



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

**POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**Caracterización taxonómica de comunidades  
arsenato-reductoras y su potencial para la  
detoxificación de arsénico**

Tesis que presenta  
**Herón Navarrete Euán**

Para obtener el grado de  
**Maestro en Ciencias Ambientales**

**Director de la Tesis:**  
Dra. María de Lourdes Berenice Celis García

San Luis Potosí, S.L.P., Octubre de 2023



## **Constancia de aprobación de la tesis**

La tesis “**Caracterización taxonómica de comunidades arsenato-reductoras y su potencial para la detoxificación de arsénico**” presentada para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Herón Navarrete Euán** y aprobada el **10 de octubre de 2023** 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

---

**Dra. Nguyen Esmeralda López Lozano**  
Miembro del Comité Tutorial

---

**Dra. Aura Virginia Ontiveros Valencia**  
Miembro del Comité Tutorial



**CIENCIAS  
AMBIENTALES  
IPICYT**

## **Créditos Institucionales**

Esta tesis de maestría titulada “Caracterización taxonómica de comunidades arsenato-reductoras y su potencial para la detoxificación de arsénico” fue elaborada en los laboratorios de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Berenice Celis García.

Durante la realización de los estudios de posgrado y del trabajo experimental (2020 – 2022) el autor, Herón Navarrete Euán, recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-780596).

Este trabajo de investigación fue financiado por el Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología a través del proyecto FME-2021-01-14 “Mejora de la calidad del agua: remoción de arsénico de sistemas hídricos de zonas áridas” y como responsable técnico la Dra. María de Lourdes Berenice Celis García.

## Acta de examen

## **Dedicatorias**

A mi familia y a la memoria de mi padre, que sin ellos no hubiera llegado hasta aquí.

## Agradecimientos

Quiero agradecer a la Dra. Celis por haberme apoyado durante todo el proceso de la maestría, por creer y confiar en mí. A las Dras. Aura y Esmeralda por guiarme durante el camino del análisis de datos y por sus acertados comentarios que enriquecieron el trabajo.

También agradezco a los técnicos académicos M. en C. Juan Pablo Rodas Ortíz, M. en C. María del Carmen Rocha Medina y M. en C. Guillermo Vidriales Escobar, por su invaluable apoyo técnico y administrativo en la realización de este proyecto.

De igual manera, extendo los agradecimientos al personal técnico del Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) Dra. Nadia Martínez Marrero, así como al Biol. Salvador Ambriz Granados Técnico Académico de la División de Biología Molecular por su apoyo con los análisis bioinformáticos y técnicas moleculares especializadas.

Una mención especial que quiero realizar es a Guadalupe Medina de la Rosa, por su invaluable ayuda con las técnicas moleculares y análisis bioinformáticos. Le agradezco su tiempo, paciencia, y enseñanzas que van más allá de lo académico.

Quiero agradecer principalmente a mi familia por creer en mí y apoyarme cuando no me creía capaz de lograr mis objetivos. Sus palabras me han motivado e impulsado a continuar. También me gustaría mencionar a mis compañeros y amigos de generación, que me acompañaron en momentos difíciles y su apoyo como foráneos los ha convertido en mi segunda familia, especialmente Arturo, Paloma, Paco, y Paola.

Por último, pero no menos importante quiero mencionar a mi novia Susy por darme sus palabras de aliento y apoyo en mis momentos de estrés. Gracias igual a mis amigos de parkour que cada día me inspiran a superarme y perder mis miedos.

# Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Glosario	xiv
Resumen	xvii
Abstract	xviii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>5</b>
2.1 Propiedades del arsénico, mineralización y movilización de arsénico en el ambiente	5
2.2 Tecnologías para la remediación de aguas contaminadas con arsénico	12
2.3 Procesos metabólicos involucrados en las transformaciones del arsénico y diversidad microbiana asociada	15
2.3.1 Procesos metabólicos que permiten transformar el arsénico	15
2.3.2 Microorganismos involucrados en la respiración de arsenato ( $\text{As}^{+5}$ ) – reducción del arsénico	18
2.3.3 Detoxificación del arsénico	19
2.3.4 Reducción de arsenato combinada con la reducción de sulfato	21
2.4 Genes funcionales en las transformaciones del arsénico	25
2.4.1 Genómica funcional	25
2.4.2 Genes funcionales de la reducción de arsenato	28
2.4.3 Genes funcionales de la detoxificación del arsénico	29
<b>3. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS, Y OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
3.2 Preguntas de investigación	34
3.3 Hipótesis	34
3.4 Objetivos	34
3.4.1 Objetivo general	34
3.4.2 Objetivos específicos	35

<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	36
4.1 Fuente de microorganismos	36
4.2 Medios de cultivo	36
4.3 Intercambio de atmósfera para alcanzar condiciones anaerobias	37
4.4 Diseño experimental	39
4.5 Selección de los consorcios de trabajo para las cinéticas	39
4.6 Experimentos en microcosmos	41
4.7 Análisis fisicoquímicos de las muestras	42
4.8 Análisis moleculares para la identificación taxonómica de bacterias de los consorcios	42
4.9 Identificación y cuantificación de los genes <i>arsC</i>	43
4.10 Identificación taxonómica de la comunidad arsenato y sulfato reductora	46
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	47
5.1 Cinética de crecimiento de los consorcios arsenato reductores	47
5.2 Cinética de consumo de lactato y producción de acetato de los consorcios arsenato-reductores	51
5.3 Velocidades de consumo de lactato	58
5.4 Identificación taxonómica de la comunidad arsenato/sulfato reductora y potencial genético de detoxificación	60
5.4.1 Índices de diversidad alfa	60
5.4.2 Identificación taxonómica de la comunidad arsenato y sulfato reductora	66
5.4.3 Número de copias del gen de resistencia al arsénico ( <i>arsC</i> )	75
5.4.4 Relaciones entre los consorcios y la concentración de lactato con presencia y ausencia de arsénico	80
<b>6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b>	88
<b>7. REFERENCIAS</b>	91
<b>ANEXOS</b>	103

## Lista de tablas

<b>Tabla 2.1.</b> Tabla de los genes involucrados en el metabolismo del arsénico en diferentes bacterias relacionados con el metabolismo y resistencia	26
<b>Tabla 4.1.</b> Secuencias correspondientes a los cebadores seleccionados de los genes <i>arsC</i>	43
<b>Tabla 4.2.</b> Programas de PCR para la amplificación de los genes 16S rRNA y <i>arsC</i>	45
<b>Tabla 5.1.</b> Valores de velocidad de consumo de lactato en presencia y ausencia de arsénico para cada uno de los tratamientos* de los tres consorcios.	58
<b>Tabla A.1.</b> Abundancia absoluta de ASVs asignados a nivel de género para cada una de las muestras	103

## Lista de figuras

- Figura 2.1.** Estructura del grupo fosfato (izquierda) y arsenato (derecha), donde se observa que presentan una estructura similar. 7
- Figura 2.2.** Especiación de (a) arsenito y (b) arsenato en función del pH (fuerza iónica de aprox 0.01 M). Las condiciones redox son similares para que los estados de oxidación indicados dominen la especiación en ambos casos. (Tomado de Smedley y Kinniburgh, 2002). 9
- Figura 2.3.** Estructura química de los compuestos arsenato y arsenito. Se ejemplifica el proceso de reducción en el que un par de electrones es adquirido por el arsenato, transformándose a arsenito, dejando libre un par de electrones, aumentando su electronegatividad y con ello, su atracción hacia otros elementos (Tomado de Wilson, 2014). 10
- Figura 2.4.** Esquema que representa a las actividades de bacterias en ambientes mineros y que influyen en las transformaciones del arsénico. (Adaptado de Drewniak y Sklodowska, 2013) 17
- Figura 2.5.** Esquema que representa el acoplamiento de bacterias arsenato reductoras y sulfato reductoras para la biomineralización de sulfuros de arsénico. Las dos bacterias podrían ser bacterias sulfato-reductoras o una bacteria sulfato-reductora con una bacteria arsenato-reductora 23
- Figura 2.6.** Esquema que representa los mecanismos de reducción del arsenato, para la respiración y detoxificación en bacterias mediante los genes funcionales *arrA* y *arsC*, respectivamente. CK: Ciclo de Krebs. 27
- Figura 2.7.** Esquema que representa al operón *ars* que contiene a los genes estructurales *arsA*, *arsB* y *arsC*; y dentro de los reguladores al represor *arsR* y la chaperona *arsD*. (Adaptado de Singh y Manel del Valle, 2023) 30
- Figura 4.1.** Diagrama simplificado de la estrategia experimental 38
- Figura 4.2.** Diagrama simplificado de la selección de los cultivos para el 39

monitoreo de los consorcios

- Figura 4.3.** Diagrama de inóculos y cultivos para determinar cinética de crecimiento, consumo de lactato y producción de acetato, esta metodología se aplicó para cada uno de los inóculos CB9, CT1 y CT5. 40
- Figura 5.1.** Cinéticas de crecimiento de los cultivos arsenato-reductores en microcosmos. Se muestran los perfiles de densidad óptica (absorbancia 600 nm). Se usó lactato 10 ó 22 mM como donador de electrones. a) y b) Consorcio 1; c) y d) Consorcio 5; e) y f) Consorcio 9. Código de la leyenda: el primer dígito indica el número del consorcio (C1, C5, ó C9), los dos siguientes dígitos indican la concentración de lactato adicionada (10 ó 22 mM) y los signos indican (+) en presencia de arsénico o (-) en ausencia. 48
- Figura 5.2.** Perfiles de las cinéticas de consumo de lactato (sustrato) y producción de acetato (subproducto) del Consorcio 1. a) 10 mM de lactato + 10 mM de As(+5); b) 10 mM de lactato sin As(+5); c) 22 mM de lactato + 10 mM de As(+5); d) 22 mM de lactato sin As(+5). 52
- Figura 5.3.** Perfiles de las cinéticas de consumo de lactato (sustrato) y producción de acetato (subproducto) del Consorcio 5. a) 10 mM de lactato + 10 mM de As(+5); b) 10mM de lactato sin As(+5); c) 22 mM de lactato + 10 mM de As(+5); d) 22 mM de lactato sin As(+5). 53
- Figura 5.4.** Perfiles de las cinéticas de consumo de lactato (sustrato) y producción de acetato (subproducto) del Consorcio 9. a) 10 mM de lactato + 10 mM de As(+5); b) 10mM de lactato sin As(+5); c) 22 mM de lactato + 10 mM de As(+5); d) 22 mM de lactato sin As(+5). 55
- Figura 5.5.** Curvas de rarefacción de los consorcios (1, 5, y 9) y sus respectivos inóculos (i) bajo los diferentes tratamientos con (+) ó sin (-) arsénico, y lactato 10 ó 22 mM. La línea negra vertical indica el número mínimo de secuencias para la rarefacción (7559 pb). No se consideraron las ASVs cuyo porcentaje fue menor que 1%. 62
- Figura 5.6.** Diversidad alfa de las distintas comunidades arsenato-reductoras. Panel superior: diversidad observada. Panel medio: estimador Chao 1. Panel inferior: índice Shannon-Weaver. Clave de los tratamientos: Primer dígito corresponde al consorcio (1, 5, ó 64

9); segundos dos dígitos concentración de lactato (10 ó 22 mM); (+) con arsénico, (-) sin arsénico. Los inóculos se identifican con (i).

**Figura 5.7.** Abundancia relativa a nivel de *phylum* expresado en porcentaje (%), se presentan los resultados de los diferentes tratamientos con (+) y sin arsénico (-), y la concentración de lactato 10 y 22 mM junto con sus inóculos (i) de los diferentes Consorcios (1, 5 y 9). 67

**Figura 5.8.** Abundancia relativa de los cultivos a nivel de género, se presentan las abundancias relativas de los géneros con una abundancia relativa mayor a 1% contra las muestras bajo los diferentes tratamientos con (+) y sin arsénico (-), y la concentración de lactato 10 y 22 mM junto con sus inóculos (i) de los diferentes Consorcios (1, 5, y 9). 68

**Figura 5.9.** Número de copias/mL del gen *arsC-Trx* para cada uno de los tratamientos, de los Consorcios 1, 5 y 9 (primer dígito), cultivados con 10 mM ó 22 mM de lactato (segundos dos dígitos), en ausencia (-) o presencia (+) de 10 mM de As(+5). 76

**Figura 5.10.** a) Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS). de Bray-Curtis que presenta la comparación entre muestras bajo los diferentes tratamientos con arsénico, “+” y sin arsénico, “-“; y lactato (10 y 22 mM), para los Consorcios 1, 5 y 9 con sus respectivos inóculos (i). b) Composición de las comunidades bacterianas sulfato-reductoras/arsenato-reductoras. El heatmap está basado en las abundancias relativas de los géneros con una abundancia relativa mayor a 1 % contra las muestras bajo los diferentes tratamientos representados en las barras de colores de la izquierda: con (+) y sin arsénico (-), y la concentración de lactato 10 y 22 mM junto con sus inóculos (i) de los diferentes Consorcios (1, 5 y 9). El agrupamiento de los datos está basado en la distancia Bray-Curtis (dendrograma de la izquierda). El *phylum* asociado se encuentra en la barra de colores horizontal superior. 82

**Figura 5.11.** Correlación entre factores y géneros bacterianos entre tratamientos. 85

**Figura 5.12.** Análisis de componentes principales (PCA), los puntos representan las muestras categorizadas por la presencia (rojo) y 86

ausencia (azul) de arsénico y vectores que indican los géneros que más contribuyen dentro de las muestras a la variabilidad total de los datos. El porcentaje descrito en los ejes representa la varianza explicada por cada componente principal de todos los datos (Superior). Diagrama que representa el cambio de las abundancias relativas entre *Clostridium sensu stricto* 7 y *Desulfosporosinus* dependiendo de la presencia o ausencia de arsénico (Inferior)

- Anexo 2.** Abundancia relativa expresado en porcentaje a nivel de clase (%), se presentan los resultados de los diferentes tratamientos con (+) y sin arsénico (-), y la concentración de lactato 10 y 22 mM junto con sus inóculos (i) de los diferentes Consorcios (1, 5 y 9). 104
- Anexo 3.** Abundancia relativa expresado en porcentaje (%) de la comunidad microbiana, se presentan los resultados de los diferentes tratamientos con (+) y sin arsénico (-), y la concentración de lactato 10 y 22 mM junto con sus inóculos (i) de los diferentes Consorcios (1, 5 y 9). a) Abundancia relativa a nivel de orden, b) Abundancia relativa a nivel de familia. 105
- Anexo 4.** Curva estándar de las diluciones de ADN molde (clonas construidas con pGEM-T easy Vector system (PROMEGA) que contienen el gen *arsC* amplificado a partir de la cepa *Geobacter sulfurreducens* strain PCA (DSM 12127, DSMZ, Alemania; ATCC51573)), usando el par de cebadores *arsC4* (Trx) a diferentes diluciones (100 a 108 copias). El control negativo consistió en agua inyectable estéril (Superior). La eficiencia se determinó mediante la recta  $y = -0.293 * x + 10.748$  (Inferior) 106
- Anexo 5.** Curva de fusión del control positivo ( $T_m=79^\circ\text{C}$ ) correspondiente a la clona y las muestras ( $T_m = \sim 75-76^\circ\text{C}$ ) 107

## Glosario

**Acuagliceroporina.** Proteína de la membrana celular que permite el transporte de agua y glicerol a través de la membrana.

**Adenosina Trifosfato (ATP).** Molécula de adenina (base nitrogenada) enlazada a un átomo de carbono de una molécula de ribosa (pentosa), azúcar que a su vez tiene enlazados tres iones fosfatos a otro átomo de carbono. Es la principal fuente de energía para la mayoría de los procesos y funciones celulares.

**Amplicón (Amplicon Sequence Variant, ASV).** Fragmento de ADN amplificado mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

**Cebador.** Secuencia de oligonucleótido, usualmente de 20-25 pares de bases de longitud que son específicos para un segmento de una secuencia conocida y que se desea amplificar. Son los puntos de partida para la síntesis de ADN o ARN una vez que la ADN polimerasa y los dNTPs (deoxinucleosidos trifosfatos) son agregados.

**Ciclo de Krebs.** Serie de reacciones bioquímicas que ocurren en las mitocondrias (eucariotes) o en el citoplasma (procariotes) y que desempeñan un papel crucial en la generación de energía a partir de los nutrientes en forma de ATP.

**Comunidad clave** (*Core community*): Grupo de microorganismos que consistentemente se encuentran presentes en un determinado ambiente o comunidad microbiana. Estos microorganismos forman una parte central o fundamental de la comunidad, y su presencia es considerada esencial para el funcionamiento y la estabilidad del ecosistema microbiano.

**Desnaturalización.** Efecto provocado por calor o algún químico sobre el ADN o una proteína que produce cambios en su estructura proteica de doble cadena e implica la pérdida biológica de funciones.

**Exopolisacárido.** Macromolécula de carbohidratos, generalmente junto con proteínas, que se sintetizan por enzimas bacterianas y se excretan y acumulan extracelularmente.

**Fosforilación oxidativa.** Proceso mediante el cual se genera ATP a partir del flujo de electrones a través de la cadena respiratoria y la síntesis de ATP en la mitocondria.

**Fotocatalizador.** Material que absorbe la luz para llevarla a un nivel de energía superior y tiene la capacidad de acelerar o facilitar una reacción química.

**Heterotrófico.** Organismo que obtiene su energía y nutrientes alimentándose de otros organismos o de compuestos orgánicos ya formados

**Jales mineros.** Apilamiento de rocas molidas que quedan después de que los minerales de interés como el plomo, zinc, cobre, plata y otros han sido extraídos de las rocas que los contienen. Estos residuos sólidos tienen características tóxicas como una alta acidez y concentraciones elevadas de metales pesados.

**Metagenoma.** Conjunto de material genético colectivo derivado de todas las especies microbianas presentes en una muestra ambiental o comunidad.

**Mineral pirítico.** Mineral que contiene pirita como su componente principal. La pirita es un mineral sulfuro de hierro ( $\text{FeS}_2$ )

**Nanoswitch.** Dispositivo a escala nanométrica que tiene la capacidad de cambiar o controlar la conductividad eléctrica en respuesta a un estímulo externo, como un cambio en la temperatura, una señal eléctrica o una presión mecánica. Estos interruptores operan a nivel de nanoestructuras, como nanotubos de carbono, nanocables, nanodispositivos o incluso moléculas individuales.

**Oligonucleótido.** Secuencia corta de ADN o ARN.

**Oxianión.** Molécula con carga negativa que contiene oxígeno.

**Oxihidróxidos.** Compuesto químico formado por un metal, oxígeno y un grupo OH.

**Quimiolitoautótrofo.** Organismo que obtiene energía y carbono a partir de compuestos inorgánicos que les permiten la síntesis de moléculas orgánicas

**Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR).**

Técnica de biología molecular utilizada para amplificar una región específica de ADN a través de varios ciclos de temperatura que desnaturalizan los fragmentos, permiten el alineamiento con cebadores y posteriormente una Taq polimerasa extiende las secuencias de nucleótidos complementaria a la cadena molde.

**Sideróforo.** Metabolitos secundarios que recogen hierro del ambiente al formar complejos de  $\text{Fe}^{3+}$  solubles y lo transportan al interior de la célula mediante receptores específicos. El hierro actúa como cofactor de las enzimas para catalizar reacciones redox involucradas en procesos metabólicos importantes como la respiración, síntesis de ADN y protección a las especies reactivas de oxígeno. El hierro no se encuentra biodisponible en grandes cantidades por su estado de oxidación ( $\text{Fe}^{3+}$ ), el cual es insoluble a pH neutros y básicos.

**Taq polimerasa.** Enzima utilizada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar segmentos específicos de ADN.

**Temperatura de fusión (Melting temperature,  $T_m$ ).** Temperatura a la cual la mitad de las bases constitutivas de una molécula de ADN de doble cadena se disocian y forman dos cadenas individuales.

## Resumen

**Navarrete Euán Herón (2023). Caracterización taxonómica de comunidades arsenato-reductoras y su potencial para la detoxificación de arsénico. Tesis de Maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. México.**

El arsénico es un metaloide que puede estar presente en el ambiente ya sea por fuentes naturales o antropogénicas. La exposición de los seres vivos al arsénico causa diversos efectos nocivos, por lo que su remoción del agua o suelos resulta crítica. Para ello, se pueden emplear bacterias capaces de transformar el arsénico y que propicien su remineralización para facilitar su remoción. Algunas bacterias, como las sulfato reductoras tienen la capacidad de ayudar a reducir la toxicidad de arsénico ya que además de reducir sulfato a sulfuro, pueden reducir arsenato a arsenito en un proceso respiratorio y promover la formación de sulfuros de arsénico. Cabe señalar que las bacterias también pueden reducir arsenato a arsenito para detoxificarlo, este proceso lo llevan a cabo muchas bacterias y está regulado por el gen *arsC*. El objetivo de este trabajo fue caracterizar comunidades microbianas cultivables expuestas al arsénico para determinar su uso potencial en sistemas de remediación de arsénico. A partir de comunidades capaces de tolerar arsénico (10 mM) en ausencia de sulfato con dos concentraciones distintas de lactato (10 ó 22 mM) se observaron los cambios en la composición de las comunidades y se compararon con cultivos donde el arsénico se encontraba ausente. De igual manera, se cuantificó el gen *arsC*, donde se observó que el arsénico ejerce una presión selectiva sobre las comunidades promoviendo un cambio en su estructura y crecimiento, favoreciendo a las bacterias que toleran el arsénico a través de la detoxificación y que también podrían estar respirando arsenato. Entre los géneros bacterianos favorecidos por el arsénico se encontró *Desulfosporosinus* que tiene capacidad de respirar arsenato, mientras que en ausencia de arsénico se favoreció el género *Clostridium*, con capacidad fermentativa primordialmente. Se estima que la mayor parte de las bacterias encontradas en los cultivos con arsénico poseen el gen de detoxificación; y en donde no se observó este gen, se considera que los microorganismos podrían llevar a cabo la respiración de arsenato.

Las diferentes condiciones a las que fueron sometidas las comunidades sulfato-reductoras/arsenato-reductoras modificaron su composición de acuerdo con su capacidad de tolerancia al arsénico y, en menor medida, se observaron cambios a una mayor concentración de donador de electrones como el lactato. En consecuencia, estas condiciones permitieron la selección exitosa de bacterias arsenato reductoras, encontrando entre cinco y nueve géneros distintos, de los cuales *Desulfosporosinus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, y *Bacillus* resultaron miembros clave de la comunidad y podrían ser esenciales para futuros procesos de arsenato reducción para la biorremediación de aguas contaminadas con este metaloide.

**Palabras clave:** Arsénico, arsenato-reducción, arsenato reductasa, detoxificación, respiración, comunidades microbianas

## Abstract

**Navarrete Euán Herón (2023). Taxonomic characterization of arsenate-reducing communities and their potential for arsenic detoxification. M.Sc. Thesis. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. México.**

Arsenic is a metalloid that can be present in the environment due to natural or anthropogenic sources. The exposure to arsenic of living organisms can cause several health issues, thus, its removal from water and soil must be addressed. It has been demonstrated that some bacteria can transform arsenic and facilitate the removal of arsenic through re-mineralization. Some bacteria, like sulfate-reducing bacteria can lessen arsenic toxicity, because in addition of reducing sulfate to sulfide, some of them can also reduce arsenate to arsenite through a respiratory process and promote the formation of arsenic sulfides. It is worth noting that bacteria can also reduce arsenate to arsenite for detoxification, which is carried out by several bacterial genera and is regulated by the *arsC* gene. The objective of this work was to characterize culturable microbial communities exposed to arsenic and determine their potential use in arsenic remediation systems.

From cultivable microbial communities capable of tolerating arsenic (10 mM) in the absence of sulfate with two different concentrations of lactate (10 and 22 mM) as electron donor, the changes in the community structure were observed and compared among cultures in the presence and absence of arsenic. Additionally, by means of quantifying the *arsC* gene it was observed that arsenic exerts a selective pressure over the community structure. Suggesting that detoxification, and perhaps respiration, were used as mechanisms to tolerate arsenic, promoting changes in the structure and growth rate favoring arsenic resistant bacteria. Among the bacterial genera favored by arsenic, *Desulfosporosinus* most likely promoted arsenate reduction through respiration, whereas the *Clostridium* genus used lactate in a fermentative process favored by the absence of arsenate. It is estimated that most of the bacteria found in the communities have the detoxification gene, and where this gene was not observed, it is considered that microorganisms could carry out arsenate respiration. The sulfate/arsenate reducing communities exhibited changes based on the conditions to which they were exposed such as their capacity to tolerate arsenate, and according to the increase in lactate concentration.

As a result, these conditions allowed the successful selection of arsenate reducing bacteria, finding between five to nine different bacterial genera. From these genera, *Desulfosporosinus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, and *Bacillus* were part of the core community and might be essential in future projects for the bioremediation of contaminated water with arsenic.

**Keywords:** Arsenic, arsenate reduction, arsenate reductase, detoxification, respiration, microbial communities

## 1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, el acceso al agua es una de las problemáticas mundiales que demandan soluciones inmediatas. Se estima que a nivel mundial más de 300 millones de personas no tienen acceso al agua para cubrir sus necesidades básicas. El problema se acentúa en las zonas áridas en donde el nivel de precipitaciones no asegura una fuente constante de agua, por lo que el agua subterránea representa la mayor fuente de este vital líquido (Alarcón-Herrera *et al.*, 2020). Sin embargo, para satisfacer las necesidades de la población no es suficiente con garantizar su disponibilidad, sino que también se debe tomar en cuenta su calidad.

En general, en las zonas áridas cada vez se ejerce una presión mayor sobre los acuíferos profundos y existe la creciente preocupación de encontrar altas concentraciones de metales pesados en el agua extraída de estos acuíferos. En otro escenario, los metales presentes en el agua pueden ser consecuencia de actividades como la minería. Además, en las aguas superficiales, ante la falta de precipitaciones, los metales tienden a concentrarse en los sedimentos o en los suelos y eventualmente se infiltran al subsuelo (Nava-Reyna y Medrano-Macías, 2022).

Específicamente en el caso del arsénico, el mecanismo más aceptado de la incorporación de este metaloide al agua (por causas naturales) es mediante la reducción de los (oxihidro)óxidos de hierro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) que disuelven los minerales y movilizan los metales y metaloides asociados (Glodowska *et al.*, 2020). La industria minera también puede contribuir con la incorporación de metales tóxicos al ambiente, ya que después de la extracción del metal de interés, los jales mineros quedan expuestos a la atmósfera en donde interacciones químicas, físicas, y biológicas complejas dan lugar al drenaje ácido de mina (AMD, por sus siglas en inglés) (Ighalo *et al.*, 2022). Este flujo de agua se caracteriza por su baja acidez (pH: 2-6) con altas concentraciones de sales, sulfatos de hierro y otros metales no ferrosos (Simate y Ndlovu, 2014). Cuando estos drenajes ácidos de mina no son manejados correctamente como residuos peligrosos o especialmente cuando las minas se abandonan, pueden provocar la movilización en suelo y agua de elementos tóxicos como arsénico, selenio, boro, y metales pesados como plomo, cadmio, cobre y zinc (Tabelin *et*

*al.*, 2020). En este escenario, estas corrientes representan un riesgo para el ecosistema en general por los efectos toxicológicos que tienen sobre los seres vivos, entre los que incluyen la inhibición de actividades enzimáticas y de bacterias que regulan los procesos biogeoquímicos del suelo (Ighalo *et al.*, 2022).

En particular, en San Luis Potosí, y zonas áridas del norte de México se han encontrado concentraciones significativas de arsénico en agua y suelos (Nava-Reyna y Medrano-Macías, 2022), llegando a detectarse concentraciones entre 25 y 75  $\mu\text{g/L}$  en aguas subterráneas. Se estima que más de 1.5 millones de mexicanos son los expuestos a aguas contaminadas con arsénico que tienen concentraciones muy altas y que superan el límite máximo establecido por la ONU de 10  $\mu\text{g/L}$  para el agua potable (Alarcón-Herrera *et al.*, 2020).

Existen diversas tecnologías que se han empleado para la disminución de la contaminación por arsénico en agua y suelos, entre ellas: tratamientos físicos, químicos, y biológicos. Entre éstas, se incluyen la precipitación selectiva de metales, adsorción, procesos electroquímicos y tratamiento con membranas (Rodríguez-Galán *et al.*, 2019). Los métodos de remediación del arsénico pueden ser clasificados en dos mecanismos: el activo, que opera con un flujo de manera continua y el pasivo, el cual es aplicado a sistemas cerrados o que no requieren intervención humana (Taylor, 2021). El reto que supone la remediación de los residuos mineros como los drenajes ácidos de mina radica en la diversidad de metales tóxicos disueltos que puede contener y sus diferentes proporciones, además del grado de acidez que puede tener (Kefeni *et al.*, 2017). Generalmente, los tratamientos fisicoquímicos requieren de una continua adición de sustancias, que se traduce en un aumento de costos, supervisión constante y formación de residuos que pueden contener elementos no deseados, resultando en un daño ambiental si no son tratados antes de ser liberados (Daraz *et al.*, 2023). Por lo tanto, el empleo de tecnologías con métodos biológicos representa un área de oportunidad ya que no se generan subproductos tóxicos que necesiten ser tratados y los sistemas solo requieren de materia orgánica para el crecimiento de las bacterias (Kefeni *et al.*, 2017). Entre los beneficios que se obtienen del uso de bacterias como mecanismo de remediación de aguas y suelos contaminados con arsénico, es el favorecimiento de la

precipitación de diversos metales de sulfuro, los cuales poseen una mayor estabilidad y son de fácil recuperación por su baja solubilidad (Rambabu *et al.*, 2020; Estay *et al.*, 2021). Estos precipitados son el producto de la actividad de bacterias sulfato reductoras, las cuales son capaces de reducir el sulfato hasta H<sub>2</sub>S (ácido sulfhídrico). De igual manera, las bacterias sulfato reductoras pueden contribuir a la neutralización de los residuos mineros en caso de requerirse por la alcalinidad que surge de la producción de bicarbonato a partir de la oxidación de la materia orgánica (Rambabu *et al.*, 2020). En cambio, los tratamientos con carbonatos e hidróxidos de calcio, eventualmente pierden su reactividad por la pérdida de la porosidad, ocasionada por un alto grado de acidez y las altas concentraciones de metales (Kefeni *et al.*, 2017; Rötting *et al.*, 2008).

Entre los productos minerales resultantes de la actividad de bacterias sulfato reductoras están aquellos asociados a metales con estados de oxidación +2, como Zn, Fe, Cu, Ni, Cd, entre otros, así como también metaloides. Estos precipitados de sulfuros minerales además tienen un uso potencial por algunas industrias, ya que por su origen microbiano son sintetizados en tamaños pequeños y son considerados nanopartículas. Estas nanopartículas pueden ser empleadas en la industria como material de recubrimiento de superficies, nanoswitches, componentes de celdas solares, absorbentes de radiación, fotocatalizadores, sensores de gas y filtros dieléctricos (Estay *et al.*, 2021). En el caso del arsénico, cuando forma los sulfuros de arsénico, es atractivo para la industria energética por sus capacidades foto-catalíticas (Baláz *et al.*, 2011).

En el caso específico del distrito minero de Santa María de la Paz, Matehuala, en San Luis Potosí, las actividades mineras se remontan desde hace 240 años y los remanentes del sitio minero están compuestos principalmente de calcita y cuarzo (Martínez-Villegas *et al.*, 2013; Rios-Valenciana *et al.*, 2017). Aunque también destaca la presencia de sulfuros y hierro que forman parte de complejos procesos de oxidación (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2021). La calcita en este sitio tiene un papel neutralizante en el medio, por lo que el pH se mantiene por arriba de los valores ácidos de los drenajes ácidos de mina. En el sitio están también presentes minerales con arsénico, principalmente en forma de arsenopirita (FeAsS) con concentraciones de arsénico de hasta 50 g/kg. La distribución de los residuos mineros

por una falta de manejo adecuado a través de los años ha ocasionado la contaminación de suelos, sedimentos, agua, aves, cultivos e incluso niños en un área de 100 km<sup>2</sup> a través de un complejo hidráulico artesanal que se usa para el riego de cultivos, actividades de recreación y fuente de agua para los animales en los que se han detectado concentraciones de arsénico entre 5.9 y 7.2 mg/L (Martínez-Villegas *et al.*, 2013), es por esta razón que resulta importante asegurar una mejor calidad de agua a la región y realizar acciones para la remediación del agua.

En este trabajo, se plantea analizar comunidades microbianas previamente aisladas de sedimentos de una poza ubicada en una región árida cercana al distrito minero de Santa María de la Paz que naturalmente contiene arsénico. Se pretende identificar las condiciones de cultivo y los géneros bacterianos que componen dichas comunidades con capacidad de detoxificación de arsénico para su potencial uso en la remoción de arsénico del agua.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Propiedades del arsénico, mineralización y movilización de arsénico en el ambiente**

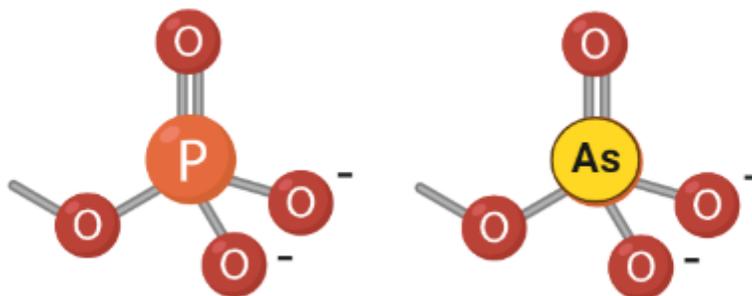
El arsénico es uno de los elementos que constituyen la corteza terrestre y por lo tanto forma parte de los procesos geológicos y biológicos del planeta Tierra (Andres y Bertin, 2016); aunque a nivel global tiene una abundancia relativa de sólo 0.0001% en el ambiente (Bruneel *et al.*, 2017). Sin embargo, las actividades humanas han propiciado el aumento de las concentraciones de este metaloide en los ecosistemas y, en consecuencia, su permanencia prolongada dentro de los ciclos biogeoquímicos y en la cadena trófica. El origen del arsénico presente en suelos, sedimentos, y agua puede ser natural o antropogénico debido a la disolución de minerales que contienen arsénico (p. ej. arsenopirita), lo que promueve un incremento en su biodisponibilidad (Andres y Bertin, 2016; Rios-Valenciana *et al.*, 2020).

Diversos sectores industriales usan arsénico en la elaboración de sus productos, este metaloide puede formar parte de pesticidas y herbicidas como compuesto activo en la agricultura (Bruneel *et al.*, 2017). Además, se usa para fabricar tintes sintéticos, preservativos de madera, así como medicamentos usados en la industria avícola (Oremland y Stolz, 2003).

De todas las actividades industriales, la minería es la que contribuye en mayor medida al problema de la movilización del arsénico en el ambiente, debido a la exposición de grandes cantidades de minerales piríticos con altas concentraciones de arsénico (y otros metales) al ambiente (Lièvreumont *et al.*, 2009). La intemperización de los jales mineros, causa una serie de reacciones químicas y biológicas que resultan en una corriente denominada drenaje ácido de mina, que contiene altas concentraciones de sulfato, hierro, metales pesados (Au, Ag, Cd y Zn) así como otros elementos tóxicos, entre los que se encuentra el arsénico (Bruneel *et al.*, 2017). Eventualmente, dichas corrientes se incorporan a los cuerpos de agua cercanos a las actividades mineras (ríos, lagos), en donde se han reportado altas concentraciones de metales (Zhang *et al.*, 2017).

En general, la presencia de metales pesados en el ambiente está ligada a un desequilibrio de los procesos biogeoquímicos y puede tener diversos efectos en el ambiente. Por ejemplo, los suelos de un ambiente conservado son productivos cuando se realizan funciones enzimáticas de deshidrogenasas (ciclo de C), ureasas (ciclo de N), fosfatasas (ciclo del P), sulfatasas (ciclo del S) y que usualmente son indicadores de un suelo saludable (Newsome y Falagán, 2021). Estas funciones resultan afectadas negativamente por la toxicidad de los metales pesados al promover cambios en la composición y tamaño de las comunidades microbianas del suelo, ya que los metales pesados pueden interrumpir procesos esenciales como la división celular, transcripción, y desnaturalización proteica (Xie *et al.*, 2016; Raklami *et al.*, 2022). Como consecuencia de las alteraciones al suelo, las plantas reducen sus procesos bioquímicos y fisiológicos como la germinación, balance de agua, fotosíntesis, sistema de transporte de electrones, asimilación de CO<sub>2</sub> y la obstrucción del funcionamiento de enzimas citoplasmáticas al aumentar el estrés oxidativo, lo cual altera el crecimiento y metabolismo de la planta, que la conducen a su muerte y que a gran escala puede conducir a la inseguridad alimentaria (Raklami *et al.*, 2022).

En el caso específico del arsénico, su toxicidad y efectos adversos se deben a que puede provocar la interrupción de los procesos bioquímicos o formar metabolitos que contengan arsénico en sustitución de un grupo fosfato (Firrincieli *et al.*, 2019). Lo anterior, debido a la similitud entre las estructuras del arsenato y fosfato (Figura 2.1). En su conjunto, los efectos adversos del arsénico incluso pueden ocasionar la muerte celular. Por un lado, el arsenato (As<sup>5+</sup>) interrumpe el sistema de generación de energía para la célula (síntesis de ATP) como consecuencia de la inhibición de la fosforilación oxidativa. En cuanto al arsenito (As<sup>3+</sup>), esta especie reducida de arsénico, inactiva la actividad enzimática al bloquear los grupos tiol y sulfhidrilo de las proteínas, como por ejemplo la piruvato deshidrogenasa y la 2-oxoglutarato deshidrogenasa esenciales en Ciclo de Krebs (Bruneel *et al.*, 2017), evitando la producción del poder reductor necesario (NADH + H<sup>+</sup>) para transferir los electrones hasta la cadena de transporte de electrones.



**Figura 2.1.** Estructura del grupo fosfato (izquierda) y arsenato (derecha), donde se observa que presentan una estructura similar.

El arsénico está catalogado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como uno de los 10 contaminantes prioritarios que más riesgo representan para la salud (Andres y Bertin, 2016). En este sentido, la OMS ha establecido un máximo de concentración de arsénico en el agua potable de 10  $\mu\text{g/L}$  (Bruneel *et al.*, 2017), y en México hasta el año 2021, la norma correspondiente establecía un límite máximo de 25  $\mu\text{g/L}$ , que para el año 2022 debería reducirse a 10  $\mu\text{g/L}$  (Secretaría de Salud, 2021). Específicamente, en los humanos, la exposición prolongada al arsénico, a través del consumo de agua contaminada o de alimentos, provoca efectos negativos a la salud lo que puede derivar en mutaciones, diversas enfermedades cardiovasculares, neurológicas, y de la piel, e inclusive cáncer y diabetes (Andres y Bertin, 2016; Briones-Gallardo *et al.*, 2017). Sin embargo, el grado de toxicidad está determinado por la duración de la exposición y la dosis absorbida (Raklami *et al.*, 2022).

Los estados de oxidación del arsénico pueden ser +5, +3, 0, y -3; aunque rara vez se encuentra en estado puro y, por lo tanto, forma compuestos a partir de su forma ionizada asociado con otros elementos (Oremland y Stolz, 2003). Los minerales en los que se encuentra el arsénico son arseniuros, sulfuros, óxidos, arsenatos y arsenitos que generalmente se encuentran asociados a metales como hierro, cobre, níquel, cobalto cadmio, plomo, plata y oro (Drewniak y Sklodowska, 2013). Los compuestos inorgánicos de arsénico más comunes en la naturaleza son el arsenato ( $\text{As}^{+5}$ ) y el arsenito ( $\text{As}^{+3}$ ), siendo éstos los que primordialmente se encuentran en agua, sedimentos y suelos. Mientras que,

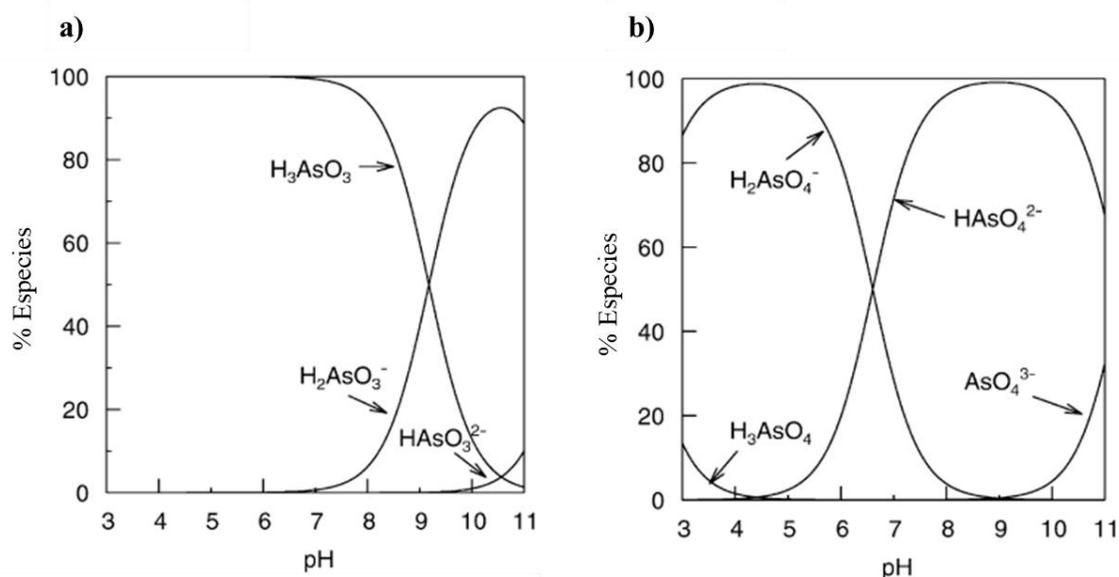
las formas orgánicas predominan en pescados y mariscos como ácido dimetilarsínico (DMA), ácido monometilarsínico (MMA), arsenobetaína y arsenocolina (Park *et al.*, 2019). El arsénico en forma gaseosa se puede unir con hidrógeno para formar arsina ( $\text{AsH}_3$ ), la inhalación de este gas puede resultar letal ya que ataca a las células rojas y la hemoglobina (Das *et al.*, 2016; Oremland y Stolz, 2003). En general, la toxicidad del arsénico depende de la especie química, aunque el arsénico inorgánico es más tóxico que el orgánico, siendo el arsenito unas 60 veces más tóxico que el arsenato (Hao *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2019).

En el ambiente, las condiciones redox son las que determinan las especies en las que se encuentra el arsénico, como se observa en la Figura 2.2. En condiciones oxidativas, como la superficie del suelo y agua, el arsénico se encuentra comúnmente como arsenato, en su estado de oxidación +5, en cualquiera de los oxianiones  $\text{H}_2\text{AsO}_4^-$  y  $\text{HAsO}_4^{2-}$  (Bruneel *et al.*, 2017). No obstante, estos aniones están condicionados al pH del medio en el que se encuentren, el primero se observa en valores de pH entre 2 y 7, mientras que el segundo predomina a valores de pH mayores a 7 (Bruneel *et al.*, 2017; Crognale *et al.*, 2017). Por otro lado, en ambientes anóxicos como aguas subterráneas, donde prevalecen condiciones reductoras, el arsénico se encuentra en su estado de oxidación +3, conocido como arsenito, en forma de las especies  $\text{H}_3\text{AsO}_3$  y  $\text{H}_2\text{AsO}_3^-$ . La molécula neutra de arsenito predomina entre un pH de 0 y 9, mientras que a valores de pH mayores a 9.2, se encuentra con carga negativa,  $\text{H}_2\text{AsO}_3^-$  (Bruneel *et al.*, 2017; Crognale *et al.*, 2017).

Los distintos estados de oxidación que el arsénico puede tener en solución le confieren distintas propiedades que impactan su movilidad. Aunque también, la movilidad del arsénico está sujeta al tipo de suelo y textura. Por ejemplo, aquellos suelos de arcilla con textura fina tienden a generar mayor resistencia a la movilidad del arsénico, en comparación con aquellos suelos con una mayor capacidad de sorción como los arenosos con textura rugosa (Gu *et al.*, 2017).

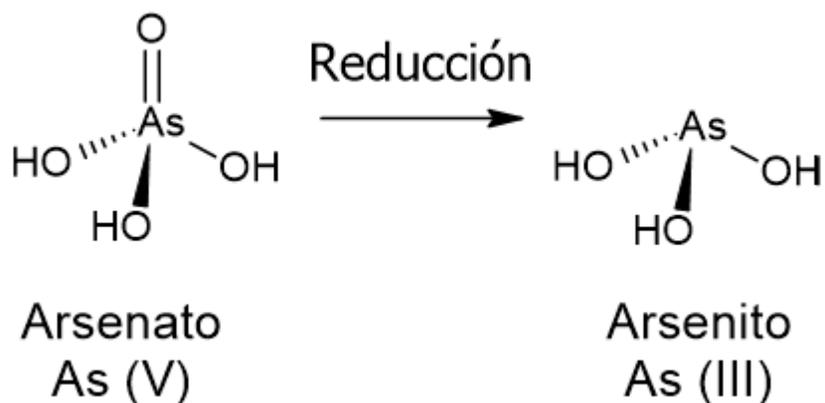
En ambientes naturales, la especie de arsénico con una menor movilidad es el arsenato ó  $\text{As}^{+5}$ , que se encuentra en su forma iónica, ya que los valores de pH son cercanos a 7 en estos ambientes. Por tanto, el arsenato tiende a ser adsorbido preferentemente en minerales que contienen óxidos de hierro. En cambio, el arsenito al encontrarse en su forma no iónica ( $\text{H}_3\text{AsO}_3$ ) se desplaza con mayor facilidad, característica que lo hace más tóxico que el

arsenato (Tsuchiya *et al.*, 2019). No obstante, el arsénico (+3) no está exento a cambios en su estado de oxidación, por ejemplo, el arsenito puede ser oxidado a la forma menos tóxica arsenato y menos soluble, permitiendo su remoción de la fase acuosa mediante precipitación con elementos como el hierro, calcio y azufre (Ostermeyer *et al.*, 2021). Por el contrario, si ocurre la reducción de As(+5) a As(+3), el arsenito es capaz de movilizarse nuevamente el ambiente (Bruneel *et al.*, 2017) (Figura 2.3).



**Figura 2.2.** Especiación de (a) arsenito y (b) arsenato en función del pH (fuerza iónica de aprox 0.01 M). Las condiciones redox son similares para que los estados de oxidación indicados dominen la especiación en ambos casos. (Tomado de Smedley y Kinniburgh, 2002).

También es posible inmovilizar al arsénico en su estado de oxidación +3 mediante la formación de complejos insolubles que facilitan su remoción, no mediante fenómenos de sorción, si no por la formación de enlaces químicos con otros elementos como el sulfuro ( $S^{2-}$ ) (Bruneel *et al.*, 2017; Drewniak y Sklodowska, 2013). La formación de estos enlaces ocurre como consecuencia de procesos de óxido-reducción, que promueven el cambio en los estados de oxidación del arsénico, y son mediados por microorganismos (Costa *et al.*, 2014).



**Figura 2.3.** Estructura química de los compuestos arsenato y arsenito. Se ejemplifica el proceso de reducción en el que un par de electrones es adquirido por el arsenato, transformándose a arsenito, dejando libre un par de electrones, aumentando su electronegatividad y con ello, su atracción hacia otros elementos (Tomado de Wilson, 2014).

Los microorganismos juegan un papel primordial en los procesos de movilización e inmovilización del arsénico, ya que se encuentran distribuidos en la mayoría de los ambientes y han logrado adaptarse a distintos ambientes con severas condiciones para la vida. El mecanismo por el cual las bacterias logran movilizar el arsénico comienza con la secreción de exopolisacáridos (Spanò *et al.*, 2023), lo que permite la adherencia y colonización de otras bacterias en la superficie de los minerales de la roca madre que contengan arsénico, ocasionando su disolución mediante la excreción de sideróforos. Se ha descrito que una mayor producción de sideróforos en bacterias provoca una mayor resistencia a arsenato y arsenito (Retamal-Morales *et al.*, 2018). Estos sideróforos son capaces de unirse a los iones metálicos en solución y en la superficie mineral, permitiendo que las bacterias usen a los metales disponibles (principalmente  $\text{Fe}^{3+}$ ) como aceptores de electrones, disolviendo el mineral y por ende, solubilizado el arsénico. Diversos estudios han demostrado que la cantidad, calidad y biodisponibilidad de materia orgánica resulta crucial para la disolución reductiva del  $\text{Fe}^{3+}$  y por lo tanto para la movilización del arsénico (Drewniak y Sklodowska, 2013; Glodowska *et al.*, 2020). Además de intervenir en la disolución de minerales de arsénico, los procesos microbianos también transforman al

arsénico ya que algunas pueden reducirlo desde  $As^{+5}$  hasta  $As^{+3}$ , especie con una mayor movilidad que el arsenato (Glodowska *et al.*, 2020).

No todas las bacterias poseen la maquinaria metabólica para poder sobrevivir y contrarrestar los efectos tóxicos del arsénico. Sin embargo, algunas bacterias poseen mecanismos que involucran la oxidación o reducción de arsenito y arsenato, respectivamente. Las bacterias capaces de oxidar arsenito pueden realizar esta función metabólica con la finalidad de detoxificación, pero se ha encontrado que también pueden utilizar el arsenito como donador de electrones para la respiración aerobia (Escudero *et al.*, 2013). Aunque la respiración de arsenito está limitada a una población de bacterias quimiolitotróficas en ambientes aerobios. De igual manera, la reducción de arsenato puede ocurrir para dos propósitos distintos: 1) para reducir su toxicidad (detoxificación) y 2) como mecanismo de respiración. En el segundo caso, el arsenato desempeña la función de aceptor terminal de electrones en la cadena respiratoria de la bacteria al usar distintos donadores de electrones para la obtención de energía (Silver y Phung, 2005).

Dentro de los procesos de detoxificación que las bacterias usan para combatir la toxicidad del arsénico también se encuentran los procesos de metilación y demetilación (Crognale *et al.*, 2017; Huang, 2014). Estos mecanismos de detoxificación ha sido reportados en hongos, bacterias y arqueas (Drewniak y Sklodowska, 2013), y ocurren principalmente en suelo y cuerpos de agua, mediante una serie de reacciones que inicia con la metilación de arsenato o arsenito, que posteriormente puede ser reducido a la forma pentavalente de arsénico, mientras que otros compuestos culminan en la volatilización como la dimetilarsina (DMAs(+3)) y trimetilarsina (TMAs(+3)) (Alam y McPhedran, 2019; Zhu *et al.*, 2014).

Debido a la importancia de los microorganismos en la especiación y distribución del arsénico en el ambiente se ha planteado su uso para poder remover el arsénico de aguas y suelos contaminados.

## 2.2 Tecnologías para la remediación de aguas contaminadas con arsénico

Diversos procesos físico-químicos han sido utilizados para la remediación de agua contaminada con arsénico, entre estos tratamientos se encuentran la coagulación/filtración, intercambio iónico, adsorción y ósmosis inversa (Plewniak *et al.*, 2018). La remediación de aguas con los tratamientos físico-químicos son mayormente efectivos para la especie de arsenato ( $\text{As}^{+5}$ ) (Bertin *et al.*, 2022), por lo que si el agua contiene arsenito se requerirá un pretratamiento para lograr la oxidación de  $\text{As}(+3)$ , generando residuos a partir del uso de agentes oxidativos (permanganato de potasio, ozono, cloro, óxido de manganeso y peróxido de hidrógeno). De tal modo que los costos operacionales incrementan y se obtienen residuos que deben disponerse apropiadamente debido a que aún pueden contener metales que suponen un riesgo para el medio ambiente (Alazard *et al.*, 2010; Crognale *et al.*, 2017). Asimismo, se ha reportado que las transformaciones del arsénico de manera abiótica pueden ocurrir, pero a diferencia de las transformaciones por acción biológica, suceden lentamente (Huang, 2014). Además, las bacterias resultan especialmente útiles por la especificidad que sus enzimas pueden tener hacia un sustrato como el arsénico, entre otros elementos tóxicos (Bertin *et al.*, 2022).

Como resultado de la exposición de arsénico en ambientes como lagos alcalinos, manantiales y drenaje ácido de mina, se han encontrado organismos que incluyen bacterias, plantas y hongos con características metabólicas que les confieren mecanismos de resistencia a este metaloide (Andres y Bertin, 2016).

En términos más generales, las diferentes estrategias metabólicas que las bacterias pueden utilizar para transformar las especies de arsénico en formas menos tóxicas están la bioacumulación, adsorción, biolixiviación, mineralización y volatilización (Kabiraj *et al.*, 2022; Plewniak *et al.*, 2018). La bioacumulación, por ejemplo, comienza con la entrada del arsénico al interior de la célula. En este caso, la bioacumulación es efectiva únicamente en células vivas, ya que está mediada por procesos que requieren energía con la participación de transportadores de membrana. La acumulación del arsénico ocurre con las especies de arsenito, que entran a la célula por canales acuagliceroporinas y posteriormente forma enlaces con los grupos sulfhidrilos de proteínas, y de este modo, se anula su reactividad

(Yin *et al.*, 2022). Así, cada bacteria posee diferentes mecanismos para acumular el arsenito, como por ejemplo *Achromobacter xylosoxidans* BHW-15, cepa extraída de aguas subterráneas en Bangladesh contaminadas con arsénico y con la capacidad de oxidar el arsenito mediada por el gen arsenito oxidasa (*aioA*). En diferentes ensayos, esta cepa fue expuesta a una concentración de arsenito de hasta 15 mM, y demostró la capacidad de almacenar intracelularmente este compuesto, posteriormente fue inmovilizada en perlas de alginato de calcio con la finalidad de determinar su capacidad de detoxificación de arsenito del medio, mostrando la capacidad de oxidar el arsenito a arsenato durante 18 días con una reconversión del medio cada 6 días. Su rendimiento de detoxificación fue de 0.0224 mM/h, el cual resultó atractivo no solo para la remediación de aguas residuales, sino también como biosensor electroquímico (Diba *et al.*, 2021).

Otra actividad metabólica de las bacterias que también se ha reportado como alternativa a los procesos de remoción de arsénico es la capacidad de producir exopolisacáridos (EPS) y excretarlos, ya que estos biopolímeros tienen la posibilidad de atrapar iones metálicos mediante procesos de adsorción. Los EPS forman una matriz compleja y con ello, previenen la entrada de dichos iones metálicos al interior de la célula. La capacidad de adsorción de los EPS ocurre debido a las interacciones entre las cargas negativas de estos polisacáridos, proporcionadas por diferentes grupos orgánicos e inorgánicos (sulfato, fosfato, ácido acético, acetilato, amina e hidroxilo), y las cargas positivas de los iones metálicos (arsénico, cobre, plomo, cadmio), lo cual resulta en su inmovilización por fuerzas electrostáticas, de Van der Waals o enlaces covalentes (Spanò *et al.*, 2023; Yin *et al.*, 2022). Distintos mecanismos de adsorción pueden ocurrir como consecuencia de otros procesos metabólicos en bacterias como la reducción de metales. Los metales, ahora en su forma reducida precipitan como óxidos de hierro y sulfuros, que tienen la capacidad de adsorber el arsénico. También se ha observado que la síntesis de nanopartículas como FeO-OH por *Klebsiella oxytoca* BAS-10 en una matriz polimérica extracelular con hidrogel, tienen capacidades de adsorción de arsénico +5 y +3 de 31.8 y 27.3 mg As/g Fe, respectivamente. Otros mecanismos reportados de adsorción para la remoción del arsénico del agua es por adsorción/coprecipitación con hidróxidos de hierro y manganeso (Crognale *et al.*, 2017).

Dentro de la diversidad de funciones bacterianas, se ha observado que la actividad de biomineralización se encuentra presente en una gran variedad de organismos, desde bacterias, hongos, y algas hasta virus; con más de 60 minerales identificados en organismos que van desde estructuras nanométricas hasta macroscópicas que les confieren diversas propiedades. Dado que algunas bacterias con estas capacidades son resistentes a metales tóxicos, este proceso de inmovilización es de gran relevancia para la remoción de contaminantes del suelo y agua como lo es el arsénico (Qin *et al.*, 2020).

Por ejemplo, las bacterias reductoras de arsenato en combinación con las bacterias reductoras de sulfato han sido reportadas con la capacidad de disminuir la presencia de arsénico disuelto al producir arsenito y sulfuro, respectivamente, que interactúan químicamente entre sí para formar minerales de sulfuro de arsénico (Plewniak *et al.*, 2018). Dichos minerales de arsénico, como el oropimente ( $As_2S_3$ ) o rejalgar ( $As_4S_4$ ), resultan estables en ambientes anaerobios y subóxicos. Además, la formación biológica de sulfuros de arsénico tiene otras ventajas sobre los tratamientos fisicoquímicos al prescindir de un equipo sofisticado, el escalamiento del tratamiento es sencillo, genera pocos residuos, requiere de sustratos de bajo costo, y evita pretratamientos que demanden el ajuste de pH y oxidación previa de  $As(+3)$  a  $As(+5)$ . Por lo tanto, la remediación del arsénico utilizando a estos microorganismos, con la capacidad de producir sulfuros de arsénico, resulta atractiva para la remoción del arsénico (Alam y McPhedran, 2019).

Se puede destacar que las bacterias presentan diferentes mecanismos de adaptación a su entorno que dependen de condiciones como pH, potencial redox y contenido de materia orgánica (Darma *et al.*, 2021). Por lo tanto, las bacterias desarrollaron mecanismos y adaptaciones particulares para lidiar con el arsénico y el estudio de estas estrategias brinda una visión más amplia que posibilite el desarrollo de nuevas metodologías de remediación de arsénico.

### **2.3 Procesos metabólicos involucrados en las transformaciones del arsénico y diversidad microbiana asociada**

En 1918 se descubrió que las bacterias son capaces de contrarrestar el efecto tóxico del arsénico a través de la oxidación del arsenito a una forma menos tóxica, arsenato (García-Domínguez *et al.*, 2008). A partir de esto, comenzaron a realizarse investigaciones sobre los mecanismos que las bacterias empleaban para enfrentar al arsénico. Después se descubrió la arsenato reducción como mecanismo de detoxificación y en 1994, se observó la reducción de arsenato para la obtención de energía (proceso respiratorio), y cuya enzima es codificada por el gen *arrA* (Páez-Espino *et al.*, 2009).

La diversidad de bacterias que pueden sobrevivir a ambientes contaminados con arsénico está determinada por las condiciones del medio en el que se encuentran, usualmente en ambientes donde el arsénico está presente, otros metales como hierro, azufre, entre otros también están presentes. Por lo tanto, algunas bacterias que pueden usar nitrato, sulfato, selenito, tiosulfato, nitrito y especies de hierro como aceptores de electrones también han mostrado su capacidad para respirar arsenato (Suhadolnik *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2017).

#### **2.3.1 Procesos metabólicos que permiten transformar el arsénico**

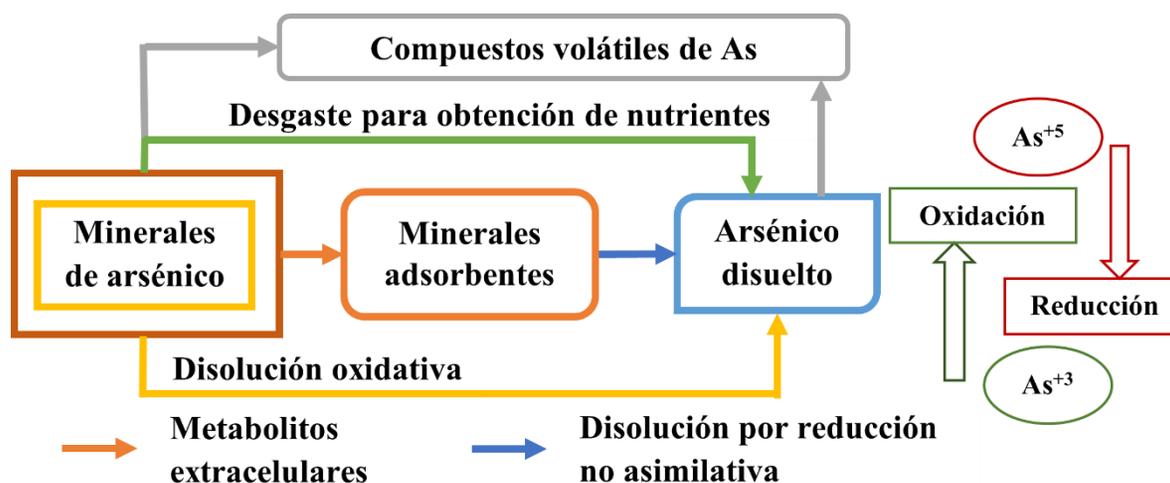
Debido a la ubicuidad del arsénico en el ambiente, podemos decir que casi todos los seres vivos poseen mecanismos de detoxificación para tolerar o reducir su toxicidad. Los procariotes son los organismos que poseen una variedad más amplia de metabolismos para transformarlo, ya que lo pueden usar como una fuente de energía (o aceptor de electrones) en procesos de respiración, o incorporarlo en moléculas estables (Rosen *et al.*, 2011). Cabe destacar que las bacterias no poseen sistemas de transporte específicos para introducir arsénico a la célula (Crognale *et al.*, 2017) y el arsenato entra a las células mediante los transportadores de fosfato (Pit y Pst); en células eucariotas y arqueas se han encontrado transportadores similares a los de bacterias. Por otro lado, el arsenito entra a las células procariotes mediante acuaglicerolporinas, canales que facilitan la entrada de ácidos grasos y urea (Páez-Espino, *et al.*, 2009; Rosen y Liu, 2009).

Para sacarlo de las células y combatir su toxicidad, los procariotes poseen enzimas para reducir el arsenato a arsenito y transportadores para expulsar el arsenito fuera de la célula a través de una bomba de eflujo (Bruneel *et al.*, 2017), este mecanismo confiere la tolerancia al arsénico. Sin embargo, en algunos microorganismos existen enzimas especializadas que permiten reducir arsenato a arsenito para obtener energía mediante un proceso de respiración y con un donador de electrones apropiado. Otros microorganismos evolucionaron para oxidar el arsenito hasta arsenato, donde el arsenito actúa como un donador de electrones (Rosen *et al.*, 2011).

De este modo, los procariotes son los responsables de las transformaciones del arsénico en el ambiente. En particular, Drewniak y Sklodowska (2013) propusieron un modelo conceptual de las transformaciones del arsénico en ambientes mineros (Fig. 2.4), donde plantean que un conjunto de distintas bacterias son las responsables de los distintos cambios en el estado de oxidación del arsénico. Primero, las bacterias quimiolitautotróficas y tolerantes al arsénico son las involucradas en la disolución de minerales de arsénico como realgar ( $\text{AsS}/\text{As}_4\text{S}_4$ ), arsenopirita ( $\text{FeAsS}$ ), oropimente ( $\text{As}_2\text{S}_3$ ), gersdorffita ( $\text{NiAsS}$ ) y lollingita ( $\text{FeAs}_2$ ). Las bacterias quimiolitautotróficas usan metales como hierro, arsénico y azufre para la producción de energía, mientras que las tolerantes al arsénico producen metabolitos extracelulares como exopolisacáridos, sideróforos, y ácidos orgánicos que permiten la disolución de los minerales. Segundo, las bacterias que efectúan la reducción no asimilativa (respiración) de arsénico o hierro disuelven los óxidos de hierro, como goetita ( $\text{FeO}\cdot\text{OH}$ ), magnetita ( $\text{Fe}_2\text{O}_4$ ), hematita ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) y ferrihidrita ( $\text{Fe}_5\text{HO}_8 \times 4\text{H}_2\text{O}$ ) (Huang, 2018) que contienen arsenito y/o arsenato. Finalmente, el arsenato y arsenito disueltos están sujetos a transformaciones de manera constante por los microorganismos (Drewniak y Sklodowska, 2013).

La información sobre las comunidades microbianas involucradas en la transformación del arsénico es muy amplia y se han estudiado en una gran variedad de ambientes, por ejemplo en sedimentos, agua de acuíferos profundos, ríos, lagos, jales mineros, y minas abandonadas, entre muchos otros (Dunivin *et al.*, 2019). Los microorganismos que metabolizan arsénico también se han encontrado en ambientes con temperaturas extremas, como en turberas de Finlandia en donde bacterias de los géneros *Pseudomonas*,

*Rhodococcus*, *Rhodoferax*, y *Polaromonas* entre otras, se encontraron en comunidades capaces de oxidar, reducir, o detoxificar arsénico a temperaturas entre 2 y 5 °C (Ziegelhöfer y Kujala, 2021).



**Figura 2.4.** Esquema que representa a las actividades de bacterias en ambientes mineros y que influyen en las transformaciones del arsénico. (Adaptado de Drewniak y Sklodowska, 2013)

En ambientes más complejos como en el delta fluvial Bengalí, en Bangladesh, donde desembocan varios ríos y acarrearán sedimento de otras regiones, las comunidades estaban compuestas por *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Brevundimonas*, *Polaromonas*, *Rhodococcus*, *Methyloversatilis* y *Methylotenera*, con capacidades metabólicas de reducción de arsenato para la detoxificación y respiración; así como oxidación de arsenito, actividades características en las zonas óxicas/anóxicas de sistemas acuíferos superficiales.

No obstante, es importante resaltar que estas especies también pueden tener otras capacidades metabólicas que se ajustan a las condiciones ambientales complejas, ya que en este caso se observó que las comunidades además pueden usar hidrocarburos poliaromáticos como fuente de carbono y utilizar el par  $As(+5)$  y  $Fe(+3)$  como aceptor final de electrones (Paul *et al.*, 2015). En su conjunto, la presencia de microorganismos con capacidad de metabolizar arsénico en una gran variedad de ambientes se puede explicar por la ubicuidad de este metaloide en la biósfera.

### 2.3.2 Microorganismos involucrados en la respiración de arsenato ( $\text{As}^{+5}$ ) – reducción del arsénico

Bajo condiciones reductoras, la especie predominante de arsénico es el arsenato. Algunos procariones son capaces de reducir el arsenato hasta arsenito al usarlo como aceptor final de electrones, metabolismo conocido como respiración de arsénico. Para la reducción, los microorganismos pueden usar diversos donadores de electrones, desde moléculas muy sencillas ( $\text{H}_2$ ), ácidos orgánicos de cadena corta (lactato, citrato, propionato), hasta sustancias aromáticas complejas como benzoato y tolueno (Crognale *et al.*, 2017).

La mayoría de los procariones identificados como respiradores de arsénico pertenecen al dominio bacteria y se agrupan en varias clases del filo Proteobacteria como *Beta*, *Gamma*, *Delta* y *Épsilon*, así como del filo de *Firmicutes*. También destacan los miembros del filo *Chrysiogenetes* (Andres y Bertin, 2016), los cuales han sido identificados como anaerobios estrictos con capacidad de utilizar ácidos grasos de cadena corta como donadores de electrones y arsenato o selenato como aceptores finales de electrones; además de algunos miembros capaces de respirar nitrito y nitrato (Bini *et al.*, 2011). Mientras que algunos miembros del filo *Deferribacteres* pertenecientes al género *Deferribacter* (anaerobios termofílicos), son capaces de crecer con azufre elemental, nitrato, o arsenato como aceptores de electrones y como donador pueden usar diversos ácidos orgánicos o incluso etanol (Andres y Bertin, 2016; Takai *et al.*, 2003). En el dominio *Archea*, hasta ahora solo se han detectado dos géneros pertenecientes al filo *Chrenarcaeota*, *Pyrobaculum arsenaticum* y *P. aerophilum*, ambos son hipertermófilos y autótrofos facultativos (Andres y Bertin, 2016). *P. arsenaticum* además de arsenato puede usar azufre elemental como aceptor de electrones, mientras que *P. aerophilum* puede usar una amplia gama de aceptores de electrones como oxígeno, nitrato, nitrito, selenato, selenito y hierro (3+) (Cozen *et al.*, 2009).

Dentro del filo de las proteobacterias, algunos géneros capaces de reducir arsénico son: *Gallionella* e *Hydrogenphaga* (*Betaproteobacteria*), géneros comunes en el agua de acuíferos profundos que también pueden disolver hierro de óxidos de manganeso y hierro. En este sentido, la mayoría de los miembros de la clase *Deltaproteobacteria* se caracterizan por usar distintos aceptores de electrones y participan ampliamente en la reducción de

hierro y azufre en el ambiente. Algunos géneros que se han asociado con la reducción de arsenato son *Desulfomicrobium*, *Desulfuromonas* y *Geobacter* (Kujala *et al.*, 2020).

Dentro de la clase *Gammaproteobacteria* los miembros del género *Acinetobacter* poseen un metabolismo del arsénico muy versátil, ya que lo pueden oxidar, reducir (respirar) o detoxificar. Mientras que algunas especies de *Shewanella* (*Shewanella* sp. ANA-3), pueden reducir  $As^{+5}$  y  $Fe^{+3}$  de fases minerales sólidas, por ejemplo ferrihidrita con arsénico (Zhu *et al.*, 2017). Muchos géneros de *Pseudomonas* también han mostrado su capacidad para reducir arsenato y puede ser predominante cuando se cultivan comunidades a partir de agua de acuíferos profundos. Los miembros de este género también son muy versátiles ya que pueden oxidar y reducir arsénico, así como metilarlo (Zecchin *et al.*, 2021). Finalmente, dentro de la clase *Epsilonproteobacteria* destaca *Sulfurospirillum* con la presencia de los genes *arrA* dentro de su genoma (Suhadolnik *et al.*, 2017).

En el filo *Firmicutes* también se encuentran muchos ejemplos de géneros con capacidad para reducir arsenato y destacan: *Desulfitobacterium*, *Desulfotomaculum*, *Desulfuribacillus*, *Sedimentibacter* y *Exiguobacterium* por mencionar algunos (Rios-Valenciana *et al.*, 2023). Muchas de estas bacterias también pueden reducir sulfato y formar endoesporas, como por ejemplo las bacterias del género *Desulfosporosinus* (Alazard *et al.*, 2010). Otras pueden realizar disolución reductiva de minerales como la scorodita ( $FeAsO_4 \cdot 2H_2O$ ), usando acetato como donador de electrones, tal es el caso de la cepa *Desulfotomaculum auripigmentum* OREX-4 (Drewniak y Sklodowska, 2013).

### 2.3.3 Detoxificación del arsénico

La forma más común con la que los organismos pueden lidiar con la toxicidad del arsénico es mediante la reducción de  $As^{+5}$  y los sistemas de eflujo de  $As^{+3}$ , los cuales se han estudiado ampliamente en microorganismos y en organismos superiores (Zhu *et al.*, 2017). Como se mencionó anteriormente, el arsenato entra fácilmente a la célula al ser confundido con el fosfato donde es reducido hasta  $As^{+3}$  que es más tóxico, lo cual puede resultar contra intuitivo. Sin embargo, tal parece que los microorganismos primitivos desarrollaron los sistemas de eflujo cuando la atmósfera era reductiva, mismos que permanecieron cuando la

atmósfera se volvió oxidante (Zhu *et al.*, 2017). La reducción de arsénico para la detoxificación se logra mediante una enzima arsenato reductasa citoplasmática y el sistema de eflujo de arsenito en la membrana (Andres y Bertin, 2016). Al igual que los microorganismos capaces de oxidar o reducir arsénico, los microorganismos que lo toleran se han aislado a partir de una gran variedad de ambientes. Por ejemplo, en suelos de manglares se ha observado una gran abundancia de microorganismos que poseen los sistemas para la detoxificación de arsénico (Dunivin *et al.*, 2019). Otros autores han indicado una correspondencia entre la presencia de bacterias tolerantes al arsénico en aquellos ambientes con una mayor concentración del metaloide (Gu *et al.*, 2017). Ejemplos típicos de géneros que poseen resistencia al arsénico son *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* (Páez-Espino *et al.*, 2009).

Cabe aclarar que no todas las bacterias resistentes al arsénico pueden tolerar los mismos niveles de arsénico y el efecto que ocasiona el incremento de la concentración de arsénico en el ambiente es una presión selectiva sobre la comunidad bacteriana, que genera una menor diversidad. Este fenómeno se pudo observar en la composición de una comunidad microbiana de tres sitios con diferentes concentraciones de arsénico en un estudio realizado en sedimentos del río Camarones en Chile. Se determinó que en suelos con una menor concentración de arsénico en sedimentos (128 mg/kg), había una mayor diversidad de bacterias, comparado con la zona de mayor concentración de arsénico (498 mg/kg). Posteriormente, se inocularon bacterias provenientes de estos sedimentos y se caracterizó su capacidad de reducción de arsenato identificando miembros del género *Pantoea*, perteneciente a *Gammaproteobacterias* como el de mayor porcentaje de detoxificación de arsenato mediante los genes *arsC* (98%), aislado de sedimentos con hasta 498 mg/kg de arsénico en sedimento. También se identificaron a los géneros de *Pseudomonas* con un porcentaje de detoxificación de arsenato de 95%, seguido de *Sphingomonas*, 80%; *Aeromonas*, 75% y *Acinetobacter*, 70%. Por otro lado los sedimentos con una menor concentración de arsenato en sedimento, al ser inoculados, únicamente reportaron un porcentaje de detoxificación de arsenato entre 10-40 % realizado por miembros de las clases: *Alfa*, *Beta*, *Gamma-proteobacterias* y *Firmicutes* (Leon *et al.*, 2018).

Entre otros géneros bacterianos identificados con los genes para la detoxificación de arsenato han sido *Rhodococcus aetherivorans* y *Corynebacterium glutamicum* pertenecientes al *phylum* de *Actinobacterias* (Firrincielli *et al.*, 2019), así como miembros del género *Geobacter*, pertenecientes a la clase de *Deltaproteobacterias* y *Sphingomonas*, de la clase de *Alphaproteobacterias* (Gu *et al.*, 2017).

#### **2.3.4 Reducción de arsenato combinada con la reducción de sulfato**

Las bacterias sulfato-reductoras usan el sulfato como aceptor final de electrones para producir sulfuro, algunas de ellas también son capaces de realizar arsenato reducción simultáneamente (Alam y McPhedran, 2019). Las bacterias sulfato-reductoras destacan por su capacidad de promover la formación de minerales de sulfuro en presencia de metales en solución (Alazard *et al.*, 2010). Los nanocristales de sulfuros metálicos derivados de procesos de sulfato reducción en presencia de metales como cobre, zinc, hierro, y arsénico pueden ser empleados también como recubrimientos de superficies, nanoswitches, componentes en paneles solares, absorbentes de radiación y fotocatalizadores (Costa *et al.*, 2016). Los minerales de sulfuro, en especial los compuestos por arsénico cuentan con diversas propiedades ópticas que los convierten en materiales atractivos para los físicos y los científicos de materiales debido a los cambios en sus propiedades fisicoquímicas foto-inducidas, las cuales pueden ser reversibles o irreversibles (Bindi *et al.*, 2015). Estas propiedades han sido de especial atención para su aplicación en la industria optoelectrónica y se ha encontrado especialmente favorable la síntesis de estos minerales en forma de nanopartículas (Baláž *et al.*, 2011).

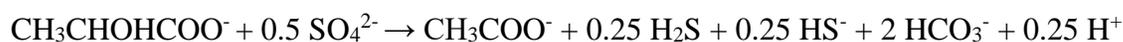
Para la mineralización del arsénico y sulfuro se requiere de un donador de electrones para que las bacterias realicen los procesos de arsenato- y sulfato-reducción. Los donadores de electrones más comunes para la sulfato-reducción son sencillos y de cadena corta como por ejemplo: acetato, etanol, hidrógeno, glicerol, y lactato; aunque también pueden usar sustratos complejos como melazas. El lactato es el más adecuado para la sulfato-reducción y la generación de una mayor cantidad de biomasa. No obstante, el lactato puede oxidarse

de manera completa o incompleta hasta acetato ya que algunas bacterias sulfato-reductoras no pueden oxidar acetato (Alam y McPhedran, 2019).

Las reacciones estequiométricas para la oxidación completa (Reacción 2.1) y la incompleta a acetato (Reacción 2.2) se muestran a continuación:



(Reacción 2.1)



(Reacción 2.2)

Del mismo modo que la sulfato reducción, utilizando lactato como donador de electrones, se realiza la reducción del arsenato a arsenito y se ejemplifica en la siguiente reacción (Alam y McPhedran, 2019):



(Reacción 2.3)

De la reacción anterior se puede observar la formación de acetato, por la oxidación incompleta del lactato, compuesto que puede estar disponible para las bacterias sulfato-reductoras para ser utilizado también como donador de electrones durante la arsenato reducción (Alam y McPhedran, 2019). La Reacción 2.4 presenta la oxidación de acetato simultánea con la arsenato reducción por bacterias sulfato-reductoras/arsenato-reductoras:



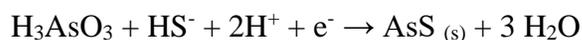
(Reacción 2.4)

Finalmente, para la obtención de los minerales de sulfuro, el arsenito precipita como sulfuro de arsénico cuando reacciona con el sulfuro. La estequiometría de las reacciones

para la formación de los sulfuros de arsénico se muestran a continuación, obteniendo oropimente (Reacción 2.5) y rejalgar (Reacción 2.6).



(Reacción 2.5)



(Reacción 2.6)

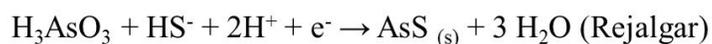
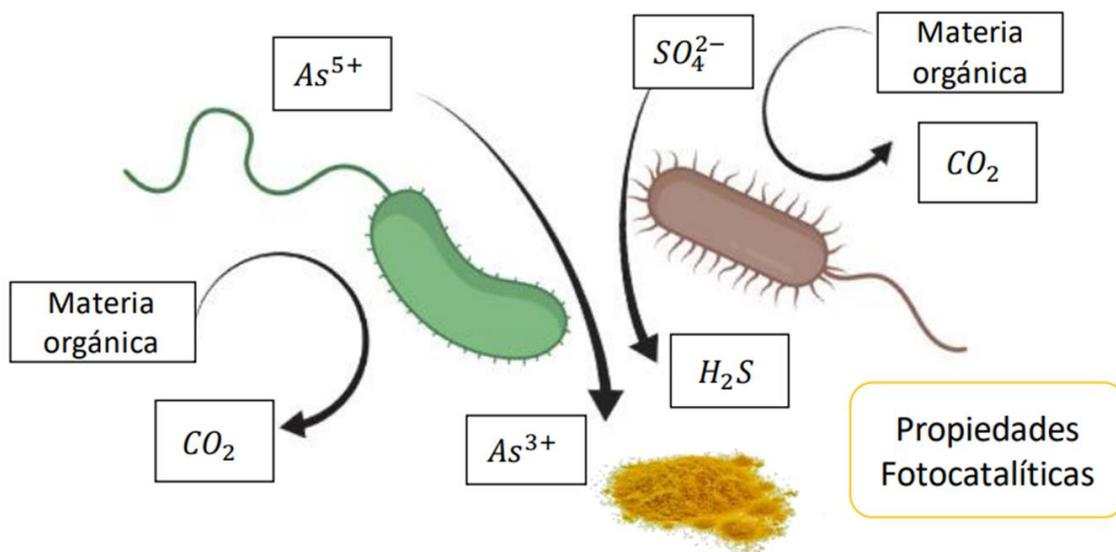
Los sulfuros y la alcalinidad que se producen por la oxidación del lactato y en general, de compuestos orgánicos simples, proveen las condiciones favorables para la formación de enlaces entre el sulfuro y el arsénico (Drewniak y Sklodowska, 2013).

En la Figura 2.5 se presenta un esquema simplificado de las interacción entre bacterias arsenato- y sulfato-reductoras para la formación de minerales de sulfuro y arsénico como oropimente ( $\text{As}_2\text{S}_3$ ) y rejalgar ( $\text{AsS}$ ). Estos minerales son obtenidos con bacterias sulfato reductoras en ambientes reducidos, por lo que, si estos estos minerales se encuentran en ambientes oxidantes y/o en presencia de altas concentraciones de compuestos de sulfuro, pueden disolverse nuevamente en el medio (Sun *et al.*, 2016).

El cambio en las condiciones puede promover entonces la redisolución de los sulfuros de arsénico, por ejemplo: un ambiente oxidante puede promover la formación de arsenito a partir de los minerales de sulfuro y una alta concentración de sulfuros puede promover la formación de tioarsenatos, como  $\text{HAsS}_3\text{O}^{2-}$  y  $\text{AsS}_4^{3-}$ , que promovería la solubilidad del arsénico en el medio. De igual manera, un incremento en el pH y de la concentración de oxígeno disuelto en el medio también puede provocar la solubilización de los sulfuros de arsénico (Mirazimi y Liu, 2021; Sun *et al.*, 2016).

Por lo tanto, las reacciones de reducción que finalizan con la precipitación de minerales de sulfuro de arsénico son complejas y dependientes del pH del medio (Alazard *et al.*, 2010). La reducción del sulfato y arsenato también depende de la concentración inicial del

arsénico, del sulfuro producido y del tipo de microorganismo que esté catalizando las reacciones (Alam y McPhedran, 2019).



**Figura 2.5.** Esquema que representa el acoplamiento de bacterias arsenato reductoras y sulfato reductoras para la biomineralización de sulfuros de arsénico. También se muestran las reacciones para la formación de oropimente y rejalgam. Las dos bacterias podrían ser bacterias sulfato-reductoras o una bacteria sulfato-reductora con una bacteria arsenato-reductora.

Entre los géneros de bacterias sulfato reductoras que también son capaces de respirar arsénico se encuentran *Desulfovibrio* que pertenece a *Deltaproteobacteria* y *Desulfomicrobium* y *Desulfosporosinus*, que pertenecen a *Firmicutes* (Alam y McPhedran, 2019). Debido a que algunas de ellas pueden también reducir el arsénico, en este estudio nos enfocaremos en aquellas bacterias que tengan esta capacidad de reducción de arsenato y sulfato, que promuevan la formación de minerales de sulfuro de arsénico para la biorremediación de aguas contaminadas con este metaloide. Para que las bacterias puedan lograr esta mineralización del sulfuro deben entonces contar con los genes que le permitan reducir el arsénico.

## **2.4 Genes funcionales en las transformaciones del arsénico**

### **2.4.1 Genómica funcional**

En los ecosistemas se puede encontrar una gran cantidad de servicios ambientales y estos se encuentran relacionados con la biodiversidad del ecosistema en cuestión. En este sentido, las comunidades microbianas son las que proveen gran parte de las funciones de un ecosistema, ya que intervienen en procesos cruciales como la producción primaria, descomposición de materia orgánica, ciclo de nutrientes, regulación climática, propagación de enfermedades y transformación de contaminantes (Escalas *et al.*, 2019). Entre las enzimas que las bacterias emplean para realizar estas actividades mencionadas podemos encontrar a las celulasas, proteasas, lipasas/esterasas, glicosidasas, quitinasas/xilanasas, fosfatasas; que son biocatalizadores que han sido aisladas de bacterias que se encontraban en diversos ecosistemas con aplicaciones en la investigación, industria química y farmacéutica (Plewniak *et al.*, 2018).

Los microorganismos son capaces de realizar estos procesos a través de la transferencia de electrones y elementos, modificando de este modo los sistemas ambientales, con repercusiones a nivel local, regional e incluso global. Mediante disciplinas como la microbiología y biología molecular se pueden ligar las actividades microbianas con la biogeoquímica de elementos como el arsénico (Huang, 2014).

Con la secuenciación masiva, se ha incrementado la cantidad de información genética, que en conjunto con herramientas bioinformáticas han ampliado la visión sobre las comunidades microbianas, su función y fisiología. El análisis de la respuesta de las comunidades microbianas en términos de diversidad y dinámica poblacional ante perturbaciones en su ambiente puede incrementar nuestro conocimiento sobre procesos naturales de remediación, donde se identifiquen a bacterias clave con características que permitan el diseño de bioprocesos dirigidos a la intervención de un ambiente para la eliminación de compuestos tóxicos. En este sentido, los estudios genómicos de los microorganismos y sus comunidades son importantes para comprender la interacción que existe entre el arsénico y sus actividades metabólicas (Bertin *et al.*, 2022), ya que dichas

actividades mediadas por enzimas son codificadas por regiones específicas en el genoma de la bacteria. En la Tabla 2.1 se presentan algunos de los genes relacionados con el metabolismo, ya sea de reducción u oxidación de arsénico, así como aquellos que confieren resistencia a la toxicidad del arsénico.

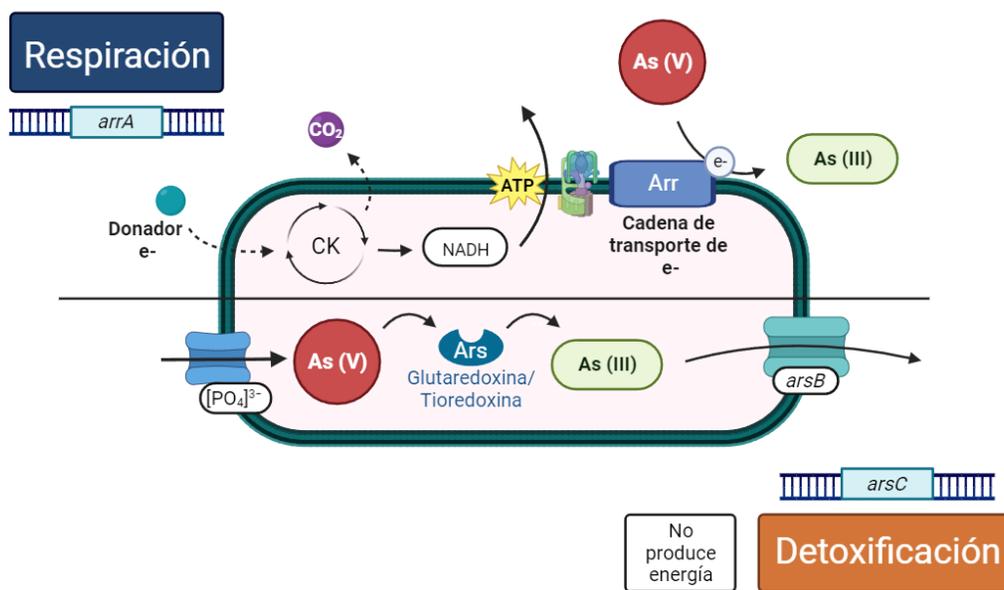
**Tabla 2.1.** Tabla de los genes involucrados en el metabolismo del arsénico en diferentes bacterias relacionados con el metabolismo y resistencia

Gen	Descripción funcional	Referencias
<i>arsC</i> Grx	Arsenato reductasa (detoxificación)	Escudero <i>et al.</i> , 2013
<i>arsC</i> Trx	Arsenato reductasa (detoxificación)	Escudero <i>et al.</i> , 2013
<i>acr3</i>	Bomba de expulsión de arsenito (Mayor afinidad que <i>arsB</i> )	Firincieli <i>et al.</i> , 2019
<i>arsB</i>	Bomba de expulsión de arsenito	Firincieli <i>et al.</i> , 2019
<i>arsD</i>	Represor transcripcional y metalo-chaperona para bomba de eflujo	Tsuchiya <i>et al.</i> , 2019
<i>arsA</i>	ATPasa para la traslocación de arsenito al exterior de la célula	Firincieli <i>et al.</i> , 2019
<i>arsR</i>	Represor de transcripción del gen <i>arsC</i>	Kang <i>et al.</i> , 2016
<i>arrA</i>	Arsenato reductasa respiratoria	Andres y Bertin, 2016
<i>aioA/B</i>	Arsenito oxidasa	P. S. Costa <i>et al.</i> , 2014
<i>arsM</i>	Arsenito metiltransferasa	Dunivin <i>et al.</i> , 2019
<i>arxA</i>	Arsenito oxidasa	Costa <i>et al.</i> , 2014

Existen dos mecanismos regulados genéticamente por los cuales las bacterias pueden reducir As(+5). El primero usa As(+5) como aceptor de electrones en la respiración y de este modo generar energía para la bacteria. Mientras que el segundo reduce el arsénico en el citoplasma, como mecanismo de detoxificación (Shi *et al.*, 2020). La regulación de estas actividades está controlada por una serie de genes que forman parte de operones (Andres y Bertin, 2016). En este sentido, la respiración es regulada por el gen *arrA* y la detoxificación es regulada por el gen *arsC* (Shi *et al.*, 2020) los cuales son, a su vez, inducidos por la concentración de arsénico (+3) (Tsuchiya *et al.*, 2019). Aunque se ha reportado que para el

gen *arrA*, en *Shewanella sp.* cepa ANA-3, el arsenato también puede inducir su expresión (Murphy *et al.*, 2009). En cuanto a la oxidación de arsénico, está regulado por el operón *aio* (Nie *et al.*, 2021). La expresión de los genes para la oxidación de arsenito está regulada por la presencia de otro gen, activado por la concentración de arsenito, el represor *arsR*. (Murphy y Saltikov, 2009). En esta tesis, los genes funcionales que más interesan son los de reducción de arsénico, específicamente el de detoxificación.

En la Figura 2.6 se presenta un esquema general de los mecanismos utilizados por diferentes bacterias para poder realizar la detoxificación y respiración de arsenato, mecanismos que se describen con más detalle en las secciones posteriores.



**Figura 2.6.** Esquema que representa los mecanismos de reducción del arsenato, para la respiración y detoxificación en bacterias mediante los genes funcionales *arrA* y *arsC*, respectivamente. Ars: Proteína arsenato reductasa para la detoxificación; Arr: Proteína arsenato reductasa de respiración; [PO<sub>4</sub>]<sup>3-</sup>: Transportador de fosfato; CK: Ciclo de Krebs.

Los genes funcionales *arrA*, *arsC* y *aio* han sido usados con éxito para la caracterización de comunidades en diversos sitios contaminados con arsénico. Por ejemplo, en sedimentos de

una de las zonas mineras más grandes de la región de Brasil fueron identificaron los genes capaces de realizar diversas actividades metabólicas relacionadas con el ciclo biogeoquímico del arsénico. Ahí, se identificaron los genes para la arsenato reductasa (*arsC* y *arrA*) y para la arsenito oxidasa (*aioA*), mediante el cultivo del sedimento en medio enriquecido para favorecer a las bacterias resistentes al arsénico. A partir del clonaje de los genes se pudo determinar que el género con mayor abundancia el sitio contaminado con arsénico fue *Bacillus*, y que está relacionado con la oxidación y reducción de este metaloide, por la presencia de los tres genes en su genoma (Costa *et al.*, 2014).

De igual manera, la genómica funcional puede proporcionar más información acerca de las diferencias en la diversidad genética y la influencia de los nutrientes sobre distintos ambientes que ante los efectos tóxicos de metaloides como el arsénico puedan responder de manera distinta.

En su conjunto, los resultados ejemplificados y los de otros estudios, destacan la relevancia de combinar distintas herramientas para explicar y entender mejor la ecología y evolución de bacterias que participan en la biogeoquímica del arsénico. Dicho conocimiento, puede ser explotado para la solución de problemas relacionados con la contaminación de arsénico.

#### **2.4.2 Genes funcionales de la reducción de arsenato**

Para que un procarionte pueda usar arsenato ( $\text{As}^{+5}$ ) como aceptor final de electrones en un proceso de respiración y obtener energía, se requiere de la presencia de los genes integrados en el operón *arrAB*. Este operón codifica para dos subunidades de proteínas, el gen *arrA* que codifica para una arsenato reductasa involucrada en la respiración de arsénico y que puede estar localizada en la membrana citoplasmática (bacterias Gram-positivas) o en el periplasma (bacterias Gram-negativas) (Fig. 2.6). El operón también incluye el gen *arrB*, que codifica para una proteína transportadora de electrones desde la cadena de transporte de electrones hasta la arsenato reductasa (Andres y Bertin, 2016; Escudero *et al.*, 2013; Osborne *et al.*, 2015). Las bacterias que respiran arsenato presentan una ventaja sobre las que únicamente detoxifican, ya que la enzima *Arr* al estar en el periplasma, es capaz de

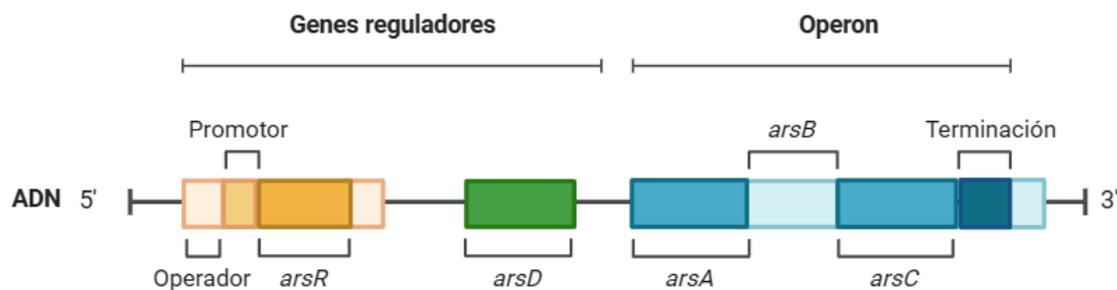
reducir el arsenato que se encuentra disuelto en el medio y también el que se encuentra adsorbido (Suhadolnik *et al.*, 2017).

La respiración de arsénico, no solo se ha encontrado en bacterias anaerobias obligadas sino también en bacterias anaerobias facultativas e inclusive arqueas (Costa *et al.*, 2014). En este sentido, la presencia de los genes *arrA* ha sido reportada en sitios con distintas concentraciones de oxígeno disuelto cerca de la saturación (1.5-10.8 mg O<sub>2</sub>/L) (Escudero *et al.*, 2013). Aunque esto se deba más bien a una relación entre los genes de oxidación de arsenito y el de respiración de arsenato (*arrA*). Por ejemplo, se ha encontrado que en cultivos enriquecidos en presencia de oxígeno, las bacterias que respiran arsenato podrían estar en el cultivo a pesar de estar inhibidas (Costa *et al.*, 2014). Lo anterior también podría estar relacionado con la actividad bidireccional de la enzima codificada por el operón *arr*, que tiene la capacidad de reducir arsenato y oxidar arsenito, como se ha encontrado en *Alkaliphilus oremlandii* y *Shewanella sp. ANA-3* (Singh *et al.*, 2021).

### **2.4.3 Genes funcionales de la detoxificación del arsénico**

Para prevenir la entrada de el arsénico a la célula, algunas bacterias han desarrollado una mayor selectividad para el fosfato y el transportador de glicerol, aunque el arsenato y arsenito pueden filtrarse por estos canales, respectivamente. Sin embargo, una vez que el arsenato se encuentra dentro de la célula, una bomba de eflujo dependiente de ATP (requiere energía), se emplea para la expulsión del arsénico en forma de arsenito. Para lo anterior, el arsenato debe ser reducido previamente por una arsenato reductasa citoplasmática codificada por el gen *arsC* (Drewniak y Sklodowska, 2013). Este gen está acompañado de una serie de genes que en conjunto conforman el operón *ars*. Este operón se encuentra ampliamente distribuido en un gran número de bacterias y otros organismos, siendo incluso más predominante que los operones involucrados en la síntesis de triptófano (Fekih *et al.*, 2018).

El operón *ars* puede estar integrado por tres (*arsRBC*) o cinco (*arsRDABC*) genes que han sido organizados en una misma unidad transcripcional (Fekih *et al.*, 2018), en la Figura 2.7 se muestra un esquema de este operón.



**Figura 2.7.** Esquema que representa al operón *ars* que contiene a los genes estructurales *arsA*, *arsB* y *arsC*; y dentro de los reguladores al represor *arsR* y la chaperona *arsD*. (Adaptado de Singh y Manel del Valle, 2023)

Una vez que se reduce el  $As(+5)$  hasta  $As(+3)$  por la arsenato reductasa citoplásmica se requiere la expulsión del  $As(+3)$ , ya que el arsénico dentro del citoplasma continúa siendo un peligro por su toxicidad. Esto se logra a través de una bomba de expulsión codificada por los genes *arsB* o *acr3*. Las proteínas codificadas por dichos genes tienen una actividad antiporter para un cambio de protones con  $As(OH)_3$ , que es la forma de  $As(+3)$  a pH neutro (Fig. 2.6). La proteína codificada por el gen *acr3* tiene una mayor afinidad para  $As(+3)$  y se encuentra en mayor medida en bacterias, arqueas y eucariotes, que la que codifica *arsB* (Firrincieli et al., 2019).

En el operón *ars*, también se encuentran los genes que regulan la actividad de detoxificación (gen *arsR*); la transcripción del operón *ars* se activa mediante la interacción de la proteína ArsR con el arsenito y comienza la reducción del arsenato (Kang et al., 2016). El resto de los genes en el operon codifican para proteínas chaperonas u otras bombas de eflujo de arsenito (Tsuchiya et al., 2019).

Se ha identificado que el gen *arsC* puede estar integrado a los cromosomas de eucariotes como *Sacharomyces cerevisiae* o en plásmidos en diversos microorganismos lo que sugiere que el gen *arsC* ha sido objeto de varias transferencias horizontales (Jackson y Dugas, 2003). Esta idea es respaldada por la presencia de los genes *arsC*, no exclusiva en plásmidos, sino también en transposones e islas genéticas, lo que puede permitir a las

bacterias compartir su información genética con otras para la resistencia a arsénico a través de la transferencia horizontal de genes (Fekih *et al.*, 2018).

Algunos reportes indican que la presencia de los genes *arsC* y *arrA* no son mutuamente excluyentes y existen casos que comprueban la presencia de ambas funciones por la presencia de dichos genes, como en el caso de *Shewanella* sp. (Escudero *et al.*, 2013). Aun cuando respirar arsénico parece ser más beneficioso para las bacterias, al generar energía para el crecimiento celular, el gen *arsC*, se ha identificado como el mecanismo de detoxificación de arsénico más frecuentemente encontrado en bacterias en el ambiente, promoviendo la reducción del As(+5) a As(+3). Por lo anterior, resulta interesante conocer cuáles bacterias son capaces de realizar estas funciones y en qué condiciones se favorece la detoxificación sobre la respiración de arsenato o viceversa. Hasta ahora se desconoce por qué en sedimentos, la detoxificación es la que prevalece. Por ejemplo, en sedimentos adyacentes a minas de oro, con altas concentraciones de arsénico en Minas Gerais, Brasil se identificó al gen *arsC* en aproximadamente 85% de las bacterias resistentes al arsénico en sedimentos (Costa *et al.*, 2014). De igual manera, en un estudio realizado con la base de datos metagenómicas de suelo de 38 sitios (Base de datos RefSoil+) los genes de detoxificación (*arsC*), fueron más abundantes que los genes de respiración (*aioA*, *arrA*, *arxA*) (Dunivin *et al.*, 2019).

Debido a la gran presencia del gen *arsC* en muchos organismos, es importante comprender por qué se favorece esta función. Cabe mencionar que hasta ahora las arsenato reductasas codificadas por el gen *arsC* están clasificadas en tres familias dependiendo de su estructura, mecanismos de reducción y el sitio catalítico de sus residuos de cisteína (Firrincieli *et al.*, 2019). La primera familia se identificó en *Escherichia coli* y depende del glutatión, se conoce como (GSH)-glutarredoxina (GRX) (*arsC-GSH/Grx*), la glutarredoxina actúa como una pequeña proteína que transfiere electrones a la arsenato reductasa. Una segunda familia utiliza a la tiorredoxina como sistema de reducción a través de una cascada redox intramolecular que requiere de tres cisteínas para la reducción de arsenato. Las arsenato reductasas dependientes de tiorredoxina (*arsC-trx*) se han identificado en *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*. La tercera familia depende de un sistema de micotiol

(MSH)/micorredoxina (Mrx) (*arsC-Mrx*) para la reducción de arsenato (López-Maury *et al.*, 2009; Escudero *et al.*, 2013), encontradas hasta ahora únicamente en actinobacterias (Firrincieli *et al.*, 2019). De estas tres arsenato reductasas, se ha reportado que la enzima dependiente de la tiorredoxina es la que tiene una mayor eficiencia en la reducción de arsenato (Escudero *et al.*, 2013), mientras que ambos genes que codifican para las arsenato reductasas citoplasmáticas (*arsC-Grx* y *arsC-trx*) han sido reportados con una mayor predominancia en los cromosomas y una pequeña fracción en forma de plásmidos (Dunivin *et al.*, 2019).

La abundancia del gen *arsC* (*trx*) ha sido observada en mayor presencia en *Firmicutes*, en ambientes con una mayor concentración de arsénico, mientras que el gen *arsC* (*grx*), encontrado mayormente en especies de *Enterobacterias*, se observó en ambientes con bajas concentraciones de arsénico (Escudero *et al.*, 2013). Los cambios en la abundancia de los genes que se toman como indicadores y la relación con los niveles de arsénico pueden ser observados a través de una PCR en tiempo real (Gu *et al.*, 2017).

A partir del análisis de los genes de las bacterias se puede determinar la filogenia y los posibles procesos metabólicos que realizan algunas bacterias, las cuales permiten descubrir el potencial fenotípico, los mecanismos de expresión enzimática, la distribución de los genes y la identidad de las bacterias dentro de un complejo sistema de interacciones como en sitios contaminados con arsénico. Estos datos genéticos resultan útiles para diseñar sistemas óptimos de remediación del agua junto con las condiciones necesarias para la inducción y regulación de la expresión genética de aquellas bacterias que presentan resistencia al arsénico (Andres y Bertin, 2016; Plewniak *et al.*, 2018). Entre las aplicaciones derivadas del uso de herramientas genéticas a partir de análisis del genoma de bacterias resistentes al arsénico puede destacarse el monitoreo ambiental por ejemplo, a través del desarrollo de una proteína quimérica que emplea la arsenato reductasa de bacterias termoresistentes como *Thermus thermophilus* HB27 (*TtArsC*) con la finalidad de ser empleada como un biosensor de las concentraciones de As(+3) en el ambiente, debido a su capacidad para resistir cambios en pH, temperatura y fuerzas iónicas (Puopolo *et al.*, 2021).

### **3. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS, Y OBJETIVOS**

#### **3.1 Justificación**

En el estado de San Luis Potosí existe una tradición minera, y en ciertas regiones es posible que la presencia de arsénico en el ambiente se deba a las alteraciones de los procesos biogeoquímicos del ambiente promovidas por la minería. En otras regiones, sin embargo, la presencia de arsénico en el agua subterránea es de origen natural. En cualquiera de los casos, se requiere realizar las acciones necesarias que permitan reducir la concentración de arsénico en el agua de una forma efectiva.

El arsénico es tóxico para los seres vivos, interrumpe procesos metabólicos y puede ocasionar la muerte celular. En ambientes con altas concentraciones de arsénico, se han encontrado microorganismos que han proliferado a través de la adaptación de sus diversas funciones metabólicas, siendo capaces de utilizar el arsénico como parte de su mecanismo energético mediante la respiración de especies oxidadas de arsénico ( $\text{As}(+5)$ ). Otros microorganismos, son capaces de tolerar el arsénico, ya que después de confundir al arsenato con fosfato y dejarlo entrar al citoplasma deben reducirlo hasta arsenito ( $\text{As}(+3)$ ) y expulsarlo mediante una bomba de extrusión.

En este sentido, los sitios contaminados con arsénico representan una fuente de consorcios microbianos que pueden ser aprovechados para la implementación de biotecnologías que ayuden a mitigar la presencia de este metaloide en sedimentos o cuerpos de agua. Los consorcios provenientes de dos sedimentos con presencia de arsénico encontrados en un distrito minero de San Luis Potosí (Matehuala, S.L.P), han mostrado la capacidad de arsenato reducción. No solo eso, sino que dichos consorcios también contienen microorganismos sulfato reductores que promueven la formación de bio-precipitados de sulfuros de arsénico. De esta forma se puede lograr separar el arsénico de la fase líquida y eventualmente los bio-precipitados de sulfuros de arsénico podrían presentar características fotocatalíticas de interés para la industria. Conocer la estructura y función de las comunidades microbianas recuperadas de dichos ambientes ayudaría a capitalizar las diversas capacidades metabólicas de los microorganismos, ya que se podrían evaluar las condiciones necesarias para remover el arsénico del agua más eficientemente. Por otro lado, conocer la identidad de estos microorganismos permitirá su propagación que al final será útil para la rentabilidad y escalamiento del tratamiento continuo en biorreactores. Así, se

podrán emplear tecnologías de biorremediación para preservar el recurso hídrico de manera que no existan peligros derivados de los tratamientos tradicionales de remediación de agua, como los procesos fisicoquímicos, y que además, sean rentables. Para ello, se plantea resolver las siguientes preguntas de investigación.

### **3.2 Preguntas de investigación**

Considerando que en los consorcios microbianos recuperados de ambientes naturales expuestos al arsénico, que han sido cultivados en el laboratorio con altas concentraciones de este metaloide (750 mg/L) y que poseen genes que potencialmente podrían conferirles la capacidad de detoxificar arsénico (*arsC*). ¿Cuál es la respuesta de las comunidades microbianas ante un cambio en las condiciones del medio de cultivo en términos de concentración de donador de electrones y presencia/ausencia de arsénico? ¿Dentro del consorcio microbiano extraído de ambientes expuestos al arsénico existirán bacterias que no han sido reportadas previamente con genes de resistencia?

### **3.3 Hipótesis**

El enriquecimiento de cultivos seleccionados de consorcios arsenato-sulfato reductores favorece a los microorganismos con la capacidad de tolerar y reducir el arsenato. Al incrementar la presencia de donador de electrones se favorecerá el crecimiento de las comunidades y se espera que de esta manera también puedan incrementar sus capacidades de arsenato reducción. Sin embargo, ante el cambio de la concentración del donador de electrones y la ausencia o presencia del aceptor final de electrones (arsénico), la comunidad microbiana cambiará su estructura y disminuirá su diversidad en presencia de arsenato.

### **3.4 Objetivos**

#### **3.4.1 Objetivo general**

Caracterizar la estructura y función de comunidades cultivables de bacterias arsenato-reductoras para determinar su potencial uso en procesos biotecnológicos de remediación de arsénico.

### 3.4.2 Objetivos específicos

- Propagar una comunidad microbiana sulfato/arsenato reductora para determinar su cinética de crecimiento y velocidad de consumo de lactato.
- Caracterizar la diversidad taxonómica de los consorcios sulfato/arsenato reductores mediante la amplificación del gen 16S rRNA para conocer los microorganismos que potencialmente poseen los genes funcionales para la detoxificación de arsénico, *arsC*.
- Cuantificar el número de copias del gen que permite la detoxificación de arsénico (*arsC*) como un indicador de la abundancia de microorganismos capaces de llevar a cabo esta función y con ello describir el potencial biotecnológico de los consorcios.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Fuente de microorganismos

Como inóculo se usaron diversos cultivos arsenato-sulfato reductores previamente enriquecidos a partir de sedimentos con altas concentraciones de arsénico. Los consorcios se originaron a partir de sedimentos denominados “Cerrito Blanco” o CB y de “Club de Tiro” o CT. Dichos sitios se localizan cerca del distrito minero en Santa María de la Paz en el municipio de Matehuala, San Luis Potosí, México. Previo a este trabajo, los consorcios de estos sedimentos fueron enriquecidos, cultivados, y propagados en medios de cultivo que tuvieron la finalidad de obtener consorcios capaces de producir sulfuros de arsénico usando sulfato y arsenato como aceptores de electrones (Ríos-Valenciana *et al.*, 2017, 2020). Por lo que al momento de realizar esta tesis los consorcios ya se encontraban libres de sedimento, a consecuencia de las transferencias sucesivas, eliminando así las posibles interferencias en el monitoreo del crecimiento de los cultivos (Ríos-Valenciana *et al.*, 2020). Cabe destacar que en los sedimentos originales se encontraron altas concentraciones de arsénico así como en el agua de poro. El sedimento CT presentó la mayor concentración de arsénico con  $2263.1 \pm 167.72$  g/kg, mientras que en el agua de poro se detectaron  $47.8 \pm 0.85$  mg/L. En el sedimento CB la concentración de arsénico fue de  $238.3 \pm 4.13$  g/kg y en el agua de poro  $13.1 \pm 2.21$  mg/L. Ambos sedimentos presentaron cierto grado de alcalinidad con valores entre 8.4 - 8.5. Para un mayor detalle de las características fisicoquímicas de los sedimentos se puede consultar a Ríos-Valenciana *et al.* (2017).

### 4.2 Medios de cultivo

Los medios de cultivo y la concentración de arsenato utilizada en estos experimentos (10 mM) se basó en estudios previos con comunidades microbianas que han sido seleccionadas y sometidas a altas concentraciones de arsénico (Newman *et al.*, 1997), así como con la capacidad de sintetizar sulfuros de arsénico en ausencia de hierro y con un pH que favorece la precipitación de sulfuros de arsénico (6.1 - 6.5) (Rodríguez-Freire *et al.*, 2014).

El medio mineral base que se usó para realizar los distintos cultivos se basó en el reporte de Rodríguez-Freire *et al.* (2014) con la siguiente composición (mM):  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 7.5;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.87;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.09;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 5.23;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 3.45; extracto de levadura,

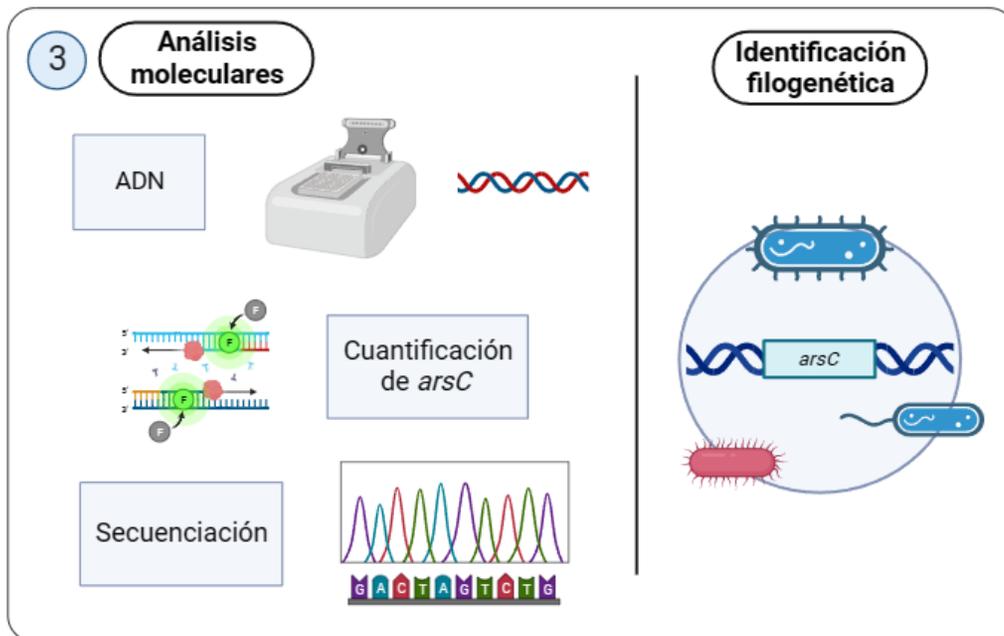
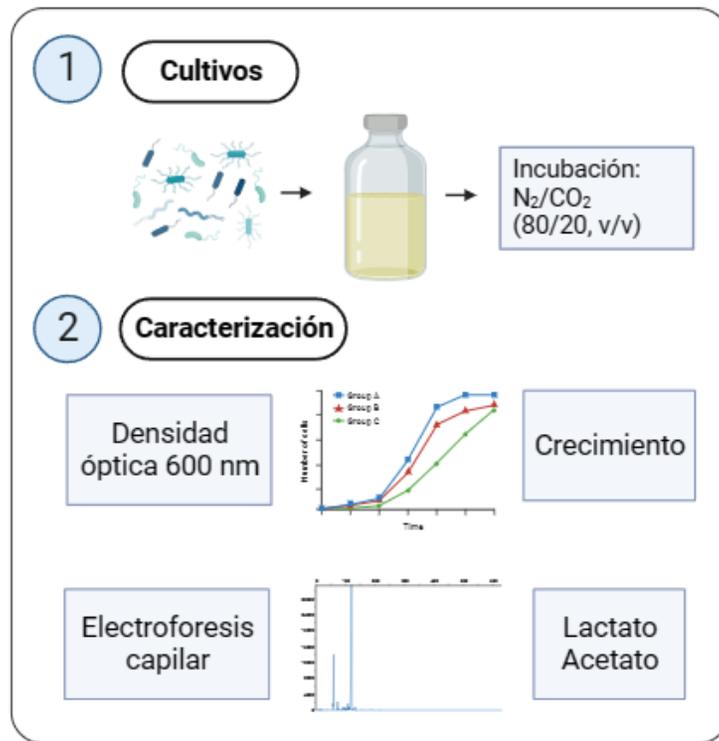
20 mg/L; resazurina 0.5 mg/L como indicador redox y 20  $\mu$ L/L de solución mineral de Wolfe concentrada que contiene minerales traza (Rios-Valenciana *et al.*, 2020). La composición de la solución mineral de Wolfe es la siguiente (g/L):  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (3), ácido nitriloacético (1.5), NaCl (0.1),  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0.5),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.1),  $\text{CoCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.1),  $\text{CaCl}_2$  (0.1),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.1),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0.01),  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  (0.01),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (0.01),  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (0.01).

Dependiendo del experimento, el medio mineral base se suplementó con arsenato ( $\text{As}(+5)$ ) y/o sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) como aceptores de electrones y con lactato como donador de electrones, a partir de soluciones stock de 1M de arsenato de sodio (Sigma Cat. No 10048-95-0), sulfato de sodio anhidro (Fluka CAS No.7757-82-6), y lactato de sodio 60% (Sigma Cat No. 867-56-1). El pH del medio se ajustó a 6.5 con bicarbonato de sodio.

La concentración de lactato suplementada fue de 10 ó 22 mM, dependiendo del experimento, estas concentraciones están de acuerdo con otros estudios de microorganismos y comunidades arsenato-reductoras (Newman *et al.*, 1997; Rodríguez-Freire *et al.*, 2014).

### **4.3 Intercambio de atmósfera para alcanzar condiciones anaerobias**

Para obtener las condiciones anaerobias dentro de las botellas serológicas, se intercambió el espacio gaseoso como se describe a continuación. Después de dispensar el volumen de medio de cultivo deseado en cada botella, las botellas se cerraron con tapones de caucho y anillos de aluminio. Posteriormente, se purgó el aire del espacio gaseoso con una mezcla de  $\text{N}_2/\text{CO}_2$  (80/20, v/v) y se equilibró la presión, liberando el exceso de gas que pudo quedar en la botella. Una vez realizado este paso, las botellas se esterilizaron por autoclave (121°C, 20 min).



**Figura 4.1.** Diagrama simplificado de la estrategia experimental

#### 4.4 Diseño experimental

El experimento consistió de dos etapas (Fig. 4.1), en la primera se llevaron a cabo experimentos en microcosmos para determinar las velocidades del consumo de sustrato de los consorcios en presencia y ausencia de arsénico. La segunda etapa consistió en los análisis moleculares para determinar la composición taxonómica de los consorcios así como la cuantificación del gen funcional para la detoxificación del arsénico *arsC*.

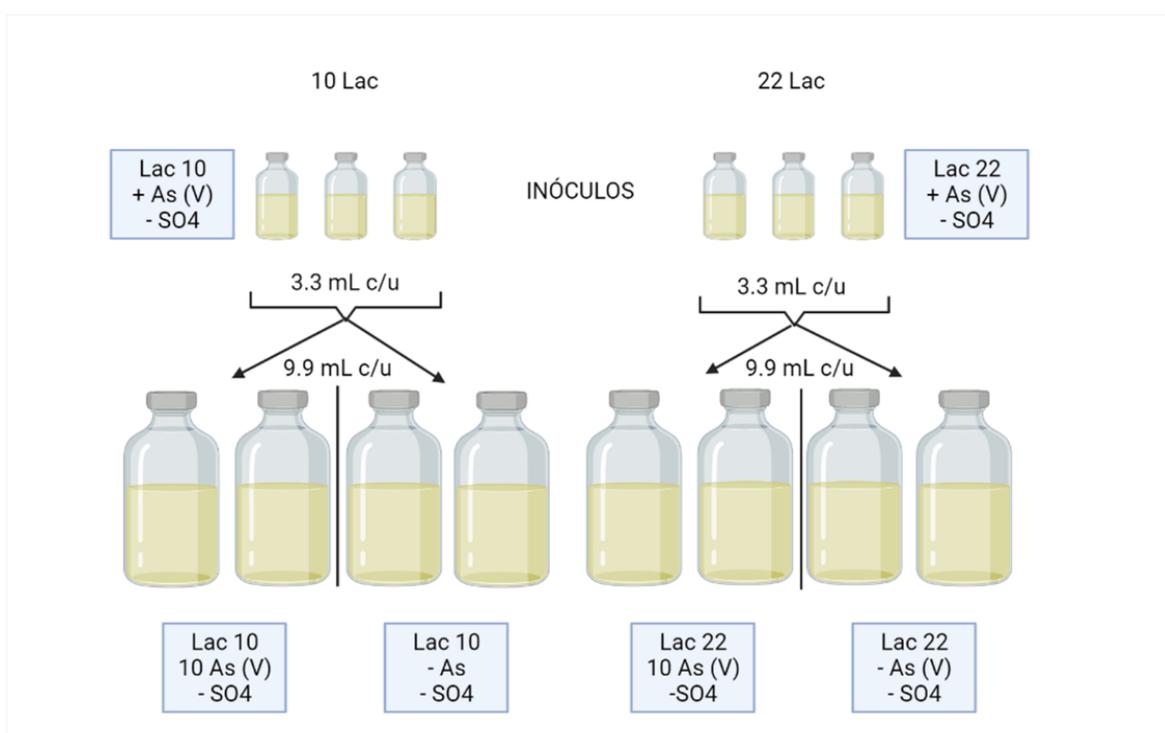
#### 4.5 Selección de los consorcios de trabajo para las cinéticas



**Figura 4.2.** Diagrama simplificado de la selección de los cultivos para el monitoreo de los consorcios

A partir de los consorcios fuente (Secc. 4.1), se hicieron diluciones seriadas ( $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ ) en botellas serológicas (12 mL) que contenían 9 mL de medio mineral base (Secc. 4.2) suplementado con 10 mM arsenato (750 mg As(+5)/L), 10 mM de sulfato (960 mg/L) y 10 mM de lactato (890 mg/L) previamente esterilizadas. Las diluciones seriadas se realizaron en la campana de flujo laminar; para la primera dilución ( $10^{-1}$ ) se colocó 1 mL del

consorcio fuente correspondiente, después de agitar, se tomó 1 mL de la dilución y se colocó en una botella serológica conteniendo 9 mL de medio, el proceso se repitió hasta obtener la dilución  $10^{-6}$ . Las botellas se incubaron a 30 °C en la oscuridad y sin agitación; periódicamente se observaban para detectar la presencia de precipitado amarillo, que indica la formación de minerales de sulfuro de arsénico. Las diluciones que presentaron el precipitado amarillo fueron inoculadas en una segunda dilución que se realizó bajo las mismas condiciones. Después de 43 días, se seleccionaron aquellas diluciones que visualmente presentaron precipitado amarillo.



**Figura 4.3.** Diagrama que ilustra los inóculos y cultivos para determinar las cinéticas de crecimiento, consumo de lactato, y producción de acetato, esta metodología se aplicó para cada uno de los inóculos denominados CB9, CT1 y CT5.

Las diluciones seleccionadas fueron las denominadas C1 (dilución  $10^{-5}$ ) y C5 (dilución  $10^{-2}$ ) del consorcio CT, y la dilución C9 (dilución  $10^{-4}$ ) del consorcio denominado CB. Una vez seleccionados los consorcios, se prepararon cultivos por triplicado de cada uno de los consorcios elegidos, con el mismo medio mineral pero con un volumen final de 50 mL en botellas serológicas de 60 mL con la finalidad de reproducir el consorcio.

A cada botella que contenía 40 mL de medio base suplementado con sulfato (10 mM) y lactato (10 mM) se le adicionó 20% (v/v) de la dilución seriada correspondiente.

Después del crecimiento del consorcio por 56 días, se realizó un segundo cultivo con las mismas condiciones en duplicado para el aislamiento de bacterias arsenato reductoras.

Transcurridos 102 días, a partir de estos cultivos se realizaron los preinóculos para los experimentos en microcosmos (Figura 4.3). El medio de cultivo de los preinóculos y los posteriores cultivos, no contenía sulfato para poder eliminar la interferencia generada por los precipitados minerales de sulfuros de arsénico durante la medición de la densidad óptica. Los preinóculos se realizaron en dos grupos por triplicado, un primer grupo con 10 mM de lactato y otro con 22 mM de lactato, ambos grupos con 10 mM de As(+5) como aceptor final de electrones.

#### **4.6 Experimentos en microcosmos**

Para determinar las diferencias de crecimiento y metabolismo, se realizaron ensayos en microcosmos con los inóculos provenientes de las líneas de cultivo ya seleccionadas (C1, C5, y C9). Una vez cultivados los preinóculos durante 21 días, se procedió a la preparación de los experimentos en microcosmos. Primero se prepararon 28 botellas (de 120 mL) con medio mineral base (90 mL) suplementado solo con arsenato (10 mM) y lactato (10 ó 22 mM) o solo con lactato (10 ó 22 mM), el pH inicial del medio de cultivo se ajustó a 6.5 con NaHCO<sub>3</sub>. El espacio de cabeza de las botellas se intercambió y se esterilizaron antes de inocular. Las botellas se inocularon con una mezcla homogénea de los tres cultivos denominados preinóculos (10 % del volumen final) y se realizaron por duplicado.

Los experimentos de microcosmos se analizaron periódicamente los días (0, 2, 4, 7, 14, 25 y 30) utilizando una alícuota de 2 mL tomada del cultivo a las cuales se le midió la densidad óptica (DO). Posteriormente, dicha alícuota se usó para cuantificar lactato y acetato; para ello, la muestra se centrifugó (12000 rpm) por 5 min y el sobrenadante se filtró por membrana (0.22 µm).

#### **4.7 Análisis fisicoquímicos de las muestras**

La densidad óptica se cuantificó a 600 nm en un espectrofotómetro inmediatamente después de recuperar la muestra. Las concentraciones de lactato y acetato se cuantificaron mediante electroforesis capilar (Agilent 1600A) en muestras centrifugadas (12000 rpm) y filtradas (0.22  $\mu$ M) y con las curvas estándar correspondientes a partir de soluciones stock de ácido láctico y acético (1M c/u) diluidas para obtener concentraciones finales de 60, 100, 400, 600, 800 y 1000 mg/L. La determinación de los ácidos grasos volátiles (AGV) se hizo mediante detección indirecta UV usando un detector de arreglo de diodos, con un buffer básico de aniones (Agilent, pH = 12.1) a una señal de longitud de onda de 350 nm y otra de referencia a 230 nm. El equipo cuenta con una columna capilar de sílica fundida (Agilent,  $\text{id} = 50 \mu\text{m}$ ,  $L = 80.5 \text{ cm}$ , longitud efectiva = 72 cm). El voltaje aplicado fue de -25 kV y la temperatura en el capilar de 20 °C (Soga y Ross, 1999).

#### **4.8 Análisis moleculares para la identificación taxonómica de bacterias de los consorcios**

Al término de la cinética (día 30), se centrifugaron (7000 rpm, 20 min) 150 mL de los cultivos. El pellet se recolectó en tubos eppendorf de 1.5 mL y se procedió con la extracción de ADN siguiendo las instrucciones del Kit DNeasy Power soil (QIAGEN). Al término de la extracción, el ADN se suspendió en 40  $\mu$ L de buffer Tris-HCL (10 mM, pH 8.5), y la concentración de ADN se cuantificó con el equipo Nanodrop. Posteriormente, el ADN se usó para amplificar el gen 16S rRNA mediante PCR a punto final con los cebadores universales para bacteria 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'), los cuales, en principio, cubren la mayor parte de la longitud (~1400 pb) del gen 16S rRNA (dos Santos, *et al.*, 2019). Las concentraciones finales de los reactivos en la mezcla para la PCR (25  $\mu$ L) fueron: Buffer 1X,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, dNTPs 0.2 mM, primer 27F 0.2 mM, primer 1492R 0.2 mM y Taq polimerasa 0.02 U/ $\mu$ L, además se adicionaron 2  $\mu$ L de DNA molde sin diluir. El programa de PCR se muestra en la Tabla 4.2 La visualización de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa (1%) con buffer tris-acetato-EDTA (TAE 1X) y 85 V durante 50 min; el gel se tiñó con bromuro de etidio para visualizarlo en el fotodocumentador. De esta forma se

corroboró que los extractos de ADN contaban con la calidad adecuada para realizar secuenciación masiva. Los extractos de ADN fueron secuenciados por síntesis mediante la plataforma de Illumina MiSeq (pareado) y el kit de reactivos v3 MiSeq (600 ciclos) por la compañía ZymoBIOMICS Laboratory (Zymo Research Corp., USA), con los cebadores f-341 (CCTACGGGNGGCWGCAG) y r-785 (GACTACHVGGGTATCTAATCC) que amplifican para las regiones V3 y V4 del gen 16s ARN.

#### 4.9 Identificación y cuantificación de los genes *arsC*

Para determinar si en los consorcios existían microorganismos portadores de los genes de detoxificación de arsénico (*arsC*) primero se realizó la puesta a punto de los protocolos mediante PCR a punto final.

**Tabla 4.1.** Secuencias correspondientes a los cebadores seleccionados de los genes *arsC*

Gen objetivo	Nombre del primer	Secuencia (5' a 3')	Referencia
<i>arsC</i> (GSH/Gxr)	amlt-42-f	TCGCGTAATACGCTGGAGAT	Sun <i>et al.</i> , 2004
	amlt-376-r	ACTTTCTCGCCGTCTTCCTT	
	smrc-42-f	TCACGCAATACCCTTGAAATGATC	
	smrc-376-r	ACCTTTTCACCGTCCTCTTTCGT	
<i>arsC</i> (Trx/TrxR)	<i>arsC4f</i>	TCH TGY CGH AGY CAA ATG GCH GAA G	Escudero <i>et al.</i> , 2013
	<i>arsC4r</i>	GCN GGA TCV TCR AAW CCC CAR TG	
	<i>arsC5f</i>	GGH AAY TCH TGY CGN AGY CAA ATG GC	
	<i>arsC5r</i>	GCN GGA TCV TCR AAW CCC CAR NWC	

Para el gen *arsC* se evaluaron dos grupos de cebadores independientemente (Tabla 4.1), uno de los grupos de cebadores codifica para la clase de arsenato reductasa que depende de la Tiorredoxina (Trx) para la reducción del arsenato: *arsC4* y *arsC5* (Escudero *et al.*, 2013). El otro grupo de cebadores codifica para la clase de arsenato reductasa que depende del glutatión denominada *arsC* GSH (Escudero *et al.*, 2013).

La mezcla de reacción (23  $\mu$ L) para las PCR del gen *arsC* Trx contenían: Buffer 1X,  $MgCl_2$  2 mM (1.5 mM para el gen *arsC* GSH), dNTPs 0.2 mM, cebadores 0.3  $\mu$ M (0.25  $\mu$  M para el gen *arsC* GSH) y Taq polimerasa 0.02 U/  $\mu$ L (0.05 U/ $\mu$ L1.5 mM para el gen *arsC* GSH). Se utilizaron 2  $\mu$ L de DNA molde sin diluir. Los programas de PCR se muestran en la Tabla 4.2.

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa y TAE 1X. Las condiciones de la electroforesis fueron 85 V por 60 minutos, el gel se tiñó con bromuro de etidio durante 30 – 40 min y se visualizó bajo luz ultravioleta (UV) para adquirir la imagen en el fotodocumentador (MiniBIS PRO, DNR, Israel), los resultados indicaron la amplificación del gen *arsC* dependiente de la tiorredoxina, por lo que se descartaron los cebadores del gen *arsC* dependiente del glutatión.

Para la cuantificación del número de copias del gen *arsC* se realizó una reacción PCR cuantitativa (qPCR) en el equipo PikoReal 96 Real-Time PCR System (TCR0096, Thermo Fisher Scientific Inc.). Se empleó la mezcla de reacción lista para usarse FastStart Essential DNA Green Master (Roche, Basilea, Suiza) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El FastStart Essential DNA Green Master 2x contiene FastStart Taq DNA polimerasa, buffer de reacción, dNTPs, colorante SYBR Green y  $MgCl_2$ . El par de cebadores que se emplearon para realizar la cuantificación del gen *arsC* fueron: *arsC4f*, *arsC4r*, para la familia de genes *arsC* dependientes de tiorredoxina (Trx)/tiorredoxina reductasa (TrxR) (Escudero *et al.*, 2013).

La reacción para el gen *arsC* (Trx/TrxR) se realizó en un volumen final de 10  $\mu$ l que contenía: 5  $\mu$ l del FastStart Essential DNA Green Master 2X, 0.3  $\mu$ M de cada uno de los cebadores *arsC4* (Tabla 4.1), 1  $\mu$ l de ADN molde (1:10). Se usó el mismo programa de amplificación que para la PCR a punto final (Tabla 4.2). Previo a la qPCR, se realizó una prueba de inhibición por PCR punto final usando diferentes concentraciones de ADN molde a partir de diluciones 1:10 del extracto original. Para la PCR a punto final, se usó el mismo reactivo que se empleó en la qPCR FastStart Essential DNA Green Master con SYBR Green y Taq polimerasa, sin detectar anomalías. Al finalizar la PCR en tiempo real se realizó la construcción de una curva de fusión, que consiste en elevar la temperatura hasta 95°C con la finalidad de desnaturalizar el ADN para verificar la especificidad del producto.

Posteriormente, los resultados de la cuantificación de los productos de PCR en tiempo real se visualizaron mediante una gráfica de las unidades relativas de fluorescencia contra los ciclos de la reacción. Dichas gráficas indican el número de copias del gen *arsC*. Para asegurar la calidad de las reacciones, se construyó una curva estándar con (100 a 10<sup>8</sup> copias) con clonas construidas con pGEM-T easy Vector system (PROMEGA), y el gen *arsC* amplificado a partir de la cepa *Geobacter sulfurreducens* strain PCA (DSM 12127, DSMZ, Alemania; ATCC51573). El control negativo consistió en agua inyectable estéril.

**Tabla 4.2.** Programas de PCR para la amplificación de los genes 16S rRNA, *arsC*, y *arrA*

<i>arsC</i> 4 ( <i>arsC</i> -Trx1a)	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	5 min	1 vez
Desnaturalización	95 °C	90 s	35
Alineación	46.7 °C	90 s	35
Extensión	72 °C	3 min	35
Extensión final	72 °C	5 min	
<b><i>arsC</i> 5 (<i>arsC</i>-Trx1b)</b>			
Desnaturalización inicial	95 °C	5 min	1 vez
Desnaturalización	95 °C	90 s	35
Alineación	60 °C	90 s	35
Extensión	72 °C	3 min	35
Extensión final	72 °C	5 min	
<b><i>arsC</i> (GSH/Gxr)</b>			
Desnaturalización inicial	95 °C	3 min	1 vez
Desnaturalización	95 °C	15 s	40
Alineación	60 °C	15 s	40
Extensión	72 °C	15 s	40
Extensión final	72 °C	15 min	
<b>rARN 16s</b>			
Desnaturalización inicial	95 °C	4 min	1 vez
Desnaturalización	95 °C	60 s	35
Alineación	54 °C	60 s	35
Extensión	72 °C	3 min	35
Extensión final	72 °C	7 min	

#### **4.10 Identificación taxonómica de la comunidad arsenato y sulfato reductora**

Los análisis de las secuencias crudas de la secuenciación del gen 16S rRNA de los cultivos, se realizaron utilizando el lenguaje y entorno estadístico R (versión 4.1.1; R Core Team, 2022). Como primer paso, se procedió a filtrar y hacer cortes de calidad en las secuencias en las posiciones 276 y 232, lo cual permitió remover los fragmentos de baja calidad, que son secuencias de ADN que tienen una alta probabilidad de tener una base nitrogenada colocada de manera errónea durante el proceso de amplificación. Para determinar estas posiciones se utilizó la herramienta FIGARO (<https://github.com/Zymo-Research/figaro>), utilizando los datos del tamaño de amplicones de 420 pares de bases (pb) y de los cebadores *forward* (16 pb) y *reverse* (24 pb); dicho proceso se llevó a cabo con el software R. Para el análisis de la diversidad microbiana se utilizó el programa DADA2 (Divisive Amplicon Denoising Algorithm) (Callahan *et al.*, 2016), del cual también se derivó la remoción de quimeras. A partir de dicho análisis, se obtuvieron secuencias variantes de amplicones (Amplicon Sequence Variants, ASV) que fueron cotejadas contra la base de datos de SILVA versión 138 (<https://www.arb-silva.de>) para obtener la asignación taxonómica de los microorganismos presentes en las muestras.

El análisis de los datos de la secuenciación también incluyó una curva de rarefacción, de la cual se filtraron previamente las especies raras o secuencias que estuvieron presentes con una abundancia menor a 1% mediante el paquete de R, *vegan* (Oksanen *et al.*, 2022).

Los cálculos de diversidad alfa (diversidad observada, Chao 1 y Shannon-Weaver), se hicieron mediante el software R con las paqueterías *phyloseq* (McMurdie y Holmes, 2013), *Biostrings* (Pagès, 2023), *dplyr* (Wickham *et al.*, 2023), *microbiome* (Lahti *et al.*, 2017), *DECIPHER* (Wright, 2016), *phangorn* (Schliep *et al.*, 2017) y *ggplot2* (Wickham *et al.*, 2016). Mientras que para la diversidad entre muestras o diversidad beta, se realizó el cálculo de la disimilitud entre muestras utilizando las distancias de Bray-Curtis y se presentaron mediante una gráfica de escala multidimensional no métrica (Non-metric MultiDimensional Scaling, NMDS).

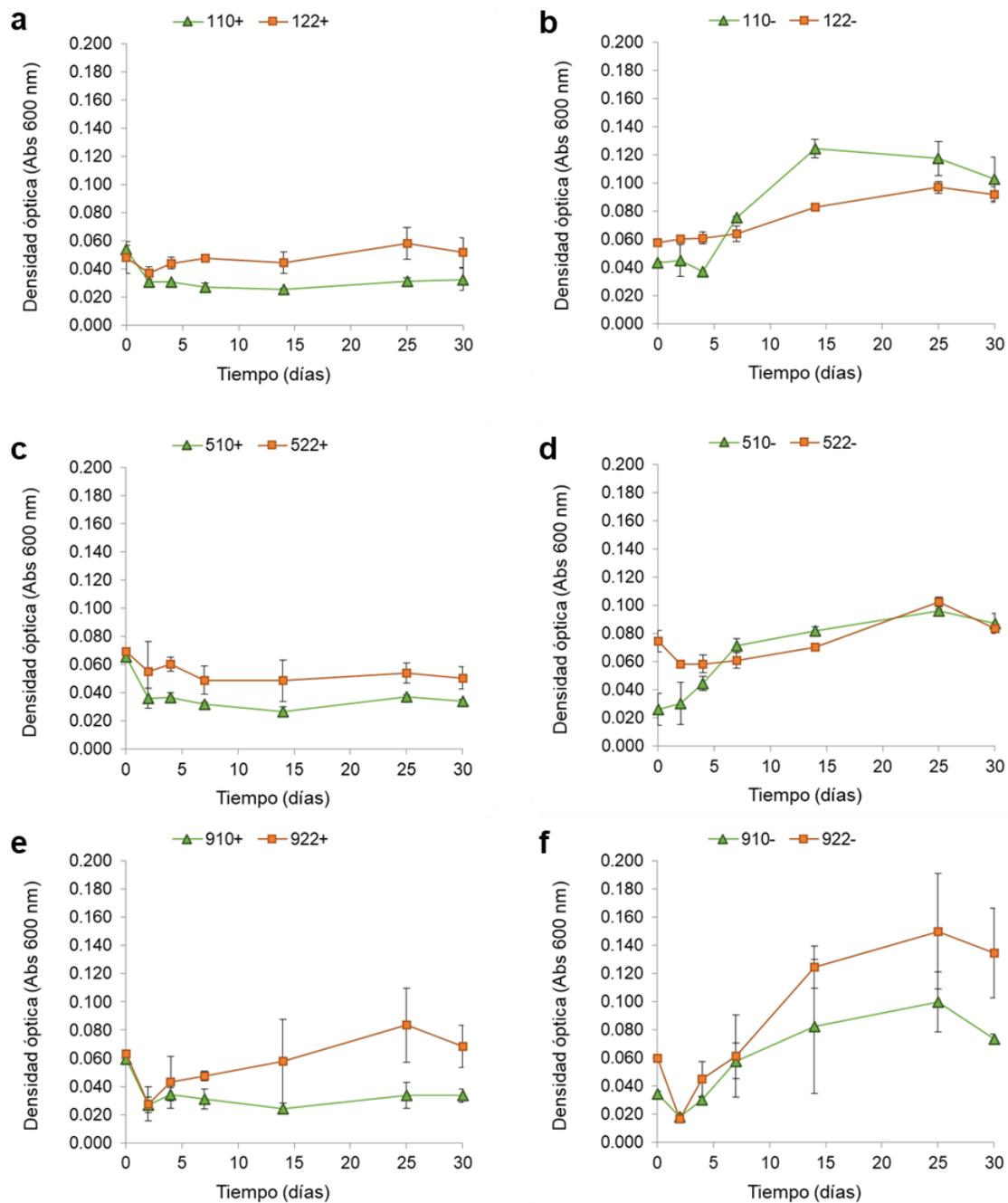
## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los procesos metabólicos realizados por comunidades microbianas son complejos y los que ocurren en las comunidades arsenato-reductoras y/o sulfato-reductoras no son la excepción. Muchas de las actividades metabólicas que realizan las bacterias arsenato-reductoras y/o sulfato-reductoras dependen de las condiciones ambientales en las que se encuentren, como por ejemplo, la disponibilidad de nutrientes y concentración de arsénico que involucra cierta toxicidad. No obstante, a partir de estudios previos sobre comunidades arsenato-reductoras/sulfato-reductoras se sabe que muchas variables se encuentran en juego cuando dichas comunidades se desarrollan en un sedimento. Estudiar las comunidades en el laboratorio tiene la ventaja de que al reducir dichas variables se puede obtener información acerca de cómo ciertas variables afectan o modifican tanto la estructura de la comunidad microbiana-como su respuesta fisiológica.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos del estudio en microcosmos de comunidades arsenato-reductoras que también demostraron ser sulfato-reductoras y que fueron seleccionadas previamente mediante diluciones seriadas en medios de cultivos con arsenato (10 mM) y sulfato (10 mM).

### **5.1 Cinética de crecimiento de los consorcios arsenato reductores**

A partir de cultivos preseleccionados mediante diluciones seriadas se cultivaron los consorcios bacterianos denominados C1, C5, y C9, cabe recordar que C1 y C5 provienen de del mismo origen (s edimento CB), mientras que C9 se obtuvo del sedimento CT. Los tres consorcios se cultivaron en presencia o ausencia de arsenato y con dos concentraciones distintas de donador de electrones, lactato 10 ó 22 mM. Para evaluar el crecimiento de estas comunidades se cuantificó la densidad óptica de los cultivos durante 30 días, la cual se puede visualizar en la Figura 5.1 Las absorbancias se determinaron a 600 nm en un espectrofotómetro UV-Vis, que es una técnica usada frecuentemente para el monitoreo del crecimiento bacteriano, ya que es fácil, práctica y rápida.



**Figura 5.1.** Cinéticas de crecimiento de los cultivos arsenato-reductores en microcosmos. Se muestran los perfiles de densidad óptica (absorbancia 600 nm). Se usó lactato 10 ó 22 mM como donador de electrones. a) y b) Consorcio 1; c) y d) Consorcio 5; e) y f) Consorcio 9. Código de la leyenda: el primer dígito indica el número del consorcio (C1, C5, ó C9), los dos siguientes dígitos indican la concentración de lactato adicionada (10 ó 22 mM) y los signos indican (+) en presencia de arsénico o (-) en ausencia.

En general, para los tres consorcios, las densidades ópticas de los cultivos con arsénico fueron menores (0.02 – 0.08 abs 600 nm) que las observadas en los cultivos sin arsénico (0.07 – 0.130 abs 600 nm). Estos resultados ilustran que el arsénico resulta perjudicial para las bacterias que componen los consorcios. Hasta ahora, los consorcios siempre se habían cultivado con dos aceptores de electrones (arsénico y sulfato) que permitían la precipitación de arsenito con sulfuro y por lo tanto la disminución de su toxicidad.

En los cultivos con arsénico, es posible que la rápida disponibilidad del arsénico que se encontraba en el medio haya afectado el crecimiento bacteriano ocasionando una menor densidad óptica. Lo anterior podría ser resultado del ingreso del arsenato al citoplasma de los microorganismos que no pueden respirar arsenato a través de transportadores de fosfato, donde la similitud de la estructura del fosfato con el arsenato no permite al transportador la distinción entre ambas moléculas (Garbinski *et al.*, 2019). Una vez que las células han asimilado el arsenato, lo reducen a arsenito y al expulsarlo éste se mantiene en el medio. El arsenito es mucho más tóxico que el arsenato resultando perjudicial para el crecimiento celular. Se ha documentado que el arsenito puede reaccionar con grupos tiol de pequeñas moléculas y grupos sulfhidrilo de residuos de cisteína de las proteínas, impidiendo el funcionamiento eficiente de los procesos bioquímicos en la célula (Yan *et al.*, 2019).

No obstante, la concentración de fosfato en el medio puede tener una influencia sobre la respiración del arsenato, donde una mayor concentración del fosfato promueve la respiración de arsénico y esto es especialmente favorable durante la fase de crecimiento, ya que el fosfato bloquea la entrada del As(+5) al interior de las células, disminuyendo la energía que se requiere para la detoxificación y redirigiéndola hacia el crecimiento celular (Shi *et al.*, 2022). Cabe mencionar que en los cultivos que se estudiaron en esta tesis, se utilizó un medio enriquecido que contenía 10.95 mM de fosfato en forma de:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (7.5 mM) y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (3.45 mM). Por lo que, hipotéticamente, se esperaría que un aumento en la concentración de fosfato resultaría en un mayor crecimiento de las bacterias.

Otro factor que pudo modificar el crecimiento bacteriano es la concentración del donador de electrones, los cultivos con 10 mM de lactato presentaron valores de densidad óptica menores que aquellos cultivos donde se adicionaron 22 mM de lactato. En los consorcios C1 y C5 cultivados con arsénico, que provenían de un sedimento identificado como CT (Figs. 5.1a y c), se puede observar este efecto. En cambio, los cultivos sin arsénico (Figs. 5.1b y d) presentaron valores similares de densidad óptica al término de la cinética; por lo que se puede decir que los cultivos crecieron sin un efecto adverso. Sin la presencia de arsénico las bacterias crecen únicamente por la disponibilidad del donador de electrones y sin el efecto dañino lo que se traduce en un crecimiento mayor al compararse con los consorcios con arsénico.

Adicionalmente, el origen de los consorcios tuvo una influencia en el crecimiento microbiano, es decir los sedimentos CB y CT que fue de donde originalmente se obtuvieron los enriquecimientos y posteriormente los consorcios. Los consorcios 1 y 5 provienen del sedimento CT en donde la concentración de arsénico en el agua de poro era de 48 mg/L, mientras que el Consorcio 9 proviene del sedimento CB que contenía 5 mg/L de arsénico en el agua de poro. Las bacterias que se encontraban presentes en dichos sedimentos fueron enriquecidas mediante diluciones seriadas con la finalidad de obtener cultivos que pudieran realizar sulfato- y arsenato-reducción. (Rios-Valenciana *et al.*, 2020, 2023). Fue a partir de esos enriquecimientos que se recuperaron los tres consorcios que se describen aquí.

El Consorcio 9, con tratamiento de 22 mM de lactato con arsénico, presentó los valores de densidad óptica (Fig. 5.1e) más altos de todos los tratamientos con arsénico con una densidad óptica al día 30 de 0.069 abs 600 nm. Un factor que contribuyó a que el Consorcio 9 en presencia de arsénico y con 22 mM de lactato presentara un mayor crecimiento, que su homólogo con 10 mM de lactato al día 30 (0.034 abs 600 nm), podría explicarse por la composición de la comunidad bacteriana, las bacterias presentes pudieron aprovechar la disponibilidad de la mayor concentración de electrones (22 mM), lo que redujo su competencia y aumentaron biomasa. Lo mismo ocurrió para este consorcio en ausencia de arsénico con valores de 0.074, para el tratamiento con lactato 10 mM y 0.135, para el tratamiento con 22 mM al día 30.

Los consorcios 1 y 5 en presencia de arsénico, al igual que el Consorcio 9, con lactato 10 mM, tuvieron densidades ópticas similares al día 30, 0.033 y 0.34 abs 600 nm, respectivamente. Lo mismo ocurrió con los tratamientos con lactato 22 mM con valores de 0.052 para el Consorcio 1 y 0.051 abs 600 nm, para el Consorcio 5. Para el caso de los tratamientos sin arsénico, se pudo notar que al término del experimento (día 30), los valores de densidad óptica abs 600 nm para los consorcios 1 y 5 fueron cercanos para ambos tratamientos con concentración de lactato 10 y 22 mM. Para el Consorcio 1, tenemos 0.103 y 0.092, respectivamente; y para el Consorcio 5, los valores de densidad óptica con lactato 10 mM fue de 0.087, mientras que para lactato 22 mM, 0.084.

Por lo que, en ausencia de arsénico podemos ver que las bacterias logran competir libremente por el donador de electrones, aunque resulta interesante que únicamente el Consorcio 9 haya presentado una mayor densidad óptica cuando se aumentó la concentración de lactato a 22 mM. Este aumento de la densidad óptica podría ser consecuencia, como se mencionó anteriormente, de la identidad de las bacterias presentes que se describirá en los capítulos siguientes y la función que desarrollan dentro del consorcio.

Cabe señalar que hasta ahora, los consorcios sólo se habían estudiado en condiciones simultáneas de arsenato y sulfato reducción, dando origen a precipitados de arsénico que interfieren con la determinación del crecimiento mediante densidad óptica.

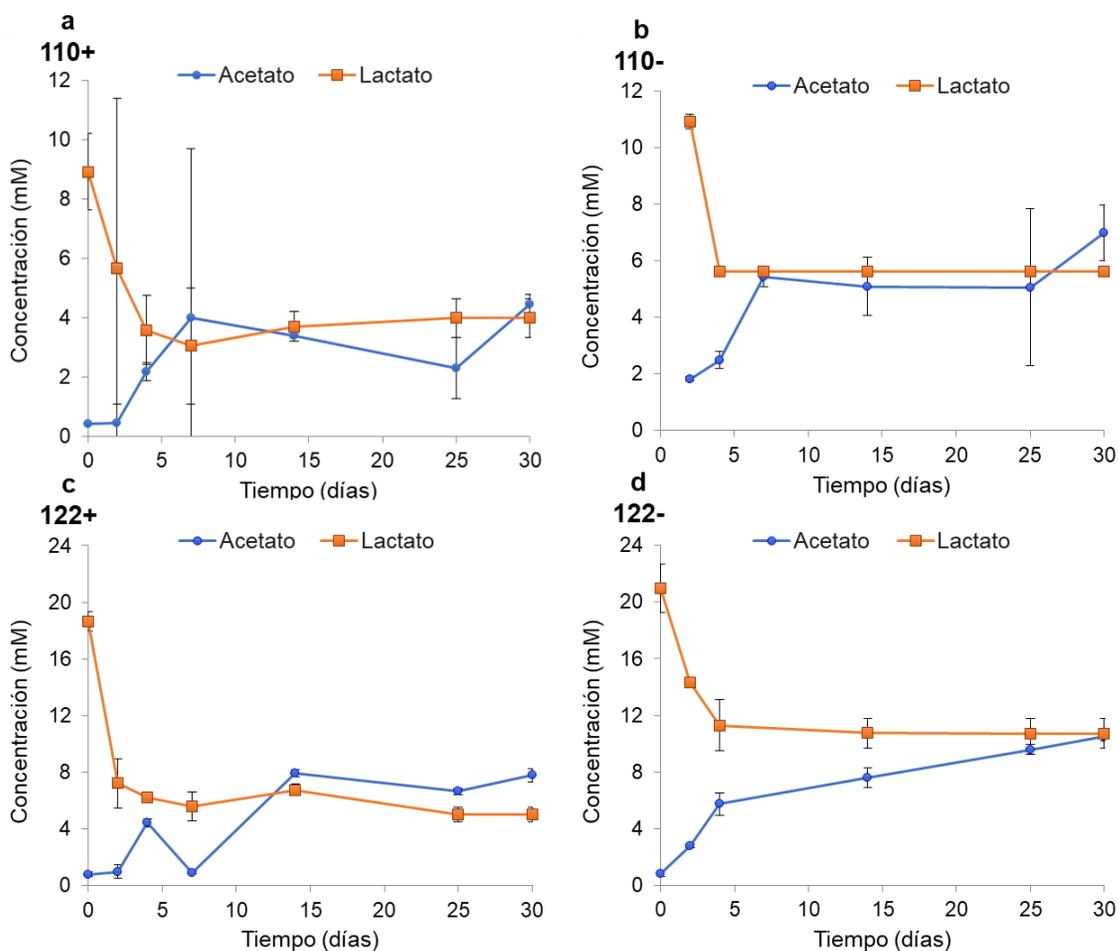
## **5.2 Cinética de consumo de lactato y producción de acetato de los consorcios arsenato-reductores**

Para comprobar que los consorcios eran capaces de consumir lactato y evaluar el efecto de la concentración del donador de electrones sobre el crecimiento de los consorcios, se cuantificaron las concentraciones de lactato residual y de acetato mediante el equipo de electroforesis capilar. Los resultados se presentan por consorcio en las Figuras 5.2 a 5.4 para los consorcios 1, 5, y 9, respectivamente.

A partir del consumo de lactato se puede destacar que en ninguno de los tratamientos se observó un consumo completo del donador de electrones. En general, se alcanzó un consumo de sustrato entre 33-83% en todos los diferentes tratamientos, y en las Figuras 5.2

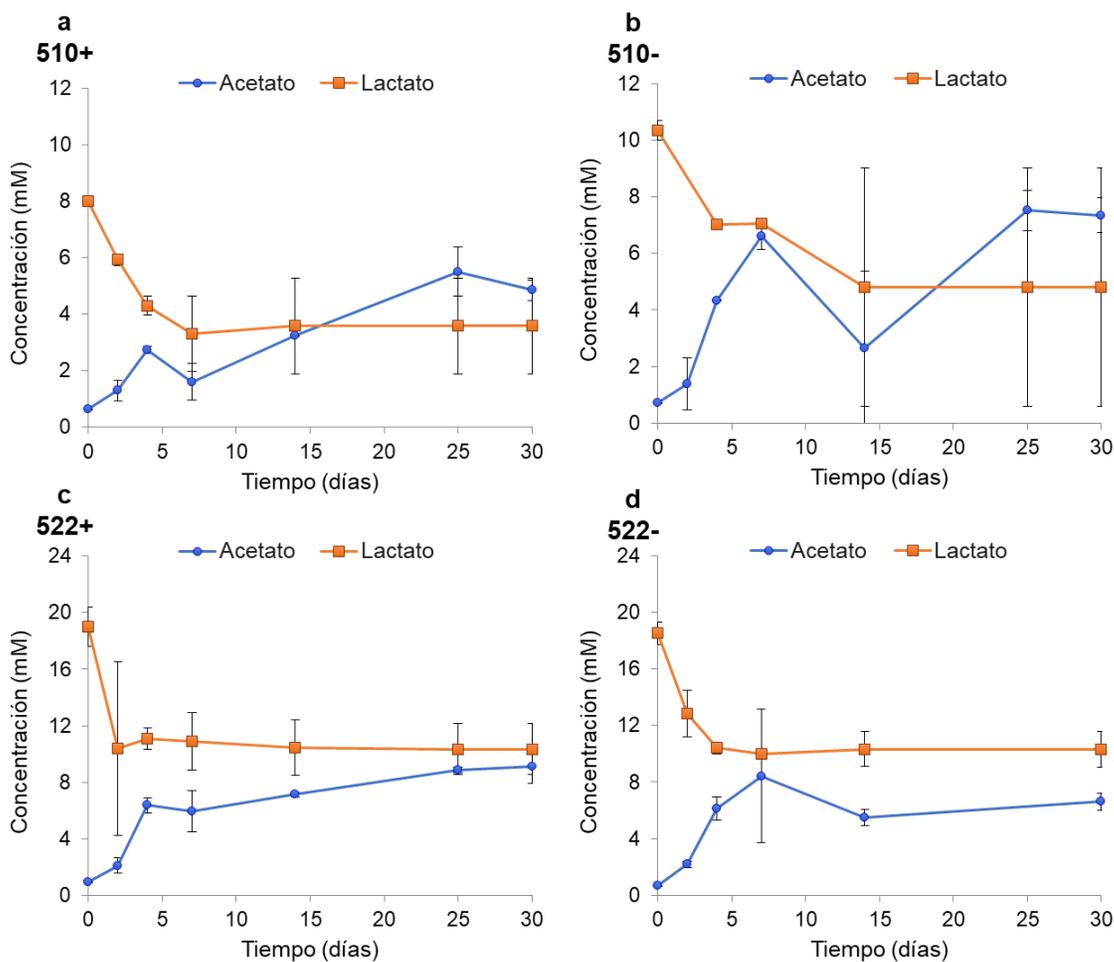
a 5.4 se puede observar una concentración mínima de lactato alcanzada entre los días 5-8 y que representa un máximo consumo del sustrato. Fue a partir de ese periodo que la concentración del sustrato se mantiene estable hasta la finalización del experimento en el día 30 e indica la oxidación parcial del lactato que se adicionó como donador de electrones.

Por otro lado, se observa que la producción de acetato tiene una correlación con el consumo de lactato, ya que al aumentar el consumo del lactato y disminuir su concentración se notó que la concentración de acetato aumenta de manera progresiva durante los 30 días de la duración del experimento en todos los tratamientos.



**Figura 5.2.** Perfiles de las cinéticas de consumo de lactato (sustrato) y producción de acetato (subproducto) del Consorcio 1. a) 10 mM de lactato + 10 mM de As(+5); b) 10 mM de lactato sin As(+5); c) 22 mM de lactato + 10 mM de As(+5); d) 22 mM de lactato sin As(+5).

En general, la concentración final de acetato estuvo entre 4.47 y 10.51 mM para todos los tratamientos. En el caso del Consorcio 1, la mayor producción de acetato se presentó en la muestra sin arsénico con 22 mM de lactato, con una concentración final de 10.51 mM. La de menor producción del mismo consorcio fue el tratamiento con arsénico y 10 mM de lactato, con 4.47 mM de acetato al día 30.



**Figura 5.3.** Perfiles de las cinéticas de consumo de lactato (sustrato) y producción de acetato (subproducto) del Consorcio 5. a) 10 mM de lactato + 10 mM de As(+5); b) 10mM de lactato sin As(+5); c) 22 mM de lactato + 10 mM de As(+5); d) 22 mM de lactato sin As(+5).

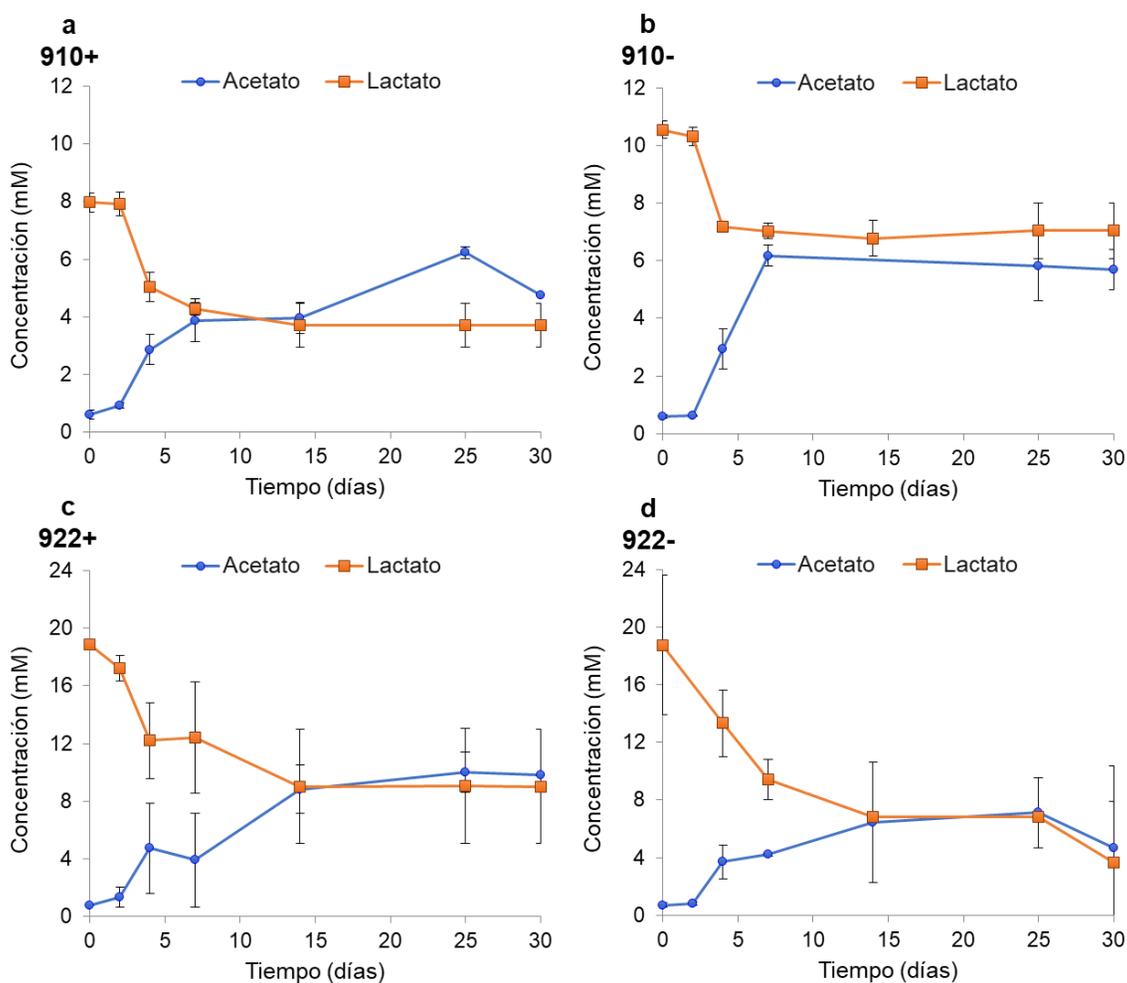
El tratamiento con el mayor porcentaje de consumo de lactato del Consorcio 1 fue el adicionado con 10 mM de lactato sin arsénico con 83% de lactato consumido, mientras que

el menor porcentaje de consumo para el mismo consorcio fue también sin arsénico pero con 22 mM de lactato inicial, consumiendo únicamente 49%. Lo anterior no indica que se consumió menos lactato en el tratamiento 122-, ya que consumió 10.23 mM y por el contrario, es una mayor concentración consumida de lactato comparada con su contraparte el tratamiento 110- con 8.35 mM de lactato consumido. A partir de los datos de las Figuras 5.3a y b, se encontró que para el Consorcio 5 con 10 mM de lactato inicial, los consorcios mostraron un porcentaje de consumo de lactato de 55 y 53% para los tratamientos con y sin arsénico, respectivamente. En cambio, cuando la concentración de lactato fue de 22 mM (Figs. 5.3c y d), el consumo de lactato fue un poco menor siendo de 46% con arsénico y 44% sin arsénico. En cuanto a la producción de acetato como producto de la oxidación incompleta del lactato, se encontró que al adicionar arsénico, el acetato se acumuló paulatinamente y no se degradó. En contraste, en ausencia de arsénico el acetato se acumuló hacia el día 7 y posteriormente se puede apreciar, que pudo existir un consumo de acetato (Figs 5.3 b, d ).

En la Figura 5.4 se presentan los resultados correspondientes a los tratamientos con el Consorcio 9. Se puede observar que los tratamientos con arsénico tienen un porcentaje de lactato consumido similar entre 52 y 54% para el tratamiento 922+ y 910+, respectivamente. A diferencia de los tratamientos del Consorcio 9 sin arsénico con valores contrastantes del consumo de lactato, 33% para el tratamiento con 10 mM de lactato, y 81% con 22 mM de lactato. La tasa de consumo de lactato del tratamiento del Consorcio 9 sin arsénico y con 22 mM de lactato (Fig. 5.4 d) muestra el mismo comportamiento de mayor consumo de lactato que el Consorcio 1, también sin arsénico, pero con lactato inicial 10 mM. Que contrasta con el comportamiento del resto de los tratamientos, donde se observó una tendencia de una mayor tasa de consumo de lactato en presencia de arsénico.

En la mayoría de los tratamientos para los tres consorcios, la producción de acetato fue mayor en ausencia de arsénico. A excepción de los tratamientos 522- y 922-. Para el consorcio 5 con arsénico y 22 mM de lactato, el acetato tuvo una concentración final de 9.10 mM, mientras que sin arsénico, 6.60 mM. Para el consorcio 9 con 22 mM de lactato con arsénico, se registró 9.80 mM de acetato producido y para su contraparte sin arsénico, 4.69 mM. Esta menor concentración final de acetato para los tratamientos sin arsénico con mayor concentración inicial de lactato (22 mM), podría indicarnos que existe un consumo

de este producto de la fermentación del lactato por parte de las bacterias presentes. Algunas bacterias sulfato reductoras, como *Desulfobacca acetoxidans* (phylum *Thermodesulfobacteriota/Proteobacteria* (Delta)) y *Desulfotomaculum acetoxidans* (phylum *Bacillota/Fimicutes*) han sido reportadas con la capacidad de utilizar acetato como donador de electrones (Muyzer y Stams, 2008), por lo que en los Consorcios 5 y 9, alguna bacteria capaz de utilizar el acetato para su crecimiento podría estar presente.

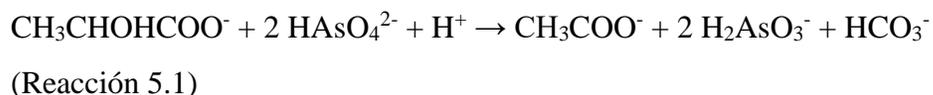


**Figura 5.4.** Perfiles de las cinéticas de consumo de lactato (sustrato) y producción de acetato (subproducto) del Consorcio 9. a) 10 mM de lactato + 10 mM de As(+5); b) 10mM de lactato sin As(+5); c) 22 mM de lactato + 10 mM de As(+5); d) 22 mM de lactato sin As(+5).

Tomando en cuenta el consumo de lactato y los resultados de densidad óptica (Sección 5.1) se puede afirmar que el arsénico es perjudicial para el crecimiento pero no para su actividad, ya que en la mayoría de los tratamientos con arsénico se observó un mayor consumo de lactato, a excepción de los tratamientos del Consorcio 1 con 10 mM de lactato (110+) y el Consorcio 9 con 22 mM de lactato (922+), donde el consumo de lactato fue mayor en sus contrapartes sin arsénico (Figs 5.2b, d y 5.4b,d).

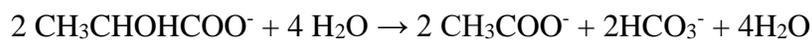
Los consorcios aquí estudiados se caracterizan por la presencia de bacterias sulfato-reductoras con la capacidad de reducir también arsenato (Rios-Valenciana *et al.*, 2023), así como por no oxidar completamente el lactato hasta CO<sub>2</sub> (donador de electrones) (Muyzer y Stams, 2008). A continuación, se presentan las estequiometrías de las reacciones que podrían estar ocurriendo en los experimentos.

En presencia de arsénico, la reacción estequiométrica del consumo de lactato es la siguiente (Alam y McPhedran, 2019), produciendo acetato, arsenito y bicarbonato:



La Reacción 5.1 tiene una  $\Delta G^{\circ}$  de  $-194.7$  kJ/reacción equivalente a  $-48.7$  kJ/e<sup>-</sup> (a valores de pH entre 6.5 - 8.5) (Hoeft *et al.*, 2004). Cabe destacar que el pH en los medios de cultivo se ajustó a un valor de 6.5. También es importante decir que se han documentado bacterias sulfato-reductoras con la capacidad de cambiar su metabolismo ante la ausencia de sulfato, como en los ensayos realizados en el presente estudio, y pueden recurrir a la fermentación de ácidos orgánicos y alcoholes (Plugge *et al.*, 2011). En este sentido, en ausencia de arsenato el consumo de lactato podría estar dirigido hacia la fermentación, ya que la fermentación es un proceso que ocurre en ausencia de oxígeno y de un aceptor terminal de electrones (Novotnik *et al.*, 2019), como lo son el arsenato o el sulfato para el caso que nos ocupa.

La reacción estequiométrica con los productos de la fermentación de lactato, acetato y bicarbonato, se presentan en la Reacción 5.2, denominada fermentación homoacética (Oyekola *et al.*, 2009)

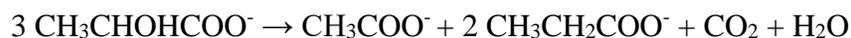


(Reacción 5.2)

$$\Delta G^{\circ'} = -7.98 \text{ kJ/reacción}$$

De igual forma, se ha observado que la fermentación incompleta de lactato puede producir además de acetato, propionato (Muyzer y Stams, 2008). La producción de propionato se ha reportado en biorreactores de agitación continua, en la que una comunidad con actividad sulfato-reductora alimentada con 6.7 de lactato y 0.32 mM de sulfato, produjo acetato y propionato una vez agotado el sulfato (Dar *et al.*, 2008).

La reacción estequiométrica con su respectiva energía libre de Gibbs se presenta a continuación (Seeliger *et al.*, 2002):



(Reacción 5.3)

$$\Delta G^{\circ'} = -170 \text{ kJ/reacción}$$

Considerando la energía libre de Gibbs como referencia, se sugiere que la reacción más favorable en ausencia de arsenato en el medio es aquella en la que se produce propionato y acetato de manera simultánea. No obstante, el propionato no fue cuantificado en este estudio debido a limitaciones con la técnica analítica.

En los consorcios sin arsénico el consumo en general de lactato fue menor, con respecto al tratamiento con arsénico. Sin embargo, este consumo entre 33% y 53% (excluyendo los cultivos 110- y 922- con un mayor consumo de lactato) representó un mayor crecimiento celular que los tratamientos con arsénico, como se observa en los resultados de la densidad óptica (Fig. 5.1). Esto sugiere que los consorcios con arsénico a pesar de tener un alto consumo de lactato (comparado con el tratamiento sin arsénico), tuvieron un bajo rendimiento en el crecimiento por la toxicidad de éste. Mientras que, en los cultivos sin

arsénico, las bacterias pudieron crecer sin la presión que ejerce el arsénico por su toxicidad y por tanto, no necesitaron consumir tanto lactato para observar un mayor crecimiento.

### 5.3 Velocidades de consumo de lactato

En la Tabla 5.1, se presentan los valores correspondientes a las velocidades calculadas a partir de las cinéticas de consumo de lactato en el periodo del experimento (30 días). De manera general, se puede notar que para los tres consorcios, un aumento en la concentración de lactato aumenta la velocidad de consumo del mismo.

De los valores presentados en la tabla se puede destacar que en los consorcios 5 y 9, los experimentos sin arsénico presentaron una mayor velocidad de consumo de lactato y son dependientes de la concentración inicial de lactato (10 ó 22 mM), en comparación con sus contrapartes tratadas con arsénico con velocidades menores. Los resultados sugieren que el arsénico pudo limitar el consumo de lactato en estos consorcios. La excepción fue el tratamiento del Consorcio 5 con 10 mM de lactato, ya que con o sin la adición de arsénico se observó la misma velocidad de consumo de lactato (0.83 mmol/L·d).

**Tabla 5.1.** Valores de velocidad de consumo de lactato en presencia y ausencia de arsénico para cada uno de los tratamientos\* de los tres consorcios.

Tratamiento	Velocidad (mmol/L·d)	Tratamiento	Velocidad (mmol/L·d)	Tratamiento	Velocidad (mmol/L·d)
110+	2.92 ± 0.39	510+	0.83 ± 0.03	910+	1.08 ± 0.54
110-	1.50 ± 0.28	510-	0.83 ± 0.07	910-	1.56 ± 0.14
122+	5.72 ± 1.22	522+	1.98 ± 0.55	922+	1.53 ± 0.53
122-	3.31 ± 0.39	522-	2.69 ± 0.64	922-	2.07 ± 0.79

Clave de los tratamientos: Primer dígito indica el Consorcio (1, 5, ó 9), siguientes dos dígitos indican la concentración inicial de lactato (10 ó 22 mM), el símbolo + ó – indica con la adición de As(+5) o sin adición de As(+5), respectivamente.

Al comparar las velocidades de consumo de lactato con la densidad óptica se observa que los Consorcios 5 y 9 sin arsénico presentan un crecimiento en los primeros 15 días, a diferencia de los consorcios con arsénico que muestran una cinética casi sin cambios que

indica nulo crecimiento. Cabe mencionar que una mayor velocidad de consumo no se traduce directamente en una mayor eficiencia de consumo de lactato.

Cabe destacar que las velocidades de consumo de lactato del Consorcio 1 con arsenato fueron las más altas de todos los tratamientos. Por ejemplo, el tratamiento con 22 mM de lactato y arsénico presentó una velocidad de 5.72 mmol/L·d, mientras que su contraparte sin arsénico registró 3.31 mmol/L·d.

De igual manera, para el tratamiento con arsenato del Consorcio 1 adicionado con 10 mM de lactato se registró una velocidad de 2.92 mmol/L·d, mientras que para la misma concentración de lactato sin arsénico se observó una velocidad de consumo menor (1.50 mmol/L·d).

Considerando que el Consorcio 1 mostró un comportamiento distinto al de los otros consorcios, se plantea que la comunidad bacteriana podría tener un metabolismo distinto con arsénico, que ocasionó un aumento en la velocidad de consumo de lactato. Este aumento en la velocidad podría estar relacionado con un predominio de la respiración de arsenato, debido a que las bacterias arsenato-reductoras obtienen energía mediante esta actividad respiratoria que depende del poder reductor del lactato. A pesar de que la respiración de arsénico genera energía a partir de la reducción de arsenato resulta indispensable un donador de electrones (lactato). Los electrones donados pasan por el ciclo de Krebs hasta la cadena de transporte de electrones, por lo que un aumento en el consumo de lactato podría generar un aumento de electrones disponibles en forma de NADPH (Genova, 2014). Esos electrones, serían transferidos a la arsenato reductasa y finalmente serían aceptados por el arsenato. Para el sustento de esta idea se tiene que el sistema de respiración de arsenato, Arr, posee una alta afinidad hacia el arsenato y también una alta velocidad de reducción ( $K_m = 44.6 \mu\text{M}$ ,  $k_{cat}/K_m = 2.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) (Glasser *et al.*, 2018), una mayor afinidad por el sustrato y una mayor velocidad de reducción se traduciría en un aumento de la demanda de electrones por parte del sistema Arr, por lo que aumentarían las actividades metabólicas, que supondrían un mayor consumo de lactato.

En cambio, en los Consorcios 5 y 9 una disminución en la velocidad de consumo de lactato en presencia del arsénico, indica que se tiene un efecto tóxico sobre las comunidades, en ausencia de sulfato. Entonces, para que las bacterias puedan sobrevivir deben de realizar

dos procesos metabólicos distintos, uno que les provea de energía necesaria para poder realizar sus funciones celulares y otra que les permita lidiar con la toxicidad del arsénico. En este sentido, se sugiere que la detoxificación de arsenato fue el proceso predominante en el metabolismo de las comunidades. En este caso, para que las células puedan obtener energía (ATP) para sus procesos metabólicos, deben realizar fermentación como se mencionó anteriormente (Sección 5.2), al igual que los consorcios sin arsénico. Así, con el ATP suficiente, las células ya poseen la energía para afrontar la toxicidad del arsénico; cabe mencionar que el proceso de detoxificación mediada por el gen *arsC* no promueve el crecimiento, como se ha reportado en *Desulfovibrio* cepa Ben-RA, quien posee este gen para la detoxificación de arsenato a arsenito (Macy *et al.*, 2000). Mas bien, la detoxificación es un sistema que requiere de energía para la expulsión del arsenito (producto de la reducción de arsenato por la arsenato reductasa) del citoplasma mediante una APTasa (Yan *et al.*, 2019), lo que se traduce en un consumo de energía constante si se está en un medio con arsenito disuelto. De igual manera, el proceso de detoxificación de arsenato sería más lento en comparación con la respiración, debido a la menor afinidad y velocidad del sistema Ars ( $K_m = 68 \mu\text{M}$ ,  $k_{cat}/K_m = 5.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) (Glasser *et al.*, 2018).

Por consiguiente, la fermentación del lactato ocurre tanto en las comunidades sin arsénico de los tres consorcios (1, 5 y 9) y de manera predominante en los tratamientos con arsenato de los Consorcios 5 y 9. Mientras que la respiración es el mecanismo predominante en el Consorcio 1. Cabe destacar, que dentro de éste y los otros consorcios diferentes bacterias están involucradas activamente en el proceso de arsenato reducción, por lo que es importante determinar la identidad de las bacterias presentes como se discutirá más adelante.

## **5.4 Identificación taxonómica de la comunidad arsenato/sulfato reductora y potencial genético de detoxificación**

### **5.4.1 Índices de diversidad alfa**

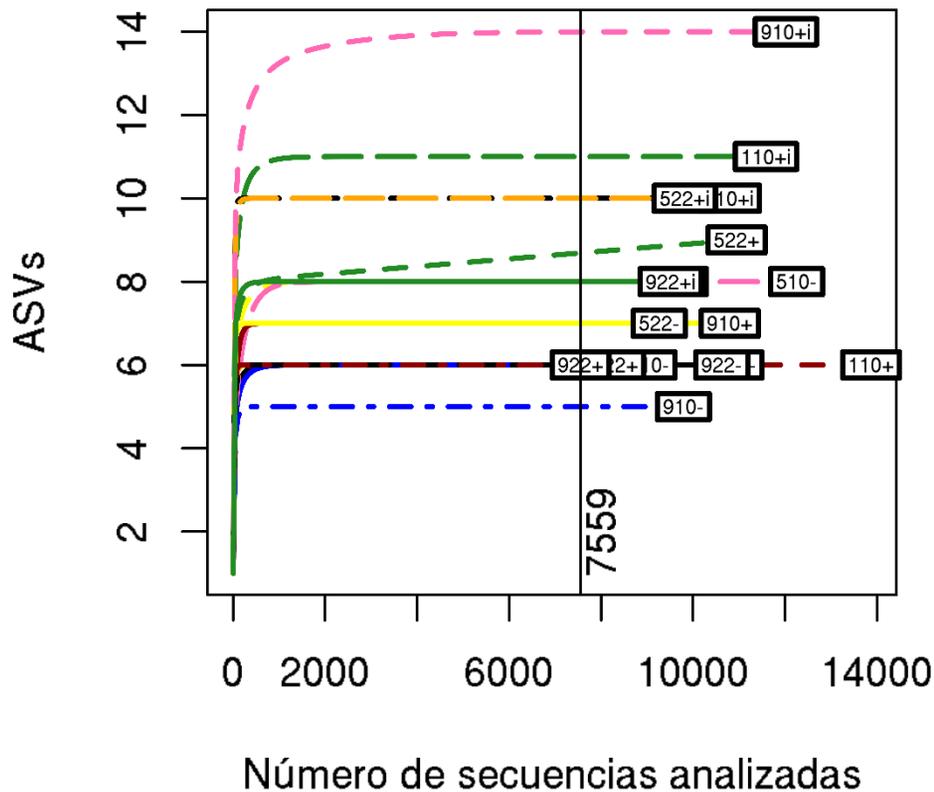
Después de la secuenciación que se realizó mediante la plataforma Illumina se obtuvieron 2,125,992 secuencias, mismas que se filtraron utilizando el paquete FIGARO (Weinstein *et*

*al.*, 2019). Este paquete informático permite de manera automática conservar el máximo de secuencias que tengan la menor cantidad de errores de secuenciación ya que el paquete identifica los parámetros ideales de corte y de unión de secuencias complementarias. Las posiciones aplicadas para la filtración fueron 276 para las secuencias forward y 232 para las reverse. Después del filtrado se obtuvieron 186,203 secuencias que fueron asignados a 1,346 variantes de secuencias de amplicones (ASVs por sus siglas del inglés Amplicon Sequence Variants). Las ASVs son secuencias que han sido agrupadas de acuerdo a su similitud tomando en cuenta pequeñas variaciones que están asociadas a un mismo taxón, a comparación de las OTUs que agrupan secuencias basadas en un porcentaje de similitud (frecuentemente 97%). De este modo, las ASVs representan de manera más precisa la diversidad de las muestras. Cabe destacar que los resultados correspondientes a la muestra del Consorcio 5 con 10 mM de lactato y arsénico (510+) no se presentan debido a que la extracción de ADN no pudo realizarse de manera satisfactoria porque la concentración de biomasa resultante no fue la suficiente para poder realizar la extracción de ADN.

En la Figura 5.5 podemos ver el número de las secuencias analizadas para cada una de las muestras y el número de ASVs que representan las especies encontradas en cada una de las muestras. Cabe mencionar que para preparar los resultados de la diversidad alfa se realizó un filtro de las muestras que presentan ASVs con una presencia menor al 1%. La mayoría de las curvas alcanzaron una asíntota lo que indica que la cobertura o número de secuencias fue la indicada para el análisis de las comunidades (Hamood Altowayti *et al.*, 2020).

Las curvas fueron normalizadas a partir de la determinación de un mínimo de secuencias para la realización de la rarefacción tomando en cuenta 7559 fragmentos secuenciados (Cameron *et al.*, 2021). De igual modo, en la gráfica se puede notar que la muestra 910+i (correspondiente al inóculo del Consorcio 9 con 10 mM lactato y con arsénico) es la que posee una mayor diversidad (14 ASVs) comparada con la muestra 910-, que es la menos diversa (5 ASVs). En promedio se observaron 8 ASVs en cada muestra.

A partir de las curvas de rarefacción se puede interpretar que los puntos de corte aplicados en el análisis de secuencias crudas fue el indicado para tener una cobertura amplia de las muestras representando la totalidad o mayoría de los individuos dentro de las muestras y que con ello, las muestras puedan ser comparables (Chao y Chiu, 2016).



**Figura 5.5.** Curvas de rarefacción de los consorcios (1, 5, y 9) y sus respectivos inóculos (i) bajo los diferentes tratamientos con (+) ó sin (-) arsénico, y lactato 10 ó 22 mM. La línea negra vertical indica el número mínimo de secuencias para la rarefacción (7559 fragmentos secuenciados). No se consideraron las ASVs cuyo porcentaje fue menor que 1%.

Para identificar la estructura de la comunidad de cada una de las muestras y comparar las diferencias entre tratamientos con respecto a la abundancia relativa de los miembros de la comunidad se procedió a analizar la diversidad alfa, la cual permite conocer el número de especies dentro de una comunidad y la abundancia de cada una de estas especies (Willis, 2019) a través del estimador Chao1 y el índice de Shannon-Weaver.

Resulta relevante mencionar que la muestra 522+, que representa al Consorcio 5 con el tratamiento en presencia de arsénico y lactato inicial 22 mM, fue la única que no presentó un comportamiento asintótico de la curva, sin embargo su pendiente indica que pocas ASVs

fueron excluidas del muestreo (Figura 5.5), y que comparando las muestras observadas y el estimado del número de ASVs presentes en la muestra, se comprobó que si se logró muestrear a todas las especies dentro del consorcio (9 especies observadas en ambos indicadores).

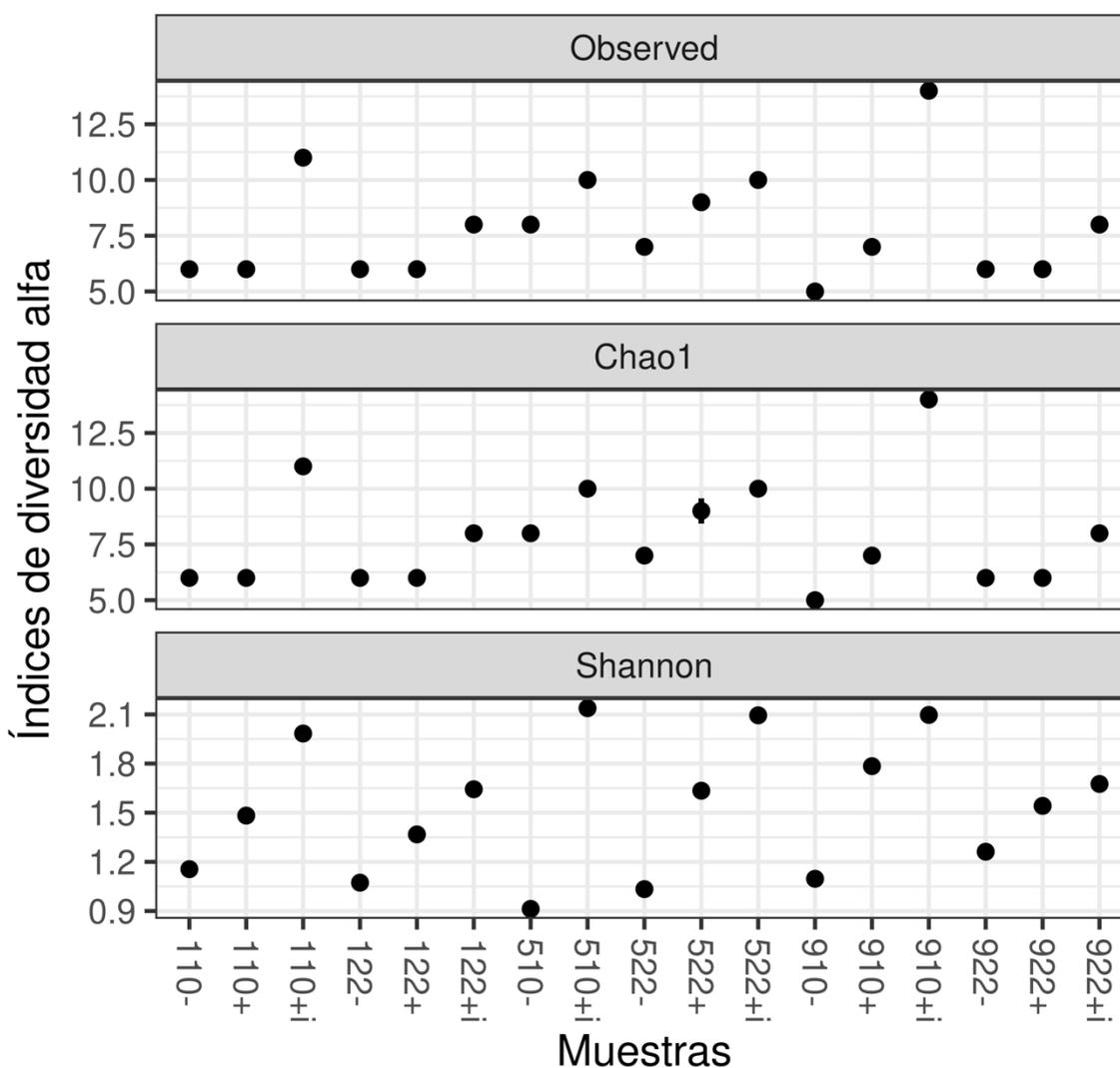
La Figura 5.6 muestra los resultados obtenidos de los análisis de diversidad alfa. Primero se presenta la diversidad observada en el panel superior, seguido del estimador Chao1 y en la parte inferior el índice de Shannon-Weaver. La diversidad observada resultó idéntica a la estimada mediante Chao1, con valores entre 5 y 14 especies en todas las comunidades analizadas. Los inóculos de los consorcios 1 y 9 cultivados con 10 mM de lactato y en presencia de arsenato tuvieron los valores de especies más altos de 11 y 14, respectivamente. En general, los inóculos presentaron un mayor número de especies que sus tratamientos.

Se puede observar la tendencia de un mayor número de especies en los inóculos con una concentración de 10 mM en comparación con los inóculos con 22 mM. Se esperaría que una mayor disponibilidad de donador de electrones permitiera a otras bacterias proliferar, sin embargo, una mayor concentración de lactato pudo ocasionar que la especie bacteriana que sea capaz de resistir/metabolizar el arsénico de manera más eficiente y con una velocidad de consumo de lactato mayor sea quien predomine en el medio.

Los tratamientos presentaron valores de Chao1 entre 5 y 9 especies distintas. Entre los tratamientos se pudo notar que para la mayoría de los consorcios la presencia o ausencia de arsénico y las diferentes concentraciones de lactato (lactato 10 ó 22 mM) no representaron factores que cambiaran el número de especies en las muestras. Como excepción se notó a los Consorcios 9 con 10 mM y el 5 con 22 mM, con más especies en el tratamiento con arsénico. Una de las razones por la que podría haber un mayor número de especies con arsénico, puede ser porque en ausencia de arsénico podría existir una mayor competencia por el donador de electrones, porque ya no están inhibidas por el As y desplazaría a las bacterias con un metabolismo que no sea competitivo.

En general, se observó que un bajo número de especies en todas las muestras teniendo valores de las especies observadas y el estimador Chao1 idénticas, lo cual indica que las

muestras contienen a todas las especies de la comunidad. Los valores de Chao1 están basados en las especies raras que se puedan encontrar en la comunidad y la pérdida de estas especies raras sea el resultado de la selección de las comunidades por la presión selectiva del arsénico y el efecto de las diluciones seriadas. El aumento de la concentración de lactato pareciera no tener efecto en la diversidad de los consorcios ni la presencia o ausencia de arsenato.



**Figura 5.6.** Diversidad alfa de las distintas comunidades arsenato-reductoras. Panel superior: diversidad observada. Panel medio: estimador Chao 1. Panel inferior: índice Shannon-Weaver. Clave de los tratamientos: Primer dígito corresponde al consorcio (1, 5, ó 9); segundos dos dígitos concentración de lactato (10 ó 22 mM); (+) con arsénico, (-) sin arsénico. Los inóculos se identifican con (i).

Por otro lado, otros índices complementan la información sobre la estructura de la comunidad bacteriana, como el índice Shannon-Weaver. Los índices de Shannon-Weaver de este estudio mostraron que los inóculos de los consorcios son las muestras más diversas comparados con las comunidades de los tratamientos. Resalta que los valores del índice de Shannon-Weaver sugieren que la diversidad de las comunidades en los tratamientos está relacionada con la presencia de arsénico más que con la concentración de lactato.

Después de los inóculos, los tratamientos con arsénico quienes presentan una mayor diversidad de Shannon-Weaver con valores entre 1.36 – 2.13, seguidas de las muestras sin arsénico con valores entre 0.91 y 1.26. Los cultivos están tan especializados en arsenato reducción, que al quitar el arsenato se pierde la diversidad. Unas pocas bacterias serían las que dominan, presentando una mayor abundancia relativa y posiblemente tener un crecimiento más rápido, es probable que esto sea el resultado del metabolismo de bacterias fermentativas, ya que se favorece este metabolismo en un ambiente anaerobio y sin aceptor de electrones (Dar *et al.*, 2008), También cabe la posibilidad de que no todos los microorganismos que respiran el arsénico puedan fermentar.

En contraste, las muestras con el tratamiento con arsénico están sujetas a un estrés constante por el efecto tóxico, lo cual no permitiría que los miembros de la comunidad compitan por el donador de electrones, a causa de los requerimientos metabólicos que implica la expulsión del tóxico de la célula. Dicho de otro modo, las bacterias en presencia de arsénico dirigen su metabolismo hacia la reducción del arsénico como mecanismo de detoxificación o para la obtención de energía, permitiendo la disponibilidad del aceptor de electrones para otras especies de bacterias.

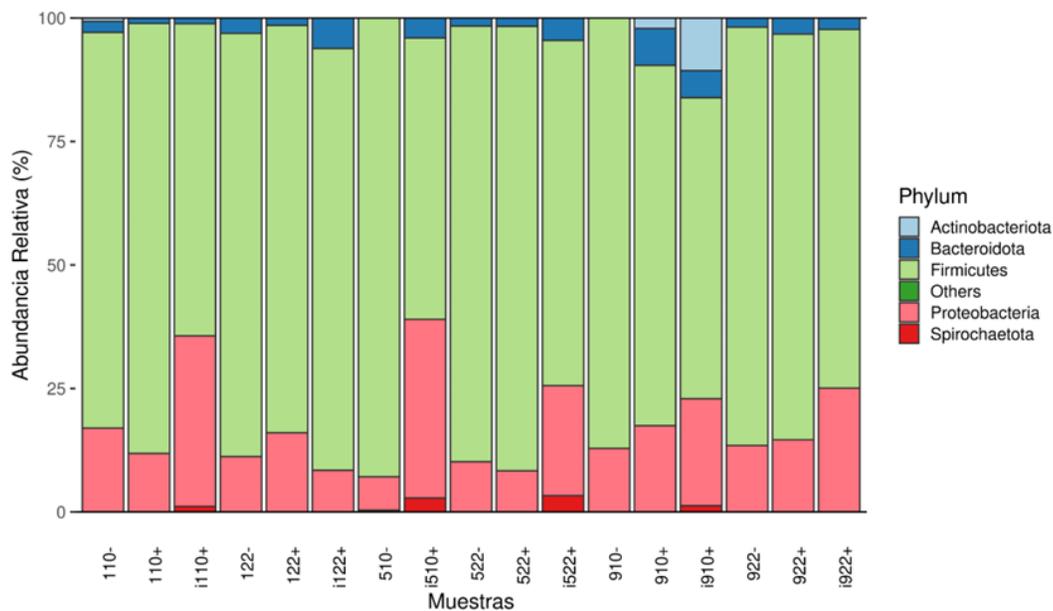
Las diferentes especies que se encuentran en las muestras aquí estudiadas pueden poseer diferentes capacidades metabólicas adicionales que les permitan sobrevivir a diferentes condiciones formando una red de cooperación que pueden ser de utilidad para el diseño de nuevas técnicas de biorremediación (Bertin *et al.*, 2011).

#### 5.4.2 Identificación taxonómica de la comunidad arsenato y sulfato reductora

Para poder dilucidar la identidad de las bacterias presentes en las comunidades, se realizó la secuenciación de las muestras, que posteriormente fueron analizadas. En la Figura 5.7 se presenta la composición de las comunidades de los consorcios a nivel de Filo. Aquí, se puede destacar que existe una diferencia entre los inóculos y las muestras que se derivaron de éstos. En general, las comunidades estuvieron dominadas por *Firmicutes* que representó entre 56.95% y 92.88% de las comunidades. El filo *Proteobacteria* contribuyó entre 6.75% y 36.15% de la diversidad, mientras que *Bacteroidota* representó 1.11% y 7.45% en casi todas las muestras a excepción del tratamiento 510-, donde está ausente. En casi todos los inóculos, con excepción del i122+ y el i922+ se encontró *Spirochaetota* (4.83 – 42.56%).

También se realizó la asignación taxonómica a nivel de orden y familia que se incluyen en los anexos 2 y 3.

A nivel de género, en la Figura 5.8 se observa que las comunidades de las muestras fueron asignadas exitosamente a grupos bacterianos conocidos. Cabe destacar que menos de 1% de las secuencias se asignaron dentro de la categoría de otros. En general, se encontró que las comunidades estuvieron compuestas hasta por 14 géneros, siendo los inóculos los más diversos (7 – 14 géneros). Esta baja diversidad de géneros indica que las comunidades se encuentran muy seleccionadas y adaptadas al medio como resultado de las diluciones seriadas. Es preciso recordar que los cultivos han pasado por un proceso de selección mediante diluciones seriadas en las que se adicionó al medio 10 mM de arsenato en cada una, por lo que se esperaría que todas las bacterias presentes posean mecanismos de detoxificación, respiración, y/u oxidación de arsenito. Sin la presencia de sulfato, el arsenito está disuelto en el medio, por lo que se espera que las bacterias aquí presentes tengan mecanismo para sobrellevar la toxicidad del arsénico. En los tratamientos, se encontró que un menor número de géneros (entre 5 y 8) componía las comunidades, comparado con los inóculos.



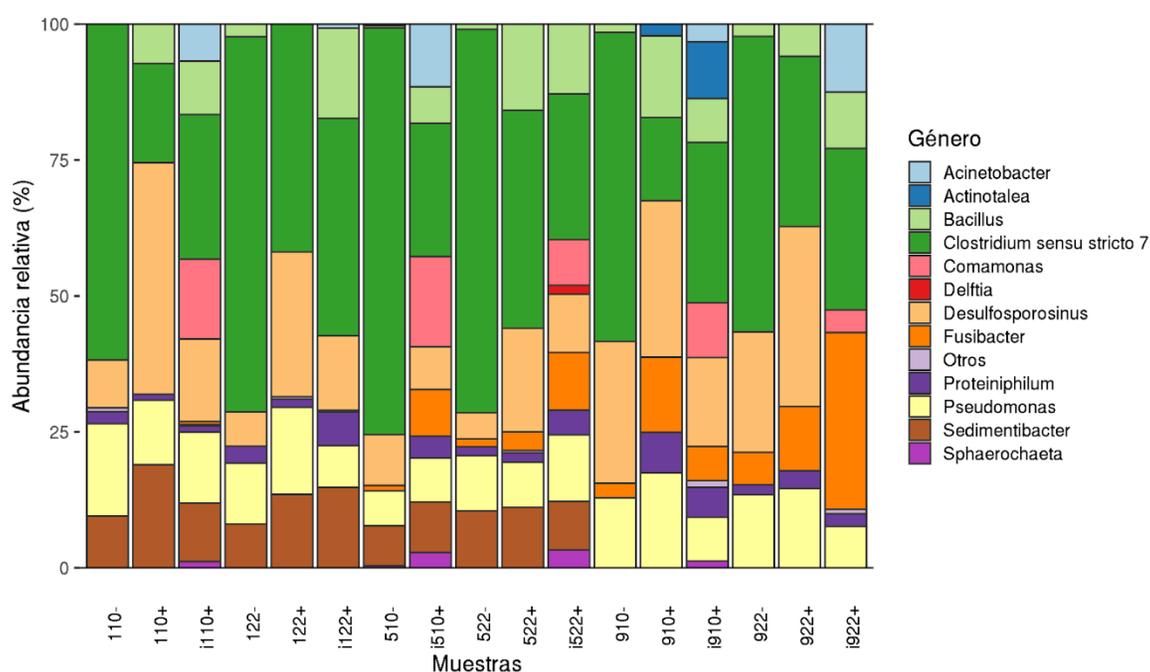
**Figura 5.7.** Abundancia relativa a nivel de phylum expresado en porcentaje (%), se presentan los resultados de los diferentes tratamientos con (+) y sin arsénico (-), y la concentración de lactato 10 y 22 mM junto con sus inóculos (i) de los diferentes Consorcios (1, 5 y 9).

Se puede distinguir de la Figura 5.8 los orígenes de los consorcios, ya que en los consorcios 1 y 5, se identificaron a miembros de *Sedimentibacter*, dichos consorcios provienen del sedimento del sitio CT. Mientras que en las muestras del Consorcio 9 que provienen de sedimento del sitio CB, no se encontró la presencia de *Sedimentibacter*

En todas las comunidades se observó la presencia de miembros de los géneros *Pseudomonas* y *Clostridium*, seguidos de los géneros *Desulfosporosinus*, los cuales estuvieron presentes en la mayoría de las muestras excepto en el inóculo del consorcio 9 (i922+), y *Bacillus*, ausente únicamente en las muestras 110- y 122+. El género *Sedimentibacter* se observó únicamente en los tratamientos donde se usaron los Consorcios 1 y 5 que provenían del sitio CT, por lo que su presencia está relacionada al origen del inóculo. La Figura 5.10 permite distinguir que en general los miembros de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, y *Clostridium* predominaban en las comunidades. Dichos géneros han sido previamente descritos como miembros de comunidades arsenato-reductoras (Freikowski *et al.*, 2010; C. Zhang *et al.*, 2023). Pero también se han destacado otras capacidades en los géneros *Clostridium* y *Bacillus* como la de reducción de hierro. De igual

manera, se caracterizan por su capacidad para formar esporas y por lo tanto resultan ubicuos en distintos ambientes (Galperin *et al.*, 2012). Aunque también se ha descrito que *Desulfosporosinus* y *Sedimentibacter* forman esporas (Grigoryan *et al.*, 2018).

Ante una mayor presencia de lactato (22 mM) se puede observar que, *Clostridium* tuvo una mayor abundancia relativa (26 - 41%) comparado con aquellos cultivos con lactato 10 mM cuando se encuentra presente arsenato en donde la abundancia relativa de *Clostridium* fue menor (15 - 30%) (Figura 5.10). Se destaca que *Clostridium*, *Bacillus*, y *Desulfosporosinus* son miembros del *phylum Firmicutes*, mientras que *Pseudomonas* pertenece a la clase de las *Gamma-proteobacterias*.



**Figura 5.8.** Abundancia relativa de los cultivos a nivel de género, se presentan las abundancias relativas de los géneros con una abundancia relativa mayor a 1% contra las muestras bajo los diferentes tratamientos con (+) y sin arsénico (-), y la concentración de lactato 10 y 22 mM junto con sus inóculos (i) de los diferentes Consorcios (1, 5, y 9).

Otros géneros como *Comamonas* (4.15-16.57%), *Acinetobacter* (3.24-11.51%), y *Sphaerochaeta* (0.35-2.82%) únicamente fueron localizados en algunos inóculos, pero sin presencia en los demás tratamientos. *Comamonas* y *Acinetobacter* pertenecen a *Gamma-proteobacterias*, mientras que *Sphaerochaeta* pertenece al filo *Spirochaetota*.

*Bacillus* es un género que estuvo presente entre un 2.3 - 16.59% de abundancia relativa en las muestras. Siendo más abundante en el tratamiento del inóculo del Consorcio 1 con lactato 22 mM y arsenato. En general, una mayor presencia de este género pudo observarse en aquellos tratamientos con arsénico. En cambio, en los tratamientos sin arsénico el género *Bacillus* se encuentra en bajas proporciones. Por ejemplo, en la muestra 510-, tuvo una abundancia de 0.33%, pero coincide con que en esta muestra predominó *Clostridium* con quien probablemente compitió por el donador de electrones en las muestras sin arsénico. Dentro de este género se han reportado especies como *B. flexus* con capacidad de detoxificación de arsenato mediante la presencia del gen *arsC* (Marwa *et al.*, 2019). De igual manera, otra cepa (*Bacillus sp.* strain SF-1) miembro de este género extraído de un efluente contaminado con Selenio de una fábrica de vidrio, presentó el mecanismo de respiración de arsenato en un medio con lactato 20 mM y 10 mM, cabe destacar que al finalizar la reducción de arsenato, la bacteria dejó de crecer, lo cual corroboró el uso del arsenato como aceptor final de electrones (Yamamura *et al.*, 2003).

Miembros del género *Fusibacter* también parecen tener un papel destacado dentro de las comunidades. En general, su tendencia es una mayor presencia en los tratamientos con arsénico, donde fueron observadas en los Consorcios 5 y 9, con una mayor proporción en el Consorcio 9, con abundancias relativas entre 2.69 – 32.53%. La mayor abundancia se encontró en el inóculo del Consorcio 9 con lactato 22 mM con arsénico (i922+). Este género ha sido reportado como un género bacteriano con la capacidad de reducción de sulfato y tiosulfato, al igual que de reducción de arsenato (Wang *et al.*, 2021), tal como se ha reportado para la cepa *Fusibacter spp.* 3D3, aislada en el Salar Ascotán en Chile, por su capacidad de reducción de arsenato mediante los genes *arsC*. No obstante, en los estudios previos del grupo de investigación, se ha identificado a este género específicamente con la capacidad de respiración de arsenato (Rios-Valenciana *et al.*, 2023).

En el caso de *Pseudomonas*, su presencia se pudo notar en todas las muestras, por lo que es uno de los pocos géneros omnipresentes de los tratamientos, sin presentar preferencia por el arsénico o una concentración de lactato, ya sea 10 o 22 mM. Miembros de este género se encuentran con una abundancia relativa de entre 6.44 y 17.46 %, por lo que su metabolismo

flexible les permitió mantener una proporción similar en todos los cultivos. Se ha descrito que *Pseudomonas* es capaz de resistir la toxicidad del arsenato de manera anaerobia y también aerobia, aunque es capaz de resistir concentraciones mayores de arsenato bajo condiciones aerobias. Se ha comprobado la presencia del gen *arsC* y también el de respiración *arrA*, por lo que ante el agotamiento de un donador de electrones como lactato *Pseudomonas* también podría usar  $\text{As}^{+3}$  como donador de electrones para respirar, este proceso es mediado por el gen *aioB*. En este sentido, también posee la capacidad de crecer en presencia de arsenito ( $\geq 5$  mM) y utilizar  $\text{Fe}^{3+}$  como aceptor final de electrones (Leon *et al.*, 2018; Paul *et al.*, 2015). Sin embargo, no todas las especies de *Pseudomonas* poseen estas características, ya que algunas especies de este género como *P. aeruginosa* y *P. putida* no son capaces de tolerar concentraciones mayores de arsenato 10 mM, por lo que carecen de alguna de los genes de resistencia/respiración de arsenato (Patel *et al.*, 2007).

*Proteiniphilum*, miembro del *phylum Bacteroidota* es también de los pocos géneros que se encontraron en la mayoría de los tratamientos, a excepción de las muestras de los consorcios 5 y 9 con lactato 10 mM sin arsénico (510- y 910-). Su abundancia relativa, sugiere que su aportación funcional a las comunidades es menor, en comparación con *Pseudomonas*, con proporciones de presencia entre 1.11 – 7.45%. *Proteiniphilum* se ha reportado con diversas capacidades metabólicas, en las que destacan la respiración de arsenato (Rios-Valenciana *et al.*, 2020), al igual que se ha encontrado en digestores anaerobios con capacidad fermentativa, por lo que son capaces de resistir condiciones ácidas, producto de la fermentación y por ello también están presentes en las muestras sin arsénico. Se sugiere que miembros de este género también puedan estar relacionados con la oxidación de arsenito a arsenato, por la presencia de genes *aioA*, en un estudio de una comunidad que simulaba ser un vertedero dentro de un reactor semi-anaerobio con concentraciones de arsenito 75  $\mu\text{M}$  ( $\text{NaH}_2\text{AsO}_3$ ) y lactato de sodio 4.46 mM (Nie *et al.*, 2021).

En cuanto al género de *Sedimentibacter*, perteneciente al filo *Firmicutes* puede notarse que ligeramente prefieren los tratamientos con arsénico donde su abundancia relativa con este metaloide estuvo entre 9 - 18%, mientras que, en ausencia de arsénico estuvo presente (7 - 10%). Ante esta aparente preferencia, *Sedimentibacter* ha sido cultivado en medios con las especies de arsénico +3 (2 mM) y +5 (10 mM), por lo que podrían ser capaces de oxidación

de arsenito y arsenato reducción (Suhadolnik *et al.*, 2017). La reducción de arsenato sería a través de los dos mecanismos, detoxificación y respiración. Entre otras actividades que se han reportado para miembros del género también está la reducción de sulfato al mismo tiempo que crece de manera anaerobia con arsenato (Grigoryan *et al.*, 2018; Rios-Valenciana *et al.*, 2023).

El género *Comamonas* estuvo presente únicamente en los inóculos de los tres consorcios, a excepción del inóculo del Consorcio 1 con lactato 22 M, por lo que se podría decir que no pudo adaptarse a los tratamientos posteriores a consecuencia de la selección por la dilución consecutiva. Su abundancia relativa estuvo entre 4.15 y 16.57%. Cabe destacar que estos inóculos fueron adicionados con arsénico, por lo que el arsénico podría ser parte importante de su metabolismo. En este sentido, dentro de este género han sido identificadas cepas como *Comamonas* spp. TS37 y TS38 en sitios contaminados con arsénico, específicamente con la capacidad de tolerar el arsenito (>20 mM) a través de genes de oxidación *aoxB* (L. Cai *et al.*, 2009). Es posible que el papel de este género en la comunidad del inóculo fuera la oxidación de arsenito. No obstante, también se ha encontrado que algunos miembros de este género pueden detoxificar el arsenato, como la cepa *Comamonas* sp. strain CNB-1, que posee los genes de resistencia *arsC* (Y. Zhang *et al.*, 2007). Por lo que podría estar realizando la oxidación de arsenito y/o detoxificación de arsenato como mecanismo de resistencia al arsénico.

Los miembros del género *Acinetobacter* repiten la misma tendencia que *Comamonas* al estar presente únicamente en los inóculos, a excepción del inóculo del Consorcio 5 con lactato 22 mM más arsénico (i522+). Estas bacterias han sido documentadas con la capacidad de oxidar arsenito (Basu *et al.*, 2023). Esta oxidación podría ser un mecanismo por el cual el consorcio se mantiene protegido ante los altos niveles de arsenito dentro del medio y al convertirlo a arsenato pudiera sustentar a las bacterias que son capaces de respirar el arsenato junto con *Sedimentibacter*. También en especies de *Acinetobacter* como *A. junii*, se ha detectado la presencia del gen *arsC* para la detoxificación de arsénico (Marwa *et al.*, 2019).

De igual manera, el género *Sphaerochaeta* fue identificado únicamente en inóculos, exceptuando a los inóculos del Consorcio 1 y 9, ambos con lactato 22 mM y arsénico

(i122+ e i922+) con abundancias relativas bajas entre 1.13 y 3.2%. Se ha visto que tiene la capacidad de fermentación de lactato (Caro-Quintero *et al.*, 2012).

Dentro de las bacterias que poseen más del 1% de abundancia relativa, pero que únicamente aparecen en una muestra están *Delftia* con una abundancia relativa de 1.61% en la muestra i522+, este género al no estar presente en los consorcios y sin representación en otras muestras, parece ser no competitiva o tener un crecimiento lento, por lo que no pudo prosperar en el siguiente traspaso. Especies de este género como *Delftia* spp. BAs29 son capaces de realizar la oxidación de arsenito, cuando se inoculó en un medio con 10 mM de As(+3) y 5 mM de As(+5) como aceptor final de electrones y 0.5% de dextrosa como fuente de carbono (Biswas *et al.*, 2018).

Entre las capacidades metabólicas de los *Clostridium* se ha encontrado que tienen el gen de detoxificación de arsénico (Jackson y Dugas, 2003), por lo que es de esperarse que se encuentre entre los cultivos. También se ha documentado la presencia de algunos miembros del género *Clostridium* en suelo de arrozales que contienen arsénico y fueron catalogados con la capacidad de crecer con lactato y de respirar arsenato como *Clostridium sp OhiLAs*, el cual posee el gen *arrA* (Lara *et al.*, 2012). Entre sus capacidades metabólicas también se ha registrado la fermentación (Qiao *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2021), lo cual refuerza la idea que en las comunidades sin arsénico esta actividad pudiera estar sucediendo. Específicamente, miembros del género *Clostridium sensu stricto* 7 han sido previamente reportados con capacidades fermentativas y de respiración de arsenato, potencialmente con genes *arrA* en su genoma (Rios-Valenciana *et al.*, 2023). *Clostridium* tiene una buena capacidad de resistencia a ambientes ácidos (Zhang *et al.*, 2023) lo cual le confiere una ventaja al resistir los productos de la fermentación, como el propionato, que se ha reportado que *Clostridium* es quien produce este compuesto (Rios-Valenciana *et al.*, 2020). De tal forma que, posee una ventaja adicional sobre otros géneros de bacterias en ausencia de arsénico, ya que también compite por el donador de electrones, por lo que resultó en una mayor abundancia relativa comparada con bacterias de otros géneros como *Desulfosporosinus* y *Pseudomonas*. También sobre *Sedimentibacter*, para el caso de los consorcios 1 y 5. De igual manera, se observó que *Fusibacter* fue superada en abundancia relativa sobre las comunidades de los Consorcios 5 y 9, por la competencia del donador de electrones ante *Clostridium*. Ante las capacidades metabólicas de arsenato-reducción por

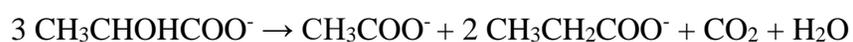
detoxificación y/o respiración posibles de *Clostridium*, en presencia de arsénico, podría competir directamente con *Desulfosporosinus*, *Pseudomonas* y *Bacillus* por la fuente de carbono y el aceptor final de electrones. De igual manera competiría con *Comamonas*, en el caso de las comunidades de los inóculos.

Asimismo, el género *Desulfosporosinus* perteneciente a *Firmicutes* ha sido descrito con actividad sulfato-reductora y capaz de realizar la respiración de arsenato independientemente de la reducción de sulfato (Barton *et al.*, 2015; C. Zhang *et al.*, 2023). Algunos miembros de este género, pueden llegar incluso a realizar la oxidación de arsenito como la especie *Desulfosporosinus meridei* (Suhadolnik *et al.*, 2017). Por otro lado, (Qiao *et al.*, 2018) menciona que *Desulfosporosinus* se relaciona con la respiración de arsenato ya que cuenta con clústeres del gen *arrA*. Entre sus características está su crecimiento por la oxidación de lactato de manera incompleta a acetato bajo condiciones anaerobias (Zhang *et al.*, 2021). *Desulfosporosinus* y *Clostridium sensu stricto* se ven favorecidos con la adición de lactato en el medio a diferencia de otros donadores de electrones como acetato, ácidos húmicos y materia orgánica como AQS (anthraquinone-2,6-disulfonate, por sus siglas en inglés) en reactores inoculados con sedimentos con registro de exposición prolongada a arsénico de hasta 0.56  $\mu\text{M}$  disuelto (Wang *et al.*, 2021). Es muy seguramente por esta preferencia, que estos dos géneros lograron dominar en los consorcios.

Sin embargo, no todas las especies de *Desulfosporosinus* realizan la reducción de arsenato. Se ha descrito, por ejemplo, que la especie *D. acidiphilus* sp., perteneciente al género *Desulfosporosinus* puede ser inducido a la esporulación cuando el arsenato está presente en el medio, como respuesta a su toxicidad ante su incapacidad de utilizar el arsenato como aceptor de electrones (Alazard *et al.*, 2010).

Adicionalmente, se han reportado géneros bacterianos que son capaces de oxidar arsenito en ambientes anaerobios usando al arsenito como donador de electrones y un aceptor de electrones inorgánico. Entre los géneros que destacan por su presencia dentro de los tratamientos está *Acinetobacter* y *Bacillus*, que poseen el gen *aioB*, para la oxidación de arsenito (Paul *et al.*, 2015; Stolz *et al.*, 2006). En condiciones anaerobias y sin un aceptor

de electrones inorgánico como sulfato, el CO<sub>2</sub> y bicarbonato pueden ser quienes realicen esta función y sean además la fuente de carbono, como se ha descrito en bacterias que poseen el gen arsenito oxidasa (*aioA*) como *Ancylobacter dichloromethanicus* As3-1b (Andreoni *et al.*, 2012). Como consecuencia de la oxidación del lactato en la reducción de arsenato (Reacción 5.1) y la fermentación de lactato a acetato (Reacción 5.2), se genera como subproducto bicarbonato y, en el caso de la fermentación a propionato, se obtiene como subproducto CO<sub>2</sub> (Reacción 5.3). En este caso, el bicarbonato y el CO<sub>2</sub> podrían fungir como el aceptor de electrones para la oxidación de arsenito.



(Reacción 5.3)

$$\Delta G^{\circ} = -170 \text{ kJ/reacción}$$

Los géneros *Bacillus* y *Acinetobacter*, en conjunto con otros que se encuentran en los consorcios, como *Comamonas*, *Proteiniphilum* y *Pseudomona*, podrían también participar en la oxidación de arsenito, como se mencionó previamente.

Del análisis filogenético de las comunidades se puede decir que todos los consorcios de este estudio se pusieron a prueba al usar arsenato 10 mM (750 mg/L) en las diluciones seriadas, por lo que las bacterias que conforman las comunidades son todas resistentes al arsenato y arsenito del medio. Sin embargo, la capacidad de cada género para resistir la potencial toxicidad del arsénico difiere y por lo tanto predominan aquellos géneros capaces de tolerar la alta concentración de arsénico disuelto, ya sea como arsenato o arsenito después de ocurrir la reducción, efectuada por las arsenato reductasas. De igual manera, se mencionó que bacterias presentes en el medio podrían también realizar la oxidación de arsenito mediante una arsenito oxidasa. Sin embargo, la comunidad clave es la que realiza la reducción de arsenato. Las arsenato reductasas son las responsables de esta actividad ya sea para la detoxificación o para la producción de energía mediante la respiración. A continuación se presentan los resultados de la presencia del gen de detoxificación en los diferentes consorcios y sus tratamientos.

### 5.4.3 Número de copias del gen de resistencia al arsénico (*arsC*)

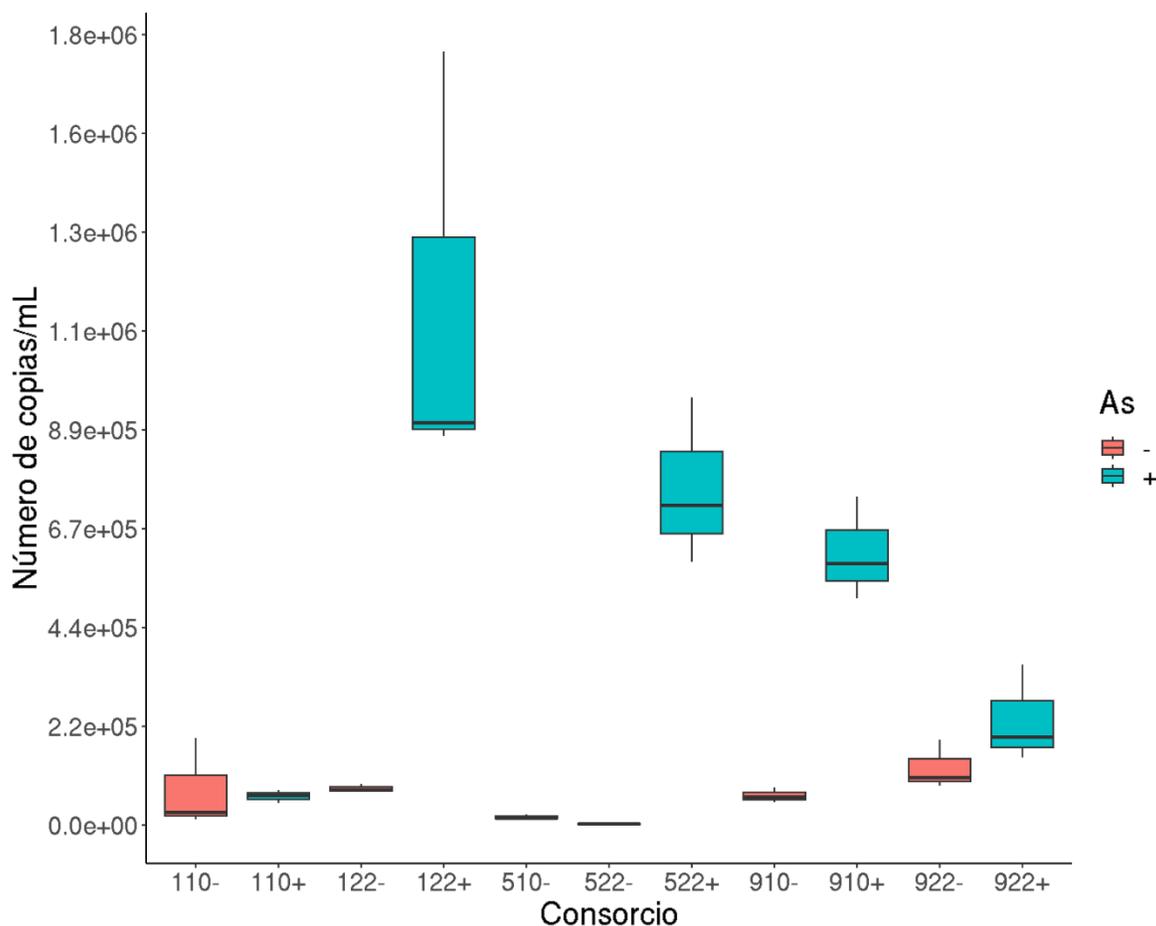
A partir de los extractos de ADN, se procedió a realizar la determinación del número de copias del gen *arsC* y que resulta de particular interés por ser el gen que codifica para la enzima arsenato reductasa que cataliza la reducción de arsenato a arsenito para la detoxificación. Los resultados del número de copias de este gen fueron obtenidos a partir de una PCR en tiempo real, cuyos resultados se presentan en la Figura 5.9. En total se analizaron 13 muestras mediante qPCR. Para poder llevar a cabo la cuantificación, cada muestra se analizó por triplicado y los resultados fueron usados para la construcción de la gráfica. Se realizó una curva estándar para la qPCR que obtuvo una eficiencia del 96.38% con una  $R^2$  de 0.988 (Anexo 8.2). La curva de fusión resultante presentó una temperatura de fusión de las clonas (referencia positiva) de 79°C. Mientras que las muestras realizadas tuvieron una temperatura cercana, alrededor de 75 y 76 °C (Anexo 8.3).

De la Figura 5.9, se puede destacar que aquellos consorcios cultivados con arsénico presentan un mayor número de copias del gen *arsC*, a diferencia de aquellos consorcios que carecen de arsénico. Por lo que, los integrantes de las comunidades bacterianas bajo condiciones con arsénico deben tener la capacidad de detoxificación, mediado por el gen *arsC* o también contar con un mecanismo de respiración de arsénico, regulado por el gen *arrA*.

La diferencia más evidente en el número de copias del gen *arsC* se encontró para los consorcios 1 y 5 alimentados con 22 mM de lactato. Donde el promedio de número de copias por microlitro para los tratamientos con 22 mM de lactato fue de  $7.86 \times 10^4$  en el cultivo del Consorcio 1 sin arsénico y de  $9.05 \times 10^5$  para el cultivo con arsénico. En el caso del Consorcio 5 con arsénico y lactato 22 mM, el promedio fue de  $7.19 \times 10^5$  copias del gen *arsC* por microlitro y de  $2.45 \times 10^3$  copias en ausencia de arsénico.

El promedio del número de copias del Consorcio 9, en general, fue más bajo de los tres consorcios con arsénico, siendo de  $5.88 \times 10^5$  copias con 10 mM de lactato y de  $1.98 \times 10^5$  con 22 mM, ambos en presencia de arsénico. Sin embargo, las muestras sin arsénico sí presentaron números de copias del gen *arsC*, por ejemplo, el tratamiento 922- tuvo un promedio de  $1.07 \times 10^5$  copias, el mayor valor de los tratamientos sin arsénico. Sin embargo, la cuantificación de número de copias del gen *arsC* en cultivos sin arsénico, no indica que estén activos, si no que las bacterias tienen en sus genes los mecanismos necesarios para la

detoxificación (*arsC*) de manera basal, que en caso de encontrarse en presencia de arsenato, serían capaces de expresarlos y aumentar su número de copias.



**Figura 5.9.** Número de copias/mL del gen *arsC-Trx* para cada uno de los tratamientos, de los Consorcios 1, 5 y 9 (primer dígito), cultivados con 10 mM ó 22 mM de lactato (segundos dos dígitos), en ausencia (-) o presencia (+) de 10 mM de As(+5).

Dicho lo anterior, un mayor número de copias del gen *arsC* podría estar relacionado con la capacidad de resistencia al arsénico del consorcio en cuestión, ya que el gen *arsC Trx* le confiere a las bacterias la resistencia al arsénico. La capacidad de detoxificación confiere también a las bacterias un mecanismo para mantener el arsenito fuera de la célula. Dicho mecanismo de expulsión de arsenito, es dependiente de ATP (Yan *et al.*, 2019) y por lo tanto, los microorganismos con la capacidad de detoxificación deben oxidar lactato para mantener a la célula libre de la toxicidad del arsénico.

Sin embargo, para poder afirmar si las diferencias observadas en el número de copias del gen *arsC* Trx son significativas deben realizarse las pruebas estadísticas pertinentes con el suficiente número de réplicas, de al menos tres. Desafortunadamente, la poca biomasa que se logró obtener en los ensayos no fue suficiente para lograr las réplicas adecuadas y los triplicados corresponden a los realizados a la muestra, de acuerdo con el protocolo para la técnica de qPCR.

No obstante, se puede observar una excepción en la correlación positiva entre la presencia de arsénico y el número de copias del gen *arsC*, ya que el Consorcio 1 cultivado con 10 mM de lactato y en presencia de arsénico mostró valores del promedio del número de copias por microlitro del gen *arsC* ( $6.64 \times 10^4$ ) similares a los cuantificados en ausencia de arsénico ( $2.88 \times 10^4$ ) (Fig. 5.12).

Posiblemente, es el Consorcio 1 con lactato inicial 10 mM y arsénico quien realiza una mayor respiración de arsenato, a comparación del resto de los tratamientos. Esta hipótesis se propone asumiendo un bajo promedio del número de copias por microlitro del gen *arsC* (Fig. 5.12). En este consorcio, posiblemente el lactato se usó como donador de electrones para efectuar la reducción del arsenato, quien es el aceptor final de electrones para la obtención de energía. Otro resultado que apoya esta hipótesis es la velocidad de consumo de lactato, que fue mayor para los tratamientos con arsénico del Consorcio 1 en ambas concentraciones de lactato inicial (10 y 22 mM) (Tabla 5.1), aumentando de igual manera, cuando se aumenta a 22 mM la concentración de lactato inicial. Es posible que la mayor tasa de consumo de lactato se debió a que los cultivos usaron el lactato para donar los electrones requeridos para la conservación de energía (Malasarn *et al.*, 2004).

Curiosamente, fue en el Consorcio 1 con arsénico, en donde se encontraron mayores abundancias relativas del género *Desulfosporosinus*. Los miembros de este género además de tener la capacidad de detoxificar el arsenato, también tienen la capacidad de respirarlo, por lo que muy probablemente el mecanismo predominante en este consorcio fue la respiración de arsénico y no la detoxificación. Estudios previos demostraron que en las comunidades arsenato-reductoras de las cuales se obtuvieron los consorcios para este estudio también se encuentra presente el gen *arrA*, que codifica para la enzima arsenato reductasa respiratoria. Entre otros que se identificaron como portadores del gen *arrA*, están *Sedimentibacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* (Rios-Valenciana *et al.*, 2023), bacterias también

presentes en el Consorcio 1. Se destaca también que en el Consorcio 9, donde se observó también un número de copias menor (198,000), también estuvo presente *Desulfosporosinus*, *Bacillus* y *Pseudomonas*, capaces de realizar la respiración de arsenato, por lo que en este consorcio también podría predominar esta actividad.

No obstante, en el presente trabajo de tesis no se cuantificó al gen de la respiración de arsenato, *arrA*, únicamente se evaluó la presencia de la detoxificación de arsenato mediante la cuantificación del gen *arsC*.

En los estudios que fueron pioneros en entender los mecanismos de la respiración de arsénico (Newman *et al.*, 1997), se demuestra que existen bacterias sulfato reductoras capaces de tener una mayor tasa de crecimiento por usar arsenato (5.6 g células/mol lactato) como aceptor de electrones en lugar del sulfato (2.3 g células/mol lactato). Los autores lo atribuyen a que la energía libre de Gibbs es mayor para la reducción de arsenato ( $\Delta G^{0'} = -172$  kJ/mol) que para la reducción de sulfato ( $\Delta G^{0'} = -89$  kJ/mol) con lactato como el donador de electrones en ambos casos. En general, la reducción de arsenato también es de mayor velocidad comparada con la sulfato reducción, como se ha registrado previamente para los Consorcios CT y CB. Cabe mencionar que la reducción de arsenato ocurre a diferentes velocidades y los consorcios provenientes de CT, correspondientes a los consorcios 1 y 5 del presente proyecto, poseen una mayor tasa de reducción de arsenato a diferencia de los consorcios provenientes de CB (Consorcio 9) (1.10 mmol L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> y 0.57 mmol L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, respectivamente) (Rios-Valenciana *et al.*, 2023).

Algunas bacterias son capaces de utilizar ambos mecanismos de respiración y detoxificación de arsenato, como es el caso de *Shewanella* ANA-3. Sin embargo, *Shewanella* ANA-3 prefiere la respiración durante la fase exponencial del crecimiento microbiano, a diferencia del *arsC*, actividad que predomina durante la fase estacionaria, cuando el arsenito se ha concentrado en el medio. Lo anterior es ocasionado por la respuesta de los sistemas *arr* y *ars* ante la concentración de arsenito, ya que el sistema *arr* es inducido por una concentración de 100 nM de arsenito, mientras que para el sistema de detoxificación se requiere de una concentración 1,000 veces mayor (Saltikov *et al.*, 2005). Sin embargo, al reducir una concentración de arsenato de 5 mM (de un total de 10 mM) se ha observado que la acumulación de arsenito puede ser perjudicial para el crecimiento

bacteriano y la velocidad de reducción se ve afectada y disminuye (Newman *et al.*, 1997). Razón por la cual se observaron densidades ópticas menores que en ausencia de arsénico (Figura 5.1).

También se han documentado miembros del género *Pseudomonas* con la capacidad de reducir arsenato mediante la detoxificación y respiración. Lo anterior, se identificó utilizando diferentes donadores de electrones. Al crecer anaerobiamente en lactato y acetato, *Pseudomonas* llevó a cabo la respiración. No obstante, al cambiar de donador de electrones (glucosa), *Pseudomonas putida* utiliza este donador de electrones como fuente de energía y reduce al arsenato por detoxificación mediante el gen *arsC*. El cambio en la estrategia de reducción de arsenato se atribuye al mecanismo que más energía le puede proveer a la bacteria. En el caso de la oxidación de glucosa, la energía se obtiene a través de la fosforilación a nivel sustrato de la glicólisis, que le genera un mayor rendimiento energético a la célula (2 mol ATP/mol de glucosa) que con lactato. Mientras que con lactato como donador de electrones, la oxidación a piruvato tuvo un menor rendimiento energético (>1 mol ATP/ mol de arsenato), adicionalmente se observó que la utilización de lactato y acetato terminó, una vez que todo el arsenato fue reducido a arsenito (Freikowski *et al.*, 2010).

Es preciso mencionar que *Pseudomonas putida* estuvo presente en todos los tratamientos aquí realizados, por la flexibilidad metabólica que presenta ante diferentes donadores de electrones. El metabolismo que las bacterias prefieran dependerá del donador de electrones y las capacidades metabólicas que posean para lidiar con el arsenato. Al encontrarse, de igual manera diversas bacterias en el medio, compiten entre ellos por el donador de electrones y quien tenga una mejor ventaja será quien predomine en el medio.

En resumen, en los consorcios, en presencia de arsénico, miembros del género *Desulfosporosinus* serían los responsables principales de realizar arsenato reducción por respiración en primera instancia, dada la afinidad de la arsenato reductasa por arsenito (Glasser *et al.*, 2018) y posteriormente otras bacterias podrían estar desempeñando la detoxificación durante la fase estacionaria. De este modo, la red de interacción de las bacterias permitirían la supervivencia del consorcio, es importante también tener en cuenta a las bacterias que son parte de la comunidad principal y que son las que realizan la función

principal de la comunidad en su totalidad, como afrontar la toxicidad del arsenato, ya sea mediante la respiración o detoxificación, dependiendo de sus capacidades metabólicas.

#### **5.4.4 Relaciones entre los consorcios y la concentración de lactato con presencia y ausencia de arsénico**

Para poder comparar los diferentes tratamientos y encontrar patrones que indiquen la similitud o disimilitud de los tratamientos, los datos de las secuencias organizados en las 17 muestras se representaron gráficamente a través de la construcción de un Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS, por sus siglas en inglés), mediante el análisis de disimilitud de Bray-Curtis. El gráfico NMDS utilizando las distancias de disimilitud de Bray-Curtis permite conocer a través de la reducción de las dimensiones, una representación bidimensional que puede reflejar la semejanza o diferencia entre las muestras a través de las distancias entre ellas (Borcard *et al.*, 2018).

En la Figura 5.10a se puede observar la tendencia que presentan las muestras para agruparse ya sea por la ausencia (rojo) o presencia de arsénico (azul). Ambos conjuntos mostraron una clara separación dentro de las dos dimensiones del NMDS. Los tratamientos sin arsénico se ubicaron cerca del eje NMDS1, mientras que las muestras con arsénico se localizaron en el lado derecho del NMDS2. Lo anterior indica que los tratamientos poseen diferencias que fueron impulsadas por la presencia del arsénico.

Realizando un análisis más detallado, se observa que los inóculos con arsénico (azul) se encuentran contiguos y tienden a formar un clúster o grupo separado de los tratamientos con arsénico en la parte superior derecha, indicando que entre los tratamientos y los inóculos existe una diferencia en la composición de las comunidades bacterianas como se pudo observar en la descripción de la diversidad (Figura 5.6). De igual manera, los tratamientos sin arsénico son colindantes y se separan de las muestras con arsénico. Además las comunidades se separaron de acuerdo a su origen, ya que las comunidades de los consorcios C1 y C5 claramente formaron un clúster separado del Consorcio 9.

Entre consorcios también se puede distinguir el efecto que ocasiona la concentración de lactato (10 y 22 mM). En las muestras con arsénico se nota que los Consorcios bajo las diferentes concentraciones de lactato 10 y 22 mM se encuentran distantes, indicando que la concentración de lactato tuvo un efecto en la composición microbiana de las muestras. En

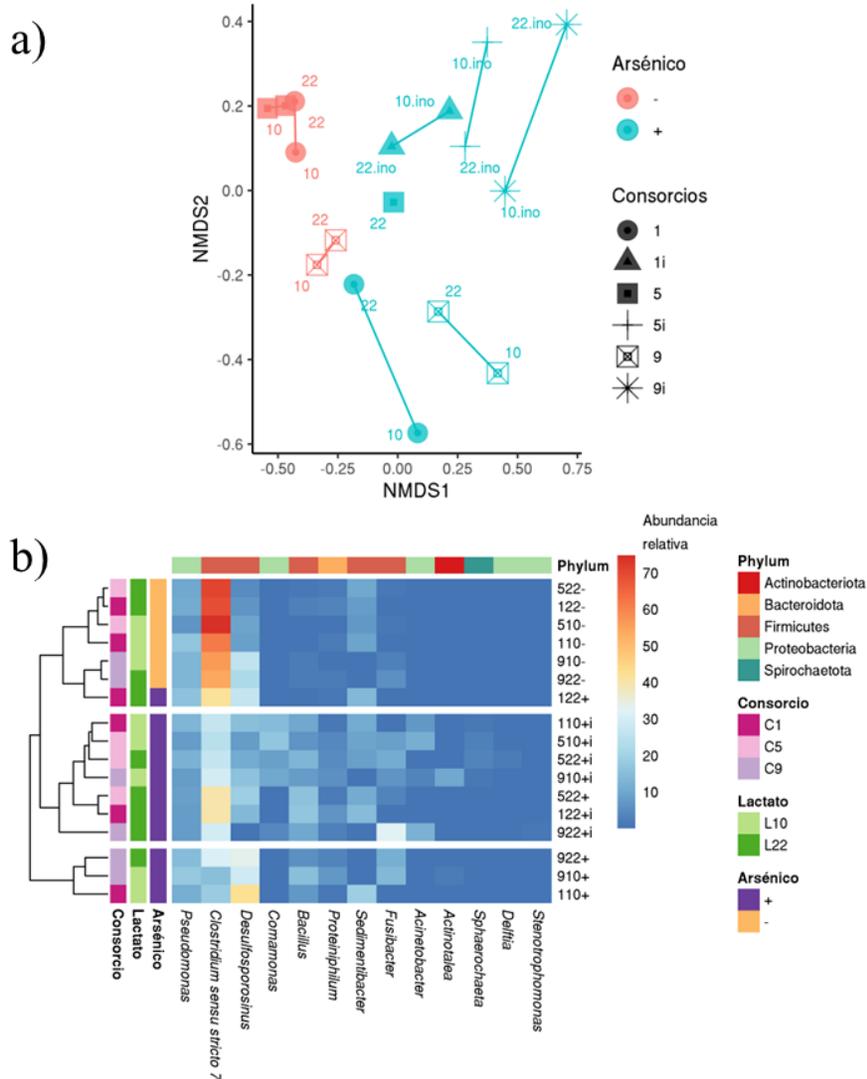
contraste, en la ausencia de arsénico se puede distinguir que las muestras pertenecientes al mismo consorcio se encuentran cercanas. Dicha cercanía indica que hay poca diferencia en la estructura de las comunidades y que la concentración de lactato (10 y 22 mM) no tuvo un efecto sobre ellas.

Por lo que, tanto el arsénico como la concentración de lactato tienen un efecto sobre la comunidad bacteriana. El donador de electrones puede tener un efecto sobre la capacidad metabólica de reducción de arsénico de la comunidad bacteriana, teniendo la capacidad de aumentar este proceso metabólico, aunque no está claro si esta reducción es parte del proceso de detoxificación o como un proceso de respiración de la comunidad bacteriana (Cai *et al.*, 2022).

Los resultados anteriores, en general, indican diferencias entre las comunidades. Sin embargo, la estructura de la comunidad bacteriana a nivel taxonómico es la que nos permite establecer diferencias más contundentes entre las comunidades, como se discutirá a continuación .

Con el propósito de visualizar a las comunidades clave de cada muestra, la similitud entre ellas y relacionarlos con los mecanismos destacados de reducción de arsenato (detoxificación y respiración), se presenta en la Figura 5.10b un heatmap con la abundancia relativa de los géneros encontrados. Se observan tres clústeres principales agrupados de acuerdo a su similitud.

En el clúster superior, se agruparon todas las muestras en ausencia de arsénico, con excepción de la muestra 122+ en la que hubo arsénico. En este clúster, se puede denotar que los consorcios están compuestos por *Pseudomonas* y *Clostridium* en mayor medida, seguido de *Sedimentibacter* y *Desulfosporosinus*. Solo dos muestras, pertenecientes al Consorcio 9 (sin arsénico y con 10 y 22 mM de lactato) cambian *Sedimentibacter* por *Fusibacter*. De este clúster de bacterias se destacaría la actividad de fermentación de lactato. Aunque para la muestra 122+ también se realizaría la detoxificación de arsenato.



**Figura 5.10.** a) Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS). de Bray-Curtis que presenta la comparación entre muestras bajo los diferentes tratamientos con arsénico, “+” y sin arsénico, “-”; y lactato (10 y 22 mM), para los Consorcios 1, 5 y 9 con sus respectivos inóculos (i). b) Composición de las comunidades bacterianas sulfato-reductoras/arsenato-reductoras. El heatmap está basado en las abundancias relativas de los géneros con una abundancia relativa mayor a 1 % contra las muestras bajo los diferentes tratamientos representados en las barras de colores de la izquierda: con (+) y sin arsénico (-), y la concentración de lactato 10 y 22 mM junto con sus inóculos (i) de los diferentes Consorcios (1, 5 y 9). El agrupamiento de los datos está basado en la distancia Bray-Curtis (dendrograma de la izquierda). El *phylum* asociado se encuentra en la barra de colores horizontal superior.

En el clúster de en medio, se agruparon todos los inóculos, con excepción de la muestra 522+, que es el tratamiento con una comunidad muy parecida a su inóculo (i522+). Cabe destacar que es el tratamiento que está más cerca de igualar el mismo número de especies que su inóculo, en comparación con los demás tratamientos, al presentar una especie menos que su inóculo (Chao 1 = 10) (Sección 5.4.1).

Asimismo, se destaca que todas las comunidades durante las diluciones seriadas previas se cultivaron con arsénico en el medio y se evidencia que poseen la mayor cantidad de géneros posibles después de esta selección por la presión de la toxicidad del arsénico. A consecuencia de esto, el metabolismo que estas comunidades estarían realizando principalmente es la detoxificación de arsénico, aunque no se descarta que la respiración y oxidación de arsenito también podrían presentarse en algunos miembros de la comunidad bacteriana. Finalmente, en el clúster inferior, se muestra el agrupamiento de las muestras 922+, 910+ y 110+, donde predomina *Desulfosporosinus*, seguido de *Clostridium* y *Pseudomonas*. A diferencia de los tratamientos del panel superior sin arsénico, destaca la presencia de *Bacillus* y en menor medida, *Proteiniphilum*. Es posible que estos consorcios tuvieran una mayor actividad de respiración de arsenato, que puede ser una de las razones por las que se observó una baja presencia del gen *arsC* en 110+ y 922+ (Figura 5.9).

Después del género *Desulfosporosinus*, *Bacillus* podría ser otro género clave para esta actividad, que como se mencionó en la Sección 5.4.3, algunas especies del género presentan la capacidad de respirar arsenato (Rios-Valenciana *et al.*, 2023; Yamamura *et al.*, 2003). La idea anterior también puede respaldarse por la ausencia de este género en los tratamientos sin arsénico, donde otras bacterias posiblemente desplazaron *Bacillus* por la competencia del donador de electrones.

La diferencia entre las muestras del Consorcio 1, pero con diferentes concentraciones de lactato (10 y 22 mM), 110+ y 122+ radica en una mayor abundancia de *Desulfosporosinus* y la presencia de *Bacillus* en 110+, razón por la cual 122+ podría tener una actividad de fermentación y el predominio de detoxificación. La actividad de detoxificación, en este sentido estaría sustentada por el alto número de copias promedio del gen *arsC*, que presenta el consorcio 122+ (Figura 5.9).

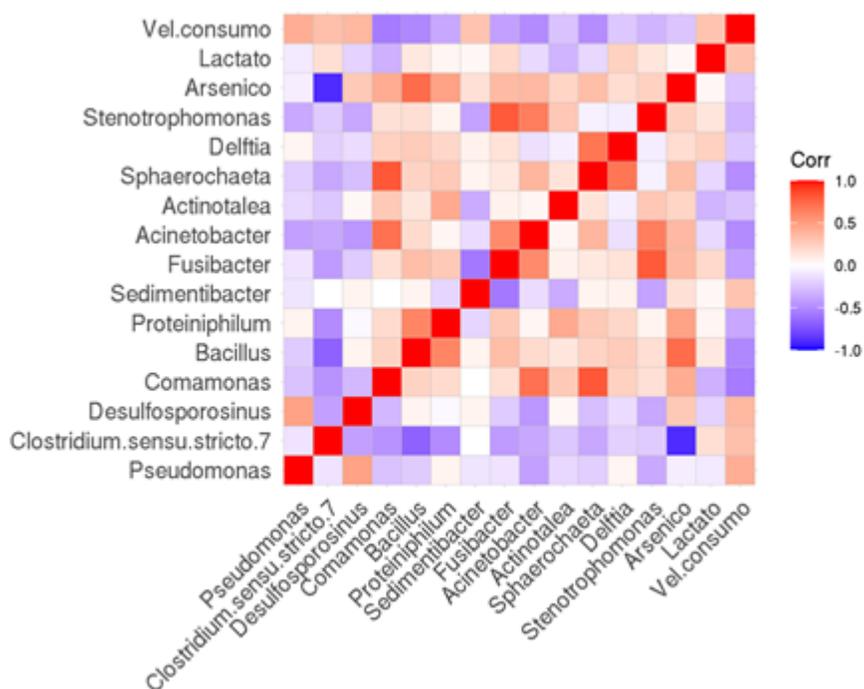
De igual manera, existe una diferencia entre los miembros del clúster inferior, donde la muestra 110+ destaca por ser el único consorcio dentro del clúster con *Sedimentibacter*, a diferencia de las muestras del Consorcio 910+ y 922+ que en vez de *Sedimentibacter*, contienen a *Proteiniphilum* y *Fusibacter*. Aunque *Proteiniphilum* presenta una abundancia relativa menor y se ha reportado en reactores de fermentación de lodos con capacidad de producción de ácidos orgánicos (acidogénico) como producto de la fermentación y con una abundancia relativa promovida por la concentración de arsenito (Nie *et al.*, 2021).

Entonces, la principal diferencia entre los Consorcios 1 y 9 estaría ligada a las posibles funciones de las bacterias que los componen como *Fusibacter*, que destaca por su actividad de respiración de arsenato, mientras que *Sedimentibacter* es capaz de realizar la detoxificación y respiración de arsenato (Rios-Valenciana *et al.*, 2023). Destaca de igual forma, que la comunidad clave (core community) de estas tres muestras pertenecen al filo de *Firmicutes*, mientras que *Pseudomonas* pertenece a *Proteobacteria*.

Para poder identificar posibles interacciones entre los miembros de la comunidad bacteriana se realizó un análisis de correlación de Pearson (Figura 5.11). La principal variable que influye sobre las diferencias en las comunidades es la presencia del arsénico, donde se aprecia en casi todos los géneros una correlación positiva, a excepción de géneros como *Clostridium* y *Pseudomonas*, que presentan una correlación negativa, muy fuerte en el caso de *Clostridium*. Cabe mencionar que la concentración del lactato también ejerció una presión selectiva sobre la comunidad de acuerdo a su capacidad de crecimiento y competencia, que incluiría sus ventajas metabólicas para contrarrestar los efectos nocivos del arsénico con una correlación débil positiva para ciertos géneros como *Clostridium*, *Bacillus*, *Fusibacter*, *Delftia* y *Strenotrophomonas*, quienes serían beneficiados por un aumento de lactato. *Proteiniphilum* y *Sedimentibacter* no parecen estar afectados por la concentración de lactato y los géneros restantes presentan una ligera correlación negativa que indicarían que estas bacterias aumentan su abundancia al disminuir la concentración de lactato a 10 mM.

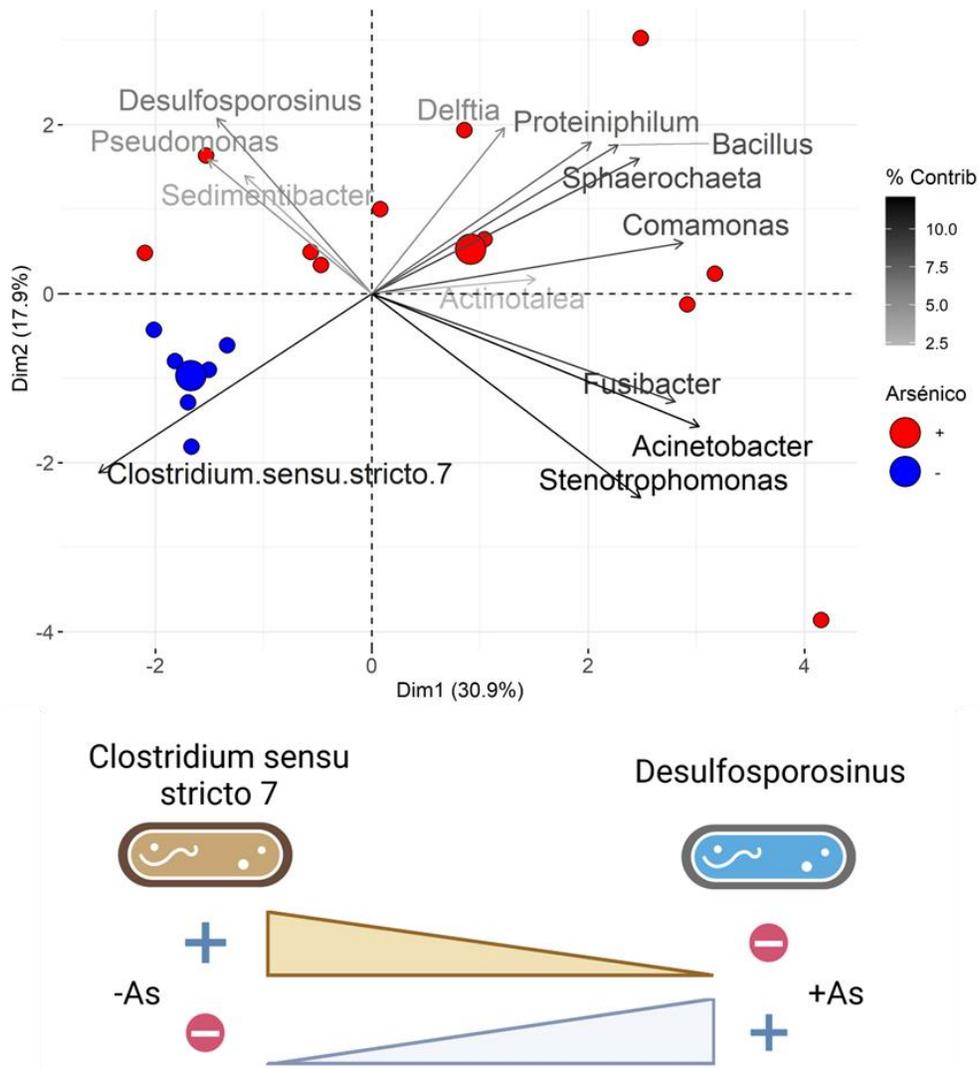
La velocidad de consumo también fue uno de los factores incluidos en la correlación y se observó una mayor correlación positiva entre la velocidad de consumo de lactato y la presencia de géneros como *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Desulfosporosinus* y

*Sedimentibacter*. En cambio, la velocidad de consumo de lactato presentó una correlación negativa con los géneros restantes, que a su vez tienen correlación negativa con el arsénico. Sin embargo, dentro de los géneros con una correlación positiva con la velocidad de consumo de lactato pero beneficiados por la presencia de arsénico están *Desulfosporosinus* y *Sedimentibacter*.



**Figura 5.11.** Correlación entre factores y géneros bacterianos entre tratamientos

Mediante esta correlación también se puede apreciar la interacción entre las bacterias, como *Desulfosporosinus* y *Clostridium*, que presentan una correlación negativa. En general *Desulfosporosinus* tiene una correlación negativa débil con otros géneros como *Comamonas*, *Acinetobacter* y *Stenotrophomonas*; y sin algún efecto con otras como *Proteiniphilum* y *Actinotalea*. Por otro lado, *Desulfosporosinus* presenta una correlación positiva únicamente con *Pseudomonas*, quienes podrían tener algún mecanismo de cooperación. En cambio, *Clostridium* presenta una correlación negativa con todos los demás géneros encontrados en este estudio.



**Figura 5.12.** Análisis de componentes principales (PCA), los puntos representan las muestras categorizadas por la presencia (rojo) y ausencia (azul) de arsénico y vectores que indican los géneros que más contribuyen dentro de las muestras a la variabilidad total de los datos. El porcentaje descrito en los ejes representa la varianza explicada por cada componente principal de todos los datos (Superior.). Diagrama que representa el cambio de las abundancias relativas entre *Clostridium sensu stricto 7* y *Desulfosporosinus* dependiendo de la presencia o ausencia de arsénico (Inferior)

La correlación negativa de *Clostridium* podría deberse en parte por el efecto que tiene el arsénico sobre este género y cómo resulta beneficiado en la ausencia de arsénico a diferencia del resto de los géneros, como se aprecia también en el gráfico de análisis de

componentes principales (Principal Component Analysis), representado en la Figura 5.12, donde las muestras representadas con círculos azules son aquellas con ausencia de arsenato y es *Clostridium* quien está influyendo en las variaciones de estas muestras.

En el análisis PCA (Fig. 5.12), también se puede apreciar cuáles bacterias están relacionadas entre sí, como se había descrito anteriormente, se tiene a los vectores del cuadrante II a *Desulfosporosinus*, *Sedimentibacter* y *Pseudomonas* asociados positivamente por la presencia de arsenato.

De igual manera, otras bacterias que están relacionadas entre sí son *Fusibacter*, *Acinetobacter* y *Stenotrophomonas*, pero éstas solo explican la contribución en una de las muestras que presentaba arsénico.

Dentro de todo el consorcio bacteriano podemos encontrar a bacterias que son clave dentro de la comunidad en términos de funcionalidad y abundancia. En la Figura 5.12 se representa lo que se observó en general con los cultivos con y sin arsénico, donde la presencia de *Desulfosporosinus* fue más dominante en los tratamientos que contenían arsénico, como lo indicaron las abundancias relativas.

El arsenato se reduce a arsenito y esto provocaría la inhibición de la fermentación (Jung y Rothstein, 1965), por lo que *Clostridium* y *Desulfosporosinus* estarían compitiendo por la fuente de electrones como lo es el lactato. En contraste, en los cultivos en ausencia de arsénico, a pesar de que *Desulfosporosinus* seguía presente, su abundancia relativa es significativamente más baja (4 – 26%) propiciando que miembros del género *Clostridium sensu stricto* 7 predominaran en los cultivos (61 – 74%). Esta situación, de manera indirecta, podría explicar los altos valores de absorbancia 600 nm en los cultivos con ausencia de arsénico, donde *Clostridium* predomina, y sería quien crecería de manera exponencial.

## 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se pudo corroborar que los microorganismos cultivables previamente seleccionados a partir de comunidades arsenato-reductoras/sulfato-reductoras y que fueron seleccionados mediante diluciones seriadas son capaces de resistir la toxicidad del arsenato (10 mM ó 750 mg/L). Además, se demostró que, aunque los consorcios fueron cultivados previo al experimento con una concentración de sulfato de 10mM, los microorganismos que componen las comunidades son cultivables y capaces de reducir el arsenato incluso en ausencia de sulfato.

También se encontró que la concentración de lactato y la presencia o ausencia de arsenato fueron los principales factores que promovieron el predominio de ciertos géneros bacterianos en los consorcios. Se encontró una menor diversidad en las comunidades de los tratamientos con arsénico a diferencia de los inóculos, es decir la presencia de arsénico seleccionó aún más las comunidades arsenato-reductoras. Desde el punto de vista del aislamiento de microorganismos, este resultado es positivo para seguir seleccionando a las bacterias y eventualmente comprender mejor las características y mecanismos para determinar los patrones en la resistencia al arsénico.

En ausencia de sulfato se observó que los consorcios tenían una mayor presión selectiva de bacterias con la capacidad de tolerar al arsénico y sus actividades metabólicas pudieron enfocarse a mecanismos contra la toxicidad del arsénico, especialmente arsenito después de la reducción. Por la razón anterior, el crecimiento bacteriano en presencia de arsénico fue prácticamente nulo. Entre las bacterias que fueron seleccionadas en presencia de arsenato estuvieron los géneros *Desulfosporosinus*, este género es muy diverso desde el punto de vista metabólico ya que además de poder llevar a cabo la arsenato-reducción también puede detoxificar arsenato y realizar sulfato-reducción. Desde el punto de vista práctico, en un posible sistema para remoción de arsénico es deseable que en las comunidades predomine *Desulfosporosinus*. Sin embargo, en ausencia de arsénico, este género no pudo competir con los miembros de *Clostridium* quien realiza preferentemente fermentación en ausencia de un aceptor de electrones como el arsenato o el sulfato.

El efecto que tuvo el lactato sobre las comunidades dependió de la presencia o ausencia de arsenato. Una mayor concentración de lactato (22 mM) en presencia de arsenato promovió

el crecimiento de bacterias con actividad de detoxificación. Mientras que en ausencia de arsenato, no se observaron diferencias en la estructura de las comunidades al incrementar la concentración de lactato.

Es posible que algunos de los géneros que se encontraron en los cultivos como *Pseudomonas*, *Sedimentibacter*, y *Commamonas* realicen la oxidación de arsenito, actividad que podría ser útil para las bacterias arsenato reductoras ante la falta del aceptor de electrones. Cabe mencionar que el lactato no fue consumido en su totalidad en ningún tratamiento, y en el caso de los tratamientos con arsénico, el agotamiento del arsenato pudo ser un factor limitante para el crecimiento de las bacterias que respiran arsenato, ya que una vez agotado este metaloide en el medio no tendrían un aceptor de electrones.

El origen del consorcio CB ó CT podría tener un efecto sobre el predominio de la actividad de detoxificación o respiración de arsenato a causa de la abundancia relativa de los miembros de la comunidad clave del consorcio como *Desulfosporosinus*, donde predominaría la respiración de arsenato.

Esta investigación es el punto de partida para una futura experimentación con los genes *arsC* y *arrA*. Por lo que una perspectiva de este trabajo es la cuantificación del gen *arrA* y que resulta crítico para poder determinar en qué cultivos se lleva a cabo la respiración e identificar a las bacterias que realizan estas funciones. De igual manera, determinar cuál es la concentración mínima inhibitoria del arsénico sobre las bacterias presentes en los consorcios, podría ser útil para seleccionar a las cepas clave para la respiración/detoxificación de arsenato, además de un estudio relacionado con el efecto de una aumento de la concentración de fosfato para conocer si se favorece la arsenato reducción ante el cambio en este parámetro.

Mediante la cuantificación del gen *arrA* y la determinación de la concentración mínima inhibitoria, se puede determinar qué condiciones propician que las comunidades bacterianas prefieran priorizar la respiración sobre la detoxificación. También, la comprobación de la oxidación de arsenito puede indicarnos las condiciones para seleccionar únicamente a aquellas que realicen la arsenato reducción.

Desde el punto de vista de la aplicación, los cultivos con bacterias capaces de realizar la arsenato y sulfato reducción se podrían usar para inocular un reactor continuo que al proporcionarles las condiciones adecuadas (tipo de sustrato, concentración, pH) podrían

promover la formación de sulfuros de arsénico que son insolubles, y con ello lograr la separación de arsénico de la corriente acuosa, sin la generación de subproductos tóxicos que necesitan disponerse. En este reactor pueden estar inoculadas las bacterias *Desulfosporosinus* con condiciones que favorezcan la arsenato y sulfato reducción con una concentración de lactato 10 mM, utilizando el medio de cultivo descrito en el presente estudio. Las condiciones que resultaron para incrementar la respiración de arsenato pueden ser evaluadas en un futuro *in situ* para la cuantificación de remoción de arsénico del medio mediante bioaumentación. De igual manera para controlar los procesos y tener un mejor rendimiento se podría caracterizar a la enzima arsenato reductora *arrA* de *Desulfosporosinus* para crear una bacteria modificada genéticamente que favorezca esta reacción. Entre otras aplicaciones futuras podrían estar biosensores para la cuantificación de arsenato como una nueva metodología que sea rápida y confiable.

## 7. REFERENCIAS

- Alam, R., y McPhedran, K. (2019). Applications of biological sulfate reduction for remediation of arsenic – A review. *Chemosphere*, 222(1), 932–944. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.194>
- Alarcón-Herrera, M. T., Martín-Alarcon, D. A., Gutiérrez, M., Reynoso-Cuevas, L., Martín-Domínguez, A., Olmos-Márquez, M. A., y Bundschuh, J. (2020). Co-occurrence, possible origin, and health-risk assessment of arsenic and fluoride in drinking water sources in Mexico: Geographical data visualization. *Science of the Total Environment*, 698. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134168>
- Alazard, D., Joseph, M., Battaglia-Brunet, F., Cayol, J. L., y Ollivier, B. (2010). Desulfosporosinus acidiphilus sp. nov.: A moderately acidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from acid mining drainage sediments. *Extremophiles*, 14(3), 305–312. <https://doi.org/10.1007/s00792-010-0309-4>
- Andreoni, V., Zanchi, R., Cavalca, L., Corsini, A., Romagnoli, C., y Canzi, E. (2012). Arsenite Oxidation in Ancylobacter dichloromethanicus As3-1b Strain: Detection of Genes Involved in Arsenite Oxidation and CO<sub>2</sub> Fixation. *Current Microbiology*, 65(2), 212–218. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0149-9>
- Andres, J., y Bertin, P. N. (2016). The microbial genomics of arsenic. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(2), 299–322. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv050>
- Bahar, Md. M., Megharaj, M., y Naidu, R. (2012). Arsenic bioremediation potential of a new arsenite-oxidizing bacterium Stenotrophomonas sp. MM-7 isolated from soil. *Biodegradation*, 23(6), 803–812. <https://doi.org/10.1007/s10532-012-9567-4>
- Baláž, P., Nguyen, A. V., Fabián, M., Cholužová, D., Pastorek, M., Sedlák, J., y Bujňáková, Z. (2011). Properties of arsenic sulphide As<sub>4</sub>S<sub>4</sub> nanoparticles prepared by high-energy milling. *Powder Technology*, 211(2–3), 232–236. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2011.04.027>
- Barton, L. L., Tomei-Torres, F. A., Xu, H., y Zocco, T. (2015). Metabolism of metals and metalloids by the sulfate-reducing bacteria. In *Bacteria-Metal Interactions* (pp. 57–84). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-18570-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-18570-5_4)
- Basu, S., Dutta, A., Mukherjee, S. K., y Hossain, S. T. (2023). Isolation and characterization of an As(+3) oxidizing bacterium, Acinetobacter sp. TMKU4 from paddy field for possible arsenic decontamination. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 10, 100289. <https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2023.100289>
- Bertin, P. N., Crognale, S., Plewniak, F., Battaglia-Brunet, F., Rossetti, S., y Mench, M. (2022). Water and soil contaminated by arsenic: the use of microorganisms and plants in bioremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(7), 9462–9489. <https://doi.org/10.1007/S11356-021-17817-4/FIGURES/3>
- Bertin, P. N., Heinrich-Salmeron, A., Pelletier, E., Goulhen-Chollet, F., Arsène-Ploetze, F., Gallien, S., Lauga, B., Casiot, C., Calteau, A., Vallenet, D., Bonnefoy, V., Bruneel, O., Chane-Woon-Ming, B., Cleiss-Arnold, J., Duran, R., Elbaz-Poulichet, F., Fonknechten, N., Giloteaux, L., Halter, D., ... Le Paslier, D. (2011). Metabolic diversity among main microorganisms inside an arsenic-rich ecosystem revealed by meta-and proteo-genomics. *ISME Journal*, 5(11), 1735–1747. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.51>
- Bindi, L., Pratesi, G., Muniz-Miranda, M., Zoppi, M., Chelazzi, L., Lepore, G. O., y Menchetti, S. (2015). From ancient pigments to modern optoelectronic applications of arsenic sulfides:

- bonazziite, the natural analogue of  $\beta$ -As<sub>4</sub>S<sub>4</sub> from Khaidarkan deposit, Kyrgyzstan. *Mineralogical Magazine*, 79(1), 121–131. <https://doi.org/10.1180/minmag.2015.079.1.10>
- Bini, E., Rauschenbach, I., Narasingarao, P., Starovoytov, V., Hauser, L., Jeffries, C. D., Land, M., Bruce, D., Detter, C., Goodwin, L., Han, S., Held, B., Tapia, R., Copeland, A., Ivanova, N., Mikhailova, N., Nolan, M., Pati, A., Pennacchio, L., ... Häggblom, M. (2011). Complete genome sequence of *Desulfurispirillum indicum* strain S5 T. *Standards in Genomic Sciences*, 5(3), 371–378. <https://doi.org/10.4056/sigs.2425302>
- Biswas, R., Vivekanand, V., Saha, A., Ghosh, A., y Sarkar, A. (2018). *Arsenite oxidation by a facultative chemolithotrophic Delftia spp. BAs29 for its potential application in groundwater arsenic bioremediation*. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.10.006>
- Borcard, D., Gillet, F., y Legendre, P. (2018). Unconstrained Ordination. In D. Borcard, F. Gillet, y P. Legendre (Eds.), *Numerical Ecology with R* (pp. 151–201). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-71404-2\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-71404-2_5)
- Briones-Gallardo, R., Escot-Espinoza, V. M., y Cervantes-González, E. (2017). Removing arsenic and hydrogen sulfide production using arsenic-tolerant sulfate-reducing bacteria. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 14(3), 609–622. <https://doi.org/10.1007/s13762-016-1174-1>
- Bruneel, O., Héry, M., Laroche, E., Dahmani, I., Fernandez-Rojo, L., y Casiot, C. (2017). Microbial Transformations of Arsenic From Metabolism to Bioremediation. In *Handbook of Metal-Microbe Interactions and Bioremediation* (pp. 521–541). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315153353-37>
- Cai, L., Liu, G., Rensing, C., y Wang, G. (2009). Genes involved in arsenic transformation and resistance associated with different levels of arsenic-contaminated soils. *BMC Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-4>
- Cai, X., Yin, N., Liu, X., Wang, P., Du, H., Cui, Y., y Hu, Z. (2022). Biogeochemical processes of arsenic transformation and redistribution in contaminated soils: Combined effects of iron, sulfur, and organic matter. *Geoderma*, 422, 115948. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2022.115948>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., y Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Cameron, E. S., Schmidt, P. J., Tremblay, B. J. M., Emelko, M. B., y Müller, K. M. (2021). Enhancing diversity analysis by repeatedly rarefying next generation sequencing data describing microbial communities. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01636-1>
- Caro-Quintero, A., Ritalahti, K. M., Cusick, K. D., Löffler, F. E., y Konstantinidis, K. T. (2012). The chimeric genome of sphaerochaeta: Nonspiral spirochetes that break with the prevalent dogma in spirochete biology. *MBio*, 3(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00025-12>
- Chao, A., y Chiu, C. (2016). Species Richness: Estimation and Comparison. In *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online* (pp. 1–26). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118445112.stat03432.pub2>
- Choong, T. S. Y., Chuah, T. G., Robiah, Y., Gregory Koay, F. L., y Azni, I. (2007). Arsenic toxicity, health hazards and removal techniques from water: an overview. *Desalination*, 217(1–3), 139–166. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2007.01.015>
- Costa, P. S., Scholte, L. L. S., Reis, M. P., Chaves, A. V., Oliveira, P. L., Itabayana, L. B., Suhadolnik, M. L. S., Barbosa, F. A. R., Chartone-Souza, E., y Nascimento, A. M. A.

- (2014). Bacteria and genes involved in arsenic speciation in sediment impacted by long-term gold mining. *PLoS ONE*, *9*(4), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095655>
- Cozen, A. E., Weirauch, M. T., Pollard, K. S., Bernick, D. L., Stuart, J. M., y Lowe, T. M. (2009). Transcriptional map of respiratory versatility in the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *Journal of Bacteriology*, *191*(3), 782–794. [https://doi.org/10.1128/JB.00965-08/SUPPL\\_FILE/SUPPTABLE\\_S3\\_ORTHOLOGS.ZIP](https://doi.org/10.1128/JB.00965-08/SUPPL_FILE/SUPPTABLE_S3_ORTHOLOGS.ZIP)
- Crognale, S., Amalfitano, S., Casentini, B., Fazi, S., Petruccioli, M., y Rossetti, S. (2017). Arsenic-related microorganisms in groundwater: a review on distribution, metabolic activities and potential use in arsenic removal processes. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, *16*(4), 647–665. <https://doi.org/10.1007/s11157-017-9448-8>
- da Costa, J. P., Girão, A. V., Trindade, T., Costa, M. C., Duarte, A., y Rocha-Santos, T. (2016). Biological synthesis of nanosized sulfide semiconductors: current status and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(19), 8283–8302. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7756-5>
- Dar, S. A., Kleerebezem, R., Stams, A. J. M., Kuenen, J. G., y Muyzer, G. (2008). Competition and coexistence of sulfate-reducing bacteria, acetogens and methanogens in a lab-scale anaerobic bioreactor as affected by changing substrate to sulfate ratio. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *78*(6), 1045–1055. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1391-8>
- Daraz, U., Li, Y., Ahmad, I., Iqbal, R., y Ditta, A. (2023). Remediation technologies for acid mine drainage: Recent trends and future perspectives. *Chemosphere*, *311*, 137089. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137089>
- Darma, A., Yang, J., Bloem, E., Moždžen, K., y Zandi, P. (2021). Arsenic biotransformation and mobilization: the role of bacterial strains and other environmental variables. *Environmental Science and Pollution Research* *2021* *29*:2, *29*(2), 1763–1787. <https://doi.org/10.1007/S11356-021-17117-X>
- Das, S., Liu, C. C., Jean, J. S., y Liu, T. (2016). Dissimilatory Arsenate Reduction and In Situ Microbial Activities and Diversity in Arsenic-rich Groundwater of Chianan Plain, Southwestern Taiwan. *Microbial Ecology*, *71*(2), 365–374. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0650-3>
- Di, X., Beesley, L., Zhang, Z., Zhi, S., Jia, Y., y Ding, Y. (2019). Microbial arsenic methylation in soil and uptake and metabolism of methylated arsenic in plants: A review. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 16, Issue 24). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijerph16245012>
- Diba, F., Khan, M. Z. H., Uddin, S. Z., Istiaq, A., Shuvo, M. S. R., Ul Alam, A. S. M. R., Hossain, M. A., y Sultana, M. (2021). Bioaccumulation and detoxification of trivalent arsenic by *Achromobacter xylosoxidans* BHW-15 and electrochemical detection of its transformation efficiency. *Scientific Reports* *2021* *11*:1, *11*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00745-1>
- Drewniak, L., y Sklodowska, A. (2013). Arsenic-transforming microbes and their role in biomining processes. *Environmental Science and Pollution Research*, *20*(11), 7728–7739. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1449-0>
- Dunivin, T. K., Yeh, S. Y., y Shade, A. (2019). A global survey of arsenic-related genes in soil microbiomes. *BMC Biology*, *17*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0661-5>
- Escalas, A., Hale, L., Voordeckers, J. W., Yang, Y., Firestone, M. K., Alvarez-Cohen, L., y Zhou, J. (2019). Microbial functional diversity: From concepts to applications. *Ecology and Evolution*, *9*(20), 12000–12016. <https://doi.org/10.1002/ece3.5670>

- Escudero, L. V., Casamayor, E. O., Chong, G., Pedrós-Alió, C., y Demergasso, C. (2013). Distribution of microbial arsenic reduction, oxidation and extrusion genes along a wide range of environmental arsenic concentrations. *PloS One*, 8(10), e78890. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078890>
- Estay, H., Barros, L., y Troncoso, E. (2021). Metal Sulfide Precipitation: Recent Breakthroughs and Future Outlooks. *Minerals 2021*, Vol. 11, Page 1385, 11(12), 1385. <https://doi.org/10.3390/MIN11121385>
- Fekih, I. Ben, Zhang, C., Li, Y. P., Zhao, Y., Alwathnani, H. A., Saquib, Q., Rensing, C., y Cervantes, C. (2018). Distribution of arsenic resistance genes in prokaryotes. *Frontiers in Microbiology*, 9(OCT), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02473>
- Firringioli, A., Presentato, A., Favoino, G., Marabottini, R., Allevato, E., Stazi, S. R., Mugnozza, G. S., Harfouche, A., Petruccioli, M., Turner, R. J., Zannoni, D., y Cappelletti, M. (2019). Identification of resistance genes and response to arsenic in rhodococcus aetherivorans BCP1. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAY), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00888>
- Freikowski, D., Winter, J., y Gallert, C. (2010). Hydrogen formation by an arsenate-reducing *Pseudomonas putida*, isolated from arsenic-contaminated groundwater in West Bengal, India. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(6), 1363–1371. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2856-0>
- Galperin, M. Y., Mekhedov, S. L., Puigbo, P., Smirnov, S., Wolf, Y. I., y Rigden, D. J. (2012). Genomic determinants of sporulation in Bacilli and Clostridia: Towards the minimal set of sporulation-specific genes. *Environmental Microbiology*, 14(11), 2870–2890. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02841.x>
- Garbinski, L. D., Rosen, B. P., y Chen, J. (2019). Pathways of arsenic uptake and efflux. *Environment International*, 126, 585–597. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.02.058>
- García-Domínguez, E., Mumford, A., Rhine, E. D., Paschal, A., y Young, L. Y. (2008). Novel autotrophic arsenite-oxidizing bacteria isolated from soil and sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, 66(2), 401–410. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6941.2008.00569.X>
- Genova, M.L. (2014). Electron Transport in the Mitochondrial Respiratory Chain. In: Hohmann-Marriott, M. (eds) *The Structural Basis of Biological Energy Generation. Advances in Photosynthesis and Respiration*, vol 39. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-8742-0\\_21](https://doi.org/10.1007/978-94-017-8742-0_21)
- Glasser, N. R., Oyala, P. H., Osborne, T. H., Santini, J. M., y Newman, D. K. (2018). Structural and mechanistic analysis of the arsenate respiratory reductase provides insight into environmental arsenic transformations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(37), E8614–E8623. <https://doi.org/10.1073/pnas.1807984115>
- Glodowska, M., Stopelli, E., Schneider, M., Lightfoot, A., Rathi, B., Straub, D., Patzner, M., Duyen, V. T., Berg, M., Kleindienst, S., y Kappler, A. (2020). Role of in Situ Natural Organic Matter in Mobilizing As during Microbial Reduction of FeIII-Mineral-Bearing Aquifer Sediments from Hanoi (Vietnam). *Environmental Science and Technology*, 54(7), 4149–4159. <https://doi.org/10.1021/ACS.EST.9B07183>
- Gotelli, N., y Colwell, R. K. (2011). Estimating species richness. In A. Magurran y B. McGill (Eds.), *Biological Diversity: Frontiers in Measurement and Assessment* (Vol. 12, pp. 39–54). Oxford University press. <https://www.researchgate.net/publication/236734446>
- Grigoryan, A. A., Jalique, D. R., Medihala, P., Stroes-Gascoyne, S., Wolfaardt, G. M., McKelvie, J., Korber, D. R., y Korber, D. R. (2018). Bacterial diversity and

- production of sulfide in microcosms containing uncompacted bentonites. *Heliyon*, 4, 722. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018>
- Gu, Y., Nostrand, J. D. Van, Wu, L., He, Z., Qin, Y., Zhao, F.-J., y Zhou, J. (2017). Bacterial community and arsenic functional genes diversity in arsenic contaminated soils from different geographic locations. *PLOS ONE*, 12(5), e0176696. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0176696>
- Hamood Altowayti, W. A., Almoalemi, H., Shahir, S., y Othman, N. (2020). Comparison of culture-independent and dependent approaches for identification of native arsenic-resistant bacteria and their potential use for arsenic bioremediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 205. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111267>
- Hao, L., Liu, M., Wang, N., y Li, G. (2018). A critical review on arsenic removal from water using iron-based adsorbents. *RSC Advances*, 8(69), 39545–39560. <https://doi.org/10.1039/C8RA08512A>
- Hoefl, S. E., Kulp, T. R., Stolz, J. F., Hollibaugh, J. T., y Oremland, R. S. (2004). Dissimilatory arsenate reduction with sulfide as electron donor: Experiments with Mono Lake water and isolation of strain MLMS-1, a chemoautotrophic arsenate respirer. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5), 2741–2747. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.5.2741-2747.2004>
- Huang, J. H. (2014). Impact of microorganisms on arsenic biogeochemistry: A review. *Water, Air, and Soil Pollution*, 225(2). <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1848-y>
- Huang, J. H. (2018). Characterising microbial reduction of arsenate sorbed to ferrihydrite and its concurrence with iron reduction. *Chemosphere*, 194, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.109>
- Ighalo, J. O., Kurniawan, S. B., Iwuzor, K. O., Aniagor, C. O., Ajala, O. J., Oba, S. N., Iwuchukwu, F. U., Ahmadi, S., y Igwegbe, C. A. (2022). A review of treatment technologies for the mitigation of the toxic environmental effects of acid mine drainage (AMD). In *Process Safety and Environmental Protection* (Vol. 157, pp. 37–58). Institution of Chemical Engineers. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2021.11.008>
- Jackson, C. R., y Dugas, S. L. (2003). *Phylogenetic analysis of bacterial and archaeal arsC gene sequences suggests an ancient, common origin for arsenate reductase*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/3/18>
- Jiang, Z., Li, P., Wang, Y., Liu, H., Wei, D., Yuan, C., y Wang, H. (2019). Arsenic mobilization in a high arsenic groundwater revealed by metagenomic and Geochip analyses. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49365-w>
- Jung, C., y Rothstein, A. (1965). ARSENATE UPTAKE AND RELEASE IN RELATION TO THE INHIBITION OF TRANSPORT AND GLYCOLYSIS IN YEAST\*. In *Biochemical I%annaco10~~* (Vol. 14). Pergamon Press Ltd.
- Kabiraj, A., Biswas, R., Halder, · Urmi, y Rajib Bandopadhyay, . (2022). Bacterial Arsenic Metabolism and Its Role in Arsenic Bioremediation. *Current Microbiology*, 79, 131. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02810-y>
- Kang, Y. S., Brame, K., Jetter, J., Bothner, B. B., Wang, G., Thiyagarajan, S., y McDermott, T. R. (2016). Regulatory activities of four ArsR proteins in *Agrobacterium tumefaciens* 5A. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(12), 3471–3480. <https://doi.org/10.1128/AEM.00262-16>
- Kefeni, K. K., Msagati, T. A. M., y Mamba, B. B. (2017). Acid mine drainage: Prevention, treatment options, and resource recovery: A review. *Journal of Cleaner Production*, 151, 475–493. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.03.082>

- Kim, B. R., Shin, J., Guevarra, R. B., Lee, J. H., Kim, D. W., Seol, K. H., Lee, J. H., Kim, H. B., y Isaacson, R. E. (2017). Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(12), 2089–2093. <https://doi.org/10.4014/JMB.1709.09027>
- Kujala, K., Besold, J., Mikkonen, A., Tiirola, M., y Planer-Friedrich, B. (2020). Abundant and diverse arsenic-metabolizing microorganisms in peatlands treating arsenic-contaminated mining wastewaters. *Environmental Microbiology*, 22(4), 1572–1587. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14922>
- Lahti, L., Shetty, S., *et al.* (2017). Tools for microbiome analysis in R. Version 1.22 URL: <http://microbiome.github.com/microbiome>.
- Lara, J., González, L. E., Ferrero, M., Díaz, G. C., Pedrós-Alió, C., y Demergasso, C. (2012). Enrichment of arsenic transforming and resistant heterotrophic bacteria from sediments of two salt lakes in Northern Chile. *Extremophiles*, 16(3), 523–538. <https://doi.org/10.1007/s00792-012-0452-1>
- Leon, C. G., Moraga, R., Valenzuela, C., Gugliandolo, C., Lo Giudice, A., Papale, M., Vilo, C., Dong, Q., Smith, C. T., Rossello-Mora, R., Yañez, J., y Campos, V. L. (2018). Effect of the natural arsenic gradient on the diversity and arsenic resistance of bacterial communities of the sediments of Camarones River (Atacama Desert, Chile). *PLOS ONE*, 13(5), e0195080. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0195080>
- Lièvreumont, D., Bertin, P. N., y Lett, M. C. (2009). Arsenic in contaminated waters: Biogeochemical cycle, microbial metabolism and biotreatment processes. *Biochimie*, 91(10), 1229–1237. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.06.016>
- López-Maury, L., Sánchez-Riego, A. M., Reyes, J. C., y Florencio, F. J. (2009). The Glutathione/Glutaredoxin System Is Essential for Arsenate Reduction in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology*, 191(11), 3534. <https://doi.org/10.1128/JB.01798-08>
- Macy, J. M., Santini, J. M., Pauling, B. V., O’Neill, A. H., y Sly, L. I. (2000). Two new arsenate/sulfate-reducing bacteria: mechanisms of arsenate reduction. *Archives of Microbiology*, 173(1), 49–57. <https://doi.org/10.1007/s002030050007>
- Martínez-Villegas, N., Briones-Gallardo, R., Ramos-Leal, J. A., Avalos-Borja, M., Castañón-Sandoval, A. D., Razo-Flores, E., y Villalobos, M. (2013). Arsenic mobility controlled by solid calcium arsenates: A case study in Mexico showcasing a potentially widespread environmental problem. *Environmental Pollution*, 176, 114–122. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2012.12.025>
- Marwa, N., Singh, N., Srivastava, S., Saxena, G., Pandey, V., y Singh, N. (2019). Characterizing the hypertolerance potential of two indigenous bacterial strains (*Bacillus flexus* and *Acinetobacter junii*) and their efficacy in arsenic bioremediation. *Journal of Applied Microbiology*, 126(4), 1117–1127. <https://doi.org/10.1111/JAM.14179>
- Mirazimi, M., y Liu, W. (2021). Aqueous arsenic and sulfur speciation analysis and solid phase characterization in the dissolution of arsenic trisulfide. *Hydrometallurgy*, 199. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2020.105545>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE*, 8(4), e61217. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0061217>
- Murphy, J. N., Durbin, K. J., y Saltikov, C. W. (2009). Functional roles of *arcA*, *etrA*, cyclic AMP (cAMP)-cAMP receptor protein, and *cya* in the arsenate respiration pathway in

- Shewanella sp. strain ANA-3. *Journal of Bacteriology*, 191(3), 1035–1043. [https://doi.org/10.1128/JB.01293-08/SUPPL\\_FILE/SUPPL.ZIP](https://doi.org/10.1128/JB.01293-08/SUPPL_FILE/SUPPL.ZIP)
- Murphy, J. N., y Saltikov, C. W. (2009). The ArsR repressor mediates arsenite-dependent regulation of arsenate respiration and detoxification operons of *Shewanella* sp. strain ANA-3. *Journal of Bacteriology*, 191(21), 6722–6731. <https://doi.org/10.1128/JB.00801-09/FORMAT/EPUB>
- Muyzer, G., y Stams, A. J. M. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 6(6), 441–454. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1892>
- Nava-Reyna, E., y Medrano-Macías, J. (2022). Arsenic occurrence in the environment: Current situation of the Comarca Lagunera in northern Mexico and bioremediation approaches. *Journal of Agriculture and Food Research*, 10. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100379>
- Newman, D. K., Kennedy, E. K., Coates, J. D., Ahmann, D., Ellis, D. J., Lovley, D. R., y Morel, F. M. M. (1997). Dissimilatory arsenate and sulfate reduction in *Desulfotomaculum auripigmentum* sp. nov. *Archives of Microbiology*, 168(5), 380–388. <https://doi.org/10.1007/s002030050512>
- Nie, Z., Hu, L., Zhang, D., Qian, Y., Long, Y., Shen, D., Fang, C., Yao, J., y Liu, J. (2021). Drivers and ecological consequences of arsenite detoxification in aged semi-aerobic landfill. *Journal of Hazardous Materials*, 420. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126597>
- Novotnik, B., Zorz, J., Bryant, S., y Strous, M. (2019). The effect of dissimilatory manganese reduction on lactate fermentation and microbial community assembly. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01007>
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O’Hara, R. B., ... y Wagner, H. (2022). vegan: Community Ecology Package (Version 2.6-4) [Software]. <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf>
- Oremland, R. S., y Stolz, J. F. (2003). The ecology of arsenic. *Science*, 300(5621), 939–944. <https://doi.org/10.1126/science.1081903>
- Osborne, T. H., McArthur, J. M., Sikdar, P. K., y Santini, J. M. (2015). Isolation of an Arsenate-Respiring Bacterium from a Redox Front in an Arsenic-Polluted Aquifer in West Bengal, Bengal Basin. *Environmental Science y Technology*, 49(7), 4193–4199. <https://doi.org/10.1021/es504707x>
- Ostermeyer, P., Bonin, L., Folens, K., Verbruggen, F., García-Timmermans, C., Verbeken, K., Rabaey, K., y Hennebel, T. (2021). Effect of speciation and composition on the kinetics and precipitation of arsenic sulfide from industrial metallurgical wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 409. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124418>
- Oyekola, O. O., van Hille, R. P., y Harrison, S. T. L. (2009). Study of anaerobic lactate metabolism under biosulfidogenic conditions. *Water Research*, 43(14), 3345–3354. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.11.044>
- Páez-Espino, D., Tamames, J., de Lorenzo, V., y Cánovas, D. (2009). Microbial responses to environmental arsenic. *BioMetals*, 22(1), 117–130. <https://doi.org/10.1007/s10534-008-9195-y>
- Páez-Espino, D., Tamames, J., De Lorenzo, V., y Cánovas, D. (2009). Microbial responses to environmental arsenic. *BioMetals*, 22(1), 117–130. <https://doi.org/10.1007/S10534-008-9195-Y/FIGURES/2>
- Pages H, Aboyoun P, Gentleman R, DebRoy S (2023). *Biostrings: Efficient manipulation of biological strings*. R package version 2.68.1, <https://bioconductor.org/packages/Biostrings>.

- Park, G. young, Kang, D. eun, Davaatseren, M., Shin, C., Kang, G. J., y Chung, M. S. (2019). Reduction of total, organic, and inorganic arsenic content in *Hizikia fusiforme* (Hijiki). *Food Science and Biotechnology*, 28(2), 615. <https://doi.org/10.1007/S10068-018-0501-3>
- Patel, P. C., Goulhen, F., Boothman, C., Gault, A. G., Charnock, J. M., Kalia, K., y Lloyd, J. R. (2007). Arsenate detoxification in a *Pseudomonad* hypertolerant to arsenic. *Archives of Microbiology*, 187(3), 171–183. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0182-9>
- Paul, D., Kazy, S. K., Gupta, A. K., Pal, T., y Sar, P. (2015). Diversity, Metabolic Properties and Arsenic Mobilization Potential of Indigenous Bacteria in Arsenic Contaminated Groundwater of West Bengal, India. *PLOS ONE*, 10(3), e0118735. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118735>
- Plewniak, F., Crognale, S., Rossetti, S., y Bertin, P. N. (2018). A genomic outlook on bioremediation: The case of arsenic removal. *Frontiers in Microbiology*, 9(APR), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00820>
- Plugge, C. M., Zhang, W., Scholten, J. C. M., y Stams, A. J. M. (2011). Metabolic flexibility of sulfate-reducing bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 2(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00081>
- Qiao, J., Li, X., Hu, M., Li, F., Young, L. Y., Sun, W., Huang, W., y Cui, J. (2018). Transcriptional Activity of Arsenic-Reducing Bacteria and Genes Regulated by Lactate and Biochar during Arsenic Transformation in Flooded Paddy Soil. *Environmental Science y Technology*, 52(1), 61–70. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03771>
- Qin, W., Wang, C., Ma, Y., Shen, M., Li, J., Jiao, K., Tay, F. R., y Niu, L. (2020). Microbe-Mediated Extracellular and Intracellular Mineralization: Environmental, Industrial, and Biotechnological Applications. *Advanced Materials*, 32(22), 1907833. <https://doi.org/10.1002/adma.201907833>
- R Core Team. (2022). R: A language and environment for statistical computing (Version 4.1.1) [Software]. <https://cran.r-project.org/>
- Rambabu, K., Banat, F., Minh Pham, Q., Ho, S.-H., Ren, N.-Q., y Loke Show, P. (2020). *Biological remediation of acid mine drainage: Review of past trends and current outlook-NC-ND license* (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>). <https://doi.org/10.1016/j.ese.2020.100024>
- Retamal-Morales, G., Mehnert, M., Schwabe, R., Tischler, D., Zapata, C., Chávez, R., Schlömann, M., y Levicán, G. (2018). Detection of arsenic-binding siderophores in arsenic-tolerating Actinobacteria by a modified CAS assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 157, 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.087>
- Rhine, E. D., Phelps, C. D., y Young, L. Y. (2006). Anaerobic arsenite oxidation by novel denitrifying isolates. *Environmental Microbiology*, 8(5), 899–908. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00977.x>
- Rios-Valenciana, E. E., Briones-Gallardo, R., Cházaro-Ruiz, L. F., Martínez-Villegas, N., y Celis, L. B. (2017). Role of indigenous microbiota from heavily contaminated sediments in the bioprecipitation of arsenic. *Journal of Hazardous Materials*, 339, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.06.019>
- Rios-Valenciana, E. E., Briones-Gallardo, R., Chazaro-Ruiz, L. F., Lopez-Lozano, N. E., Sierra-Alvarez, R., y Celis, L. B. (2020). Dissolution and final fate of arsenic associated with gypsum, calcite, and ferrihydrite: Influence of microbial reduction of As(+5), sulfate, and Fe(+3). *Chemosphere*, 239, 124823. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124823>
- Rios-Valenciana, E. E., Moreno-Perlin, T., Briones-Gallardo, R., Sierra-Alvarez, R., y Celis, L. B. (2023). The key role of biogenic arsenic sulfides in the removal of soluble arsenic and

- propagation of arsenic mineralizing communities. *Environmental Research*, 220. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.115124>
- Rodríguez-Freire, L., Sierra-Alvarez, R., Root, R., Chorover, J., y Field, J. A. (2014). Biomineralization of arsenate to arsenic sulfides is greatly enhanced at mildly acidic conditions. *Water Research*, 66, 242–253. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2014.08.016>
- Rodríguez-Galán, M., Baena-Moreno, F. M., Vázquez, S., Arroyo-Torralvo, F., Vilches, L. F., y Zhang, Z. (2019). Remediation of acid mine drainage. *Environmental Chemistry Letters*, 17(4), 1529–1538. <https://doi.org/10.1007/S10311-019-00894-W/FIGURES/5>
- Rodríguez-Hernández, A., Lázaro, I., Razo, I., y Briones-Gallardo, R. (2021). Geochemical and mineralogical characterization of stream sediments impacted by mine wastes containing arsenic, cadmium and lead in North-Central Mexico. *Journal of Geochemical Exploration*, 221, 106707. <https://doi.org/10.1016/J.GEXPLO.2020.106707>
- Rosen, B. P., Ajees, A. A., y McDermott, T. R. (2011). Life and death with arsenic. *BioEssays*, 33(5), 350–357. <https://doi.org/10.1002/bies.201100012>
- Rosen, B. P., y Liu, Z. (2009). Transport pathways for arsenic and selenium: A minireview. *Environment International*, 35(3), 512–515. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.07.023>
- Rötting, T. S., Thomas, R. C., Ayora, C., y Carrera, J. (2008). Passive Treatment of Acid Mine Drainage with High Metal Concentrations Using Dispersed Alkaline Substrate. *Journal of Environmental Quality*, 37(5), 1741–1751. <https://doi.org/10.2134/jeq2007.0517>
- Saltikov, C. W., Wildman, R. A., y Newman, D. K. (2005). Expression dynamics of arsenic respiration and detoxification in *Shewanella* sp. strain ANA-3. *Journal of Bacteriology*, 187(21), 7390–7396. <https://doi.org/10.1128/JB.187.21.7390-7396.2005>
- Schliep, K., Potts, A. J., Morrison, D. A., Grimm, G. W. (2017). Intertwining phylogenetic trees and networks. *Methods in Ecology and Evolution*, 8: 1212--1220. doi: 10.1111/2041-210X.12760
- Secretaría de Salud. (2021). *NORMA Oficial Mexicana NOM-127-SSAI-2021, Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de la calidad del agua.*
- Seeliger, S., Janssen, P. H., y Schink, B. (2002). Energetics and kinetics of lactate fermentation to acetate and propionate via methylmalonyl-CoA or acrylyl-CoA. *FEMS Microbiology Letters*, 211(1), 65–70. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11204.x>
- Shang, Y., Wu, X., Wei, Q., Dou, H., Wang, X., Chen, J., Zhang, H., Ma, S., y Zhang, H. (2020). Total Arsenic, pH, and Sulfate Are the Main Environmental Factors Affecting the Microbial Ecology of the Water and Sediments in Hulun Lake, China. *Frontiers in Microbiology*, 11, 548607. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.548607>
- Sheik, C. S., Mitchell, T. W., Rizvi, F. Z., Rehman, Y., Faisal, M., Hasnain, S., McInerney, M. J., y Krumholz, L. R. (2012). Exposure of Soil Microbial Communities to Chromium and Arsenic Alters Their Diversity and Structure. *PLoS ONE*, 7(6), e40059. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040059>
- Shi, W., Xu, Y., Wu, W., y Zeng, X. C. (2022). Biological effect of phosphate on the dissimilatory arsenate-respiring bacteria-catalyzed reductive mobilization of arsenic from contaminated soils. *Environmental Pollution*, 308. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119698>
- Shi, Z., Hu, S., Lin, J., Liu, T., Li, X., y Li, F. (2020). Quantifying Microbially Mediated Kinetics of Ferrihydrite Transformation and Arsenic Reduction: Role of the Arsenate-Reducing Gene Expression Pattern. *Environmental Science and Technology*, 54(11), 6621–6631. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b07137>

- Silver, S., y Phung, L. T. (2005). Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), 599–608. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.599-608.2005/ASSET/E41FC612-5F97-44D8-BB5A-96C54131BE41/ASSETS/GRAPHIC/ZAM0020551890007.JPEG>
- Simate, G. S., y Ndlovu, S. (2014). Acid mine drainage: Challenges and opportunities. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(3), 1785–1803. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2014.07.021>
- Singh, M., y del Valle, M. (2023). Arsenic biosensors: Challenges and opportunities for high-throughput detection. *Handbook of Arsenic Toxicology*, 649–665. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89847-8.00029-8>
- Singh, N., Ghosh, P.K., Chakraborty, S. *et al.* Decoding the pathways of arsenic biotransformation in bacteria. *Environmental Sustainability* 4, 63–85 (2021). <https://doi.org/10.1007/s42398-021-00162-0>
- Smedley P.L., y D.G. Kinniburgh. (2002). A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry*, 17, 517–568.
- Soga, T., y Ross, G. A. (1999). Simultaneous determination of inorganic anions, organic acids, amino acids and carbohydrates by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 837(1–2), 231–239. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00092-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00092-8)
- Spanò, A., Zammuto, V., Macrì, A., Agostino, E., Nicolò, M. S., Scala, A., Trombetta, D., Smeriglio, A., Ingegneri, M., Caccamo, M. T., Magazù, S., Martinez, M., Leon, C. G., Guglielmino, S. P. P., y Gugliandolo, C. (2023). Arsenic Adsorption and Toxicity Reduction of An Exopolysaccharide Produced by *Bacillus licheniformis* B3-15 of Shallow Hydrothermal Vent Origin. *Journal of Marine Science and Engineering*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/jmse11020325>
- Stolz, J. F., Basu, P., Santini, J. M., y Oremland, R. S. (2006). Arsenic and Selenium in Microbial Metabolism. *Annual Review of Microbiology*, 60(1), 107–130. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142053>
- Suhadolnik, M. L. S., Salgado, A. P. C., Scholte, L. L. S., Bleicher, L., Costa, P. S., Reis, M. P., Dias, M. F., Ávila, M. P., Barbosa, F. A. R., Chartone-Souza, E., y Nascimento, A. M. A. (2017). Novel arsenic-transforming bacteria and the diversity of their arsenic-related genes and enzymes arising from arsenic-polluted freshwater sediment. *Scientific Reports*, 7(1), 11231. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11548-8>
- Sun, J., Quicksall, A. N., Chillrud, S. N., Mailloux, B. J., y Bostick, B. C. (2016). Arsenic mobilization from sediments in microcosms under sulfate reduction. *Chemosphere*, 153, 254–261. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.117>
- Swenson, N. G., Erickson, D. L., Mi, X., Bourg, N. A., Forero-Montana, J., Ge, X., Howe, R., Lake, J. K., Liu, X., Ma, K., Pei, N., Thompson, J., Uriarte, M., Wolf, A., Wright, S. J., Ye, W., Zhang, J., Zimmerman, J. K., y Kress, W. J. (2012). Phylogenetic and functional alpha and beta diversity in temperate and tropical tree communities. *Ecology*, 93(8 SPEC. ISSUE). <https://doi.org/10.1890/11-0402.1>
- Tabelin, C. B., Silwamba, M., Paglinawan, F. C., Mondejar, A. J. S., Duc, H. G., Resabal, V. J., Opiso, E. M., Igarashi, T., Tomiyama, S., Ito, M., Hiroyoshi, N., y Villacorte-Tabelin, M. (2020). Solid-phase partitioning and release-retention mechanisms of copper, lead, zinc and arsenic in soils impacted by artisanal and small-scale gold mining (ASGM) activities. *Chemosphere*, 260. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127574>
- Takai, K., Kobayashi, H., Nealson, K. H., y Horikoshi, K. (2003). *Deferribacter desulfuricans* sp. nov., a novel sulfur-, nitrate- and arsenate-reducing thermophile isolated from a deep-

- sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(3), 839–846. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.02479-0>
- Taylor, M. (2021, Oct 24). Passive Water Treatment Systems: What You Need to Know. Save the Water. <https://savethewater.org/passive-water-treatment-systems-what-you-need-to-know/#:~:text=What%20is%20passive%20water%20treatment%3F%20Passive%20water%20treatment,chemical%20injection%20program%20or%20a%20water%20treatment%20plant.>
- Tsuchiya, T., Ehara, A., Kasahara, Y., Hamamura, N., y Amachi, S. (2019). Expression of genes and proteins involved in arsenic respiration and resistance in dissimilatory arsenate-reducing *Geobacter* sp. strain OR-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(14). <https://doi.org/10.1128/AEM.00763-19>
- Van Lis, R., Nitschke, W., Duval, S., y Schoepp-Cothenet, B. (2012). *Arsenics as bioenergetic substrates* ☆. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.08.007>
- Wang, Y., Zhang, G., Wang, H., Cheng, Y., Liu, H., Jiang, Z., Li, P., y Wang, Y. (2021). Effects of different dissolved organic matter on microbial communities and arsenic mobilization in aquifers. *Journal of Hazardous Materials*, 411, 125146. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125146>
- Weinstein, M. M., Prem, A., Jin, M., Tang, S., y Bhasin, J. M. (2019). *FIGARO: An efficient and objective tool for optimizing microbiome rRNA gene trimming parameters*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/610394>
- Wickham H, François R, Henry L, Müller K, Vaughan D (2023). *dplyr: A Grammar of Data Manipulation*. <https://dplyr.tidyverse.org>, <https://github.com/tidyverse/dplyr>.
- Wickham H. *et al.* (2016) *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. <https://ggplot2.tidyverse.org>
- Willis, A. D. (2019). Rarefaction, alpha diversity, and statistics. *Frontiers in Microbiology*, 10(OCT). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02407>
- Wilson, L. (2014, Dec 14). Chitosan-based Materials and Their Application toward Arsenic Removal from Water. *Water Conditioning and Purification International Magazine*. <https://wcponline.com/2014/12/14/chitosan-based-materials-application-toward-arsenic-removal-water/>
- Wright, E.S. (2016) "Using DECIPHER v2.0 to Analyze Big Biological Sequence Data in R." *The R Journal*, 8(1), 352-359.
- Xie Y, Fan J, Zhu W, Amombo E, Lou Y, Chen L and Fu J (2016) Effect of Heavy Metals Pollution on Soil Microbial Diversity and Bermudagrass Genetic Variation. *Front. Plant Sci.* 7:755. doi: 10.3389/fpls.2016.00755
- Yamamura, S., Ike, M., y Fujita, M. (2003). Dissimilatory arsenate reduction by a facultative anaerobe, *Bacillus* sp. strain SF-1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(5), 454–460. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)70131-5](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)70131-5)
- Yan, G., Chen, X., Du, S., Deng, Z., Wang, L., y Chen, S. (2019). Genetic mechanisms of arsenic detoxification and metabolism in bacteria. In *Current Genetics* (Vol. 65, Issue 2, pp. 329–338). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00294-018-0894-9>
- Yin, S., Zhang, X., Yin, H., y Zhang, X. (2022). Current knowledge on molecular mechanisms of microorganism-mediated bioremediation for arsenic contamination: A review. *Microbiological Research*, 258, 126990. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.126990>
- Zecchin, S., Crognale, S., Zaccheo, P., Fazi, S., Amalfitano, S., Casentini, B., Callegari, M., Zanchi, R., Sacchi, G. A., Rossetti, S., y Cavalca, L. (2021). Adaptation of Microbial

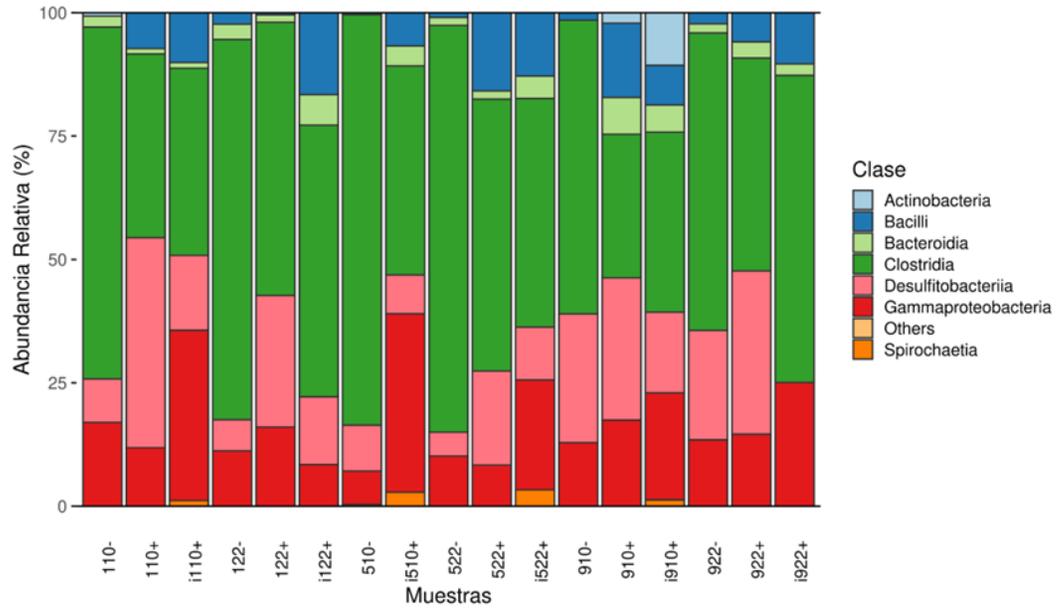
- Communities to Environmental Arsenic and Selection of Arsenite-Oxidizing Bacteria From Contaminated Groundwaters. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.634025>
- Zhang, C., Hao, Y., Zhang, K., Chen, S., y Yang, Z. (2023). Effect of biogas slurry and sucrose addition on electrokinetic removal of arsenic from paddy soil. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 20(1), 703–714. <https://doi.org/10.1007/s13762-022-04006-0>
- Zhang, L., Qin, X., Tang, J., Liu, W., y Yang, H. (2017). Review of arsenic geochemical characteristics and its significance on arsenic pollution studies in karst groundwater, Southwest China. *Applied Geochemistry*, 77, 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2016.05.014>
- Zhang, X., Tang, S., Wang, M., Sun, W., Xie, Y., Peng, H., Zhong, A., Liu, H., Zhang, X., Yu, H., Giesy, J. P., y Hecker, M. (2019). Acid mine drainage affects the diversity and metal resistance gene profile of sediment bacterial community along a river. *Chemosphere*, 217, 790–799. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.210>
- Zhang, Y., Gao, K., Dang, Z., Huang, W., Reinfelder, J. R., y Ren, Y. (2021). Microbial reduction of As(+5)-loaded Schwertmannite by *Desulfosporosinus meridiei*. *Science of the Total Environment*, 764. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144279>
- Zhang, Y., Ma, Y.-F., Qi, S.-W., Meng, B., Chaudhry, M. T., Liu, S.-Q., y Liu, S.-J. (2007). Responses to arsenate stress by *Comamonas* sp. strain CNB-1 at genetic and proteomic levels. *Microbiology*, 153(11), 3713–3721. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/011403-0>
- Zhu, Y.-G., Xue, X.-M., Kappler, A., Rosen, B. P., y Meharg, A. A. (2017). Linking Genes to Microbial Biogeochemical Cycling: Lessons from Arsenic. *Environmental Science and Technology*, 51(13), 7326–7339. <https://doi.org/10.1021/ACS.EST.7B00689>
- Zhu, Y.-G., Yoshinaga, M., Zhao, F.-J., y Rosen, B. P. (2014). Earth Abides Arsenic Biotransformations. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 42(1), 443–467. <https://doi.org/10.1146/annurev-earth-060313-054942>
- Ziegelhöfer, A., y Kujala, K. (2021). Assessing the Diversity and Metabolic Potential of Psychrotolerant Arsenic-Metabolizing Microorganisms From a Subarctic Peatland Used for Treatment of Mining-Affected Waters by Culture-Dependent and -Independent Techniques. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.648412>

## ANEXOS

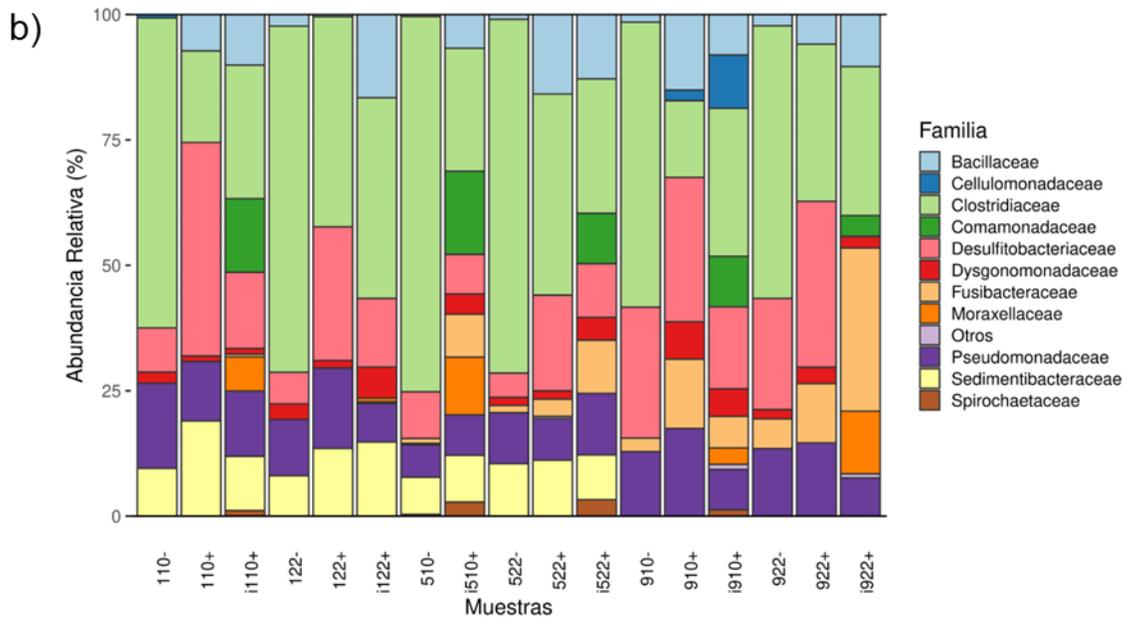
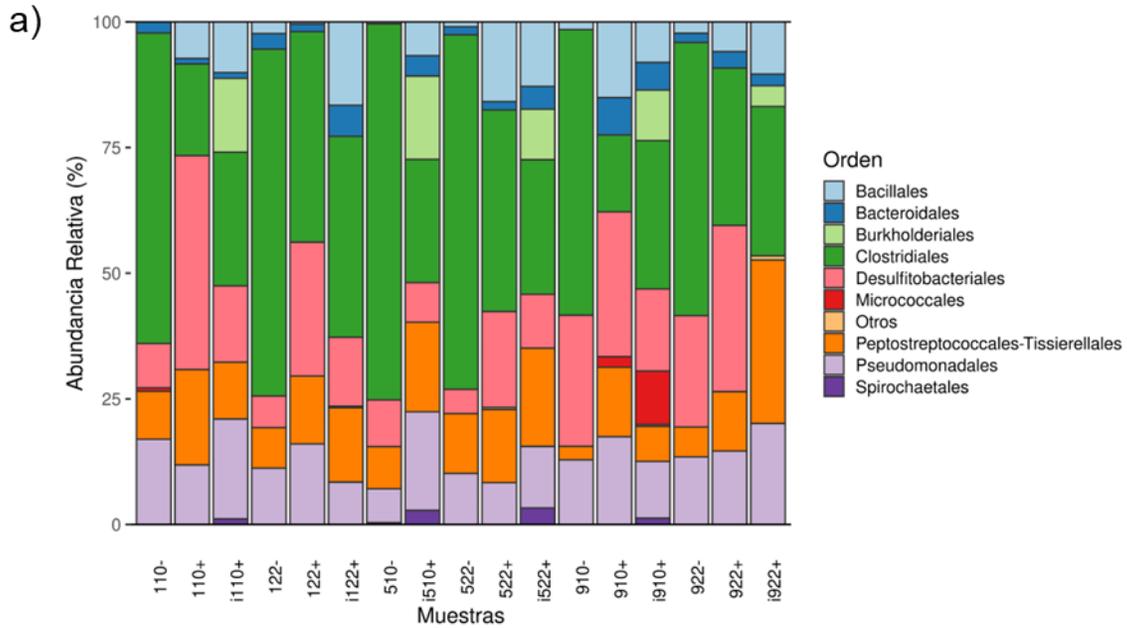
**Anexo 1.** Abundancia absoluta de ASVs asignados a nivel de género para cada una de las muestras, con el filtro del 1 % de abundancia relativa

Género	110-	110+	122-	122+	510-	510+	522-	522+	910-	910+	922-	922+	i110+	i122+	i510+	i522+	i910+	i922+
1 Pseudomonas	1279	1392	1229	1257	851	944	730	1079	1723	1530	1089	1218	700	774	984	757	737	
2 Clostridium sensu stricto 7	5837	2385	7945	3640	9726	6900	4563	5975	1614	6127	2553	3288	4061	2817	2721	3833	2859	
3 Desulfosporosinus	1092	5326	724	2225	1088	444	1972	2341	2967	2386	2387	1482	1638	847	1034	1965	85	
4 Comamonas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1760	0	1739	901	1209	390	
5 Bacillus	164	1012	252	37	48	0	1688	147	1469	239	446	1124	1507	720	1143	965	963	
6 Proteimphilum	200	154	340	124	0	150	183	0	805	203	246	293	594	421	544	661	219	
7 Sedimentibacter	705	2592	661	1158	889	1011	1273	0	0	0	0	914	1492	722	897	0	0	
8 Fusibacter	0	0	0	0	122	134	377	264	1376	722	884	0	0	1001	1071	896	3073	
9 Acinetobacter	0	0	0	0	38	0	0	0	0	0	0	784	70	1248	0	376	1115	
10 Actinotalea	0	0	0	0	0	0	0	0	229	0	0	0	0	0	0	1253	0	
11 Sphaerochaeta	0	0	0	0	44	0	0	0	0	0	0	131	0	305	323	151	0	
12 Delftia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	159	0	0	
13 Klebsiella	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
14 Stenotrophomonas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	37	78
15 Fermentimonas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	
	9277	12861	11151	8441	12806	9583	10786	9806	10183	11207	7605	10994	10062	10594	9786	12103	9519	

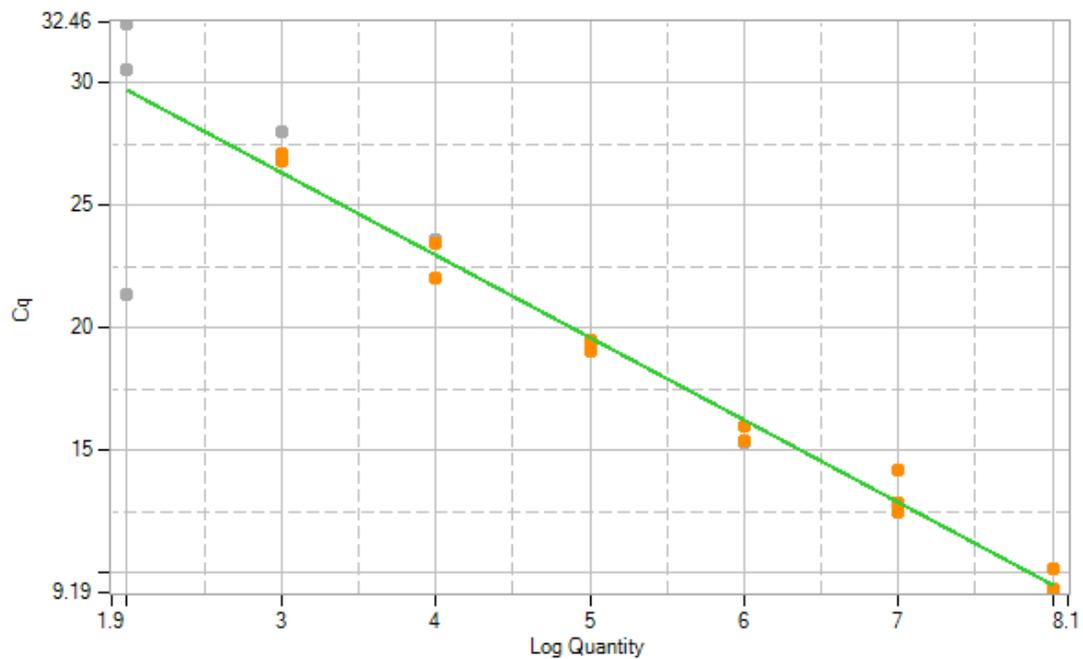
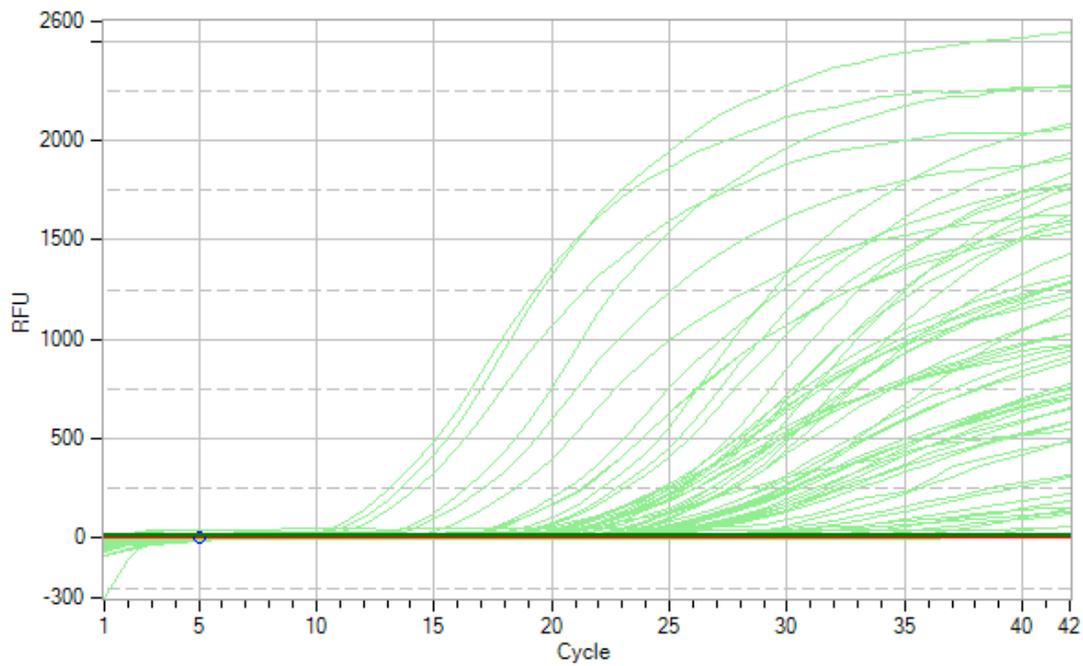
Clave de los tratamientos: Primer dígito indica el Consorcio (1, 5, ó 9), siguientes dos dígitos indican la concentración inicial de lactato (10 ó 22 mM), el símbolo + ó - indica con la adición de As(+5) o sin adición de As(+5), respectivamente.



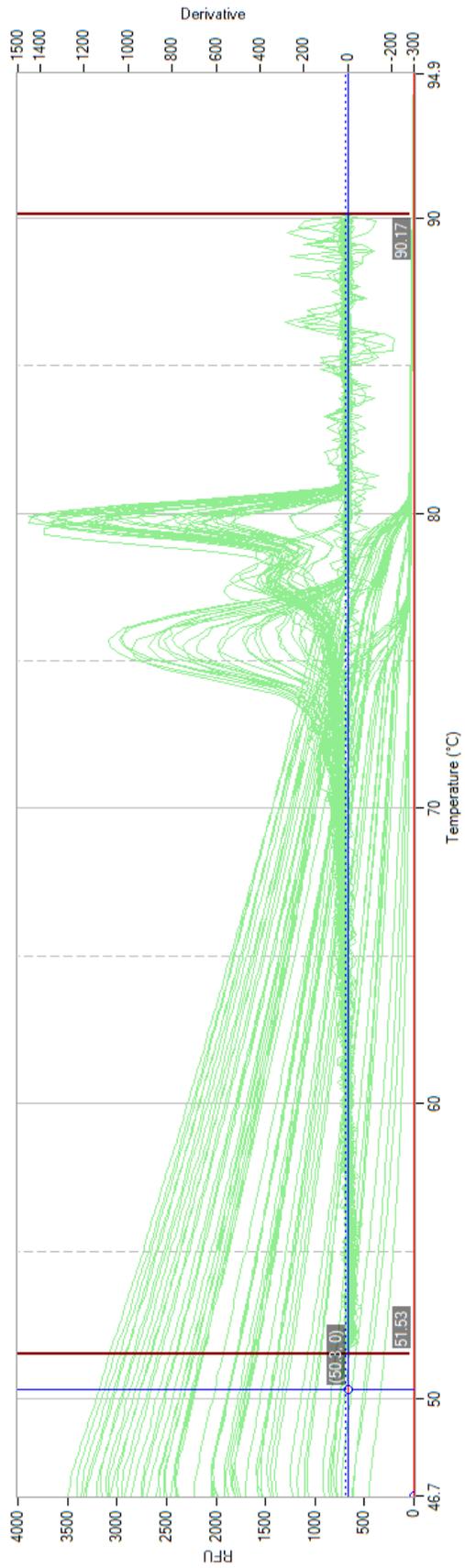
**Anexo 2.** Abundancia relativa expresado en porcentaje a nivel de clase (%), se presentan los resultados de los diferentes tratamientos con (+) y sin arsénico (-), y la concentración de lactato 10 y 22 mM junto con sus inóculos (i) de los diferentes Consorcios (1, 5 y 9).



**Anexo 3.** Abundancia relativa expresado en porcentaje (%) de la comunidad microbiana, se presentan los resultados de los diferentes tratamientos con (+) y sin arsénico (-), y la concentración de lactato 10 y 22 mM junto con sus inóculos (i) de los diferentes Consorcios (1, 5 y 9). a) Abundancia relativa a nivel de orden, b) Abundancia relativa a nivel de familia.



**Anexo 4.** Curva estándar de las diluciones de ADN molde (clonas construidas con pGEM-T easy Vector system (PROMEGA) que contienen el gen *arsC* amplificado a partir de la cepa *Geobacter sulfurreducens* strain PCA (DSM 12127, DSMZ, Alemania; ATCC51573)), usando el par de cebadores *arsC4* (Trx) a diferentes diluciones (100 a 108 copias). El control negativo consistió en agua inyectable estéril (Superior). La eficiencia se determinó mediante la recta  $y = -0.293 * x + 10.748$  (Inferior)



**Anexo 5.** Curva de fusión del control positivo ( $T_m=79^\circ\text{C}$ ) correspondiente a la clona y las muestras ( $T_m = 75.76^\circ\text{C}$ )

## Anexo 6. Rscript

```
#Dada2
#pipeline 16s sequencing analysis

rm(list=ls()) #delete all lists
#install.packages("nlme")

#set a working directory
setwd("~/Documents/IPICYT/tesis/resultados/tax_bayesian_classifier")

getwd() #to verify where I am please getwd()

#tutorial from https://benjjneb.github.io/dada2/tutorial.html

#load DADA2
library(dada2); packageVersion("dada2")

#load a path for all sequences files
path <- "~/Documents/IPICYT/tesis/resultados/datos16s_zympo"
list.files(path)

# Forward and reverse fastq filenames have format: _V3V4_R1.fastq and _V3V4_R2.fastq
fnFs <- sort(list.files(path, pattern="_V3V4_R1.fastq", full.names = TRUE))
fnRs <- sort(list.files(path, pattern="_V3V4_R2.fastq", full.names = TRUE))

library(ShortRead)
foo1 <- readFastq(fnFs[[1]])
foo1
quality(foo1)

# And again for fnFs[[2]]
foo2 <- readFastq(fnFs[[2]])
foo2
quality(foo2)

# Extract sample names, assuming filenames have format: SAMPLENAME_XXX.fastq
sample.names <- sapply(strsplit(basename(fnFs), "_"), `[`, 1)

sample.names <- sapply(strsplit(basename(fnRs), "_"), `[`, 1)

# Obtain quality profiles plot (forward)
# If I change the number within [], I modify the number of panels, same for reverse
plotQualityProfile(fnFs[1:5])
#Change the number(X) in fnFs[1:X] according to the number of samples
str(fnFs)

# Obtain quality profiles plot (reverse)
```

```

plotQualityProfile(fnRs[1:5])
str(fnRs)

# Place filtered files in filtered/ subdirectory (creates new dir)
filtFs <- file.path(path, "filtered", paste0(sample.names, "_F_filt.fastq.gz"))
filtRs <- file.path(path, "filtered", paste0(sample.names, "_R_filt.fastq.gz"))
names(filtFs) <- sample.names
names(filtRs) <- sample.names

#based on V3V4 previous work in methane files, let's try truncQ=0 as in the chimera step, I
lost more than 50% of the sequences.
# Zymo Research has recently developed a tool called Figaro that can help you choose
DADA2 truncation length parameters: https://github.com/Zymo-Research/figaro#figaro
#using figaro we obtained the truncLen 276, 232
#the code sused was : python3 figaro.py -i /path/to/fastq/directory -o /path/to/output/files -a
420 -f 16 -r 24
out <- filterAndTrim(fnFs, filtFs, fnRs, filtRs, truncLen=c(276, 232),maxN=0, truncQ=0,
rm.phix=TRUE, compress=TRUE, multithread=TRUE)
head(out)

#learn the error rates
errF <- learnErrors(filtFs, multithread=TRUE)
errR <- learnErrors(filtRs, multithread=TRUE)
plotErrors(errF, nominalQ=TRUE)
plotErrors(errR, nominalQ=TRUE)

#Sample inference
dadaFs <- dada(filtFs, err=errF, multithread=TRUE)
dadaRs <- dada(filtRs, err=errR, multithread=TRUE)

#inspect the returned dada-class object
dadaFs[[1]]
dadaRs[[1]]

#merge paired reads
mergers <- mergePairs(dadaFs, filtFs, dadaRs, filtRs, verbose=TRUE)
# Inspect the merger data.frame from the first sample
head(mergers[[1]])

#construct sequence table
#construct amplicon sequence variant (ASV), higher resolution method than OTU table
seqtab <- makeSequenceTable(mergers)
dim(seqtab)

# Inspect distribution of sequence lengths
table(nchar(getSequences(seqtab)))

```

```

#Remove chimeras
seqtab.nochim <- removeBimeraDenovo(seqtab, method="consensus", multithread=TRUE,
verbose=TRUE)
dim(seqtab.nochim)

sum(seqtab.nochim)/sum(seqtab)

#Track reads through the pipeline
getN <- function(x) sum(getUniques(x))
track <- cbind(out, sapply(dadaFs, getN), sapply(dadaRs, getN), sapply(mergers, getN),
rowSums(seqtab.nochim))

# If processing a single sample, remove the sapply calls: e.g. replace sapply(dadaFs, getN)
with getN(dadaFs)
colnames(track) <- c("input", "filtered", "denoisedF", "denoisedR", "merged", "nonchim")
rownames(track) <- sample.names
head(track)

getwd()

#ASSIGN TAXONOMY
taxa <- assignTaxonomy(seqtab.nochim,
"/home/hnavar/Documents/IPICYT/tesis/Workshop_dada2/workshop2022/silva_nr99_v13
8.1_wSpecies_train_set.fa.gz", multithread=TRUE, tryRC=TRUE)

#for the species level have the other silva file
#taxa <- addSpecies(taxa,
"/home/hnavar/Documents/IPICYT/tesis/Workshop_dada2/workshop2022/silva_species_as
signment_v138.1.fa.gz")

#inspect the taxonomic assignments
taxa.print <- taxa # Removing sequence row names for display only
rownames(taxa.print) <- NULL
head(taxa.print)

write.csv(taxa, file = "ASVs_taxonomy.csv")#to save a .cvs file
saveRDS(taxa, "ASVs_taxonomy.rds") #save to R data format
#Repeat for sequence table
write.csv(seqtab.nochim, file = "ASVs_seqtab.csv")
saveRDS(seqtab.nochim, "ASVs_seqtab.rds")
#To merge taxa and seqtab.nochim
df.combined <- cbind(taxa, t(seqtab.nochim)) #cbind stands for column bind
write.csv(df.combined, file = "taxa_abundance.csv")

#To generate a phyloseq object
#antes de construir el archivo phyloseq se puede generar el arbol filogenético con el archivo
de secuencias directo desde el archivo de taxonomia

```

```

seqs <- getSequences(seqtab.nochim)
names(seqs) <- seqs # This propagates to the tip labels of the tree
alignment <- AlignSeqs(DNAStringSet(seqs), anchor=NA,verbose=FALSE)

phangAlign <- phyDat(as(alignment, "matrix"), type="DNA")
dm <- dist.ml(phangAlign)
treeNJ <- NJ(dm) # Note, tip order != sequence order
fit = pml(treeNJ, data=phangAlign)
fitGTR <- update(fit, k=4, inv=0.2)
fitGTR <- optim.pml(fitGTR, model="GTR", optInv=TRUE, optGamma=TRUE,
  rearrangement = "stochastic", control = pml.control(trace = 0))
detach("package:phangorn", unload=TRUE)

#Construct a data.frame
#Aquí - a las filas se les denomina samples.out
samples.out <- rownames(seqtab.nochim)
str(samples.out) #The str() function returns information about the rows(observations) and
columns(variables) along with extra information like the names of the columns, class of
each column, followed by some of the initial observations of each of the columns.
#subject <- sapply(strsplit(samples.out, "D"), `[`, 1)#Esta funcion se realiza para separar los
valores del objeto samples.out despues de cada D
#print("The value of the variable subject is:")
#print(subject)

samdf <- data.frame(sample=samples.out)
str(samdf)

rownames(samdf) <- samples.out
print("Este es el resultado de head(samdf$sample):")
head(samdf$sample)
samdf1 <- samdf$sample
consorcio <- c("1", "1", "1", "1", "1", "1", "MU", "5", "5", "5", "5", "5", "9", "9", "9", "9",
"9", "9")
consorcio <- as.factor(consorcio)
Lactato <- c("10", "10", "10", "22", "22", "22", "Mockup", "10", "10", "22", "22", "22", "10",
"10", "10", "22", "22", "22")
Lactato <- as.factor(Lactato)
sampleID <- c("51L10", "51L10As", "551L10As.ino",
"51L22", "51L22As", "51L22As.ino", "Mockup", "55L10", "55L10As.ino", "55L22", "55L22A
s", "55L22As.ino", "59L10", "59L10As", "59L10As.ino", "59L22", "59L22As", "59L22.ino")
sampleID <- as.factor(sampleID)
print("Este es la variable samdf1:")
head(samdf1)
#a phyloseq no le gusta dataframe de sample con una sola columna, eso no viene en el
tutorial
#entonces tenemos que hacer una variable dummy de las mismas dimensiones que el
numero de muestras que tengo

```

```

#https://github.com/joey711/phyloseq/issues/541
#aquí se pone otra variable para que se pueda generar la metadata
Arsenico <- c("-", "+", "+", "-", "+", "+", "+", "-", "+", "-", "+", "+", "-", "+", "+", "-", "+", "+")
Arsenico <- as.factor(Arsenico)

#OJO tenemos que cargar los metadatos como factores NO como strings, si no, no funciona
samdf$Arsenico <- Arsenico
samdf$Lactato <- Lactato
samdf$sampleID <- sampleID
samdf$consorcio <- consorcio
class(samdf$sample)
print("Resultado de samdf$sample")
head(samdf$sample)

#build a phyloseq object
ps <- phyloseq(otu_table(seqtab.nochim, taxa_are_rows=FALSE),
               sample_data(samdf),
               tax_table(taxa), phy_tree(fitGTR$tree))
ps <- prune_samples(sample_names(ps) != "18", ps) # Remove mock sample
#separate names from que ASV sequence table, and assign new names ASV1, ASV2 etc..
dna <- Biostrings::DNAStrngSet(taxa_names(ps))
names(dna) <- taxa_names(ps)
ps <- merge_phyloseq(ps, dna)
taxa_names(ps) <- paste0("ASV", seq(ntaxa(ps)))
ps
print(ps)
#ready to use phyloseq
#check this tutorial for alpha diversity https://joey711.github.io/phyloseq/plot\_richness-examples.html

#para verificar cuales son las variables
print(sample_data(ps))

saveRDS(ps,
"~/Documents/IPICYT/tesis/resultados/tax_bayesian_classifier/phyloseq_object.rds")

#codigo para analisis de biodiversidad despues de asignacion taxonomica
#Previamente se corre el codigo para generar el archivo de phyloseq
#primero se importa el archivo de R
#Hacer con conda activate microbiome
ps <-
readRDS("~/Documents/IPICYT/tesis/resultados/tax_bayesian_classifier/phyloseq_object_
sin18.rds")

#install phyloseq (R 3.6.2)
#https://www.bioconductor.org/packages/3.10/bioc/html/phyloseq.html

```

```

#if (!requireNamespace("BiocManager", quietly = TRUE))
# install.packages("BiocManager")

#BiocManager::install("phyloseq")
#load phyloseq
library(dada2); packageVersion("dada2")
library(phyloseq); packageVersion("phyloseq")
library(Biostrings); packageVersion("Biostrings")
library(ggplot2); packageVersion("ggplot2")
library(plyr); packageVersion("plyr")
#install.packages("ggrepel", repos = "https://cran.r-project.org")
library(vegan)
library(ggrepel)

#ready to use phyloseq
#view the tutorial for alpha diversity : https://joey711.github.io/phyloseq/plot\_richness-examples.html
#para verificar cuales son las variables
print(sample_data(ps))

#Taxonomic filtering
# Show available ranks in the dataset
print("aquí aparecen las categorías taxonómicas")
rank_names(ps)
# Create table, number of features for each phyla
table(tax_table(ps)[, "Genus"], exclude = NULL)
table(tax_table(ps)[, "Family"], exclude = NULL)
table(tax_table(ps)[, "Order"], exclude = NULL)
table(tax_table(ps)[, "Class"], exclude = NULL)
table(tax_table(ps)[, "Phylum"], exclude = NULL)
table(tax_table(ps)[, "Species"], exclude = NULL)
#The following ensures that features with ambiguous phylum annotation are also
#removed. Note the flexibility in defining strings that should be considered ambiguous
annotation.

#ps <- subset_taxa(ps, !is.na(Genus) & !Genus %in% c("", "uncharacterized"))
#to verify that the NAs were removed:
#print("lista de phylum filtrados:")
#table(tax_table(ps)[, "Genus"], exclude = NULL)

#A useful next step is to explore feature prevalence in the dataset,
#which we will define here as the number of samples in which a taxon appears at least
once.
# Compute prevalence of each feature, store as data.frame
prevdf = apply(X = otu_table(ps),
              MARGIN = ifelse(taxa_are_rows(ps), yes = 1, no = 2),

```

```

FUN = function(x){sum(x > 0)}
# Add taxonomy and total read counts to this data.frame
prevdf = data.frame(Prevalence = prevdf,
                    TotalAbundance = taxa_sums(ps),
                    tax_table(ps))

#Are there phyla that are comprised of mostly low-prevalence features?
#Compute the total and average prevalences of the features in each phylum.
plyr::ddply(prevdf, "Phylum", function(df1){cbind(mean(df1$Prevalence),
                                                    sum(df1$Prevalence))})

#print("Selecciona el phylum a filtrar basado en el número de veces totales
#que aparece en la columna dos")
# Define phyla to filter
#filterPhyla = c("Sprochaetota")
#Filter entries with unidentified Phylum.
#ps1 = subset_taxa(ps, !Phylum %in% filterPhyla)
#ps1

# Subset to the remaining phyla, this is an unsupervised filtering of the
#remaining data First, explore the relationship of prevalence and total read
#count for each feature. Sometimes this reveals outliers that should probably
#be removed, and also provides insight into the ranges of either feature that
#might be useful.
prevdf1 = subset(prevdf, Genus %in% get_taxa_unique(ps, "Genus"))
ggplot(prevdf1, aes(TotalAbundance, Prevalence / nsamples(ps),color=Genus)) +
  # Include a guess for parameter
  geom_hline(yintercept = 0.05, alpha = 0.5, linetype = 2) +
  geom_point(size = 2, alpha = 0.7) +
  scale_x_log10() + xlab("Total Abundance") +
  ylab("Prevalence [Frac. Samples]") +
  facet_wrap(~Genus) + theme(legend.position="none")

# Define prevalence threshold as 1% of total samples
prevalenceThreshold = 0.01 * nsamples(ps)
prevalenceThreshold

# Execute prevalence filter, using `prune_taxa()` function
keepTaxa = rownames(prevdf1)[(prevdf1$Prevalence >= prevalenceThreshold)]

ps2 = prune_taxa(keepTaxa, ps)

#collapse the matrix inside the phyloseq object

print(" How many genera would be present after filtering?:")
length(get_taxa_unique(ps2, taxonomic.rank = "Genus"))

```

```

ps3 = tax_glom(ps2, "Genus", NArm = FALSE) #NArm significa remover NA

#we want to combine ASV table with taxa table
library(dplyr)
library(microbiome)

#otu.tax.ps.top70 <- combine_otu_tax(ps.genus, column.id = "ASVID")

#remove species and long ASV names
#otu.tax.ps.top70 <- subset(otu.tax.ps.top70, select=-c(ASVID, Class, Order, Family
,Genus, Species))

#extract the data into csv file
#write.csv(otu.tax.ps.top70, "tax_abundance_nofilter_Phylum.csv")

theme_set(theme_bw())

#alpha diversity
#give the plot a name
png(file = "alpha_diversity_filtered1percentgenus.png",width=10.5,height=10,units="cm" ,
res=1200)
alpha = plot_richness(ps3, x="sample", measures=c("Shannon", "Observed", "Chao1" ),
nrow=3) #, color="sample")
alpha + labs(x = "Muestras", y = "Índices de diversidad alfa")

richness <- estimate_richness(ps3, measures = c("Observed", "Shannon", "Chao1"))
muestras <- sample_names(ps3)
richness <- cbind(muestras, richness)
# Guardar los datos de riqueza de especies en un archivo de texto
write.table(richness, file = "riqueza_especies.txt", sep = "\t", row.names = FALSE)

#save the file
dev.off()

#Check this tutorial for beta diversity
# https://joey711.github.io/phyloseq/plot\_ordination-examples.html
library("plyr"); packageVersion("plyr")

#####ERROR
#si ocurre este error Error in if (autotransform && xam > 50) { :
#missing value where TRUE/FALSE needed
#Calls: ordinate -> metaMDS -> metaMDSdist
#puede ser debido a que en la taxonomía hay datos con NA o hay taxa
#con abundancia 0, por lo que se tiene que filtrar según esta web :

```

```

#https://github.com/joey711/phyloseq/issues/1495
#En el siguiente link está el tutorial sobre como hacerlo:
#https://bioconductor.org/help/course-materials/2017/BioC2017/Day1/Workshops/Microbiome/MicrobiomeWorkflowII.html#taxonomic_filtering
#se realiza al inicio, despues de crear el archivo phyloseq

```

```
GP1 = ps3
```

```

#ordinate
# Transform data to proportions as appropriate for Bray-Curtis distances
ps.prop <- transform_sample_counts(ps3, function(otu) otu/sum(otu))
ord.nm.ds.bray <- ordinate(ps.prop, method="NMDS", distance="bray")

#plot bray-curtis (ordination)
png(file = "NMDS_arsenico_filtered1percent.png", width=10.5,height=10,units="cm",
res=1200)
p2 = plot_ordination(ps.prop, ord.nm.ds.bray, color="Arsenico", shape = "consorcio")
#, label = "Lactato")# title="Bray NMDS"
  #To make a polygon that highlights samples that are the same consorcio
p2 + geom_polygon(aes(),show.legend = FALSE) + geom_point(size=5, alpha=0.75) +
  #Lo siguiente es para eliminar la cuadrícula
  theme_bw() +
  theme(axis.line = element_line(color='black'),
        plot.background = element_blank(),
        panel.grid.major = element_blank(),
        panel.grid.minor = element_blank(),
        panel.border = element_blank()) +
#+ ggtitle("MDS/PCoA on weighted-UniFrac distance")
scale_colour_discrete(name=("Arsenico")) +
  # se puede poner título a la leyenda name="Experimental\nCondition",
scale_shape_discrete(name = ("Consorcios"), labels=c("1","1i","5","5i","9","9i")) +
  # add text with geom_text for labels of points
  #geom_text(aes(label=Lactato), position = position_dodge(.9),
  #vjust=-0.25, size= 2, color="black")

#alternativa a geom text
geom_text_repel(min.segment.length = Inf, seed = 123, size = 3, box.padding = 0.5,
  aes(label = Lactato),show.legend = FALSE)
#Show.legends le quita una a que salia en la leyenda de - y + arsenico

library("vegan")
#curva de rarefacción
n_seqs <- sample_sums(ps3)#number of ASVs per sample

```

```

min_n_seqs=min(n_seqs)#returns the minimum value of a vector or data frame
min_n_seqs
tab <- otu_table(ps3)#extracts the OTU table from the phyloseq object and names it tab

class(tab) <- "matrix" #as.matrix() will do nothing
##you get a warning here, but this is what we need to have
#tab <- t(tab) #transpose observations to rows
head(tab)#to visualize in console the first 6 rows
#total number of species at each site (row of data)

#To give different colors to lines
col <- c("black", "darkred", "forestgreen", "orange", "blue", "yellow", "hotpink")
lty <- c("solid", "dashed", "longdash", "dotdash")
#To plot rarefied data
rarefy(tab, min_n_seqs)
png(filename = "rarefaction_curve_filtered1percent.png", width =10, height = 10.5,
      units = "cm", res = 2000)
rarecurve= rarecurve((tab), step=50, col=col,lty = lty, cex=0.5, lwd=2, label=TRUE,
                    xlab = "Número de secuencias analizadas", ylab = "ASVs")
abline(v=min_n_seqs)
text(x=8000, y=2, srt=90, "7559")#8000 was set to not overlap line
#rarecurve + geom_text_repel(aes(label = sample))
theme_set(theme_bw())
dev.off()

# Clean workspace
rm(list=ls())

```