-	-	0.01	Teclu D. et al. (2008)
<i>Desulfohalophilus alkaliarsenatis</i>	Lago	SLSR-1	3 Lac	5	Switzer J. et al. (2012)
<i>Comamonas sp.</i>	Desechos de curtiduría	-	-	1.3	Chitpirom K et al. (2009)
<i>Shewanella</i>	Estuario	ANA-3	10 Lac	5	Saltikov C. et al. (2003)
<i>Sybechocystis sp.</i>	-	Strain PCC 6803	-	50	López L. et al. (2009)
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Sedimento	G20	-	-	Li X. & Krumholz L. (2007)
-	Lago	MLMS-1 $\delta$ -proteobacteria	5 Lac	10	Hoelt S. et al. (2004)
<i>Citrobacter sp.</i>	Marino/ Sedimento	NC-1	5	5	Chang Y. et al (2011)
<i>Thermus</i>	Canal de drenaje	Hr13	3 Lac		Gihring T. & Banfield J. (2001)
<i>T. thermophilus</i>	Aguas termales	HB27			Giuduce I. et al. (2013)

**Tabla 2.6 (Continuación).** Consorcios y microorganismos arseniato-reductores que se han logrado cultivar a partir de diversas fuentes.

<i>Crysigenis arsenatis</i>	Sedimento	BAL-1	10 Lac	10	Macy et al. (1996)
<i>Desulfotomaculum auripigmentum</i>	Sedimento	OREX-4	20 Lac	10	Newman et al. (1997)
<i>Bacillus arsenicoselenatis</i>	Sedimento	E1H	10 Lac	10	Blum ;(1998)
<i>Sulforopirillum barnesii</i>	Ciénega	SES-3	-	-	Stolz et al. (1999)
<i>Sulforospirillum arsenophilum</i>	-	MIT-13	-	-	Stolz et al. (1999)
<i>Desulfomicobium</i>	Sedimento	Ben-RB	20 Lac	5/10/15/ 20/ 30	Macy et al. (2000)
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Sedimento	Ben-RA	20 Lac	10/ 15/ 20/ 30	Macy et al. (2000)
<i>Chrysiogenes arsenatis</i>	Sedimento/ Mina	JMM-4	5/10 Lac	5/10	Santini et al. (2002)
<i>Desulfitobacterium</i>	Sedimento	GBFH	10 For	10	Niggemyer et al. (2001)
<i>Geobacillus kaustophilus</i>	-	A1	-	5	Cuebas et al. (2011)

Lac: Lactato; For: Formiato

Adaptada y modificada de Satyanarayana et al. (2012)

### 3. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

#### 3.1 Justificación

En varios sitios del planeta, el arsénico es responsable de la contaminación de agua para consumo humano, lo que representa un alto riesgo para la salud humana. Este elemento es abundante en suelos y aguas naturales, ya que está presente en la corteza terrestre, formando minerales, o disuelto en aguas subterráneas que se encuentran en contacto con formaciones geológicas que contienen naturalmente altos niveles de arsénico. La toxicidad del arsénico y su biodisponibilidad dependen de su especiación, la cual se encuentra relacionada con transformaciones microbianas, incluyendo procesos redox, y las interacciones con procesos geoquímicos. Las dos principales formas de arsénico susceptibles de ser transformadas por procesos biológicos son el arseniato o As(V) y el arsenito o As(III). El arseniato, al ser homólogo del fosfato, entra a la célula y puede privarla de su suministro energético, mientras que el arsenito inhibe la actividad enzimática de algunas proteínas; es por ello que el arsenito se considera más tóxico que el arseniato (Costa et al., 2014; Lièvremonet et al., 2009; Barton et al., 2010).

Existen diversas tecnologías fisicoquímicas que logran disminuir la contaminación por arsénico en el agua, pero uno de sus principales inconvenientes son los desechos que generan y su alto costo, debido principalmente a la adición de reactivos para su tratamiento. Por esto, se busca implementar tecnologías que permitan reducir el efecto adverso que produce el arsénico. Los procesos biológicos podrían representar una alternativa viable para reducir la contaminación por arsénico, promoviendo la reducción de As(V) a As(III), siempre y cuando este proceso se lleve a cabo acoplado con la sulfato-reducción, permitiendo la formación de minerales de arsénico-sulfuro. Para poder llegar a esta biotecnología, es necesario conocer las capacidades metabólicas de los microorganismos que pueden respirar arsénico, por lo que obtener consorcios que puedan ser cultivados en el laboratorio facilitará el entendimiento de su funcionamiento.

El arsénico en agua normalmente se encuentra asociado a la presencia de otros metales, como por ejemplo Pb, Cd, Cu y Zn, ya que muchos minerales que contienen arsénico, contienen también dichos metales. La problemática que propician estos metales y

su potencial daño hacia la salud y al medio ambiente, hace necesario encontrar vías favorables que permitan atenuar este problema mediante la búsqueda de microorganismos no sólo resistentes al arsénico sino también a otros metales. Es por ello, que el aislamiento de bacterias arseniato-reductoras con capacidad de tolerar la presencia de otros metales resulta pertinente en el desarrollo de una aplicación biotecnológica que permita el tratamiento de efluentes ricos en metales y arsénico.

### **3.2 Hipótesis**

Dado que en la naturaleza la presencia de arsénico se encuentra comúnmente asociada a otros metales, se espera que los consorcios obtenidos de sitios contaminados con arsénico tengan la capacidad de resistir la toxicidad causada por otros metales (como por ejemplo Pb o Zn).

### **3.3 Objetivo**

Evaluar la actividad arseniato-reductora de un consorcio proveniente de la comunidad microbiana de un efluente con actividad minera del estado de San Luis Potosí y determinar el potencial de resistir la toxicidad causada por metales para conocer las capacidades metabólicas de los microorganismos arseniato-reductores que componen la comunidad y su posible aplicación biotecnológica.

### **3.1 Objetivos Específicos**

- i. Aislar bacterias arseniato-reductoras a partir de consorcios provenientes de sitios mineros del municipio de Matehuala, S.L.P. para su posterior caracterización.
- ii. Evaluar si los aislados tienen la capacidad de utilizar otros aceptores de electrones para determinar sus capacidades metabólicas.
- iii. Caracterizar por métodos moleculares dichas bacterias para su análisis y clasificación filogenética.
- iv. Someter a las bacterias arseniato-reductoras aisladas a estrés toxicológico por metales para determinar su resistencia a estos.

## 4. METODOLOGÍA

---

### 4.1 Fuente de microorganismos

Los consorcios que se usaron en este estudio provinieron de dos sitios de muestreo y fueron cultivados previamente por Ríos-Valenciana et al. (2017). Dichos consorcios se recuperaron de un punto del canal “Cerrito Blanco” (CB) (100°36’41” longitud O y 23°40’23” latitud N) y de un afloramiento de agua en el interior del club de tiro privado Los Halcones (CT) (100°38’22” longitud O y 23°38’22” latitud N), ambos sitios se localizan en el municipio de Matehuala, San Luis Potosí. Estos dos sitios son cercanos al distrito minero de Santa María de la Paz, en Matehuala (Ríos-Valenciana et al., 2017). Para llevar a cabo los ensayos en lote, se realizaron triplicados de cada sitio y se realizaron subcultivos semanales en medio mineral.

### 4.2 Medios de Cultivo

#### 4.2.1 Medio Líquido para Enriquecimiento

El medio de cultivo usado en los enriquecimientos y subcultivos contenía lo siguiente: medio mineral modificado de Burton et al. (2013) y que contenía (g/L): KCl 3.7, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 10.1, CaCl<sub>2</sub> 7.3, NH<sub>4</sub>Cl 2.7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5; extracto de levadura 0.050 g/L y la solución mineral de Wolfe (0.1 mL/L). Se adicionaba lactato como donador de electrones a una concentración de 5 mM. Además se adicionaba arseniato (HAsNa<sub>2</sub>O<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) como aceptor de electrones, para proveer un medio rico para el desarrollo de bacterias arseniato-reductoras (Burton et al., 2013). El pH del medio se ajustó a 6.8 con NaHCO<sub>3</sub> antes de esterilizar en la autoclave. Este medio se vaciaba en botellas serológicas de 25 mL para los enriquecimientos, se tapaban con tapones de butilo y la atmósfera se intercambiaba con una mezcla de N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20) para promover condiciones anaerobias. La presión de las botellas se equilibraba con la atmosférica, posteriormente las botellas se esterilizaban en el autoclave a 120°C por 15 minutos.

#### **4.2.2 Medio sólido para aislar**

Para el aislamiento de las bacterias arseniato reductoras se preparó medio sólido el cual fue el mismo medio líquido utilizado para los enriquecimientos (sección 4.2.1) pero adicionando, en este caso, 1.2% (p/v) de agar bacteriológico. El pH se ajustaba a 6.8 con  $\text{NaHCO}_3$ . Se añadía una solución de vitaminas (1 mL en 10 mL de  $\text{CaCl}_2$  a una concentración de 0.075 M) posterior a la esterilización del medio, una vez tibio ( $40^\circ\text{C}$ ) y previo al vaciado en cajas petri.

#### **4.2.3 Solución de vitaminas en $\text{CaCl}_2$**

Se preparó la solución de vitaminas (25 mL) la cual contenía: biotina (5 mg), nicotinamida (5 mg), ácido p-aminobenzoico (2.5 mg), tiamina B1 (5 mg), cianocobalamina B12 (2.5 mg), riboflavina (2.5 mg), ácido pantoténico (2.5 mg), piridoxamina (12.5 mg).

#### **4.2.4 Solución salina isotónica**

Para la técnica del número más probable de bacterias arseniato-reductoras, se preparó una solución salina isotónica al 0.9% para 16 botellas (8 por sitio), las cuales contenían 1 mL en cada una. Esta solución se preparó con 1.8 g de  $\text{NaCl}$  y aforándolo a 200 mL con agua destilada previamente reducida.

#### **4.2.5 Medio para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias para metales**

El medio que se usó para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias de metales fue el mismo medio sólido que se usó para aislar (sección 4.2.2); se adicionaron distintas concentraciones de metales a partir de soluciones stock (100 mM) después de haber esterilizado el medio (sección 4.3.5). Estas soluciones stock se colocaban sin esterilizar y dentro de la campana de flujo laminar. Los metales que se evaluaron fueron:  $\text{Pb}^{2+}$  ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ),  $\text{Zn}^{2+}$  ( $\text{ZnCl}_2$ ) y  $\text{Cd}^{2+}$  ( $\text{CdN}_2\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ).

#### **4.2.6 Medio para los ensayos con diferentes aceptores de electrones**

El medio utilizado en los ensayos para determinar los aceptores alternos se preparó de la misma manera que para los enriquecimientos (sección 4.2.1), a excepción de la sustitución de arseniato por sulfato o nitrato como aceptor de electrones. En ambos casos la

concentración final de aceptor de electrones fue de 5 mM y se adicionó a partir de soluciones stock (100 mM) de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y de KNO<sub>3</sub>, respectivamente. El donador de electrones fue lactato a una concentración de 5 mM.

#### **4.2.7 Solución salina con buffer de fosfatos (PBS)**

La solución salina con buffer de fosfatos (PBS) se usó como medio de dilución en los ensayos de las concentraciones mínimas inhibitorias de metales. La composición fue la siguiente (g/L) NaCl (2 g), KCl (0.05 g), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.36 g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.06 g); el pH se ajustó a 7.4 con NaHCO<sub>3</sub>.

### **4.3 Métodos**

#### **4.3.1 Enriquecimiento y aislamiento**

Para la selección y aislamiento de bacterias arseniato-reductoras se partió de los consorcios enriquecidos por Rios-Valenciana et al. (2017) identificados como CB y CT. Estos consorcios se encontraban en botellas que contenían sedimento y medio de cultivo, ya que el sedimento representa una fuente de ruido endógeno por las interferencias que ocasiona en el medio, se realizaron transferencias semanales durante tres semanas en medio líquido (sección 4.2.1) con la finalidad de eliminar el sedimento de los cultivos. En botellas de 60 mL se colocaban 10 mL del consorcio anterior como inóculo, en 25 ml de medio estéril; todo esto se realizaba en la campana de flujo laminar. Las transferencias se llevaron a cabo hasta observar que ya no hubiera sedimento y se incubaron a 30°C, en oscuridad y sin agitación (Liu et al., 2004; Macy et al., 1996; Switzer et al., 2012). El esquema general que representa el procedimiento de enriquecimiento y aislamiento se presenta en el Anexo 1.1.

#### **4.3.2 Número más probable bacterias arseniato-reductoras.**

Una vez que los cultivos ya no tenían sedimento, se llevaron a cabo diluciones seriadas de los enriquecimientos en solución salina isotónica al 0.9% con NaCl, con el fin de cuantificar por el método del número más probable (NMP) a las bacterias arseniato-reductoras presentes en los enriquecimientos. Este método consiste en la enumeración de bacterias que tengan una característica metabólica específica, incubando diluciones seriadas del cultivo de interés un en un medio que fomente el crecimiento de aquellas bacterias que

tengan la característica deseada, en este caso la arseniato-reducción. Para cuantificar el número más probable de bacterias arseniato-reductoras, se realizó primero una muestra compuesta en los triplicados para cada sitio, CB y CT, a partir de la última transferencia realizada en los enriquecimientos (Anexo 1.1). A partir de estas muestras compuestas, se realizaron diluciones en la solución isotónica, diluyendo 1 mL (de la dilución inmediata anterior) en 9 mL de solución salina isotónica para obtener diluciones seriadas desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-8}$ . Posteriormente, cada una de las diluciones se inoculó en cuatro botellas serológicas con 9 mL de medio para el proceso de arseniato-reducción (sección 4.2.1). Tres de las botellas se sometieron a la prueba cualitativa para identificar si hubo o no actividad arseniato-reductora; una cuarta réplica se conservó para su uso posterior. Esta cuarta botella de cada dilución se sembró en placas de medio sólido (sección 4.2.2) con agar (1.2%) al cual se le añadió 5 mM de arseniato de sodio para seleccionar y aislar bacterias resistentes al arsénico (Costa et al., 2014).

#### **4.3.3 Prueba cualitativa de arseniato-reducción**

Mediante la prueba cualitativa de arseniato-reducción se pudo identificar si al transferir semanalmente los cultivos, éstos seguían llevando a cabo la arseniato-reducción. Para esto se utilizó el método propuesto por Kuai et al. (2001) que consiste en acidificar 0.2 mL de medio, en el cual se presume se ha llevado a cabo la arseniato-respiración, con 0.1 mL de HCl 1N, seguido de la adición de 0.3 mL de  $H_2S$  a una concentración de 1.5 mM. El cambio inmediato (1-2 segundos) de color del medio a amarillo después de adicionar el sulfuro indica que el proceso de arseniato respiración se llevó a cabo positivamente. (Kuai, Nair, & Polz, 2001).

#### **4.3.4 Ensayo con diferentes aceptores de electrones**

Se evaluaron distintos aceptores de electrones sobre los aislados para determinar su capacidad metabólica (Stolz et al., 2006). Primero, se realizó una exploración en volúmenes pequeños (25 mL) para determinar si los microorganismos presentes en los consorcios podrían o no utilizar el  $NO_3^-$  o  $SO_4^{2-}$  como aceptor alternativo de electrones. Una vez comprobada la capacidad de utilizar otros aceptores de electrones se llevó a cabo

el seguimiento del consumo de los aceptores ( $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) así como la formación del producto  $\text{H}_2\text{S}$  y el consumo de sustrato (lactato).

#### **4.3.5 Evaluación de la concentración de metales mínima inhibitoria del crecimiento**

Para determinar los efectos tóxicos producidos por el arseniato y otros metales sobre el crecimiento de los microorganismos aislados se realizaron las pruebas de concentración mínima inhibitoria. Estos ensayos se llevaron a cabo con el medio sólido descrito anteriormente (sección 4.2.4), con distintas concentraciones de  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  o  $\text{Pb}^{2+}$ , como se muestra en la Tabla 4.1 (Nies, 1999; Salmassi et al, 2002). Primeramente se evaluó una concentración intermedia, y dependiendo del resultado la concentración se aumentaba o disminuía.

La técnica para realizar el ensayo consistió primeramente en determinar una concentración deseada de microorganismos, para esto, se tomó con un asa microbiológica biomasa de los cultivos en sólido y se diluyó en 1 mL de solución PBS. Una vez teniendo esta alícuota, se tomaron 200  $\mu\text{L}$  y se aforó a 1 mL, en una celda de plástico para espectrofotómetro, con medio PBS para medir su densidad óptica (DO) a 600 nm. La densidad óptica requerida para el ensayo con metales tendría que estar entre 0.4 – 0.6 unidades de absorbancia a 600 nm. Una vez obtenida la densidad óptica deseada, se calculó el volumen de la suspensión celular para ajustar la densidad óptica a 0.5 unidades de absorbancia. Los volúmenes correspondientes se centrifugaron a 15000 rpm por 3 minutos, una vez centrifugado se retiró el sobrenadante y el *pellet* de células se resuspendió nuevamente con 200  $\mu\text{L}$  de PBS. Este volumen se colocó en los pozos de la primera columna de una microplaca de 96 pozos. A partir de esta suspensión se realizaron diluciones logarítmicas tomando 20  $\mu\text{L}$  y diluyéndolos en 180  $\mu\text{L}$  de PBS estéril hasta la dilución  $10^6$ . Posteriormente, con la ayuda de un replicador de formato de 48 pines (6 filas x 8 columnas) se colocaron 7  $\mu\text{L}$  de cada dilución en cada una de las placas de crecimiento con las diferentes concentraciones de metales. A continuación las cajas petri se sellaron y se incubaron, junto con una caja control sin adicionar metal, solo con el aceptor y donador de electrones, en condiciones anaerobias (en una jarra de anaerobiosis) o en condiciones aerobias a una temperatura de 28 °C.

**Tabla 4.1.** Concentraciones de metales propuestas para su evaluación en ensayos de dilución por gota. (Sarkar et al. 2012; Nies, 1999; Salmassi et al, 2002).

Metal	Concentraciones (mM)		
Zn <sup>2+</sup>	2	5	10
Cd <sup>2+</sup>	1	3	5
Pb <sup>2+</sup>	1	2	5

Se evaluaron las concentraciones intermedias e iniciales.

## 4.4 Pruebas Moleculares

### 4.4.1 Extracción de ADN de los cultivos y amplificación por PCR

Se llevó a cabo la extracción de DNA por medio de choque térmico propuesto por Pepi et al (2007), el cual se realizó picando la colonia aislada con ayuda de un asa microbiológica y colocando la muestra en un volumen de 25  $\mu$ L de agua inyectable, posteriormente se llevó al choque térmico en un termociclador a 100°C durante 5 minutos. La amplificación de un fragmento del gen 16s rRNA (1465 pb) se llevó a cabo mediante PCR usando el oligo 27F con una secuencia de 5'-3' de AGAGTTTGATCCTGGCTCAG y el oligo 1492 R con una secuencia de 5'-3' de TACGGYTACCTTGTTACGACTT. Se realizaron reacciones de 24  $\mu$ L donde la mezcla de reacción de la PCR contenía lo siguiente: 19.925  $\mu$ L de agua, 2.5  $\mu$ L de buffer (10mM), 0.75  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0.25  $\mu$ L dNTPs (10mM), oligos sentido y antisentido 0.25  $\mu$ L de cada uno (27F y 1492 R), Taq 0.125  $\mu$ L. El programa en el termociclador que se utilizó para la amplificación por PCR fue el siguiente: Pre calentamiento a 94°C durante 4 min, desnaturalización a 94°C durante 4 min, alineamiento a 54°C durante 1 min, una extensión a 72°C durante 3 min, repitiendo esto en 30 ciclos para terminar con una extensión final a 72°C durante 7 min.

### 4.4.2 Secuenciación y afiliación filogenética

Los productos de la PCR fueron secuenciados y a partir de las secuencias obtenidas se realizó una afiliación filogenética de los aislados con ayuda de la base de datos NCBI.

## **4.5 Técnicas Analíticas**

### **4.5.1 Cuantificación de la concentración de sulfato, lactato y acetato**

El sulfato, lactato y acetato se cuantificaron en un equipo de electroforesis capilar Agilent 1600A mediante la comparación con estándares de alta pureza. La determinación de analitos se realizó mediante detección indirecta de UV usando un detector de arreglo de diodos. Se utilizó una señal de longitud de onda de 350 nm con una referencia de 230 nm. Antes de su análisis, las muestras se centrifugaron previamente a 12000 rpm por 5 minutos y se filtraron en membrana millipore de 0.22  $\mu\text{m}$ .

### **4.5.2 Cuantificación de sulfuro disuelto**

La actividad sulfato-reductora en la prueba de los distintos aceptores de electrones se cuantificó mediante la técnica de (Cord-Ruwisch, 1985), donde se tomó 0.1 mL de muestra la cual reaccionó con una solución de  $\text{CuSO}_4$  (5 mM) en un medio ácido con HCl (50 mM). Se cuantificó la absorbancia de la solución a una longitud de onda de 480 nm en un espectrofotómetro UV-VIS. La cantidad de sulfuro disuelto se obtuvo mediante la curva de calibración correspondiente.

### **4.5.3 Cuantificación de nitrato**

Para la cuantificación de nitratos se realizó una técnica colorimétrica donde se preparó una curva de calibración para determinar la absorbancia la cual se midió a 220 nm de longitud de onda. Se obtuvieron los errores de la celda y de turbidez y se realizó la corrección de la absorbancia para posteriormente determinar los nitratos en la muestra. El análisis se llevó a cabo de acuerdo a la técnica 4500- $\text{NO}_3^-$  - B. del Standard Methods, la cual consistió en tomar 0.2 mL de la muestra y aforarla con 9.8 mL de agua destilada, y se adicionó 0.2 mL de HCl a una concentración 1 N, realizando con ello una dilución 1:50, para posteriormente leerlo a 220 nm en un espectrofotómetro.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

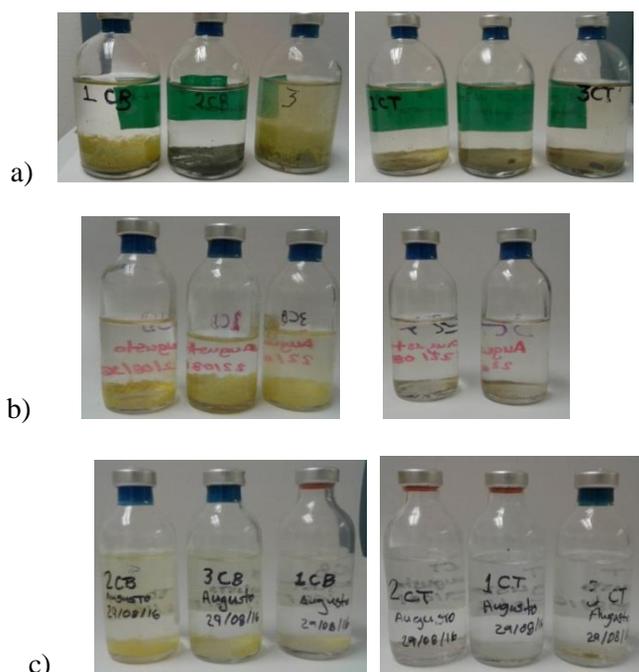
---

### 5.1 Enriquecimientos

A partir de los consorcios iniciales CB y CT se realizaron enriquecimientos, donde se tomó inóculo de los consorcios y se transfirió en medio líquido nuevo con arsénico. Este procedimiento fue llevado a cabo para seleccionar bacterias capaces de metabolizar este elemento ya que, los consorcios iniciales ricos en sedimento, contenían una comunidad microbiana, y se buscaba seleccionar aquellas con capacidad arseniato-reductoras. Estas transferencias a nuevo medio con arsénico, se realizaron cada dos semanas durante un mes, hasta el punto en el que la presencia de sedimento ya no era evidente, como se muestra en la Figura 5.1. En cada transferencia, se inoculaba 10% de la botella anterior y se incubaba a 30°C en condiciones anaeróbicas. Para verificar que en cada transferencia hubiese actividad arseniato-reductora, se procedió a realizar la prueba de arseniato-reducción (sección 4.3.3), la cual consistió en tomar una pequeña muestra del medio inoculado, colocarla en botellas de 10 mL estériles selladas, en condiciones anaeróbicas, y adicionarles HCl y H<sub>2</sub>S, las cuales, al mostrar una coloración amarillenta al instante, indicaban actividad arseniato reductora, ya que el H<sub>2</sub>S reaccionaba con el As(III) presente en el medio, producto de la reducción de As(V), para formar As<sub>2</sub>S<sub>3</sub>. En la Figura 5.1a, se observa el aspecto de los consorcios iniciales con sedimento para ambos sitios; conforme se hicieron las transferencias se observa una reducción en el contenido de sedimento (color oscuro en el fondo de las botellas Fig. 5a). Se puede ver que en la segunda transferencia (Fig. 5.1c) ya no se encuentra dicho sedimento en las botellas, además se detectó presencia de un precipitado color amarillo, indicando la formación de minerales arseniato-sulfurosos.

En trabajos previos sobre aislamiento de bacterias arseniato-reductoras se han reportado técnicas similares de enriquecimiento a la usada en este trabajo. Por ejemplo, Pepi et al. (2007), llevaron a cabo enriquecimientos con sedimento procedente de una laguna en Italia, en donde mantuvieron subcultivos cada dos semanas y posteriormente sembraron en medio sólido. Por su parte Chang et al. (2012), realizaron esta misma técnica con suelo de una zona industrial, en la cual mantuvieron enriquecimientos semanales durante un periodo de seis meses, usando glucosa como fuente de carbono y adicionando arseniato a una concentración de 10 mM. Por otro lado, Macy et al. (1996), trabajaron con

sedimento en condiciones anóxicas, con arseniato a una concentración de 10 mM y lactato como fuente de carbono a 10 mM, realizando subcultivos de los enriquecimientos semanales durante un mes.

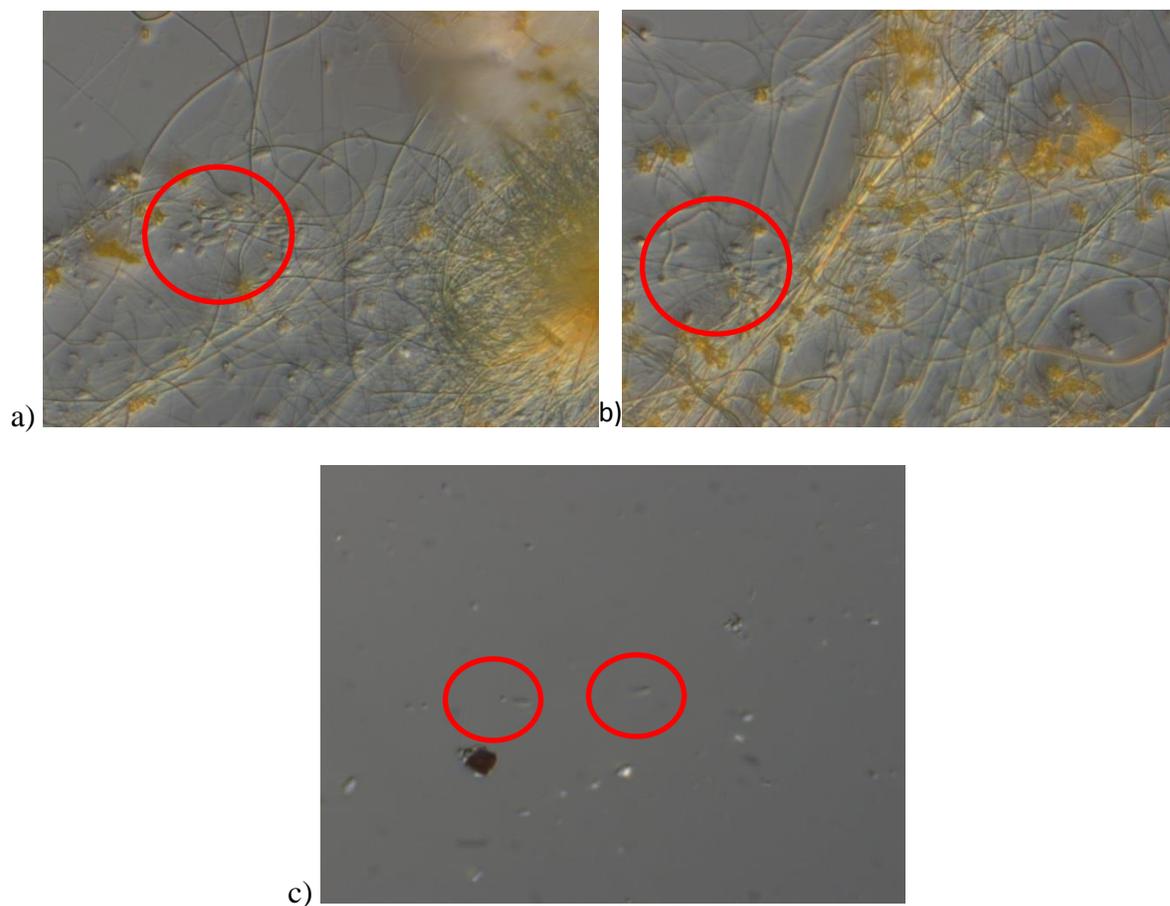


**Figura 5.1.** Aspecto de las botellas con los consorcios. a) Consorcios iniciales con sedimento del sitio recolectado en CB y CT. b) Primer pase realizado, después de 1 semana de incubación, Aún se observaba sedimento. c) Segundo pase realizado. Después de 2 semanas de incubación a 30 °C y en la oscuridad.

### 5.1.1 Formación del precipitado de $As_2S_3$

Se realizó microscopía óptica de la segunda transferencia para explorar la actividad microbiana, en dichas botellas ya no se encontraba sedimento de los enriquecimientos iniciales y se observó la formación de un precipitado que en principio debería de estar compuesto por el arsenito que contenía el frasco después de la arseniato-reducción y que reaccionó con el  $H_2S$  que se encontraba en el mismo, siendo este sulfuro procedente de los enriquecimientos con el sedimento inicial. Ríos-Valenciana et al. (2017) menciona que el sitio de procedencia de estas muestras era rico en sulfato, el cual, por posible actividad sulfato-reductora de los microorganismos presentes en los sedimentos, se redujo a  $H_2S$ , quedando un poco de sulfato también en las transferencias de los enriquecimientos. Como se muestra en la Figura 5.2 se puede observar mayor cantidad de microorganismos

alrededor del precipitado que lejos de él. Estos microorganismos que se observan tienen forma bacilar, en su mayoría y no se detectó alguna otra morfología.



**Figura 5.2.** a) y b) Micrografía en campo claro (100x), dentro de los círculos se pueden observar los microorganismos cerca del precipitado de arsénico (amarillo); c) Micrografía en contraste de fases (100x), se aprecia la forma bacilar de los microorganismos (dentro de los círculos).

## 5.2 Prueba de arseniato-reducción

Para determinar si en las transferencias seguía existiendo actividad arseniato reductora se procedió a realizar la prueba cualitativa de arseniato-reducción, la cual se realizó tomando una alícuota del cultivo y se le añadió HCl y H<sub>2</sub>S, y de acuerdo con Kuai et al. (2001) la formación de un precipitado amarillo inmediatamente después de adicionar el sulfuro indicó que la reducción de arsénico de arseniato a arsenito fue positiva. El resultado de

dicha reacción se muestra en la Figura 5.3, se observa que en los triplicados para ambos sitios CB y CT la prueba resultó positiva, indicando actividad arseniato-reductora. Esta técnica cualitativa nos muestra de una manera más rápida dicha actividad, al adicionar  $H_2S$  que reacciona con el arsenito presente, precipitando como trisulfuro de arsénico ( $As_2S_3$ ). Cabe destacar que la cantidad mínima de arsenito necesaria para formar el precipitado es de  $2.2 \times 10^{-26}$  mM, de acuerdo a su constante de solubilidad.



**Figura 5.3.** Prueba de arseniato reducción positiva. Se formó el precipitado amarillo instantáneamente para cada alícuota tomada.

#### **5.4 Número Más Probable (NMP)**

Se realizó la técnica del número más probable para determinar el número de bacterias capaces de reducir arseniato. Para llevar a cabo esta técnica, a partir de los triplicados de la segunda transferencia se tomó una muestra compuesta y sobre esta se realizó el análisis del número más probable descrito en la sección 4.3.2. En la Tabla 5.1 se pueden observar los resultados de dicha prueba para ambos sitios (CB y CT). Para otorgar un valor positivo o negativo a cada réplica de cada dilución se llevó a cabo la prueba cualitativa de arseniato-reducción. A partir de esos datos y mediante tablas estadísticas se pudo encontrar el número más probable de bacterias arseniato-reductoras que se presenta en la Tabla 5.2. Se puede notar que hay una diferencia entre ambos sitios, en el sitio CT el NMP de bacterias arseniato-reductoras fue dos órdenes de magnitud mayor que el del sitio CB, indicándonos que en este sitio existe mayor número de microorganismos con capacidades arseniato-reductoras. Esto es debido a que los sedimentos con los cuales se trabajó, tienen su origen en un distrito minero con un alto grado de contaminación con arsénico, encontrando valores de hasta 2263 mg/Kg para CT y de 238 mg/Kg para CB de acuerdo con Ríos-Valenciana et al. (2017). Los resultados del número más probable que se presentan en la Tabla 5.2 son

consistentes con lo reportado por Ríos-Valenciana et al. (2017), quienes reportan un NMP de  $4.3 \times 10^7$  y de  $21 \times 10^7$  células/mL para CB y CT, respectivamente. Mientras que en un estudio realizado por Kuai et al. (2001) en sedimentos de un estanque y de un humedal, reportan valores de NMP de  $7.6 \times 10^3$  y  $7.6 \times 10^4$  células/mL y de  $3.1 \times 10^4$  y de  $13.1 \times 10^4$  células/mL, respectivamente. Estos valores se encuentran entre 3 y 4 órdenes de magnitud menores a los de este trabajo y los datos reportados por Ríos-Valenciana et al. (2017). Esta metodología nos da una idea de que las bacterias arseniato-reductoras pueden tener un papel importante en estos sitios al estar presentes en grandes números.

**Tabla 5.1.** Resultado de la prueba arseniato-reductora en las réplicas para NMP

	No. / Dilución	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
<b>CB</b>	1	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	-	-
	3	+	+	+	+	-	-
<b>CT</b>	1	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+	+

**Tabla 5.2.** Resultado de la técnica NMP

	NMP
<b>CB</b>	$7.5 \times 10^5$ células / mL
<b>CT</b>	$> 240 \times 10^7$ células / mL

## 5.5 Resiembras

Una vez que no se detectó sedimento en la segunda transferencia, se procedió a realizar una siembra del medio líquido al medio sólido en agar al 1.2% y conteniendo 5 mM de As(V) (ver sección 4.2.2). A partir de esta siembra se realizaron cinco resiembras sucesivas en agar sólido bajo las mismas condiciones para así lograr seleccionar y aislar bacterias capaces de reducir arsénico. Estas resiembras se incubaron a 28°C en una jarra anaeróbica durante 2 semanas cada una, las cuales se revisaban periódicamente 2 veces por semana.

En la Figura 5.4 se pueden observar placas de la tercera resiembra donde se puede notar colonias aisladas de la siembra. A partir de estas colonias se realizaron dos resiembras más para lograr obtener los aislados.



---

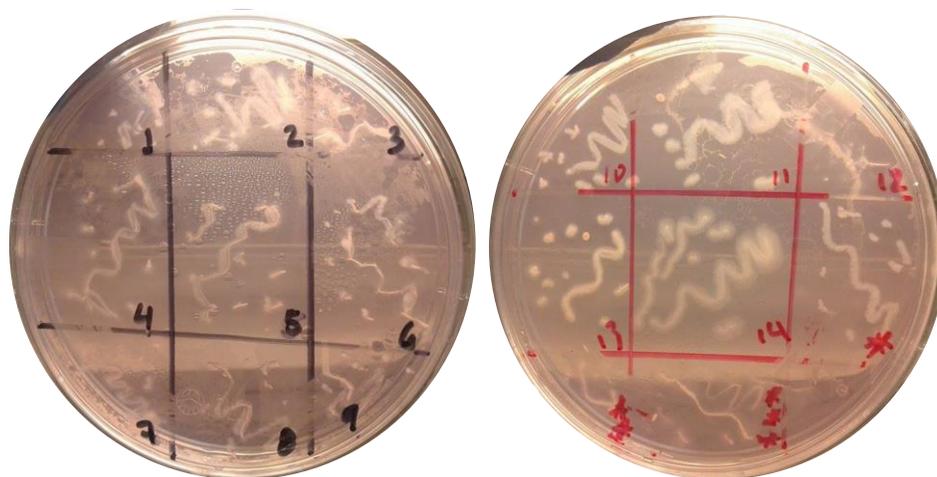
**Figura 5.4.** Aspecto macroscópico de las cajas con la resiembra 3 del sitio CB. Se logra observa colonias aisladas después de la tercera resiembra.

## 5.6 Aislados

A lo largo de cinco resiembras en agar sólido al 1.2%, con las cuales se trabajó durante un periodo de seis meses, se logró obtener catorce aislados en total, los cuales fueron posteriormente resembrados en una sola placa para obtener “archivos” de dichas colonias en condiciones anaeróbicas. Parar realizar estos archivos, en una placa con medio sólido y

arseniato a una concentración de 5 mM, se sembró en cuadrantes, una pequeña estría de cada colonia que se logró aislar, archivando así, cada aislado. Se puede observar en la Figura 5.5 el aspecto de la placa en la que se archivaron los catorce aislados claramente identificados, los cuales posteriormente se usaron para amplificar por PCR el gen 16S RNA, seguidos del análisis de secuenciación.

Autores como Pepi et al. (2007) reportaron que al realizar trabajos con la finalidad de aislar bacterias arseniato-reductoras, encontraron un total de diez cepas bacterianas que tienen la capacidad de resistir arsénico. Por otro lado, Niggemyer et al. (2001), obtuvo un aislado que además de reducir arseniato, contaba con una gran variedad de aceptores de electrones alternos. Santini y colaboradores (2002) por su parte, lograron obtener un aislado proveniente de sedimento contaminado de una mina en Australia. Este microorganismo fue capaz de reducir arseniato acoplado a la oxidación de lactato como donador de electrones.

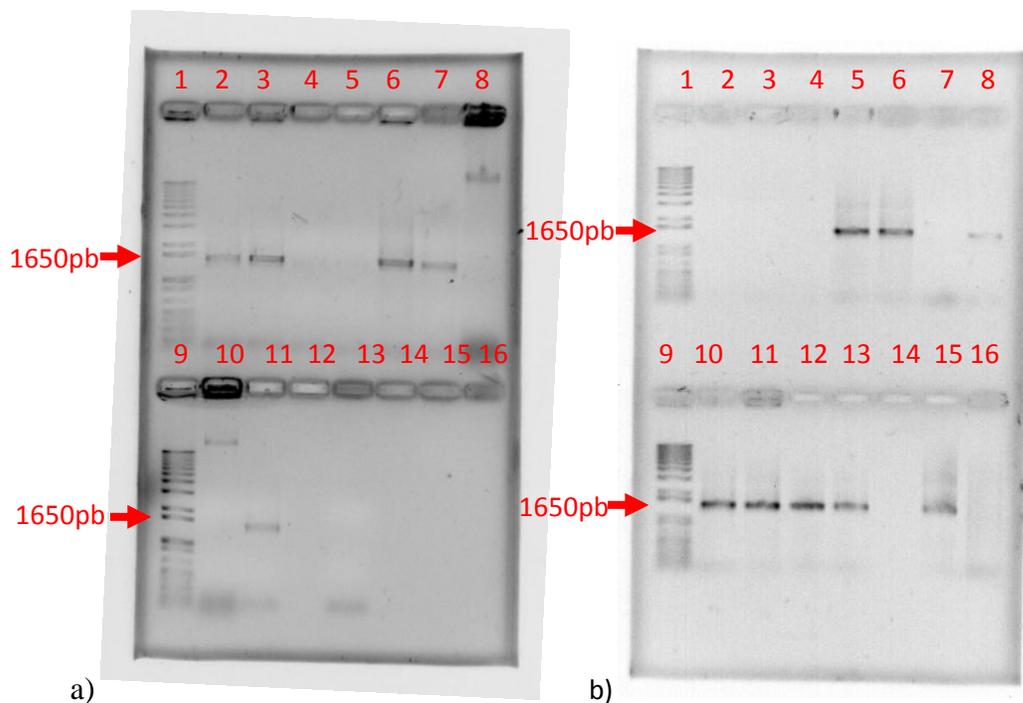


**Figura 5.5.** Aspecto macroscópico de los “archivos” de los aislados de bacterias arseniato reductoras.

### 5.7 Amplificación por PCR

De cada una de las distintas colonias aisladas, se llevó a cabo la amplificación del gen 16S RNA mediante PCR, para lo cual previamente se trataron los aislados con choque térmico para poder lisar las células y obtener el DNA genómico, a su vez, hubo un par de colonias que no se trataron con esta técnica; esto para determinar si era necesaria o no realizarla o podría amplificarse directamente realizando un pique de la colonia. La técnica de choque

térmico se llevó a cabo de acuerdo a lo propuesto por Pepi et al. (2007). Una vez realizado el choque térmico, se amplificó por PCR la región que codifica para el gen 16S rRNA a partir del DNA obtenido de las colonias. Los productos de PCR se observaron en un gel de agarosa después de una electroforesis, detectándose claramente la presencia de las bandas alrededor de 1465 pb (Figura 5.6). Cabe destacar que en el caso de las colonias donde se realizó el choque térmico para lisar las células, si aparece visible la banda correspondiente al gen 16s rRNA de la PCR (alrededor de los 1465 pb), mientras que para aquellas en donde no se llevó a cabo el choque térmico solo aparece la banda que nos indica el DNA genómico.



**Figura 5.6.** Visualización de los productos de PCR del gen 16S rRNA en geles de agarosa (1 %) y teñidos con bromuro de etidio. Para ambos geles, los carriles 1 y 9 contienen el marcador de peso molecular, mientras que para el gel (a) en los carriles 11 y 12 corresponden al positivo y negativo, y para el gel (b) los carriles 15 y 16 corresponden al positivo y negativo, respectivamente. (a) Se amplificaron las colonias 3, 8, 9, 10, 14 y 16 después del choque térmico (carriles 2 – 6 respectivamente), dando negativo los carriles 4 y 5. En el carril 8 y 10 se encuentran las colonias 2 y 14 que no recibieron choque térmico previo; se puede observar que dichos carriles muestran solamente el DNA genómico. Carriles 13-16 vacíos. (b) Se amplificaron el resto de las colonias (1, 2, 4, 5, 6, 7, 11, 12, 13, 15 y 17), todas con el tratamiento de choque térmico previo.

## 5.8 Secuencias analizadas

Los productos de PCR se enviaron a secuenciar en el LANBAMA de IPICYT. De los 14 productos de PCR provenientes de 14 cepas aisladas, solo seis de ellas se lograron comparar correctamente en la base de datos de la NCBI. Los datos obtenidos de la secuenciación de los aislados identificadas como 5, 6, 11, 12, 13 y 17 se analizaron en el programa Bioedit, con el cual se logró alinearlas, para posteriormente analizar en la base de datos. Los resultados obtenidos por la NCBI se muestran en la Tabla 5.3, donde se encuentran algunas bacterias con características aerobias mientras otras son reportadas como desnitrificantes.

Lo anterior señala que las bacterias que se lograron aislar, son en su mayoría facultativas y no estrictamente anaerobias, a pesar de que fueron cultivadas bajo condiciones anaerobias. Para determinar si son anaeróbicas estrictas, podría llevarse todo el proceso de cultivo y resiembra dentro de una cámara de anaerobiosis, y con ello evitar posibles interferencias con el oxígeno mientras se realizan las resiembras, ya que éstas últimas se realizaron en la campana de flujo laminar, sin asegurar completamente la anaerobiosis mientras se resembraban.

Llama la atención que las secuencias que se obtuvieron de los aislados 5 y 17 corresponden a microorganismos que tienen la característica de ser desnitrificantes, *Pseudomonas xanthomarina* y *Paenibacillus taohuashanense*, respectivamente, indicándonos que estos aislados tienen la habilidad de utilizar nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) como aceptor alternativo de electrones. Con esto, se puede explicar que algunas de las bacterias aisladas pueden utilizar distintos aceptores de electrones, y no únicamente el arsénico. Mientras que el aislado 6, *Pseudomonas knackmussii*, es un microorganismo con capacidades de degradar compuestos aromáticos halogenados al utilizarlos como fuente de carbono y energía. Por otro lado, con características similares, el aislado 11, *Rhizobium petrolarium*, se reporta que tiene capacidad para degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH's). Las características de estos microorganismos son diversas y apuntan a que podrían usarse estos aislados para otros intereses además de tratar efluentes contaminados con metales pesados y arsénico. Cabe destacar que de estos aislados, *Pseudomonas xanthomarina* y *Pseudomona fluorescens* han sido reportadas como bacterias resistentes al

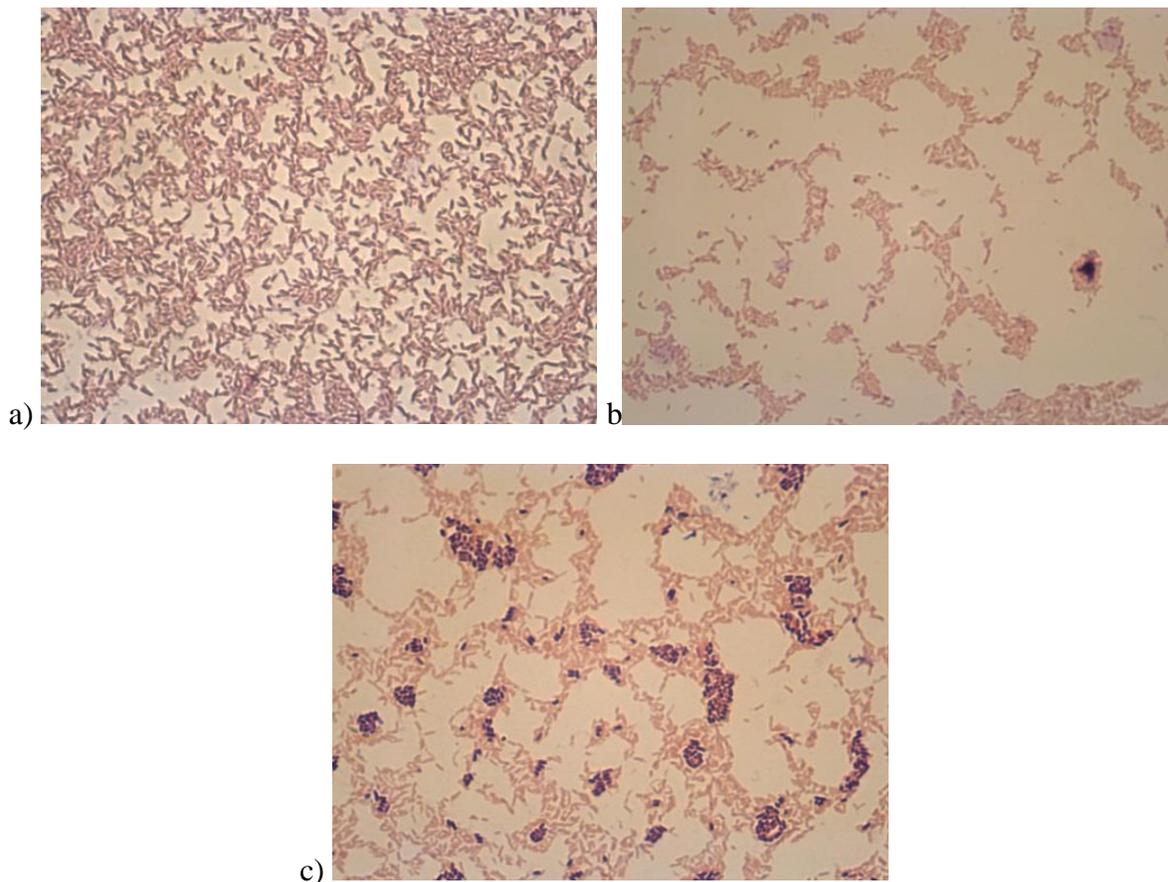
arsénico, pero no se ha reportado que alguna de ellas lo pueda respirar (Koechler et al., 2015; Prithivirajasingh et al., 2001).

## **5.9 Tinción Gram**

Se realizó la tinción Gram de los aislados que se lograron secuenciar. Se determinó presencia tanto de bacterias Gram negativas como de Gram positivas. Se muestra en la Figura 5.7 la microscopía realizada a una porción de los aislados 6, 12 y 13, respectivamente, a los cuales se les realizó un frotis y posteriormente se tiñó, dentro de las cuales se puede observar gran cantidad de biomasa, así como en el aislado 6 y 12 se distinguen claramente bacterias Gram negativo por su coloración rosada, mientras que para el aislado 13 se observan bacterias tanto Gram positivo (color morado) como Gram negativo, esto indicándonos la posibilidad de que en este aislado no se encuentren aún puro en su totalidad. Los demás aislados se muestran en el anexo, resaltando una morfología bacilar y gran cantidad de biomasa. En trabajos previos, Santini et al. (2002), lograron aislar bacterias con capacidad de respirar arsénico, mencionan una morfología bacilar y Gram positivas. Macy et al. (1996), reportan que el aislado que lograron obtener es de forma bacilar, siendo Gram negativo y estrictamente anaerobio. Mientras que en un estudio realizado por Switzer et al. (2012), lograron obtener bacterias arseniato respiradoras, bacilares y Gram negativas. Asimismo, Liu et al (2004) aislaron bacterias con morfología bacilar, Gram negativas, formadoras de endosporas y con presencia de flagelos. Estos trabajos, concuerdan con lo encontrado en el presente estudio, donde observamos que lo que se ha reportado para bacterias respiradoras de arsénico, es una morfología bacilar, y en su mayoría Gram negativas. La relevancia de esta técnica se centra en que al realizar un frotis de los aislados y la tinción de Gram se podría corroborar el grado de pureza de dicho aislado al obtener un solo Gram, sea positivo o negativo. Mientras que si observamos los dos tipos de Gram en un solo frotis, como el caso del aislado 13 (Figura 5.7 c), nos indica que el aislado aún no se encuentra totalmente puro.

**Tabla 5.3.** Datos obtenidos en la base de datos de la NCBI para las colonias arseniato-reductoras aisladas.

<b>Aislado ID</b>	<b>Nombre</b>	<b>Cobertura</b>	<b>Porcentaje de Identidad</b>	<b>Afiliación Filogenética (clase)</b>	<b>No. de acceso</b>	<b>Fuente</b>	<b>Característica</b>	<b>Referencia</b>
Col. 5	<i>Pseudomonas xanthomarina</i> cepa AJ-14, gen ribosomal 16s RNA, secuencia parcial.	100%	99%	Gammaproteobacteria	KY465430.1	Marina	Desnitrificante	Romanenko L. et al., 2005
Col. 6	<i>Pseudomonas knackmussii</i> cepa FL50, gen ribosomal 16s RNA, secuencia parcial.	100%	99%	Gammaproteobacteria	KY818967.1	Planta de aguas residuales	Degradación de compuestos aromáticos halogenados.	Stolz A. et al., 2007
Col. 11	<i>Rhizobium petrolarium</i> cepa ZJY-796, gen ribosomal 16s RNA, secuencia parcial.	100%	100%	Alphaproteobacteria	KP282805.1	Suelo	Aeróbica	Zhang X. et al., 2012
Col. 12	<i>Bacteroides</i> sp., no cultivada, gen parcial 16s RNA, clona CM3C11.	100%	98%	-	AM936288.1	Suelo	Aeróbica	Milton C. et al., 2010
Col. 13	<i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa K3, gen ribosomal 16s RNA, secuencia parcial.	100%	100%	Gammaproteobacteria	KX683301.1	-	Aeróbica	-
Col. 17	<i>Paenibacillus taohuashanense</i> cepa NJY-8, gen ribosomal 16s RNA, secuencia parcial.	100%	98%	Bacilli	MF101124.1	Suelo	Fijadora de N <sub>2</sub>	Xie J. et al., 2012



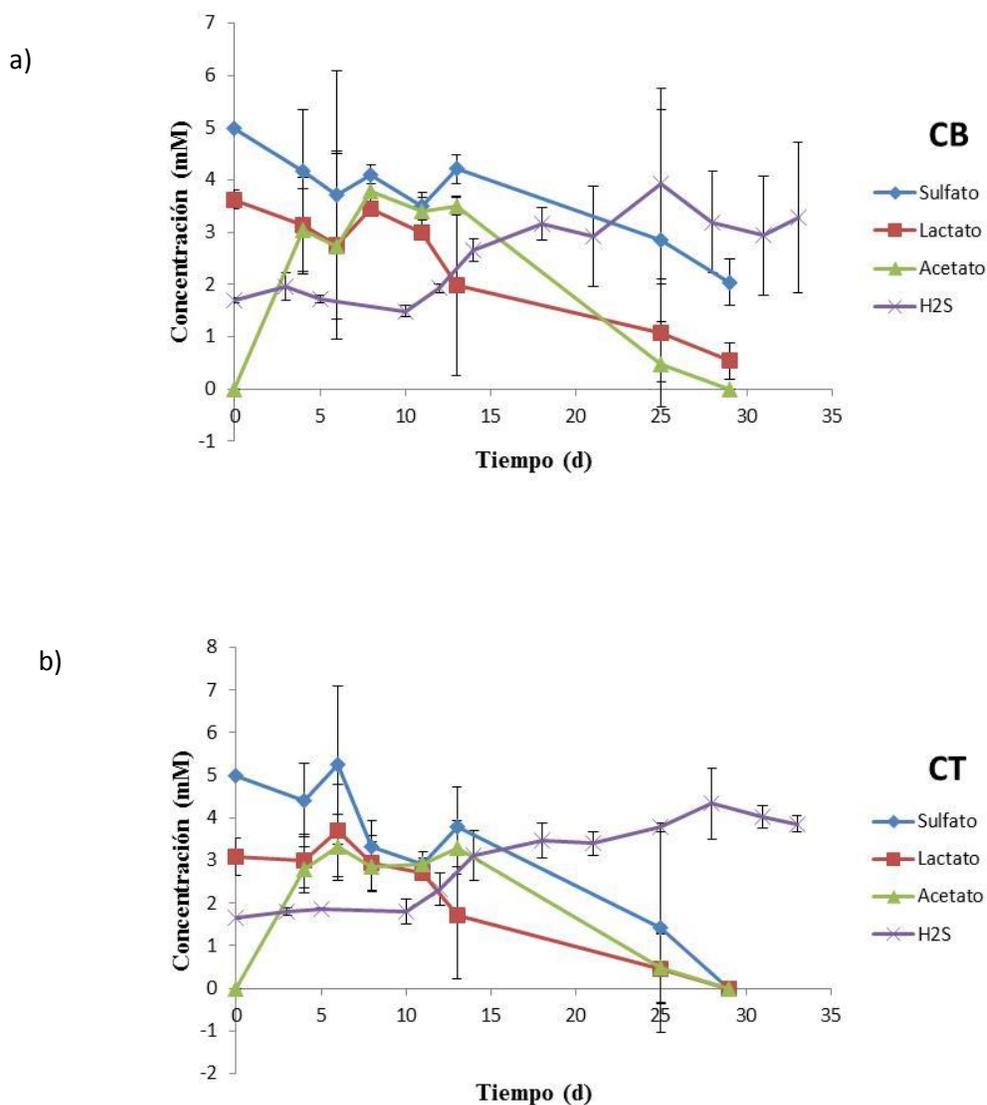
**Figura 5.7.** Micrografías (100x) de los frotis de los aislados: a) aislado 6; b) aislado 12; c) aislado 13. Se puede observar el grado de pureza de los aislados 6 y 12 con presencia de células gram negativas y una sola morfología colonial (bacilos). Mientras que en el aislado 13 aún se pueden distinguir bacterias gram positivas (morado) y negativas (rojo claro).

### 5.10 Ensayos con diferentes aceptores de electrones

Se llevó a cabo el ensayo con diferentes aceptores de electrones, en el cual se utilizó sulfato y nitrato como alternativas, así como lactato como su respectivo donador. Este ensayo se llevó en las mismas condiciones que el cultivo con arseniato. Para ambos casos ( $\text{SO}_4^{2-}$  y  $\text{NO}_3^-$ ) se usaron concentraciones de 5 mM, así como también para el lactato. Para este experimento se inoculó a partir de una muestra compuesta de la segunda transferencia de los sitios CB y CT.

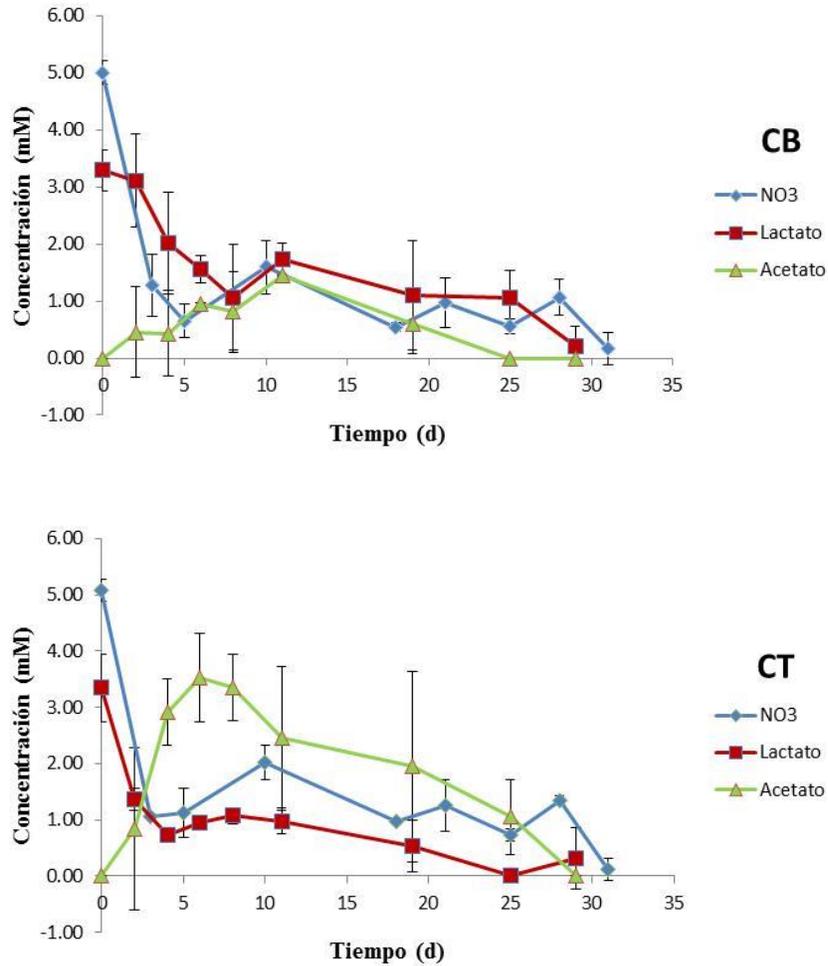
Se observó que para el caso de  $\text{SO}_4^{2-}$ , hubo un consumo paulatino de este aceptor presentando un comportamiento fluctuante, así como de su donador de una manera similar,

en los primeros quince días, mientras que a partir de este tiempo, empezó a tener una caída en su concentración. Como se puede observar en la Figura 5.8, existe una disminución paulatina para el aceptor de electrones, mientras que hubo un incremento en la formación de su producto, H<sub>2</sub>S. Además, se observa que el consumo de donador de electrones, lactato, se llevó a cabo de manera incompleta ya que se formó acetato; este último se consumió hacia el final del experimento.



**Figura 5.8.** Perfiles de consumo de aceptor de electrones y de fuentes de carbono de los consorcios recuperados de los sitios a) CB y b) CT, utilizándose sulfato como aceptor de electrones. Se observa el consumo de sulfato y lactato, y producción de acetato y H<sub>2</sub>S (Rombo azul: SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, Cuadrado rojo: Lactato, Triángulo verde: Acetato, Tacha morada: Sulfuro).

Por lo que respecta al  $\text{NO}_3^-$ , en la Figura 5.9 se puede observar que para el día 4 existe un consumo casi total de este aceptor, aproximadamente 4 mM de 5 mM iniciales; y en lo que respecta al donador, el consumo fue llevado a cabo más lentamente. Esto puede deberse a que la mayoría de los aislados encontrados en los inóculos son desnitrificantes, teniendo preferencia por este aceptor de electrones. Así mismo, para este caso hubo oxidación incompleta de lactato, dando como producto acetato, llevándose a cabo las reacciones mostradas en la Tabla 2.4. De acuerdo con la torre de reacciones redox de Borch et al. (2010) (Fig. 2.1), y las reacciones mostradas en la Tabla 2.4, el nitrato les otorgará más energía para llevar a cabo su metabolismo si se encuentra acoplado a la oxidación de acetato como donador de electrones. En contraste, si el donador de electrones es lactato y éste se oxida incompletamente a acetato, como fue en nuestro caso en los primeros días de incubación (15-20 días), la energía que podrían obtener será menor. Aun así, se explica el comportamiento observado en la Figura 5.9, donde hay un consumo bastante rápido de este aceptor en los primeros cuatro días, debido a que esta reacción les otorga  $-514.46 \text{ kJ/mol}$  de energía, comparado con lo consumido cuando se utilizó sulfato como aceptor de electrones (Figura 5.8); ya que, como se muestra en la Tabla 2.4, la energía que les puede otorgar este aceptor será mucho menor,  $-80.2 \text{ kJ/mol}$  de energía, para que los microorganismos puedan llevar a cabo su metabolismo. Con lo cual, los microorganismos presentes en el medio tendrán mayor energía al estar en contacto con el nitrato y lactato como aceptor y donador de electrones, respectivamente, que con sulfato. En lo que respecta a la versatilidad de utilizar diferentes aceptores de electrones, Kruger et al (2013), explica que los microorganismos que pueden metabolizar arseniato, son capaces de utilizar otros aceptores de electrones, entre ellos sulfato y nitrato; esto debido a que la arseniato-reducción no es un proceso obligado por lo que en un medio donde encuentren diferentes aceptores de electrones, tomarán el que termodinámicamente sea más favorable y les proporcione mayor energía. De acuerdo con los resultados obtenidos en este experimento, los microorganismos evaluados en este estudio no son respiradores de arseniato obligados, demostrando que tienen la capacidad de respirar tanto sulfato como nitrato y utilizarlos como aceptores alternos de electrones.



**Figura 5.9.** Perfiles de consumo del aceptor de electrones y de fuentes de carbono de los consorcios recuperados de los sitios a) CB y b) CT, con nitrato (rombo) como aceptor final de electrones. Se observa el consumo de lactato (cuadrado) y producción de acetato (triángulo).

Cabe destacar, que el uso de estos compuestos dependerá de las condiciones en las que se encuentren en el medio, siendo un factor muy importante la concentración y biodisponibilidad de estos recursos como aceptores de electrones para el microorganismo. En este sentido, sería importante realizar una exploración termodinámica que permita determinar el intervalo de concentraciones a las que deben estar presentes dichos aceptores para poder llevar a cabo estos procesos de reducción, ya que los valores de energía libre de Gibbs ( $\Delta G'^{\circ}$ ) reportados para estas reacciones se encuentran calculadas en condiciones estándar (actividad de 1M). Se sabe que en condiciones reales el valor de la energía libre de

Gibbs podría variar, aunque los valores estándar sirven de guía para determinar con cuál aceptor de electrones se podría obtener más energía que en principio puede ser aprovechada por los microorganismos.

### **5.11 Concentraciones mínimas inhibitorias de metales (CMIM).**

Se realizó el ensayo de las concentraciones mínimas inhibitorias para determinar la tolerancia de las bacterias aisladas hacia los metales  $Pb^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  y  $Cd^{2+}$ , ya que se ha observado que los microorganismos que pueden resistir arsénico, también son capaces de tolerar estos metales (Sarkar et al., 2013). La técnica descrita en la metodología, conocida como microdilución por gota, consistió en realizar diluciones de los aislados y sembrarlas, con ayuda de un replicador, en cajas petri conteniendo medio sólido con su respectivo metal a la concentración determinada. El crecimiento de “puntos” en dicha placa indicó el desarrollo bacteriano, y por consiguiente, la tolerancia del aislado para ese metal a la concentración dada. Se evaluaron concentraciones intermedias reportadas en la literatura, de 5, 3, y 2 mM para  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  y  $Pb^{2+}$ , respectivamente, descritas en la sección 4.3.5 (Nies, 1999; Pepi et al., 2007; Salmassi et al., 2002; Sarkar et al., 2013), y dependiendo de su reacción se modificó la concentración del metal.

En una primera aproximación se usó sulfato como aceptor alterno de electrones, omitiendo la adición de As(V) para evitar interferencias con los metales del medio de cultivo. En este ensayo, hubo crecimiento en las cajas control, sin adición de metales, tanto en condiciones anaeróbicas como aeróbicas, es decir las células eran viables. Sin embargo, no se observó crecimiento en las cajas que contenían los metales,  $Zn^{2+}$  y  $Cd^{2+}$ , a concentraciones de 5 y 3 mM, respectivamente, después de 4 días de incubación. Este ensayo se volvió a repetir pero reduciendo las concentraciones a 3 y 1 mM para  $Zn^{2+}$  y  $Cd^{2+}$ , respectivamente, con sulfato como aceptor de electrones, observando el mismo comportamiento, ningún crecimiento en las cajas con metales. Posteriormente se decidió evaluar la toxicidad del arsénico, As(V), sobre los aislados, como se muestra en la Tabla 5.4. Se prepararon cajas con 5, 10 y 50 mM de As(V), con lactato como donador y sulfato como aceptor de electrones, a una concentración de 10 mM cada uno.

**Tabla 5.4.** Resultados de los ensayos de microdilución por gota con distintas concentraciones de arsénico (5, 10 ó 50 mM) en placas con sulfato (10 mM) y lactato (10 mM). Se omite Cd y Zn debido a que no hubo ningún crecimiento en condiciones aerobias.

	Dilución (Aerobio)						
	Aislado	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
<b>Control sin As(V) adicionado</b>	5	+	+	+	+	+	-
	6	+	+	+	+	+	+
	11	+	+	+	+	+	+
	12	+	+	+	+	+	+
	13	+	+	+	+	+	-
	17	+	+	+	+	+	-
<b>As(V) [5mM]</b>	5	+	+	+	+	+	+
	6	+	+	+	+	+	+
	11	+	+	+	+	+	+
	12	+	+	+	+	+	+
	13	+	+	+	+	+	+
	17	+	+	+	+	+	+
<b>As(V) [10mM]</b>	5	+	+	+	+	+	+
	6	+	+	+	+	+	+
	11	+	+	+	+	+	+
	12	+	+	+	+	+	-
	13	+	+	+	+	+	-
	17	+	+	+	+	+	-
<b>As(V) [50mM]</b>	5	+	+	+	+	+	+
	6	+	+	+	+	+	+
	11	+	+	+	+	+	-
	12	+	+	+	+	+	+
	13	+	+	+	+	+	+
	17	+	+	+	+	+	+

Las cajas con lactato, sulfato y As(V), mostraron crecimiento de las distintas diluciones a las tres concentraciones de arsénico evaluadas, tanto para las placas incubadas en condiciones anaerobias como aerobias. Sin embargo, fue más lento su desarrollo en condiciones anaerobias, incubadas a lo largo de una semana, que en condiciones aerobias, incubadas durante 4 días (Anexo 3.1). Estos resultados señalan que los aislados tienen una alta tolerancia hacia el As, o la preferencia de este metaloide como aceptor de electrones sobre el sulfato.

Con esta observación se preparó un segundo ensayo donde se volvieron a evaluar los metales, pero ahora con As(V) como aceptor de electrones, es decir las placas contenían lactato y As(V) a una concentración de 10 mM (ambos). En esta ocasión, se evaluaron Pb<sup>2+</sup>,

$\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ , a 2, 3 y 1 mM respectivamente, con su duplicado en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Como se observa en la Tabla 5.5, en el caso de las condiciones aeróbicas, hubo crecimiento de las distintas diluciones en las cajas con  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$  a los cuatro días de incubación, mientras que en el caso de  $\text{Zn}^{2+}$ , el crecimiento no fue evidente, aún después de una semana de incubación, con lo que se descartó crecimiento bacteriano para este metal, en esta condición. Con lo que respecta a las condiciones anaeróbicas, solo se observó crecimiento en la placa control, que contenía As(V) como aceptor de electrones, al cabo de 4 días. En esta condición, para  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$ , su crecimiento fue apenas evidente, aun después de una semana de incubación, por lo que se descarta la tolerancia a estos metales en anaerobiosis (Anexo 3.2). Sin embargo estas cajas se dejaron incubando y se revisaron a la tercera semana obteniendo los resultados que se presentan en la Tabla 5.6, observando así, en condiciones anaeróbicas, crecimiento de las diluciones en todas las placas (Anexo 3.3). Lo anterior indicó que los aislados fueron capaces de tolerar las concentraciones de metales a las que fueron evaluadas, en condiciones de anaerobiosis, pero con un metabolismo más lento. Estos valores de las concentraciones a las que los aislados fueron capaces de resistir, se encuentran en valores intermedios reportados por otros autores. Por ejemplo, Pepi et al. (2007), mencionan que evaluaron  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ , obteniendo resistencia a concentraciones de hasta 1.8 mM para  $\text{Cd}^{2+}$  y de entre 3.8 mM y 7.7 mM de  $\text{Zn}^{2+}$  para los aislados evaluados en dicho estudio, valores que son similares a los obtenidos en el presente trabajo. Por otro lado, en el estudio realizado por Sarkar et al. (2012), donde evalúan la resistencia de distintos microorganismos, reportaron un máximo de resistencia para  $\text{Cd}^{2+}$  de hasta 5 mM, y de 10 mM para  $\text{Zn}^{2+}$ . Los valores reportados en estos estudios, están por encima de lo encontrado en este experimento, que son de 1 mM para  $\text{Cd}^{2+}$  y de 3 mM para  $\text{Zn}^{2+}$ .

Como ya se mencionó anteriormente, se observó que hubo mayor respuesta a la tolerancia hacia los metales evaluados cuando se encontraban en presencia de arsénico. Esto podría deberse a que dichos aislados se encuentran ya adaptados para desarrollarse en la presencia de arsénico, lo que podría activar los genes de resistencia hacia los metales, promoviendo la capacidad de resistir a los metales evaluados. Lo anterior explicaría porque no se observó la misma respuesta con sulfato.

**Tabla 5.5.** Resultados de los ensayos de microdilución por gota en placas con 10 mM lactato y 10 mM As(V), y con 2 mM Pb<sup>2+</sup> ó 1 mM Cd<sup>2+</sup> ó 3 mM Zn<sup>2+</sup> después de cuatro días de incubación en condiciones aeróbicas o anaeróbicas.

	Aislado	Dilución (Aerobio)						Dilución (Anaerobio)					
		10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
<b>Control sin metal adicionado</b>	5	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
	6	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
	11	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
	12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<b>Pb [2mM]</b>	5	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
	6	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	11	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
	12	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
	13	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	17	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
<b>Cd [1mM]</b>	5	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	6	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	11	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	12	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	13	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	17	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>Zn [3mM]</b>	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tabla 5.6.** Resultados de los ensayos de microdilución por gota en placas con 10 mM lactato y 10 mM As(V), y con 2 mM Pb<sup>2+</sup> ó 1 mM Cd<sup>2+</sup> ó 3 mM Zn<sup>2+</sup> después de tres semanas de incubación en condiciones aeróbicas o anaeróbicas.

	Aislado	Dilución (Aerobio)						Dilución (Anaerobio)					
		10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
<b>Control sin metal adicionado</b>	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
	11	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	13	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
	17	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
<b>Pb [2mM]</b>	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	6	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	12	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
	13	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
	17	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
<b>Cd [1mM]</b>	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	6	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
	11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	17	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
<b>Zn [3mM]</b>	5	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
	6	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
	11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	12	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
	13	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
	17	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-

En el caso del  $Pb^{2+}$ , se añadió a una concentración de 2 mM, lo que indica que se encontraba a 414 mg/L, y en la cual se observó mayor crecimiento de las diluciones colocadas en la placa comparando con las placas de los otros metales. En comparación con un estudio realizado por Jarolawiecka & Piotrowskat (2014), donde reporta que microorganismos del género *Pseudomonas aeruginosa* logran acumular 64.5 mg Pb/g de biomasa, siendo esta una concentración muy pequeña comparada con la colocada en el medio de este experimento, y donde a pesar de esto, se mostró crecimiento celular. Esto podría deberse a la biodisponibilidad del metal en el medio, ya que la actividad de un ion metálico libre puede verse afectada al formar complejos, causando una reducción en la biodisponibilidad del mismo en el medio (Hassen et al., 1998; Jarosławiecka & Piotrowskat, 2014). De acuerdo con el diagrama de Pourbaix para el Pb, indica que en condiciones de pH ácidas (0-6.5) y mayormente oxidantes, el plomo se encontrará como ion disuelto ( $Pb^{2+}$ ). Para el caso de  $Cd^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ , en sus respectivos diagramas de Pourbaix, en ambos casos a un pH de 6, se encontrarán de manera soluble; por esta razón, los medios sólidos preparados se trabajaron a dicho pH, permitiendo con ello la biodisponibilidad de los metales. Cabe destacar que, como mencionan Bélanger et al. (2011), en un medio sólido la biodisponibilidad de un metal será mucho menor en contraste con un medio líquido, debido principalmente a que en un medio sólido los metales pueden unirse a elementos traza presentes en el medio y reducir con ello la biodisponibilidad del metal, resultando en una sobrestimación de los resultados. Estos autores también mencionan que el crecimiento bacteriano durante las pruebas de tolerancia hacia los metales es inherentemente importante, debido principalmente a que muchos compuestos tóxicos atacan mecanismos específicos de la bacteria durante su multiplicación celular (respiración). Sin embargo, la técnica de microdilución por gota para evaluar concentraciones mínimas inhibitorias de metales es útil para llevar a cabo un análisis preeliminar sobre las cepas con potencial resistencia hacia metales, de manera fácil y rápida, y además, la utilización de este método se puede ampliar para estudiar otros casos de microorganismos de importancia ambiental y clínica.

Estos resultados demuestran que las bacterias aisladas son facultativas, teniendo mejor desempeño en condiciones aeróbicas y que, en estas condiciones, tienen preferencia hacia el oxígeno como aceptor de electrones, y que el arsénico podría estar beneficiando su

tolerancia hacia los metales debido a que muestran mayor crecimiento cuando se les adiciona este metaloide y respiran oxígeno. Mientras que en condiciones anaeróbicas, llevan a cabo un metabolismo más lento respirando  $As(V)$  y resistiendo estos metales de una manera más paulatina.

## 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

---

### 6.1 Conclusiones

Se logró identificar la capacidad metabólica del microcosmos recuperado de los sitios de muestreo Club de Tiro y Cerrito Blanco, de la comunidad de Matehuala, SLP, mediante el cultivo y aislamiento de algunos microorganismos que componen a los consorcios. Se identificó que las bacterias aisladas tienen la habilidad de respirar arsénico con lactato como sustrato. Además, mostraron una alta versatilidad metabólica ya que los consorcios fueron capaces de usar sulfato o nitrato como aceptores de electrones.

La identificación filogenética de los microorganismos aislados mostró que se trata de bacterias en su mayoría con capacidades aeróbicas. Con lo que, de acuerdo con los experimentos realizados en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, los microorganismos que se lograron aislar son facultativos. Indicándonos que para poder determinar un metabolismo completamente anaeróbico será necesario realizar las resiembras en una cámara de anaerobiosis. Estas bacterias mostraron a su vez, una alta tolerancia a los metales evaluados, principalmente hacia  $Pb^{2+}$  y  $Cd^{2+}$ , y en menor magnitud, a  $Zn^{2+}$ . La tolerancia hacia estos metales se favoreció en el experimento aeróbico en presencia de  $As(V)$ , por lo que el arsénico podría estar favoreciendo la tolerancia hacia los metales, ya que en los experimentos donde se utilizó el sulfato como aceptor de electrones, no hubo crecimiento de los aislados cuando se adicionaron metales. Esto conlleva al surgimiento de una nueva hipótesis, donde se cuestiona si el arsénico influye o no en la activación de los genes para la resistencia hacia metales de estos microorganismos. En lo que respecta a las condiciones anaeróbicas, se observó tolerancia a los metales  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ , pero en un tiempo mayor de incubación. Indicándonos así, que las bacterias evaluadas, logran respirar arseniato y tolerar a estos metales evaluados, pero con un metabolismo mucho más lento.

Las características del medio influirán en la especiación de los metales y por consiguiente en la movilidad de estos, provocando así que se encuentren o no bioaccesibles para los microorganismos, y con ello resultar de mayor o menor consecuencia para estos últimos. Por lo tanto, la tolerancia de los aislados dependerá del medio en el que se encuentren, siendo esto de vital importancia al momento de querer desarrollar alguna

biotecnología que permita utilizar estos microorganismos para tratar efluentes contaminados por arsénico u otros metales.

## **6.2 Perspectivas**

El interés de este trabajo fue estudiar las comunidades presentes en sitios contaminados con arsénico y otros metales mediante estrategias de cultivo y asilamiento, para determinar su tolerancia a estos compuestos y obtener información para implementar una biotecnología que permita su inmovilización. Como perspectiva de este trabajo se plantea el diseño e implementación de un reactor inoculado con los aislados descritos en este proyecto donde se logre realizar el proceso de arseniato-reducción, acoplado al proceso de sulfato-reducción. De esta forma se visualiza que se podría llevar a cabo la formación de minerales arsénico-sulfurosos, permitiendo así la precipitación e inmovilización de arsénico y otros metales del sistema. Es importante resaltar que se deben explorar parámetros cinéticos y termodinámicos para determinar las concentraciones y velocidades necesarias que nos permitan la formación de dichos precipitados con estos procesos.

Además, se sugiere realizar un trabajo de biología molecular más detallado para poder identificar de manera precisa los genes involucrados en la resistencia a metales. Esto podría aclarar el mecanismo exacto que siguen estos aislados y poder identificar si pueden hacer frente a otros metales que no fueron evaluados en este proyecto. A su vez, de acuerdo a los resultados obtenidos, se necesita una exploración más profunda para determinar cómo el arsénico influye en condiciones aerobias para la activación de los genes para la resistencia a metales.

## 7. Bibliografia

---

- Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Amann, R. I., & Ludwig, W. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation . Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiological Reviews*, 59(1), 143–169.
- Barton, L., Mandl, M., & Loy, A. (2010). *Geomicrobiology: Molecular and Environmental Perspective*. Springer.
- Bélanger, P.-A., Beaudin, J., & Roy, S. (2011). High-throughput screening of microbial adaptation to environmental stress. *Journal of Microbiological Methods*, 85(2), 92–97.
- Bertrand, J., Caumette, P., Lebaron, P., Matheron, R., Normand, P., & Sime-Ngando, T. (2011). *Environmental Microbiology : Fundamentals and Applications*. Springer.
- Borch, T., Kretzschmar, R., Skappler, A., Van Cappellen, P., Ginder-Vogel, M., Voegelin, A., & Campbell, K. (2010). Biogeochemical redox processes and their impact on contaminant dynamics. *Environmental Science and Technology*, 44(1), 15–23.
- Bourg A. (1995). *Speciation of Heavy Metals in Soils and Groundwater*. (R. Allan, S. Wim, & A. U. Forstner, Eds.). Springer.
- Burton, E. D., Johnston, S. G., & 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.
- Chang, J. S., Ren, X., & Kim, K. W. (2008). Biogeochemical cyclic activity of bacterial arsB in arsenic-contaminated mines. *Journal of Environmental Sciences*, 20(11), 1348–1355.
- Chang, Y. C., & Nawata, A. (2012). Isolation and characterization of an arsenate-reducing bacterium and its application for arsenic extraction from contaminated soil. *Microbial Biotechnology*, 37–44.
- Cord-Ruwisch, R. (1985). A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 4(1), 33–36.
- Costa, P. S., Scholte, L. L. S., Reis, M. P., Chaves, A. V., Oliveira, P. L., Itabayana, L. B., Nascimento, A. M. A. (2014). Bacteria and genes involved in arsenic speciation in sediment impacted by long-term gold mining. *PLoS ONE*, 9(4), e95655.
- Drewniak, L., Maryan, N., Lewandowski, W., Kaczanowski, S., & Sklodowska, A. (2012). The contribution of microbial mats to the arsenic geochemistry of an ancient gold mine. *Environmental Pollution*, 162, 190–201.

- Drewniak, L., Styczek, A., Majder-Lopatka, M., & Sklodowska, A. (2008). Bacteria, hypertolerant to arsenic in the rocks of an ancient gold mine, and their potential role in dissemination of arsenic pollution. *Environmental Pollution*, *156*(3), 1069–1074.
- Ellis, P. J., Conrads, T., Hille, R., & 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.
- Flora, S. J. S. (2011). Free Radical Biology & Medicine Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radical Biology and Medicine*, *51*(2), 257–281.
- Gallegos García, M., Razo Flores, E., & Celis García, M. de L. B. (2009). *Biopelículas Para La Precipitación De Metales*. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.
- Gorny, J., Billon, G., Lesven, L., Dumoulin, D., Madé, B., & Noiriél, C. (2015). Arsenic behavior in river sediments under redox gradient: A review. *Science of the Total Environment*, *505*, 423–434.
- Gresser, M. J. (1981). ADP-arsenate. Formation by submitochondrial particles under phosphorylating conditions. *Journal of Biological Chemistry*, *256*(12), 5981–5983.
- Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M., & Boudabous, A. (1998). Resistance of Environmental Bacteria to Heavy Metals. *Bioresource Technology*, *64*, 7–15.
- Hoefl, S. E., Kulp, T. R., Stolz, J. F., Hollibaugh JT, & Oremland, R. S. (2004). Dissimilatory arsenate reduction with sulfide as the electron donor: Experiments with Mono Lake water and isolation of strain MLMS-1, a chemoautotrophic arsenate-respirer. *Appl Environ Microbiol*, *70*(5), 2741–2747.
- Hughes, M. F. (2002). Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology Letters*, *133*(1), 1–16.
- Jarosławiecka, A., & Piotrowska-Seget, Z. (2014). Lead resistance in micro-organisms. *Microbiology*, *160*(PART 1), 12–25.
- Koehler, S., Arsène-Ploetze, F., Brochier-Armanet, C., Goulhen-Chollet, F., Heinrich-Salmeron, A., Jost, B., ... Lett, M. C. (2015). Constitutive arsenite oxidase expression detected in arsenic-hypertolerant *Pseudomonas xanthomarina* S11. *Research in Microbiology*, *166*(3), 205–214.
- Kruger, M. C., Bertin, P. N., Heipieper, H. J., & Arsène-ploetze, F. (2013). Bacterial metabolism of environmental arsenic — mechanisms and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*, 3827–3841.
- Kuai, L., Nair, A. a, & Polz, M. F. (2001). Rapid and Simple Method for the Most-Probable-Number Estimation of Arsenic-Reducing Bacteria Rapid and Simple Method for the Most-Probable-Number Estimation of Arsenic-Reducing Bacteria. *Society*, *67*(7), 3168–3173.

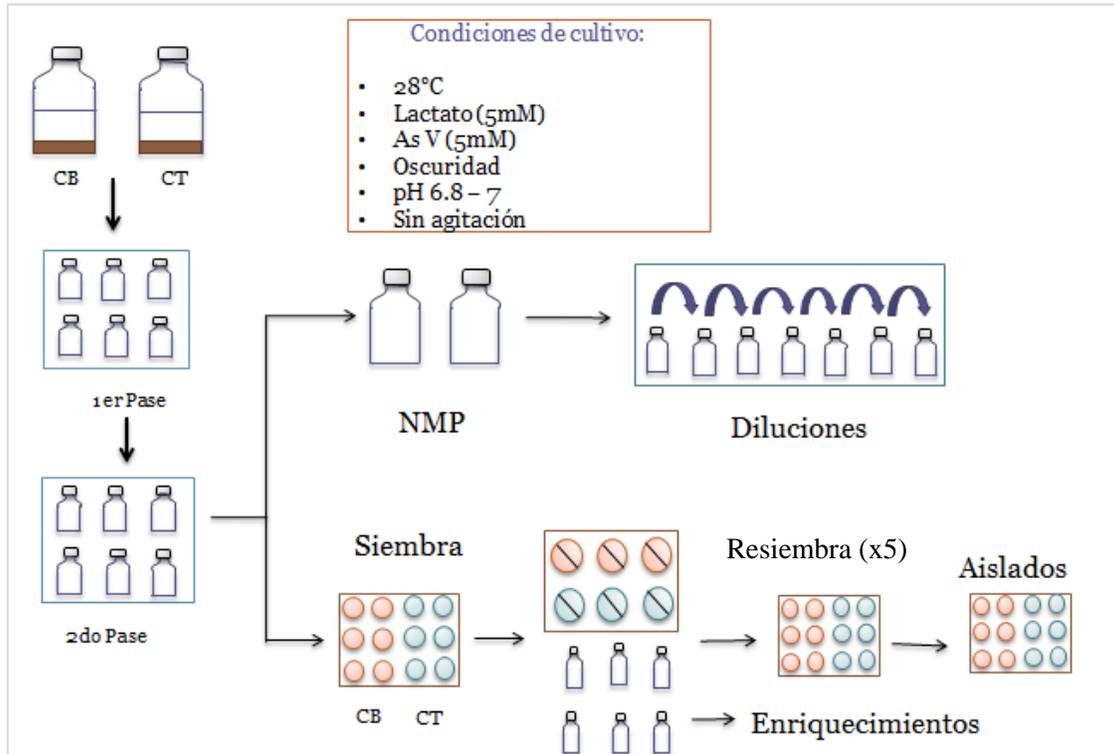
- Leonard, S., Harris, G., & Shi., X. (2004). Serial Review : Redox-Active Metal Ions , Reactive Oxygen Species , and Apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(12), 1921–1942.
- Lièvreumont, D., Bertin, P. N., & Lett, M. C. (2009). Arsenic in contaminated waters: Biogeochemical cycle, microbial metabolism and biotreatment processes. *Biochimie*, 91(10), 1229–1237.
- Liu, A., Garcia-Dominguez, E., Rhine, E. D., & Young, L. Y. (2004). A novel arsenate respiring isolate that can utilize aromatic substrates. *FEMS Microbiology Ecology*, 48(3), 323–332.
- Lovley, D. R. (1993). Dissimilatory metal reduction. *Annual Review of Microbiology*, 47, 263–290.
- Lovley, D. R., & Klug, M. J. (1983). Sulfate reducers can outcompete methanogens at freshwater sulfate concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(1), 187–192.
- Macy, J. M., Nunan, K., Iwigen, K. D., Dixon, D. R., Harbour, P. J., Cahill, M., & Sly, L. I. (1996). *Chrysiogenes arsenatis* gen. nov., sp. nov., a New Arsenate-Respiring Bacterium Isolated from Gold Mine Wastewater. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(4), 1153–1157.
- Macy, J. M., Santini, J. M., Pauling, B. V, Neill, A. H. O., & Sly, L. I. (2000). Two new arsenate / sulfate-reducing bacteria : mechanisms of arsenate reduction. *Arch Microbiology*, 173, 49–57.
- Matera, V., Le Hécho, I., Laboudigue, A., Thomas, P., Tellier, S., & Astruc, M. (2003). A methodological approach for the identification of arsenic bearing phases in polluted soils. *Environmental Pollution*, 126(1), 51–64.
- Militon, C., Boucher, D., Vachelard, C., Perchet, G., Barra, V., Troquet, J., Peyret, P. (2010). Bacterial community changes during bioremediation of aliphatic hydrocarbon-contaminated soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 74(3), 669–681.
- Mukhopadhyay, R., Rosen, B. P., Phung, L. T., & Silver, S. (2002). Microbial arsenic: From geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(3), 311–325.
- Nazari, A. M., Radzinski, R., & Ghahreman, A. (2016). Review of arsenic metallurgy: Treatment of arsenical minerals and the immobilization of arsenic. *Hydrometallurgy*.
- Newman, D. K., Kennedy, E. K., Coates, J. D., Ahmann, D., Ellis, D. J., Lovley, D. R., & Morel, F. M. M. (1997). Dissimilatory arsenate and sulfate reduction in *Desulfotomaculum auripigmentum* sp . nov . *Arch Microbiology*, 168, 380–388.
- Nies, D. H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(6), 730–750.

- Niggemyer, A., Spring, S., & Stackebrandt, E. (2001). Isolation and Characterization of a Novel As ( V ) -Reducing Bacterium : Implications for Arsenic Mobilization and the Genus Desulfitobacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12), 5568–5580.
- Oremland, R. S., & Stolz, J. F. (2003). The Ecology of Arsenic. *Science*, 300(12), 939–944.
- Oremland, & Stolz. (2005). Arsenic, microbes and contaminated aquifers. *Trends in Microbiology*, 13(2), 45–49.
- Pepi, M., Volterrani, M., Renzi, M., Marvasi, M., Gasperini, S., Franchi, E., & Focardi, S. E. (2007). Arsenic-resistant bacteria isolated from contaminated sediments of the Orbetello Lagoon, Italy, and their characterization. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2299–2308.
- Prithivirajsingh, S., Mishra, S. K., & Mahadevan, A. (2001). Functional analysis of a chromosomal arsenic resistance operon in *Pseudomonas fluorescens* strain MSP3. *Molecular Biology Reports*, 28(2), 63–72.
- Rios-Valenciana, E. E., Briones-Gallardo, R., Cházaro-Ruiz, L. F., Martínez-Villegas, N., & Celis, L. B. (2017). Role of indigenous microbiota from heavily contaminated sediments in the bioprecipitation of arsenic. *Journal of Hazardous Materials*, 339, 114–121.
- Romanenko, L. a, Uchino, M., Falsen, E., Lysenko, A. M., Zhukova, N. V, & Mikhailov, V. V. (2005). *Pseudomonas xanthomarina* sp. nov., a novel bacterium isolated from marine ascidian. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 51, 65–71.
- Rosen, B. P. (2002). Biochemistry of arsenic detoxi cation. *FEBS Letters*, 529, 86–92.
- Salmassi, T. M., Venkateswaren, K., Satomi, M., Newman, D. K., & Hering, J. G. (2002). Oxidation of Arsenite by *Agrobacterium albertimagni* , AOL15, sp. nov., Isolated from Hot Creek, California. *Geomicrobiology Journal*, 19(October 2011), 53–66.
- Saltikov, C. W., Cifuentes, A., Venkateswaran, K., & Newman, D. K. (2003). The ars detoxification system is advantageous but not required for As(V) respiration by the genetically tractable *Shewanella* species strain ANA-3. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(5), 2800–2809.
- Santini, J. M., Stolz, J. F., Macy, J. M., Joanne, M., John, F., Isolation, J. M., & Macy, J. M. (2002). Isolation of a New Arsenate-Respiring Bacterium--Physiological and Phylogenetic Studies. *Geomicrobiology Journal*, 19(1), 41–52.
- Sarkar, A., Kazy, S. K., & Sar, P. (2013). Characterization of arsenic resistant bacteria from arsenic rich groundwater of West Bengal, India. *Ecotoxicology*, 22(2), 363–376.
- Satyanarayana, B., N., Narain B., & Prakash A. (2012). *Microorganisms in Environmental Management: Microbes and Environment*. Springer.

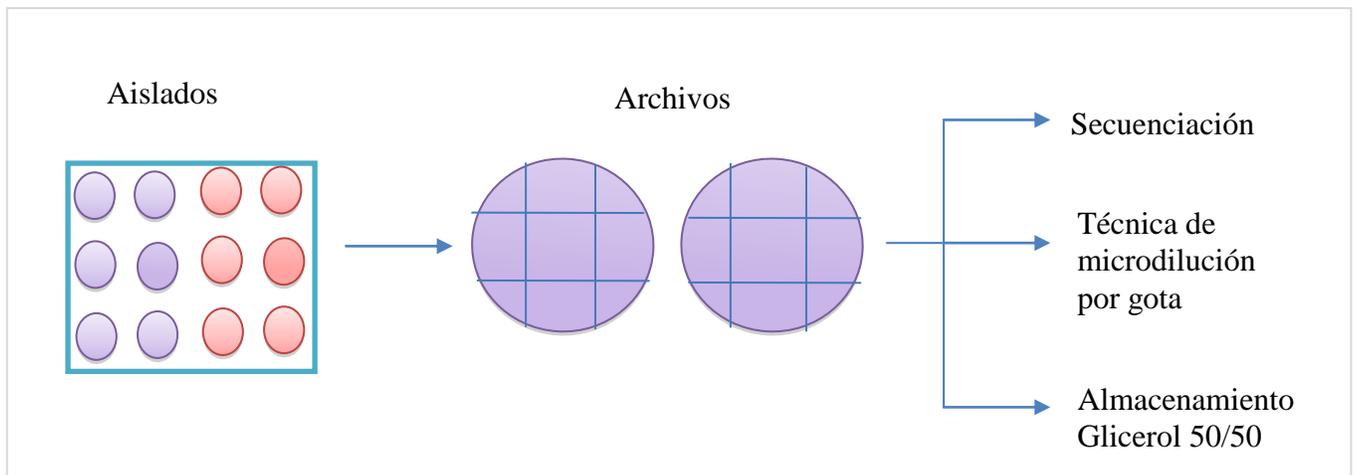
- Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2006). Toward a census of bacteria in soil. *PLoS Computational Biology*, 2(7), 0786–0793.
- Sharma, A. K., Tjell, J. C., Sloth, J. J., & Holm, P. E. (2014). Review of arsenic contamination, exposure through water and food and low cost mitigation options for rural areas. *Applied Geochemistry*, 41, 11–33.
- Silver, S., & Phung, L. T. (2005). Genes and Enzymes Involved in Bacterial Oxidation and Reduction of Inorganic MINIREVIEW Genes and Enzymes Involved in Bacterial Oxidation and Reduction of Inorganic Arsenic. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), 599–608.
- Stolz, A., Busse, H. J., & Kämpfer, P. (2007). *Pseudomonas knackmussii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(3), 572–576.
- Stolz, J. F., Basu, P., & Oremland, R. S. (2002). Microbial transformation of elements: The case of arsenic and selenium. *International Microbiology*, 5(4), 201–207.
- Stolz, J. F., Basu, P., Santini, J. M., & Oremland, R. S. (2006). Arsenic and Selenium in. *Annual Review of Microbiology*, 60, 107–130.
- Switzer, J., Thomas, B., Stolz, J. F., Miller, L. G., & Oremland, R. S. (2012). *Desulfohalophilus alkaliarsenatis* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic sulfate- and arsenate-respiring bacterium from Searles. *Extremophiles*, 16, 727–742.
- Teclu, D., Tivchev, G., Laing, M., & Wallis, M. (2008). Bioremoval of arsenic species from contaminated waters by sulphate-reducing bacteria. *Water Research*, 42(19), 4885–4893.
- Valko, M., Morris, H., & Cronin, M. T. D. (2005). Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12, 1161–1208.
- Xie, J. B., Zhang, L. H., Zhou, Y. G., Liu, H. C., & Chen, S. F. (2012). *Paenibacillus taohuashanense* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from rhizosphere soil of the root of *Caragana kansuensis* Pojark. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 102(4), 735–741.
- Yoon, S., Sanford, R. A., & Löffler, F. E. (2013). *Shewanella* spp. Use acetate as an electron donor for denitrification but not ferric iron or fumarate reduction. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(8), 2818–2822.
- Zhang, X., Li, B., Wang, H., Sui, X., Ma, X., Hong, Q., & Jiang, R. (2012). *Rhizobium petrolearium* sp. nov., isolated from oilcontaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(8), 1871–1876.

## Anexo 1. Esquemas

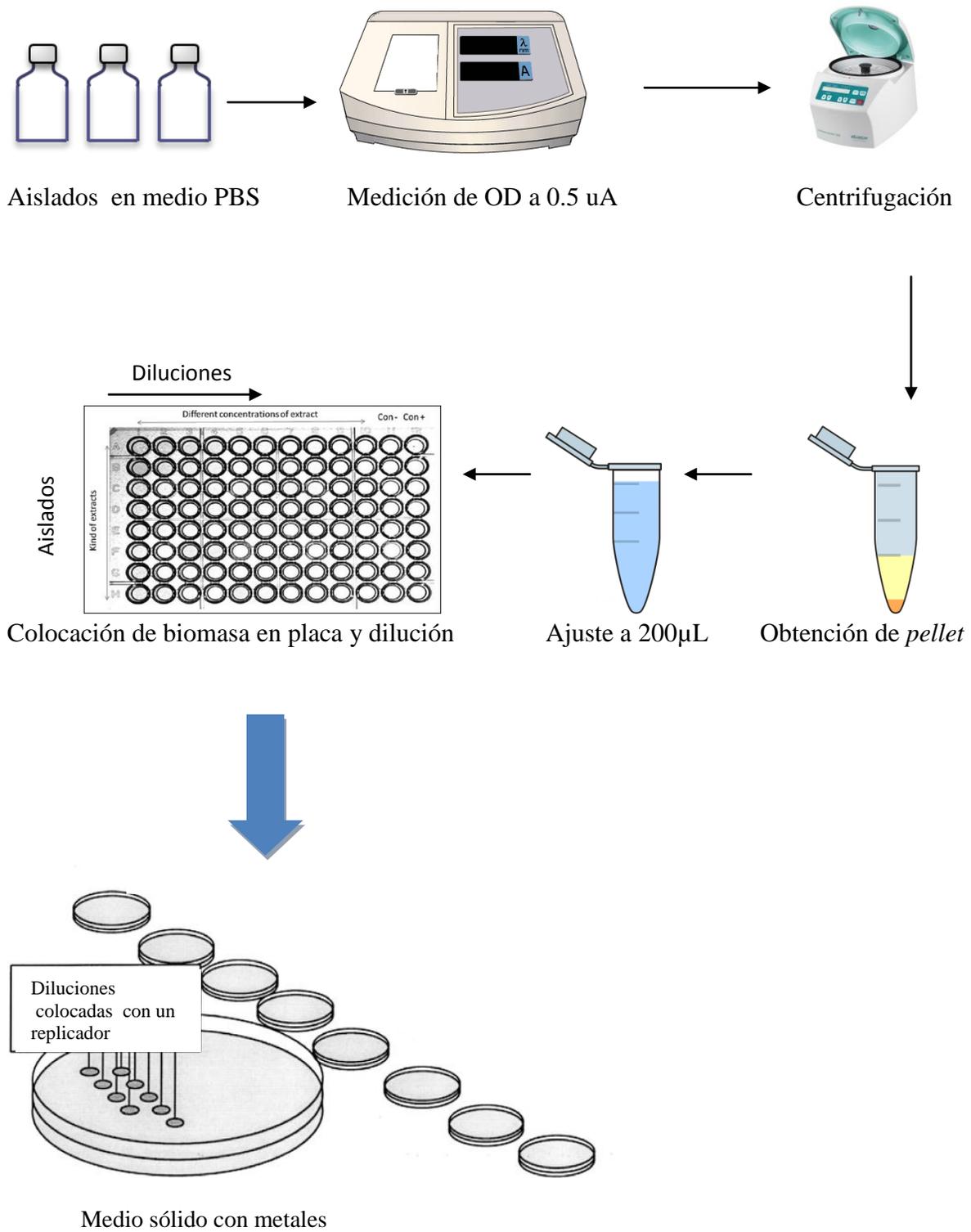
### 1.1 Esquema general experimental



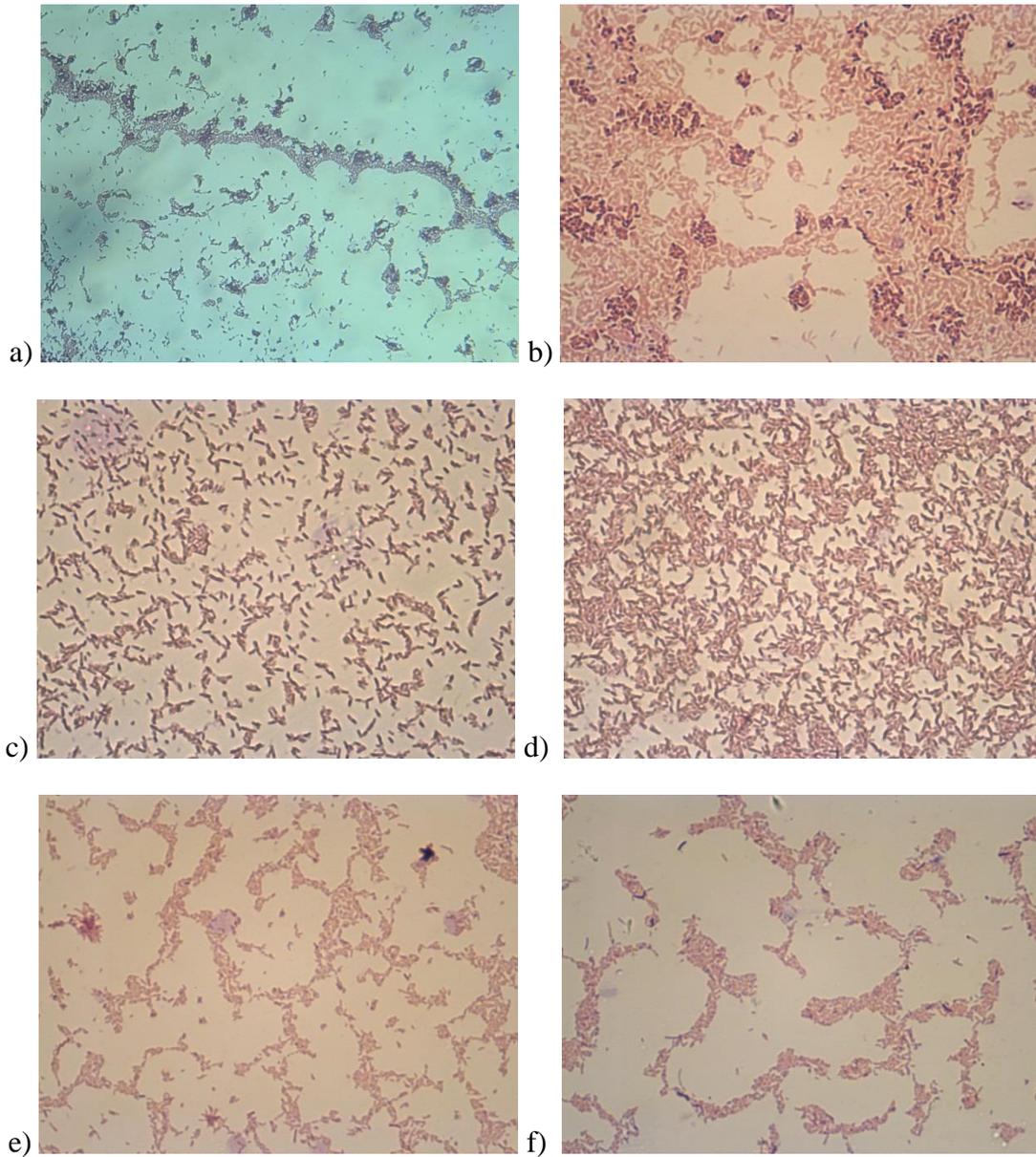
### 1.2. Esquema experimental sobre los aislados



### 1.3 Esquema Microdilución por gota.



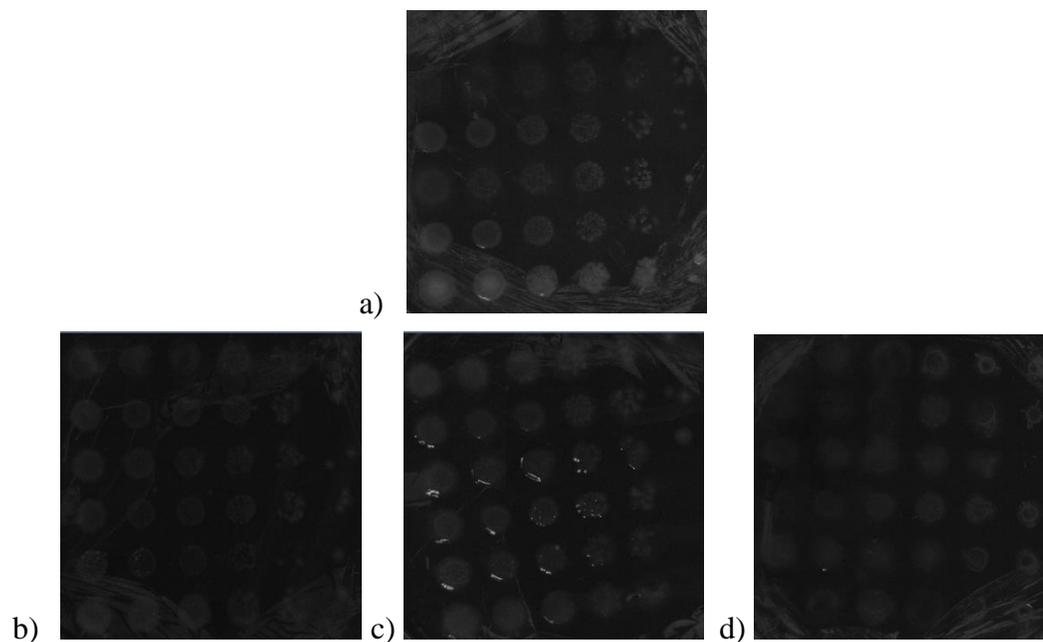
## Anexo 2. Micrografías Tinción Gram



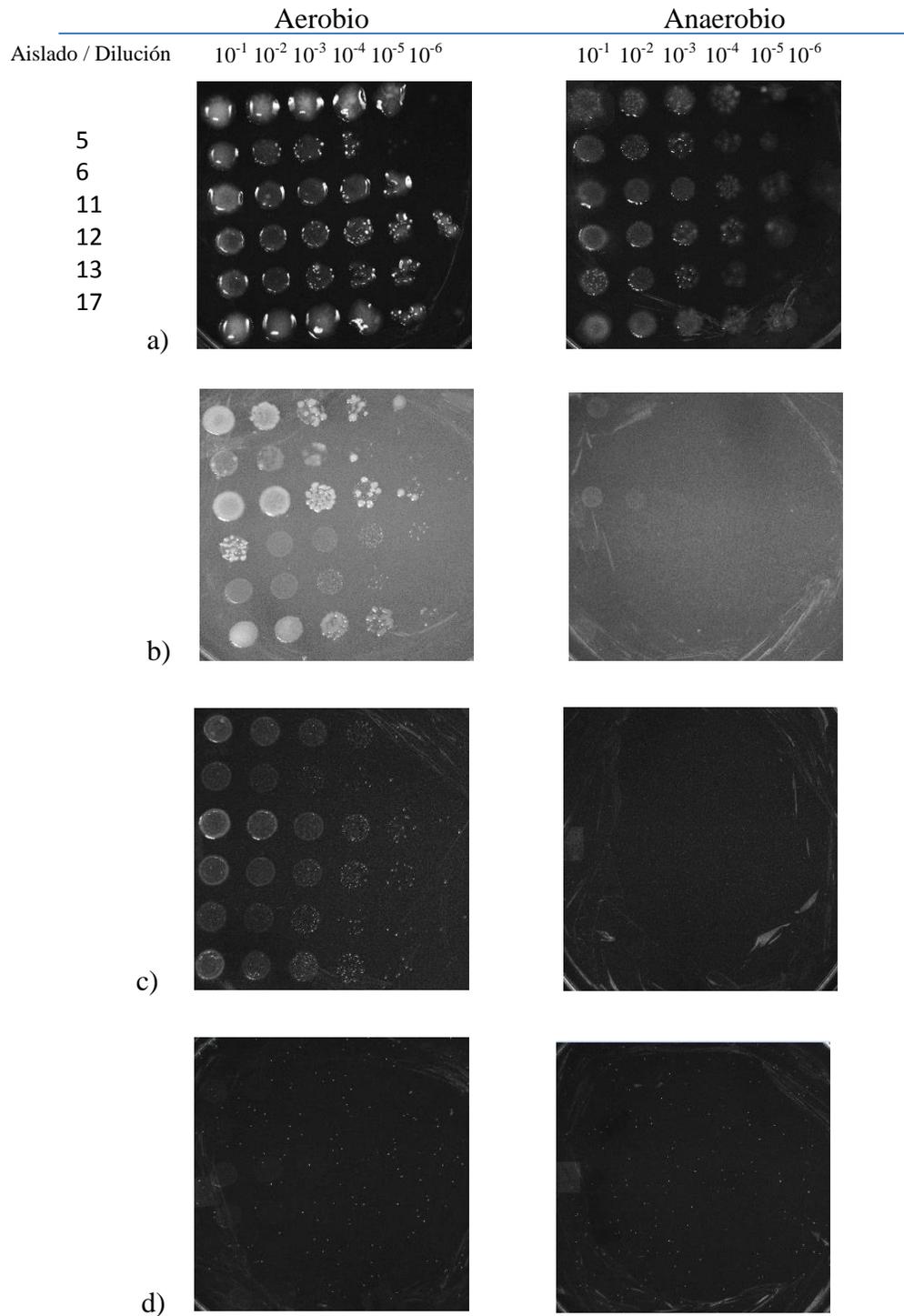
---

Se muestran las micrografías (100x) de los frotis de todos los aislados secuenciados.  
a) Aislado 5, b) Aislado 6, c) Aislado 11, d) Aislado 12, e) Aislado 13, f) Aislado 17.

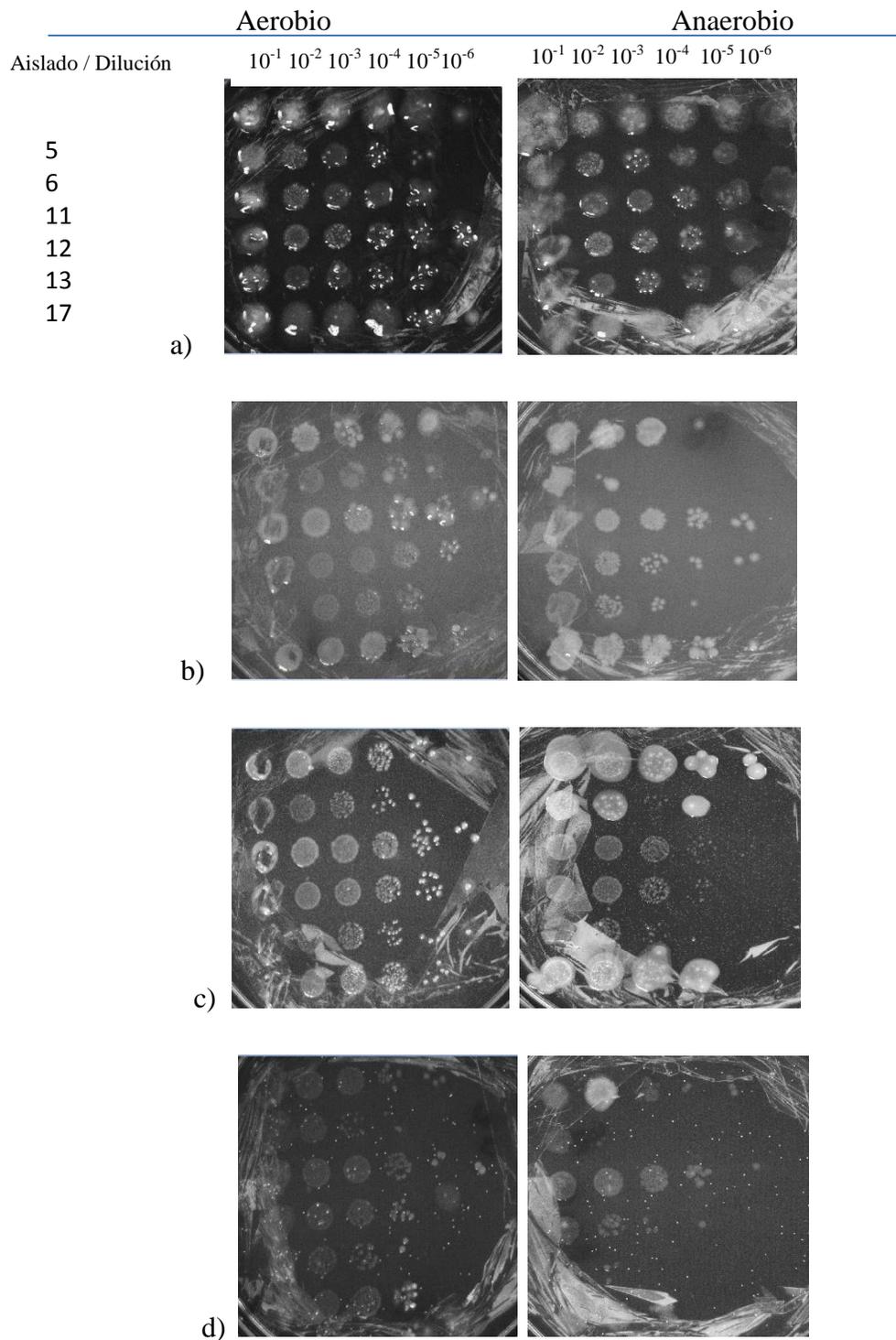
### Anexo 3. Concentraciones de metales mínima inhibitorias.



**3.1.** Técnica de microdilución por gota. Se muestra el ensayo 1, con sulfato (10 mM) como aceptor de electrones y lactato (10 mM) como donador de electrones. a) Control ( $\text{SO}_4^{2-}$  10mM), b) As (5mM), c) As (10mM), As (50mM). Se omite Cd y Zn debido a que no mostró ningún crecimiento. En la primera columna (izquierda) se muestra la dilución más concentrada y va disminuyendo hacia la derecha. En las filas, de arriba hacia abajo, se muestran los aislados 5, 6, 11,12, 13, 17; para cada caja.



**3.2.** Técnica de microdilución por gota. Se muestra el ensayo 2 con As(V) como aceptor de electrones (10 mM) y lactato como donador (10 mM), en condiciones aerobias y anaerobias. a) Control (Arseniato sin metal), b) Plomo (2 mM), c) Cadmio (1 mM), d) Zn (3 mM). En la primera columna (izquierda) se muestra la dilución más concentrada y va disminuyendo hacia la derecha. En las filas, de arriba hacia abajo, se muestran los aislados 5, 6, 11,12, 13, 17, respectivamente, para cada caja.



**3.3** Técnica de microdilución por gota. Se muestra el ensayo 2, después de la tercera semana de incubación, con As(V) como aceptor de electrones (10 mM), y con lactato como donador (10 mM) en condiciones aerobias y anaerobias. a) Control (Arseniato sin metal), b) Plomo (2 mM), c) Cadmio (1 mM), d) Zn (3 mM). En la primera columna (izquierda) se muestra la dilución más concentrada y va disminuyendo hacia la derecha. En las filas de arriba hacia abajo se muestran los aislados 5, 6, 11, 12, 13, y 17 para cada caja.