



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA**

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**Versatilidad metabólica de una comunidad
arseniato reductora bajo condiciones reductoras y
oxidantes**

Tesis que presenta

Katia Karime Treviño Calderón

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias Ambientales

Directora de la Tesis:

Dra. María de Lourdes Berenice Celis García

San Luis Potosí, S.L.P., 19 de marzo de 2026



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Versatilidad metabólica de una comunidad arseniato reductora bajo condiciones reductoras y oxidantes**” presentada para obtener el Grado de de Maestra en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Katia Karime Treviño Calderón** y aprobada el **19 de marzo de 2026** 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. Erika Elizabeth Ríos Valenciana
Miembro del Comité Tutorial

Dra. Nguyen Esmeralda López Lozano
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en los laboratorios de de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Berenice Celis García.

El trabajo de investigación de esta tesis se realizó con financiamiento del Fondo Ciencia de Frontera 2023 mediante el proyecto CF-2023-I-2616.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica de la Secretaria de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (1321781) para realizar los estudios de maestría.

Acta de examen

Dedicatorias

Para mis padres, por su amor y apoyo incondicional.

Y a la memoria de Todd, mi fiel compañero durante gran parte de este camino.

Agradecimientos

Agradezco profundamente a la Dra. Berenice Celis por brindarme la oportunidad de trabajar bajo su dirección, por su dedicación, paciencia y constante disposición al compartirme su experiencia y conocimiento a lo largo de este proceso.

A mi comité tutorial, conformado por las Dras. Erika Ríos y Esmeralda López, por sus valiosas observaciones y comentarios que fueron muy enriquecedores para mi trabajo de tesis.

Al IPICYT, por proporcionarme la infraestructura y los recursos necesarios para el desarrollo de mis estudios de maestría.

A los técnicos de la división, M. en C. Guillermo Vidriales, I.Q. Carmen Rocha, M. en C. Juan Pablo Rodas y Dra. Elizabeth Isaacs, por su gran disposición, apoyo técnico y acompañamiento durante el desarrollo experimental.

A mis compañeras del grupo de trabajo TSLAB, por su compañerismo y apoyo técnico.

A mis papás y a mi hermano, por su apoyo incondicional, confianza y comprensión en cada etapa de mi vida.

A mi familia, por su respaldo constante y por estar siempre presentes, incluso en la distancia.

A mi novio Guillermo, por su apoyo, cariño, motivación y por impulsarme a creer en mí y en mis metas.

A mis mascotas, Todd y Bolo, por ser un refugio de tranquilidad y alegría en los momentos de mayor estrés.

A las compañeras y amigas que me dejó esta institución, Amairani y Mayra, por su compañía, apoyo y por hacer más llevaderos los momentos difíciles.

Finalmente, a mis amigos, Cesar, Salma, Pavlova y Suhaid, porque a pesar del paso del tiempo, distancia y responsabilidades, el cariño y el apoyo han permanecido.

Contenido

Versatilidad metabólica de una comunidad arseniato reductora bajo condiciones reductoras y oxidantes

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
Anexos.....	XIII
Resumen.....	XIV
Abstract	XV
1. Introducción.....	1
1.1 Generalidades del arsénico	1
1.2 Ciclo biogeoquímico del arsénico	4
1.3 Microbiología del arsénico	8
1.3.1 Producción de exopolisacáridos (EPS)	10
1.3.2 Bioacumulación de arsénico.....	11
1.3.3 Biosorción de arsénico.....	11
1.3.4 Metilación y desmetilación de arsénico.....	12
1.3.5 Oxidación de arsénico	13
1.3.6 Reducción de arsénico	15
1.4 Tecnologías para la remediación de la contaminación por arsénico	18
2. Justificación	22
3. Hipótesis	23
4. Objetivos.....	24
4.1 Objetivo general.....	24

4.2 Objetivos específicos	24
5. Materiales y métodos.....	25
5.1 Fuente de microorganismos.....	25
5.2 Medio de cultivo basal	25
5.4 Evaluación de la actividad de los consorcios	26
5.4 Evaluación de cinéticas de reducción y oxidación con arsénico soluble y precipitados de sulfuros de arsénico.....	29
5.4.1 Evaluación de la capacidad de reducción de arseniato (As^{5+}) y oxidación de arsenito (As^{3+})	29
5.4.2 Evaluación de la capacidad de usar arsenito como donador de electrones a partir de sulfuros minerales de arsénico	31
5.5 Análisis fisicoquímicos.....	32
5.5.1 Cuantificación de nitrato, lactato y acetato por electroforesis capilar	32
5.5.2 Cuantificación de nitrito	33
5.5.3 Cuantificación de arseniato	33
5.5.4 Cuantificación de arsénico total.....	34
5.5.5 Balance de electrones	34
5.7 Identificación de genes funcionales involucrados en las transformaciones biológicas de arsénico (<i>aioA</i> , <i>arrA</i> , <i>arsC</i>)	36
6. Resultados y discusión	38
6.1 Selección del inóculo con características reductoras y oxidantes	38
6.2 Reducción y oxidación de arsénico con arsénico soluble	41
6.3 Oxidación de sulfuros de arsénico con el consorcio CB	50
6.4 Velocidades de reducción y oxidación de arsénico soluble y contenido en precipitados de sulfuros de arsénico.....	55
6.6 Estructura de la comunidad microbiana en los ensayos de reducción y oxidación de arsénico	58
6.5 Genes funcionales identificados en las cinéticas de reducción y oxidación de arsénico de forma soluble y en precipitados de sulfuros de arsénico	68
7. Conclusiones.....	75
8. Perspectivas	77
Referencias.....	79
Anexos.....	88

Lista de tablas

Tabla 5.1. Suplementos de cada experimento.	29
Tabla 5.2. Primers para los genes funcionales involucrados en la oxidación y reducción de arsénico.	37
Tabla 6.1. Variación de pH en etapas de reducción y oxidación de arsénico con el consorcio CB en experimentos con el arsénico soluble.	47
Tabla 6.2. Variación de pH en la oxidación de precipitados de sulfuros de arsénico endógenos o inoculados con oxígeno o nitrato.	54
Tabla 6.3. Velocidades de reducción y oxidación de arsénico con el consorcio CB.	55
Tabla 6.4. Balance de electrones para los experimentos de oxidación usando nitrato con arsénico soluble y en precipitados de sulfuros de arsénico inoculado con consorcio CB y endógeno.	57
Tabla 6.5. Genes funcionales detectados en los experimentos de reducción y oxidación de arsénico.	69

Lista de figuras

Figura 1.1 Distribución de la contaminación por arsénico en el mundo	2
Figura 1.2 Diagrama de Eh-pH para especies acuosas de arsénico en el sistema As-O ₂ -H ₂ O	3
Figura 1.3. Representación gráfica del ciclo biogeoquímico del arsénico	5
Figura 1.4. Representación gráfica de los genes y especies involucradas en la oxidación y reducción de arsénico mediada por bacterias	14
Figura 1.5. Formación y disolución de precipitados de sulfuros de arsénico. La formación se indica por medio de las flechas rojas, mientras que la disolución con las flechas moradas.	20
Figura 5.1. Representación gráfica de experimentos exploratorios con ambos consorcios (CB y CT).	26
Figura 6.1. Evaluación de cinéticas con el consorcio CT. A) Reducción de 10 mM de As(V) usando 5 mM de lactato como donador de electrones. B) Oxidación de As(III) usando oxígeno como aceptor de electrones. C) Oxidación de As(III) usando NO ₃ ⁻ como aceptor de electrones	39
Figura 6.2. Evaluación de cinéticas con el consorcio CB. A) Reducción de 15 mM de As(V) usando 8 mM de lactato como donador de electrones. B) Oxidación de As(III) usando oxígeno como aceptor de electrones. C) Oxidación de As(III) usando NO ₃ ⁻ como aceptor de electrones	41

Figura 6.3. Evaluación de cinéticas con el consorcio CB. A y B) Reducción de 10 mM de As(V) usando 8 mM de lactato como donador de electrones. C y D) Oxidación de As(III) usando nitrato como aceptor de electrones.	43
Figura 6.4. Evaluación de cinéticas con el consorcio CB. A y B) Reducción de 10 mM de As(V) usando 8 mM de lactato como donador de electrones. C y D) Oxidación de As (III) usando nitrato como aceptor de electrones.	44
Figura 6.5. Densidad óptica cuantificada a 600 nm durante la etapa de oxidación en los experimentos realizados con arsenito soluble.	50
Figura 6.6. Evaluación de cinéticas con el consorcio CB. A y B) Oxidación de arsenito con consorcio CB usando oxígeno con precipitados de sulfuros de arsénico C y D) Oxidación de arsenito a partir de precipitados de sulfuros de arsénico sin inocular.	51
Figura 6.7. Evaluación de cinéticas con el consorcio CB. A y B) Oxidación de precipitados de sulfuros de arsénico con oxígeno usando el consorcio CB. C y D) Oxidación de precipitados de sulfuros de arsénico con oxígeno sin inocular.	53
Figura 6.8. Medición de diversidad alfa en todos los experimentos con arsénico soluble y precipitado en sulfuros de arsénico.	59
Figura 6.9. Abundancias relativas de los filos bacterianos presentes en los experimentos con arsénico soluble.	60
Figura 6.10. Abundancias relativas de los géneros bacterianos presentes en los experimentos con arsénico soluble.	63
Figura 6.11. Abundancias relativas de los filos bacterianos presentes en los experimentos con arsénico precipitado en sulfuros de arsénico.	64
Figura 6.12. Abundancias relativas de los géneros bacterianos presentes en los experimentos realizados con precipitados de sulfuros de arsénico.	65
Figura 6.13. Cambios en abundancia relativa (%) respecto al inóculo de los géneros dominantes en los distintos experimentos	67

Figura 6.14. Gel de agarosa de la amplificación del gen aioA en las muestras del inóculo, arsénico soluble en etapas de reducción y oxidación y arsénico formando parte de precipitados de sulfuros de arsénico en etapa de oxidación.	70
Figura 6.15. Gel de agarosa de la amplificación del gen arrA en las muestras del inóculo, arsénico soluble en etapas de reducción y oxidación y arsénico formando parte de precipitados de sulfuros de arsénico en etapa de oxidación.	71
Figura 6.16. Gel de agarosa de la amplificación del gen arsC en las muestras del inóculo, arsénico soluble en etapas de reducción y oxidación y arsénico formando parte de precipitados de sulfuros de arsénico en etapa de oxidación.	71
Figura 6.17. Gel de agarosa de la amplificación del gen arsC en las muestras del inóculo, arsénico soluble en etapas de reducción y oxidación y arsénico formando parte de precipitados de sulfuros de arsénico en etapa de oxidación.	72
Figura 6.18. Diagrama que ilustra la reducción y oxidación de arsénico en un acuífero pobre en hierro y rico en sulfato	74

Anexos

Anexo 1. Programas de PCR usados para identificación de los genes involucrados en la oxidación y reducción de arsénico (<i>arrA</i> , <i>arsC</i> , <i>aioA</i>)	88
Anexo 2. Programa de PCR usado para la amplificación del gen 16S ARNr	91

Resumen

Katia Karime Treviño Calderón (2025). Versatilidad metabólica de una comunidad arseniato reductora bajo condiciones reductoras y oxidantes. Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. México.

El arsénico es un metaloide tóxico para todos los seres vivos, en humanos puede causar daños severos a la salud. Para la biorremediación de sitios contaminados con arsénico se pueden usar bacterias con capacidad de respirar arsénico, que usan arseniato como aceptor final de electrones para transformarlo en arsenito, en combinación con bacterias que reducen sulfato a sulfuro. El arsenito y el sulfuro al alcanzar la saturación precipitan como sulfuros de arsénico (biominerales) y de esta forma separan el arsénico de la corriente acuosa para su confinación, disposición o reúso. Sin embargo, se ha perdido de vista que existe el riesgo de que el arsénico de los sulfuros de arsénico se movilice nuevamente por la acción de bacterias quimiolitótrofas capaces de usar arsenito como donador de electrones para la fijación de CO₂ mediante la reducción de oxígeno o nitrato. Actualmente no hay investigación sobre dicho tema. El objetivo de este proyecto fue evaluar la capacidad de un consorcio especializado en arseniato reducción para movilizar arsénico de sulfuros de arsénico biogénicos, al oxidar arsenito en condiciones aerobias o anóxicas. En primer lugar, se evaluaron las cinéticas de reducción de arseniato y la posterior oxidación del arsenito producido en ensayos de microcosmos en lote por triplicado conteniendo 10 mM de arseniato. Los resultados mostraron que tanto la reducción de arseniato como la oxidación de arsenito fueron llevadas a cabo por el mismo consorcio anaerobio que se usó como inóculo en los ensayos. Dicho consorcio había sido previamente enriquecido y usado exclusivamente para llevar a cabo la reducción de arseniato y sulfato con lactato como donador de electrones en condiciones anaerobias. En otro conjunto de ensayos, se usaron precipitados de sulfuros de arsénico para evaluar la capacidad de la comunidad para movilizar nuevamente el arsénico a la fase acuosa. En este caso se encontró que la capacidad de oxidar arsenito fue 7 veces menor que en los ensayos con arsénico soluble. El consorcio microbiano con el que se realizaron los ensayos estaba compuesto por géneros como *Desulfomicrobium*, *Desulfobulbus* y *Desulfosporosinus*. Después de la etapa de oxidación, la diversidad disminuyó entre 38.8 y 68.2% para experimentos inoculados y endógenos, respectivamente; mientras que géneros como *Thauera* y *Pseudomonas* se enriquecieron entre 55-83% y 85-95%, respectivamente. Estos resultados demuestran que los consorcios microbianos arseniato reductores poseen dualidad metabólica y son capaces de realizar el proceso contrario (oxidación de arsenito). Por lo tanto, los bioprecipitados de sulfuros de arsénico obtenidos mediante un proceso de biorremediación anaerobio podrían perder su estabilidad al encontrarse bajo condiciones fluctuantes en el ambiente (óxicas/anóxicas).

PALABRAS CLAVE: Arseniato, Arsenito, Bioprecipitados, Consorcios, Nitrato, Oxidación, Reducción, Sulfuro.

Abstract

Katia Karime Treviño Calderón (2025). Metabolic versatility of an arsenate reducing consortium under reductive and oxidative conditions. M.Sc. Thesis Environmental Sciences. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. México.

Arsenic is a toxic metalloid for all living organisms; in humans it can cause severe health damage. For the bioremediation of arsenic-contaminated sites, bacteria with the ability to respire arsenic can be used, which use arsenate as the final electron acceptor to transform it into arsenite, in combination with bacteria that reduce sulfate to sulfide. When arsenite and sulfide reach saturation, they precipitate as arsenic sulfides (biominerals), and in this way arsenic is separated from the aqueous stream for confinement, disposal, or reuse. However, it has been overlooked that there is a risk that arsenic from arsenic sulfides may become mobilized again by the action of chemolithotrophic bacteria capable of using arsenite as an electron donor for CO₂ fixation through oxygen or nitrate reduction. Currently, there is no research on this topic. The objective of this project was to evaluate the capacity of an arsenate-reducing specialized consortium to mobilize arsenic from biogenic arsenic sulfides by oxidizing arsenite under aerobic or anoxic conditions. First, the kinetics of arsenate reduction and the subsequent oxidation of the produced arsenite were evaluated in triplicate batch microcosm assays containing 10 mM arsenate. The results showed that both arsenate reduction and arsenite oxidation were carried out by the same anaerobic consortium used as inoculum in the assays. This consortium had been previously enriched and used exclusively to carry out arsenate and sulfate reduction with lactate as electron donor under anaerobic conditions. In another set of assays, arsenic sulfide precipitates were used to evaluate the community's ability to mobilize arsenic again into the aqueous phase. In this case, it was found that the capacity to oxidize arsenite was 7 times lower than in assays with soluble arsenic. The microbial consortium used in the assays was composed of genera such as *Desulfomicrobium*, *Desulfobulbus*, and *Desulfosporosinus*. After the oxidation stage, diversity decreased between 38.8 and 68.2% for inoculated and endogenous experiments, respectively; while genera such as *Thauera* and *Pseudomonas* were enriched between 55–83% and 85–95%, respectively. These results demonstrate that arsenate-reducing microbial consortia possess metabolic duality and can perform the opposite process (arsenite oxidation). Therefore, arsenic sulfide bioprecipitates obtained through an anaerobic bioremediation process could lose their stability when found under fluctuating environmental conditions (oxic/anoxic).

KEY WORDS. Arsenate, Arsenite, Bioprecipitates, Consortia, Nitrate, Oxidation, Reduction, Sulfide

1. Introducción

1.1 Generalidades del arsénico

El arsénico es un metaloide abundante en la naturaleza; ocupa el lugar 47 en abundancia de los 88 elementos presentes en la Tierra, pertenece al grupo 15 de la Tabla Periódica y presenta distintos estados de oxidación (-3, -1, 0, +3 y +5) (Plant et al., 2014). La mayoría del arsénico se encuentra en la litósfera y es movilizado a la biósfera a través de una combinación de factores naturales como erosión, disolución de rocas, reacciones bioquímicas y factores antropogénicos dentro de los cuales destacan el uso de combustibles fósiles, pesticidas, herbicidas, actividades mineras, uso en desecantes de cultivos y como aditivo en la alimentación de ganado. En las últimas décadas el uso de arsénico en pesticidas, herbicidas o como aditivo en la alimentación de ganado ha sido reducido considerablemente; sin embargo, el impacto de su uso aún perdurará en el ambiente por algunos años (Smedley & Kinniburgh, 2002).

El arsénico es tóxico para todos los seres vivos, en los seres humanos puede causar graves problemas de salud tales como distintos tipos de cáncer (p. ej. piel, pulmones), problemas cardiovasculares, respiratorios y diabetes mellitus (Plant et al., 2014). La contaminación por arsénico ha causado daños severos a los ecosistemas del suelo y de sistemas acuáticos (Sevak & Pushkar, 2024). El principal problema de salud pública debido al arsénico es la existencia de aguas subterráneas con alto contenido de arsénico, proveniente de forma natural de rocas. Dentro de los países que se han reportado con sitios con alto contenido de arsénico se encuentran Argentina, Bangladesh, Chile, China, México, India, Tailandia y Taiwán, entre otros, tal y como se observa en la Figura 1.1.

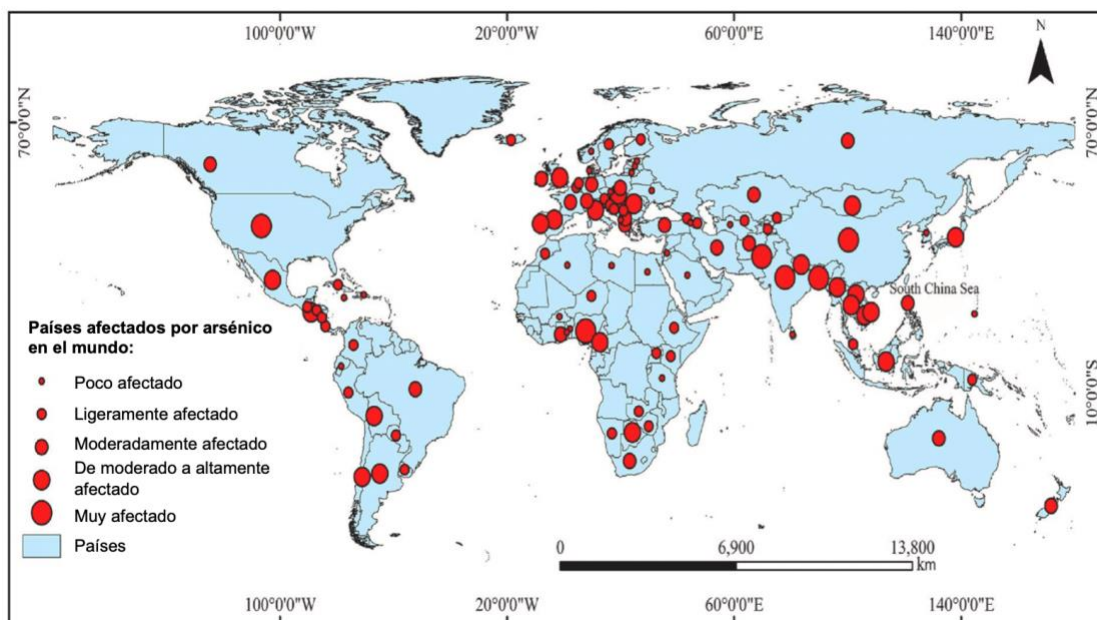


Figura 1.1. Distribución de la contaminación por arsénico en el mundo. Modificado de Shaji et al. (2021).

En México, la contaminación por arsénico se localiza en varios estados como Chihuahua, Zacatecas, Durango, San Luis Potosí y Jalisco. Dado que en México el agua subterránea es la fuente de aproximadamente 39% de agua potable dicha contaminación es un problema de salud pública relevante (Alarcón-Herrera et al., 2020). Específicamente, en los sitios que han sido estudiados en San Luis Potosí las concentraciones de arsénico en el agua varían desde 5 hasta 48 mg/L (Rios-Valenciana & Celis, 2025).

En ambientes oligotróficos como los acuíferos, el arsénico se encuentra principalmente en forma inorgánica, típicamente como As^{5+} (arseniato) y As^{3+} (arsenito), siendo más tóxico y móvil el arsenito. La toxicidad del arseniato se debe a que éste puede interferir con la bioquímica del fosfato como la fosforilación oxidativa, debido a la similaridad entre las moléculas. El arsenito, en cambio, puede inactivar los grupos sulfhidrilos de los residuos de cisteína en las proteínas (Plant et al., 2014).

La forma en que se encuentre el arsénico en el ambiente dependerá del pH y del potencial de óxido reducción (Eh) del medio, tal y como se muestra en la Figura 1.2. En sistemas acuosos bajo condiciones aerobias, el arsénico se encuentra predominantemente como arseniato formando oxianiones. La especie H_2AsO_4^- predomina cuando el pH del ambiente es menor a 6.9, mientras que la especie HAsO_4^{2-} predomina cuando el pH es mayor a 6.9. En condiciones anaerobias, el arsénico se encuentra como arsenito formando el oxianión H_3AsO_3^0 cuando el pH es menor a 9.2 (Chaudhary et al., 2024).

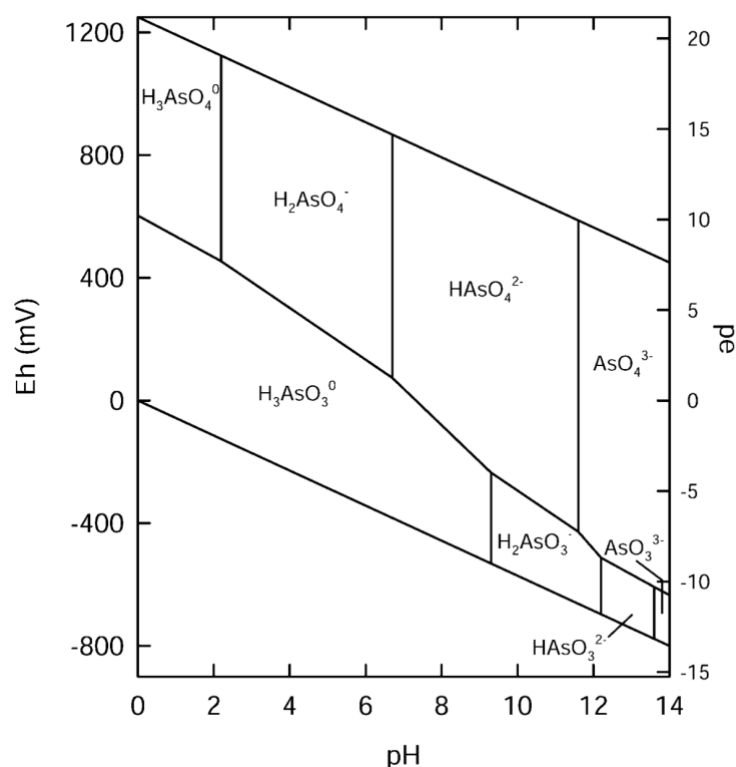


Figura 1.2. Diagrama de Eh-pH para especies acuosas de arsénico en el sistema As-O₂-H₂O. Tomado de Smedley & Kinniburgh (2002).

Debido a su toxicidad, se han establecido límites máximos permisibles para el contenido de arsénico en agua, con los cuales se previene el efecto adverso sobre la salud de los seres humanos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la NOM-127-SSA1-2021, norma que dicta los lineamientos de calidad que debe cumplir el agua para uso y consumo humano en México, han establecido una

concentración de 0.01 mg/L de arsénico como límite máximo permisible para agua potable (WHO, 2017; Secretaría de Salud, 2022). Además, la NOM-001-SEMARNAT-2021, que establece los parámetros para la calidad del agua en bienes nacionales en México, establece como límite máximo permisible una concentración de 0.03 mg/L de arsénico (SEMARNAT, 2022).

Se estima que aproximadamente 70 millones de personas alrededor del mundo están expuestas a concentraciones de arsénico en agua mayores a las indicadas como límite máximo permisible (James et al., 2016). En México, se estima que al menos 1.5 millones de personas están consumiendo agua con concentraciones de arsénico superiores al límite máximo permisible (Alarcon-Herrera et al., 2020). Por lo anterior, es de vital importancia encontrar y desarrollar estrategias que permitan remover el arsénico del agua, con las que se evitarían o mitigarían los efectos adversos que el arsénico puede causar en los organismos vivos y el ambiente.

1.2 Ciclo biogeoquímico del arsénico

Los ciclos biogeoquímicos de los elementos presentes en la naturaleza están interconectados a través de distintas reacciones redox y otras biotransformaciones. En especial, el ciclo del arsénico está interconectado con los ciclos del hierro, carbono, nitrógeno y azufre, primordialmente (Zhu et al., 2017). Estudiar conjuntamente estos ciclos puede ayudar a comprender la problemática de la presencia de arsénico en agua y ofrecer una solución viable para su remediación o mitigación.

El ciclo biogeoquímico del arsénico involucra una serie de procesos fisicoquímicos como la óxido-reducción, precipitación, solubilización y procesos de adsorción-desorción, así como procesos biológicos en los cuales los microorganismos juegan un papel clave (Lièvremon et al., 2009). Una representación gráfica sencilla del ciclo biogeoquímico del arsénico se presenta en la Figura 1.3.

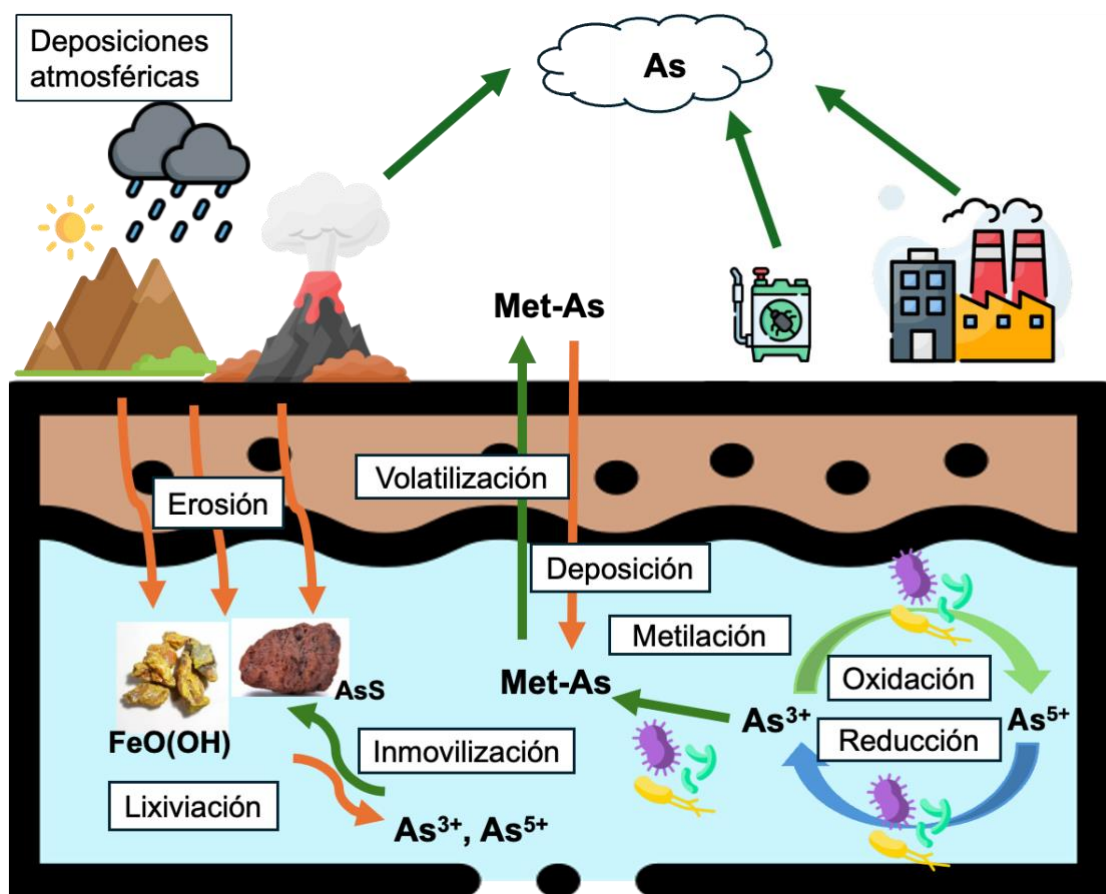


Figura 1.3. Representación gráfica del ciclo biogeoquímico del arsénico.

El arseniato, predominante en ambientes oxidantes, puede ser fuertemente adsorbido por óxidos de hierro a valores de pH entre 5 y 9; sin embargo, la eficiencia de adsorción depende de las concentraciones de óxidos de hierro y de arseniato presentes en el ambiente (Plant et al., 2014). Esta adsorción ocurre mediante un complejo de esfera interna entre el arseniato y la superficie del óxido de hierro y logra que el arseniato sea inmovilizado, lo cual funciona como un método de mitigación de la contaminación por arsénico (Gorny et al., 2015; Vera-Espíndola et al., 2024). A medida que el pH del ambiente incrementa, el arseniato predomina como oxianión (HAsO_4^{2-}), y la superficie de los hidróxidos de hierro también se vuelve negativa, dando como resultado una disminución en la eficiencia de los hidróxidos de hierro para adsorber arseniato. Adicionalmente, si existen iones fosfato en el medio, éstos compiten con el arseniato por los sitios de adsorción

(Shinoda et al., 2023). Ejemplos de los minerales en los cuales es posible que se lleve a cabo la adsorción de arsénico son: ferrhidrita ($(\text{FeOH})_3$), goetita ($\alpha\text{-FeO}(\text{OH})$) y magnetita (Fe_2O_4) (Smedley & Kinniburgh, 2002).

Por otra parte, la inmovilización de arsénico en ambientes reductores, en donde la mayor parte del arsénico se encuentra en forma de arsenito, también se puede lograr en sitios que son ricos en azufre formando sulfuros de arsénico. Alternativamente, si ya existen sulfuros de hierro formados, el arsenito puede coprecipitar con estos. La mayor parte del arsénico en minerales se encuentra como arsenopirita (FeAsS), además se pueden encontrar otros sulfuros de arsénico como oropimente (As_2S_3) y realgar (As_2S_2). La oxidación de estos minerales de sulfuros de arsénico ocurre naturalmente al cambiar de condiciones reductoras a oxidantes; sin embargo, si existe actividad minera en el sitio, este proceso se acelera (Plant et al., 2014).

En ambientes con sedimentos en donde las condiciones ambientales cambian mucho, el arsénico presente en los sedimentos puede ser liberado al agua nuevamente, afectando la calidad del agua. En estos sistemas, la mayoría de los procesos complejos de movilización-inmovilización de arsénico ocurren dentro de la interfase agua-sedimento (Zhang et al., 2017). Los procesos de adsorción-desorción son los que más contribuyen a dicha movilización y es la disolución del arsénico, que forma parte de algunos minerales, lo que provoca la contaminación del agua con arsénico en ciertas zonas (Plant et al., 2014). La disolución de arsénico desde la roca madre ocurre mayormente en zonas áridas ya que, en temporada de sequía, el arsénico presente en fases minerales tiene una menor capacidad de solubilizarse en el agua y es transportado hacia acuíferos subterráneos donde se acumula. Al iniciar las lluvias, las inundaciones alteran el balance entre los sedimentos y el agua, lo que lleva a la lixiviación del arsénico acumulado. Además, al tratarse de zonas áridas, la recarga de los acuíferos es limitada, por lo que una vez que el arsénico ha sido movilizado al agua subterránea, ocurrirá un aumento en su concentración (Zhang et al., 2017).

Algunos microorganismos destacan por su capacidad de transformar las formas inorgánicas del arsénico mediante la reducción u oxidación del arsénico. La reducción consiste en la transformación de arseniato (As^{5+}) a arsenito (As^{3+}), este proceso incrementa la movilización de arsénico. Si se considera que el pH típico del agua subterránea es entre 6 y 9, el arseniato se encuentra en forma aniónica, con carga negativa lo que facilita su adsorción, p. ej. en óxidos de hierro. En cambio, el arsenito es una especie neutra, por lo que tiene menor capacidad de ser adsorbido en la superficie de los óxidos de hierro (Gorny et al., 2015).

El proceso de reducción se puede llevar a cabo como un método de desintoxicación o para la obtención de energía mediante respiración cuando se encuentra presente un donador de electrones y arseniato como aceptor final de electrones (Hassan et al., 2015). Cabe destacar que solo algunos géneros bacterianos son capaces de respirar arsénico, mientras que la mayoría de los seres vivos cuentan con mecanismos para su desintoxicación. En el proceso inverso, la oxidación de arsenito consiste en la transformación de arsenito (As^{3+}) a arseniato (As^{5+}), la llevan a cabo bacterias heterótrofas o quimioautótrofas, donde el arsenito sirve como donador de electrones para reducir oxígeno o nitrato. En bacterias quimioautótrofas, la energía que se produce se usa para la fijación de CO_2 , proporcionando el carbono requerido para el crecimiento bacteriano (Lièvremon et al., 2009).

Un ejemplo de cómo ocurre la contaminación por arsénico debido a las condiciones ambientales cambiantes es Bangladesh, que incluso, es considerado como el mayor problema de contaminación por arsénico en el mundo. Se ha propuesto, gracias a años de investigación, que la contaminación por arsénico en agua subterránea en Bangladesh ocurre principalmente por tres mecanismos: 1) Las arsenopiritas en sedimentos son oxidadas, y por lo tanto, el arsénico es liberado a la corriente acuosa; 2) Los metabolismos microbianos basados en la degradación de la materia orgánica presente en los sitios, conducen a la formación de condiciones anóxicas, lo que lleva a la reducción de oxihidróxidos de hierro, que al ser reducidos, el arsénico adsorbido en ellos es liberado al agua subterránea; 3) Los aniones de

arsénico (arseniato) que se encuentran adsorbidos en los minerales pueden ser desplazados si existe mucho fosfato en el medio, debido a la similitud entre las moléculas. El fosfato puede provenir del uso excesivo y desmedido de fertilizantes para agricultura (Ahmad et al., 2020).

Otro ejemplo son los sitios de donde se recuperaron los inóculos para la presente investigación. Dichos sitios, denominados Cerrito Blanco (CB) y Club de Tiro (CT), se ubican en Matehuala, San Luis Potosí. Las muestras originales de donde se recuperaron los consorcios arseniato-reductores fueron sedimentos superficiales de estos sitios. Cabe destacar que ambos sitios son pobres en hierro y ricos en calcio debido a la naturaleza kárstica del sitio (Martínez-Villegas et al., 2023). La composición mineral de los sedimentos consiste principalmente de yeso ($\text{Ca}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), calcita (CaCO_3) y cuarzo (SiO_2), además, los sedimentos son ricos en sulfato. Se ha postulado que la principal fuente de arsénico en la zona proviene de la precipitación/disolución de arseniatos de calcio. Aunque estos sitios se encuentran cerca de una zona minera, se ha corroborado que la contaminación por arsénico no proviene de las actividades mineras sino de fuentes naturales de minerales que contienen arsénico (Martínez-Villegas et al., 2013; Razo et al., 2004; Rios-Valenciana et al., 2017). Se ha documentado que los sedimentos, de algunas pozas de los sitios, presentan concentraciones de arsénico entre 238 y 2263 mg de As/kg, mientras que el arsénico soluble alcanza concentraciones de hasta 48.3 mg/L en la columna de agua (Rios-Valenciana et al., 2017), dicha concentración es unas 4800 veces mayor que el límite máximo permisible establecido para agua para consumo humano según la NOM-127-SSA1-2021 por lo que representa un riesgo significativo. (Rios-Valenciana et al., 2017).

1.3 Microbiología del arsénico

Los microorganismos son capaces de estabilizar metales pesados o metaloides a través de reacciones enzimáticas, ya sea para evitar su efecto tóxico (desintoxicación) o para obtener energía (respiración), como ocurre con el arsénico (Gorny et al., 2015). Las comunidades autótrofas y heterótrofas juegan un papel

clave en el ciclo biogeoquímico del arsénico, los microorganismos pueden acelerar la movilidad del arsénico mediante procesos de oxidación y reducción bióticos hasta siete órdenes de magnitud comparados con los procesos abióticos (Barral-Fraga et al., 2020). En este marco surge la pregunta: ¿cómo un microorganismo es capaz de usar y transformar el arsénico? lo más probable es que esto date de muchos años atrás, cuando apenas surgía la vida en la Tierra. Hace aproximadamente 3.5 mil millones de años, los océanos presentes en la Tierra tenían temperaturas mayores a las existentes actualmente (entre 40 °C y 70 °C), con un pH que oscilaba entre 4.8 y 6.5 (menor al existente actualmente, de 8.2) y la atmósfera carecía de oxígeno, por lo que las actividades metabólicas de los microorganismos primitivos se realizaban anaerobiamente. Con estas condiciones fisicoquímicas, es de suponer que el arsénico estaba presente mayoritariamente como arsenito (As^{3+}). Se cree que estas condiciones ambientales prevalecieron en la Tierra durante al menos otros mil millones de años, por lo que los microorganismos existentes desarrollaron enzimas las cuales les permitieron evitar la toxicidad causada por el arsenito e incluso usarlo dentro de su metabolismo para obtener energía. Sin embargo, llegó un momento en que todo el arsenito fue oxidado a arseniato. Esto pudo haber llevado a los microorganismos a evolucionar y desarrollar enzimas especializadas que les permitieran reciclar el arseniato reduciéndolo nuevamente a arsenito, con lo que se logró la formación de un ciclo microbiano del arsénico (Zhu et al., 2014). Actualmente, podemos encontrar microorganismos capaces de prosperar en sitios contaminados con altas concentraciones de arsénico; por sus características, dichos ambientes resultan hostiles para el ser humano pero no para los microorganismos que allí se desarrollan.

Existen diversos mecanismos mediante los cuales las bacterias pueden enfrentar los efectos adversos del arsénico, donde destacan los procesos de oxidación, reducción, biosorción, metilación y volatilización. Estos mecanismos influirán en la transformación, movilización y biorremediación de arsénico, por lo tanto, tendrán un papel importante en la disponibilidad de arsénico para los microorganismos en sedimentos y en el agua (Gorny et al., 2015). Algunos microorganismos son

capaces de evitar la toxicidad causada por el arsénico mediante la arseniato-reducción enzimática y la oxidación de arsenito. En principio, todos los seres vivos poseen mecanismos enzimáticos para evitar la toxicidad del arsénico y otros metales o metaloides, incluyendo organismos procariotas y eucariotas (Zhang et al., 2022). Sin embargo, son sólo algunos procariotas, los que además de evitar la toxicidad por arsénico, también pueden obtener energía para su metabolismo al oxidar arsenito o reducir arseniato (Barral-Fraga et al., 2020).

Cabe destacar que los genes involucrados en el ciclo biogeoquímico del arsénico se encuentran ampliamente distribuidos y no son específicos de una especie o filo, esta distribución se atribuye al hecho de que estos genes tuvieron un origen antiguo, así como a la transferencia horizontal de genes (Zhuang et al., 2023). Incluso, se han reportado bacterias que poseen la información genética para poder realizar todos los procesos de reducción y oxidación de arsénico, dependiendo de las condiciones. Por lo tanto, los microorganismos del ciclo del arsénico son capaces de adaptarse a distintas condiciones. Es importante estudiar el escenario global en donde se llevan a cabo los procesos de óxido-reducción del arsénico de manera biótica, así como dilucidar qué comunidades microbianas son capaces de realizarlos (Andres & Bertin, 2016).

Los procesos microbianos mediante los cuales las bacterias toleran la toxicidad del arsénico u obtienen energía al usar arsénico como donador (oxidación) o como aceptor de electrones (reducción) se detallan en las siguientes secciones.

1.3.1 Producción de exopolisacáridos (EPS)

La formación de exopolisacáridos permite que las bacterias puedan contrarrestar la toxicidad que causa el arsénico, mediante una capa gruesa de exopolisacáridos las bacterias evitan que el arsénico pueda entrar a la célula. Los EPS están compuestos por compuestos orgánicos como carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos. Sin embargo, la composición de EPS dependerá del metal al cual se enfrente la bacteria. Ejemplos de bacterias que han demostrado llevar a cabo la formación de una capa de EPS al enfrentarse con arsénico son *Herminiimonas arsenicoxydans*,

Shinella kummerowae y *Rhizobium naphtalenivorans*. Estas bacterias aumentaron la producción de EPS entre 133 y 600 % al enfrentarse a concentraciones de hasta 2 mM (150 mg/L) de arsénico (Sevak & Pushkar, 2024).

1.3.2 Bioacumulación de arsénico

Cuando las concentraciones de arsénico son muy elevadas fuera de la célula, este es transportado al interior del citoplasma a través de la membrana celular, ya sea por difusión pasiva o a través de los transportadores de fosfato (Raturi et al., 2023). Posteriormente, el arsénico es secuestrado intracelularmente a través de metalotioneínas, las cuales se unen a metales y forman un complejo con el arsénico. El mecanismo de bioacumulación es un proceso que requiere de energía; por lo tanto, para que se lleve a cabo la bioacumulación es necesario que exista un ambiente rico en materia orgánica (Fashola et al., 2016). Entre las bacterias que tienen la capacidad de bioacumular grandes cantidades de arsénico están *Exiguobacterium* y *Pseudomonas*, las cuales se ha reportado que pueden acumular hasta 19 mg As/g de biomasa en 24 horas (Pandey & Keshavkant, 2019). Es común encontrar bacterias que bioacumulan arsénico en las raíces de plantas creando una relación simbiótica, ya que las bacterias permiten que las plantas puedan crecer en ambientes contaminados con arsénico (Kabiraj et al., 2022).

1.3.3 Biosorción de arsénico

La biosorción de arsénico incluye mecanismos de adsorción, complejación de superficie y reacciones de intercambio iónico con los grupos funcionales presentes en la superficie celular. Muchas especies bacterianas han sido reportadas con la capacidad de biosorber arsénico, dentro de estas se encuentra *Pseudomonas aeruginosa*, la cual fue aislada de agua subterránea en Pakistán y pudo disminuir la concentración de arsénico de 10,000 a 208 ppb (Fashola et al., 2016; Sevak & Pushkar, 2023). Ciertos factores influyen en la velocidad con la que ocurre la biosorción, como, por ejemplo, el pH y la temperatura. Respecto a la temperatura, cuando esta incrementa, la biosorción de arseniato disminuye. Además, en

ambientes con pH mayor a 7.0, la biosorción de arsénico es menor cuando el pH incrementa (Sevak & Pushkar, 2023).

1.3.4 Metilación y desmetilación de arsénico

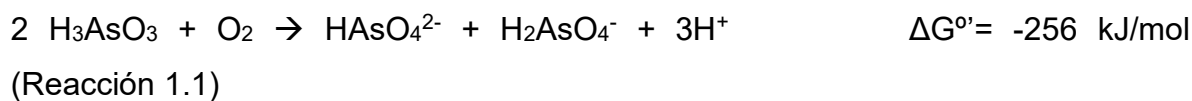
Las bacterias tienen la capacidad de convertir arsénico orgánico a arsénico inorgánico mediante procesos de metilación. La metilación de arsénico resulta en la formación de metilarsenito [MAs(III)], arsenoazúcares, arsenobetaína, arsenotricina. Estas formas orgánicas de arsénico son más estables y difíciles de romper que los enlaces iónicos encontrados en el arsénico inorgánico. El arseniato puede ser metilado a especies orgánicas que son menos tóxicas como monometilarseniato (MMA^{5+}) y dimetilarseniato (DMA^{5+}), sin embargo, la metilación de arsenito no necesariamente es un proceso de desintoxicación ya que se pueden generar especies como el monometilarsenito (MMA^{3+}) o el dimetilarsenito (DMA^{3+}) que resultan incluso más tóxicas que la especie inorgánica de arsenito. La desmetilación de metilarsénicos, consiste en la remoción de un metilo (CH_3) de la molécula, aunque se conoce que este proceso puede ser llevado a cabo por las comunidades microbianas, no se conocen los microorganismos específicos que son capaces de realizarlo (Andres & Bertin, 2016).

La metilación y desmetilación de arsénico es llevada a cabo por los productos de los genes *arsM* y *arsI*, los cuales codifican para una arsenito metiltransferasa y una C-As liasa, respectivamente. Estas enzimas son responsables de los tres sucesivos pasos de reducción y metilación oxidativa comenzando a partir de arsenito (As^{3+}) (Crognale et al., 2017). Cabe aclarar que la formación de arsénicos orgánicos no juega un rol primordial en el ciclo del arsénico ya que es probable que mediante este proceso se generen compuestos más tóxicos que las formas no metiladas (Drewniak & Sklodowska, 2013a). Es común encontrar este mecanismo de desintoxicación de arsénico en células procariotas y eucariotas, a diferencia de la oxidación y reducción, que son exclusivos de las procariotas.

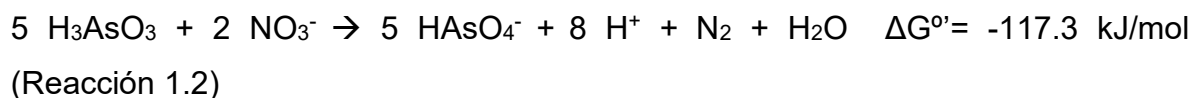
1.3.5 Oxidación de arsénico

La oxidación de arsénico puede ocurrir tanto en ambientes aerobios como anóxicos por medio de las bacterias oxidantes de arsenito (AOB, por sus siglas en inglés) y se lleva a cabo mediante dos rutas metabólicas. En la primera ruta, las bacterias heterótrofas realizan la oxidación de arsenito como un mecanismo de desintoxicación en presencia de materia orgánica, ya que el arsenito no funge como donador de electrones. Este mecanismo de desintoxicación se realiza en la membrana externa de la célula por medio de una enzima periplásmica que oxida el arsenito a arseniato. Ejemplos de géneros bacterianos con mecanismos para la desintoxicación de arsenito son *Desulfovibrio*, *Acidovorax* y *Bacillus* (Chen & Costa, 2021; Oremland & Stolz, 2003). En la segunda ruta, cuando no hay materia orgánica presente, algunas bacterias quimiolitautótrofas pueden usar arsenito como donador de electrones para su metabolismo energético y oxidarlo a arseniato mediante la enzima arsenito oxidasa. La oxidación de arsenito mediante la reducción de oxígeno (O₂) provee la energía requerida para la fijación de CO₂ en condiciones aerobias, tal como se muestra en el ΔG° de la Reacción 1.1. En condiciones anóxicas, la oxidación de arsenito puede suceder ya sea con nitrato (NO₃⁻) (Reacción 1.2), clorato (ClO₃⁻) o hierro (Fe³⁺) como aceptores de electrones (Sonthiphand et al., 2021). Algunos ejemplos de géneros bacterianos capaces de llevar a cabo la oxidación de arsenito como parte de su metabolismo energético son *Rhizobium*, *Ectothiorhodospira* y *Thiobacillus* (Oremland & Stolz, 2003; Xu et al., 2021).

Reacción de oxidación de arsenito con oxígeno (Lugtu et al., 2009):



Reacción de oxidación de arsenito con nitrato (Sun et al., 2008):



La enzima arsenito oxidasa es la encargada de realizar la oxidación de arsenito cuando se trata de la desintoxicación o de usar el arsenito como donador de electrones para el proceso de obtención de energía. Esta enzima es codificada por el gen *aio* y cuenta con dos subunidades heterólogas, AioA y AioB (Escudero et al., 2013). Una representación gráfica de la oxidación de arsenito se muestra en la Figura 1.4. Las subunidades AioA y AioB han sido estudiadas desde su descubrimiento, hace aproximadamente 30 años y se sugiere que es una enzima de origen muy antiguo, incluso antes de que ocurriera la divergencia entre arqueas y bacterias, es por esta antigüedad evolutiva que esta enzima se encuentra ampliamente distribuida entre los procariotes (Lebrun et al., 2003).

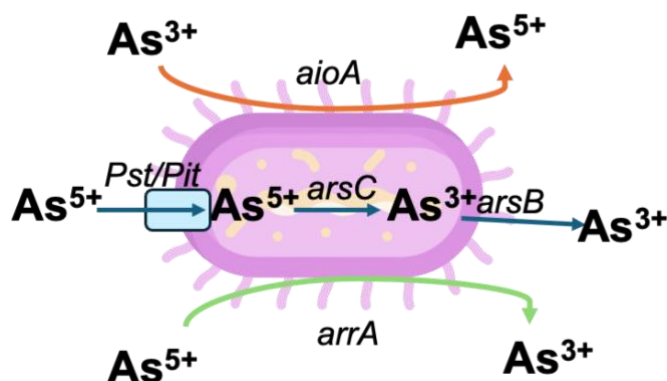


Figura 1.4. Representación gráfica de los genes (*aioA*, *arsC*, *arrA*) y especies involucradas en la oxidación y reducción de especies de arsénico (As^{5+} , As^{3+}) mediada por bacterias. Pst/Pit representan los canales de fosfato.

Asimismo, se ha postulado que el gen *aioA* es usado por las bacterias tanto en condiciones aerobias como anóxicas. Sin embargo, recientemente se descubrió que la enzima Arx también realiza la oxidación de arsenito cuando éste se usa como donador de electrones en un proceso respiratorio. Hoefft et al. (2007) sugieren que la secuencia de aminoácidos de la enzima Arx, que cuenta con dos subunidades

(ArxA y ArxB), está fuertemente relacionada con la enzima arseniato reductasa respiratoria (codificada por el gen *arrA*), la cual realiza la reducción no asimilativa de arseniato. Incluso, mediante un estudio *in vitro* se encontró que la enzima Arx no sólo lleva a cabo la oxidación de arsenito sino también la reducción de arseniato. Se ha observado que esta enzima actúa como una arseniato oxidasa alternativa durante la respiración anaerobia de nitrato y de selenato (Andres & Bertin, 2016; Sonthiphand et al., 2021; Zhu et al., 2014).

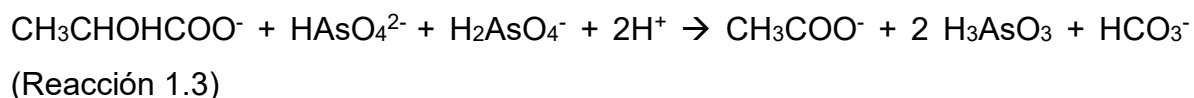
1.3.6 Reducción de arsénico

El arseniato (AsO_4^{3-}) es tóxico para los seres vivos debido a su homología con el fosfato (PO_4^{3-}), gracias a lo cual es capaz de irrumpir los canales de fosfato e inhibir la fosforilación oxidativa. Sin embargo, para lidiar y contrarrestar la potencial toxicidad, las células han desarrollado distintos mecanismos. Una vez que el arseniato (As^{5+}) se encuentra dentro de la célula, las bacterias son capaces de reducirlo a arsenito (As^{3+}) por medio de la enzima arseniato reductasa codificada por el gen *arsC*. La reducción enzimática del arseniato ocurre dentro del citoplasma de las células y el arsenito es excretado fuera de la célula a través de una bomba de eflujo (*arsB*), tal y como se ilustra en la Figura 1.4 (Danczak et al., 2019). Esta reducción corresponde a un mecanismo de desintoxicación, ya que la célula no obtiene energía al reducir el arsénico y es un mecanismo que ocurre tanto en células procariotas como en eucariotas.

Sin embargo, cabe destacar que la enzima mediante la cual se lleva a cabo la desintoxicación de arseniato es distinta para células eucariotas y procariotas (Mukopadhyay & Rosen, 2002). En el caso de las eucariotas, existen arseniato reductasas distintas a las de las células procariotas y no se ha encontrado relación evolutiva entre estas enzimas. La enzima *ACR2p* fue la primera arseniato reductasa descubierta en eucariotas y se obtuvo de *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que la enzima ARQ1/HAC1 es una arseniato reductasa que se encontró en *Arabidopsis thaliana* (Zhang et al., 2022).

En las células procariotas, el arseniato ingresa a la célula a través de los canales de fosfato (*Pit* o *Pst*; Fig. 1.4), debido a la homología entre las estructuras del arsénico y fosfato. Una vez dentro del citoplasma, es reducido por el sistema de resistencia al arsénico codificado por el gen *arsC*, posteriormente el arsenito es bombeado hacia afuera de la célula por medio de la proteína transmembranal codificada por el gen *arsB*. Cuando la reducción de arsénico ocurre como mecanismo de desintoxicación no representa ninguna ganancia energética para la célula, al contrario, requiere un gasto de energía (Hassan et al., 2023). Algunos ejemplos de géneros bacterianos capaces de llevar a cabo la desintoxicación de arsénico por reducción enzimática son *Clostridium*, *Desulfovibrio* y *Staphylococcus*, entre muchos otros (Mazumder et al., 2020; Oremland & Stolz, 2003; Zhu et al., 2014).

Por otra parte, sorprendentemente existen bacterias que pueden ganar energía (ATP) de la reducción de arsénico al usarlo como un aceptor de electrones externo para llevar a cabo un proceso respiratorio. Algunas bacterias son capaces de reducir arseniato a arsenito mediante una reacción energéticamente favorable siempre y cuando sea acoplada con la oxidación de materia orgánica (lactato, acetato, etc.) o incluso de un donador de electrones inorgánico como el hidrógeno. De esta forma, las bacterias reductoras de arsénico, usan el arseniato como aceptor final de electrones y materia orgánica como donador de electrones para su metabolismo energético. La energía libre de Gibbs (ΔG^0) para la reacción de reducción de arseniato (aceptor de electrones) y lactato como donador de electrones es de -295 kJ/mol (Reacción 1.3, Newman et al., 1998).



Comúnmente, estas bacterias se pueden encontrar en sitios contaminados con arsénico y han sido aisladas de sedimentos, ventanas hidrotermales y sitios mineros

(Oremland & Stolz, 2003). El estudio de este tipo de bacterias ha permitido conocer la gran variedad de donadores de electrones que pueden usar, como hidrógeno, acetato, lactato, piruvato, fumarato, por lo que resultan una alternativa viable para ser utilizadas en procesos biotecnológicos con fines de biorremediación. Algunos ejemplos de los géneros a los que pertenecen las bacterias arseniato-reductoras son: *Clostridium*, *Bacillus*, *Sulfospirillum*, *Desulfomicrobium*, entre otras (Hassan et al., 2023; Oremland & Stolz, 2003).

La reducción del arseniato la cataliza la enzima arseniato reductasa respiratoria codificada por el gen *arrA* que forma parte del operón *arrAB*. Este proceso ocurre en la membrana citoplasmática, en este caso el arseniato no ingresa a la célula, ya que es el aceptor final de electrones (Barral-Fraga et al., 2020; Hassan et al., 2023). El gen funcional *arrA* se utiliza como un marcador fiable de la respiración de arseniato y mediante su identificación se ha logrado caracterizar la diversidad de microorganismos que se pueden encontrar en sitios con altas concentraciones de arsénico (Zhu et al., 2014). Dentro de los géneros que se han identificado que contienen el gen *arrA* en su metabolismo se incluyen *Shewanella*, *Sulfospirillum*, *Geobacter*, *Desulfitobacterium*, *Bacillus*, entre otros (Andres & Bertin, 2016a)

A diferencia de las enzimas que oxidan arsénico y los genes que las codifican, los genes que codifican las enzimas para la reducción de arsénico han sido más estudiados. Por esta razón se conoce la existencia de dos tipos de enzimas reductoras de arsénico en células procariotas, una para llevar a cabo la desintoxicación (codificada por el gen *arsC*) y otra para llevar a cabo la respiración de arseniato (codificada por el gen *arrA*). Además, existen bacterias que cuentan con la maquinaria genética para realizar los dos procesos (desintoxicación y respiración). El mecanismo mediante el cual se lleve a cabo la reducción del arseniato dependerá de las condiciones ambientales, como por ejemplo la presencia o ausencia de oxígeno, ya que para llevar a cabo la respiración de arsénico es necesario que existan condiciones anaerobias (Hassan et al., 2015).

A priori, puede predecirse fácilmente qué tipo de metabolismo bacteriano relacionado con el arsénico predominará según el ambiente. Si se trata de un ambiente rico en arsenito y aerobio, muy probablemente los microorganismos predominantes serán quimiolitótrofos oxidadores de arsenito. En contraste, si en el ambiente abunda el arseniato, y no hay presencia de oxígeno, los microorganismos que podrían predominar son los procariotas que respiran arsénico. La versatilidad metabólica de las bacterias que transforman el arsénico les permite contar con distintos mecanismos para combatir la toxicidad del arsénico y sobrevivir incluso en condiciones en donde no se esperaría encontrarlas (Castro-Severyn et al., 2021). Al tener distintos sistemas de operones, las bacterias pueden sintetizar enzimas para metabolizar el arsénico dependiendo de las especies en las que se encuentre en el ambiente que las rodea (Zhu et al., 2017). Sin embargo, aún es necesaria una investigación más exhaustiva para conocer y entender los mecanismos de regulación que conducen a la activación o represión de estos operones (Bhardwaj, 2022).

1.4 Tecnologías para la remediación de la contaminación por arsénico

Existen métodos fisicoquímicos efectivos para la remoción de arsénico de aguas contaminadas, por ejemplo, oxidación química, precipitación, adsorción, intercambio iónico, ósmosis inversa, coagulación y precipitación (Vera-Espíndola et al., 2024). Estos métodos presentan ventajas tales como simplicidad, requerimiento de solo algunos agentes químicos, bajos costos de operación y la posibilidad de tratar grandes volúmenes de aguas contaminadas (Vera-Espíndola et al., 2024). Sin embargo, mediante los tratamientos fisicoquímicos se generan grandes cantidades de desechos, los cuales resultan inestables, por lo que el arsénico presente en esos residuos tiene alta posibilidad de liberarse y movilizarse nuevamente. Para evitar la movilización de arsénico y sus efectos contaminantes se requiere realizar la disposición de los residuos generados en vertederos de residuos peligrosos, lo que se traduce en costos elevados (Vera-Espíndola et al., 2024). Alternativamente, se pueden aprovechar los procesos biológicos que se basan en las reacciones óxido-reducción catalizadas por las bacterias descritas en la sección 1.3. Dado que el

destino final del arsénico depende de su oxidación o reducción y de las condiciones a las que estos procesos ocurren es posible aprovechar los procesos biológicos para la remediación de arsénico, ya sea al formar distintos minerales con arsénico (procesos reductivos) o para su adsorción en otras fases minerales como óxidos de hierro (procesos oxidativos). En cualquiera de los dos casos, el arsénico quedaría inmovilizado en un sólido y podría retirarse de la corriente acuosa (Bruneel et al., 2017).

Por ejemplo, en sitios con ambiente reductor, donde predomina el azufre y casi no hay hierro, el uso de bacterias sulfato-reductoras resulta una opción viable para la inmovilización del arsénico, lo que se logra mediante la formación de minerales, principalmente oropimente (As_2S_3) y rejalgar (As_4S_4), los cuales son fases sólidas que eventualmente precipitan (Smedley & Kinniburgh, 2002). Para que la reducción de sulfato y arseniato ocurra se requiere de un donador de electrones, el cual puede ser orgánico (p. ej. lactato) o inorgánico (p. ej. hidrógeno). Los factores ambientales impactarán fuertemente la formación del mineral, a pH bajo (2.5 a 5.0), la biomineralización de sulfuros de arsénico como oropimente y rejalgar será favorecida, mientras que en valores de pH mayores a 6.0 se promoverá la formación de tioarsenatos, los cuales son moderadamente solubles cuando el pH es mayor a 6.0 (Vera-Espindola et al., 2024). Aunque mediante la formación de fases minerales de sulfuro se logra inmovilizar arsénico, los precipitados de sulfuros de arsénico son susceptibles de solubilizarse de nuevo, si éstos no se mantienen bajo condiciones reductoras o cuando el pH cambia. La solubilización puede ocurrir ya sea de forma abiótica o biótica, e incluso mediante una combinación de ambas (Drewniak & Sklodowska, 2013). El pH resulta ser el factor más relevante para que la oxidación de los precipitados ocurra de forma abiótica. Sin embargo, para que se lleve a cabo la oxidación abiótica de los sulfuros de arsénico se requerirían millones de años (Smedley & Kinniburgh, 2002). Como se mencionó anteriormente, las bacterias pueden acelerar los procesos mediante los cuales se moviliza el arsénico. Se ha demostrado que para lograr la oxidación de arsénico es necesario que se propicien las condiciones adecuadas para que suceda. Una de esas condiciones, es que en

el medio debe existir un aceptor de electrones para que el arsenito, que forma parte de los sulfuros de arsénico o biominerales, pueda ser usado como donador de electrones. Adicionalmente, los aceptores de electrones que se encuentran frecuentemente en ambientes contaminados con arsénico son el oxígeno y el nitrato, mismos que pueden ser usados por las bacterias oxidadoras de arsenito. En la Figura 1.5. se muestra cómo es que ocurren la formación y disolución de sulfuros de arsénico.

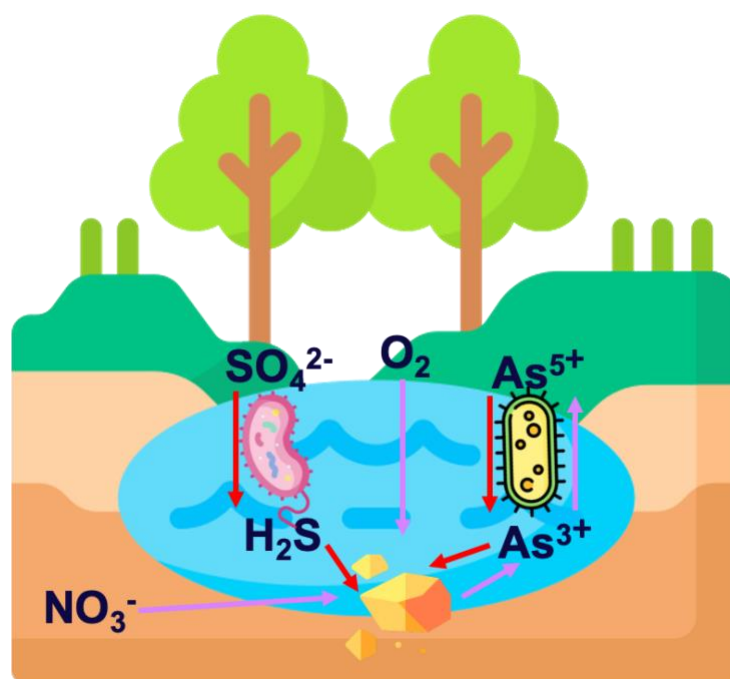


Figura 1.5. Formación y disolución de precipitados de sulfuros de arsénico. La formación se indica por medio de las flechas rojas, mientras que la disolución con las flechas moradas.

Lo anterior apunta a la importancia y necesidad de investigar si el proceso de oxidación de sulfuros de arsénico podría llevarse a cabo una vez que los sulfuros de arsénico se han formado y estos se someten a condiciones aerobias o si es necesario que el arsénico se encuentre de forma soluble.

Es importante destacar que los biominerales de sulfuro de arsénico son susceptibles de ser oxidados por la acción de bacterias sulfuro-oxidantes, ya sea en presencia

de oxígeno o nitrato como aceptores de electrones. La oxidación del sulfuro puede ser incompleta hasta azufre elemental (S^0) o completa hasta sulfato (SO_4^{2-}) (Cardoso et al., 2006). En las reacciones 1.4 a 1.7 se presentan las potenciales reacciones de oxidación de sulfuro. Se observa que la oxidación de sulfuro a sulfato (Reacción 1.5) es más favorable ($\Delta G^{0'} = -709$ kJ/mol) que la oxidación de arsenito con oxígeno o nitrato (Reacciones 1.1 y 1.2; $\Delta G^{0'} = -256$ ó -117 kJ/mol, respectivamente). Por lo anterior, es muy probable que al someter bioprecipitados de sulfuro de arsénico a condiciones oxidantes primero ocurra la oxidación del sulfuro, provocando la disolución de arsenito y finalmente ocurra la oxidación del arsenito disuelto.

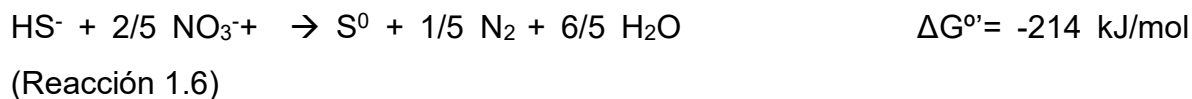
Reacción de oxidación de sulfuro a azufre elemental con oxígeno (Sánchez Andrea et al., 2014):



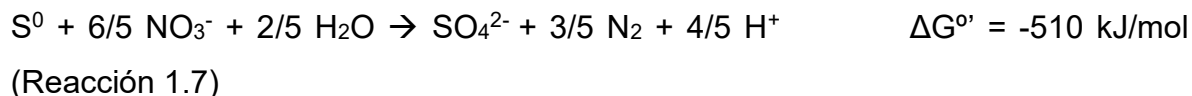
Reacción de oxidación de sulfuro a sulfato con oxígeno (Sánchez Andrea et al., 2014):



Reacción de oxidación de sulfuro a azufre elemental con nitrato (Sánchez Andrea et al., 2014):



Reacción de oxidación de azufre elemental a sulfato con nitrato (Sánchez Andrea et al., 2014):



2. Justificación

La contaminación por arsénico representa un problema global, sobre todo en zonas áridas en donde las fuentes de agua son limitadas y por lo tanto se requiere recurrir a fuentes subterráneas para satisfacer los requerimientos del recurso hídrico. Dependiendo de la geología del sitio que se trate, el agua que se obtiene de acuíferos subterráneos podría contener altas concentraciones de arsénico con el consecuente riesgo para la salud que eso representa. Un caso emblemático en México, de la presencia de altas concentraciones de arsénico, se encuentra en la región de Villa de la Paz en Matehuala, S.L.P. Aunque los pobladores de la región no usan el agua subterránea del sistema de pozos y canales que allí existe, se ha documentado que el agua se usa eventualmente para riego o para el ganado (Martínez-Villegas et al., 2013; Razo et al., 2004).

Por otro lado, en el grupo de trabajo, se ha documentado que los sedimentos recuperados de ese sistema de pozos pueden contener hasta 2263 mg/kg de sedimento y el arsénico disuelto en agua puede alcanzar concentraciones de hasta 48.3 mg/L (Rios-Valenciana et al., 2017). También existe evidencia de que los consorcios microbianos cultivados y seleccionados a partir de sedimentos de esos sitios, son capaces de formar sulfuros de arsénico y precipitar hasta 100 % de arsénico de la fase acuosa y por lo tanto inmovilizarlo en fases minerales como oropimente y rejalgá (Rios-Valenciana & Celis, 2025). Dichos consorcios tienen la capacidad de llevar a cabo la formación de precipitados de sulfuros de arsénico precisamente porque contienen microorganismos que realizan sulfato-reducción y arseniato-reducción, ya han sido cultivados bajo las condiciones que promueven su capacidad arseniato y sulfato reductora, usando arseniato y sulfato como aceptores de electrones y lactato como donador de electrones (Rios-Valenciana et al., 2023). Hasta ahora dichos precipitados de sulfuro de arsénico se han mantenido estables bajo condiciones reductoras.

Sin embargo, para considerar el uso de este tipo de consorcios que promuevan la formación de sulfuros de arsénico como un método de biorremediación exitoso, es

necesario investigar qué ocurre con los sulfuros de arsénico cuando las condiciones reductoras cambian y hay oxígeno o nitrato en el medio. Cabe destacar que, aunque los consorcios se han cultivado y propagado bajo condiciones anaerobias por seis años, existe la posibilidad de que en los consorcios se encuentren microorganismos aerobios facultativos que, al encontrar condiciones oxidantes (presencia de oxígeno) o anóxicas (presencia de nitrato), se desarrollen favorablemente. Por otro lado, los estudios previos para caracterizar la diversidad de los consorcios indicaron que los microorganismos prevalecen en los precipitados de sulfuro de arsénico (Rios-Valenciana & Celis, 2025). Por lo tanto, si dichos precipitados encuentran condiciones favorables para su oxidación, se corre el riesgo de que el arsénico sufra procesos de redisolución.

El propósito de este trabajo es conocer la versatilidad metabólica de las bacterias presentes en un consorcio primordialmente arseniato- y sulfato-reductor. Además, para el diseño efectivo de biotecnologías de remediación, resulta crucial confirmar que una vez que se logra la formación de los sulfuros de arsénico, estos biominerales sean estables y no tengan la posibilidad de disolverse nuevamente debido a procesos quimiolitótrofos de oxidación microbiana.

3. Hipótesis

Dado que en las comunidades recuperadas de sitios contaminados con arsénico se han encontrado bacterias capaces de reducirlo y oxidarlo, es posible que el arsenito, proveniente de la reducción de arseniato y que forma parte de sulfuros de arsénico, sufra una oxidación, ya sea bajo condiciones oxidantes (con oxígeno) o anóxicas (con nitrato) como aceptores de electrones. De tal forma que el arsénico podría movilizarse nuevamente hacia la fase acuosa.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Conocer si en la comunidad microbiana enriquecida con bacterias sulfato y arseniato reductoras existen bacterias capaces de llevar a cabo la oxidación de arsenito contenido en sulfuros de arsénico, ya sea de forma aerobia (con O_2) o anóxica (con NO_3^-), para descartar la posible disolución del arsénico y su movilización bajo condiciones oxidantes.

4.2 Objetivos específicos

- Realizar experimentos exploratorios de reducción y oxidación de arsénico con los dos consorcios disponibles en el grupo de trabajo (CB y CT) para seleccionar el consorcio que muestre potencial de llevar a cabo ambos procesos.
- Realizar experimentos cinéticos con el consorcio seleccionado para determinar su capacidad de reducir arseniato y oxidar arsenito (ya sea soluble o contenido en sulfuros de arsénico) en condiciones óxicas (con O_2) y anóxicas (con NO_3^-).
- Analizar la diversidad taxonómica del consorcio mediante la amplificación del gen 16S ARNr tanto en condiciones reductoras como oxidantes para identificar los cambios en la estructura de la comunidad microbiana al existir distintas condiciones ambientales.
- Detectar la presencia de genes funcionales involucrados en la oxidación y reducción de arsénico (*arrA*, *arsC*, *aioA*) para corroborar si el consorcio microbiano usó arsénico como donador o aceptor de electrones en condiciones reductoras y oxidantes.

5. Materiales y métodos

5.1 Fuente de microorganismos

Para los experimentos, se usaron dos consorcios provenientes de sitios contaminados con arsénico. El consorcio denominado CT fue recuperado de un manantial que se ubica en un Club de tiro llamado “Los Halcones” y el consorcio CB fue recuperado de una poza en Cerrito Blanco. Ambos sitios se encuentran en el distrito minero de Santa María de la Paz, Matehuala, S.L.P. Ambos consorcios han sido desarrollados y mantenidos bajo condiciones arseniato- y sulfato-reductoras (Rios-Valenciana et al., 2017, 2023; Rios-Valenciana & Celis, 2025)

5.2 Medio de cultivo basal

El medio de cultivo que se usó para llevar a cabo todos los experimentos fue un medio mineral basal que es representativo de agua subterránea (Burton et al., 2013). El medio contenía lo siguiente: 0.08 mM de KH_2PO_4 , 1 mM de NH_4Cl , 1 mM de KCl , 1 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 1 mM de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.5 mg/L de resazurina como indicador redox y 20 $\mu\text{L/L}$ de solución mineral de Wolfe concentrada que contiene minerales traza. La solución mineral de Wolfe se compone de: 3 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.5 g/L de ácido nitriloacético, 0.1 de NaCl , 0.5 g/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/L de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/L de CaCl_2 , 0.1 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/L de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/L de H_3BO_3 , 0.01 g/L de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$. El medio basal se complementó con la concentración correspondiente de sustrato o donador de electrones (lactato) y de aceptor o aceptores de electrones (arsénico y sulfato).

5.3 Mantenimiento y propagación del consorcio

Los consorcios microbianos utilizados en los experimentos fueron tomado a partir de cultivos madre denominados CT y CB, provenientes de los sitios descritos en la sección 5.1 que habían sido cultivados con 10 mM de arseniato, 10 mM de sulfato y 10 mM de lactato. Los cultivos fueron mantenidos mediante transferencias periódicas en medio fresco. Al inicio, los consorcios CT y CB se transfirieron a dos

botellas de medio fresco suplementadas con 10 mM de arseniato, 10 mM de lactato y 10 mM de sulfato, siendo un total de 4 botellas.

Una de las botellas de cada consorcio sirvió para la propagación del cultivo para ser usado como inóculo de los experimentos, mientras que la otra se usó exclusivamente para su mantenimiento.

El mantenimiento de los consorcios se hizo por medio de transferencias que se hicieron cada 15 a 20 días, con el objetivo de preservar la viabilidad y la actividad metabólica de los mismos a lo largo de los experimentos.

5.4 Evaluación de la actividad de los consorcios

Se realizaron experimentos exploratorios para evaluar con cuál de los dos consorcios con los que se cuenta en el grupo de trabajo (CT y CB) se obtenía un mejor desempeño de reducción y oxidación de arsénico con oxígeno y nitrato como aceptores de electrones. Para ello se evaluaron las cinéticas correspondientes, primeramente se evaluó la actividad reductora de arseniato y al concluir se evaluó la actividad de oxidación de arsenito. La Figura 5.1 presenta un diagrama de estos experimentos exploratorios.

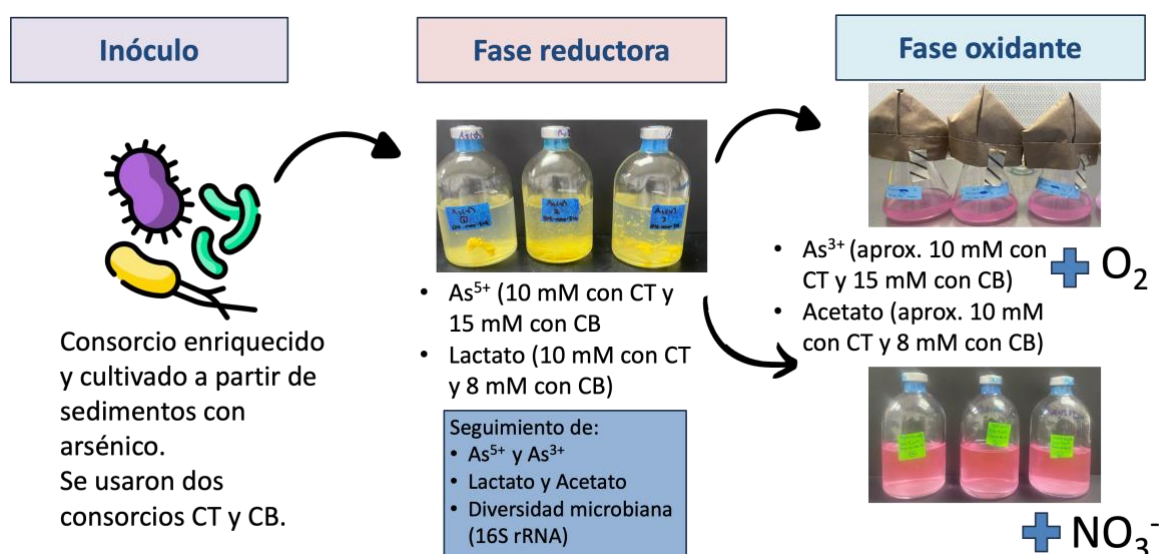


Figura 5.1. Representación gráfica de los experimentos exploratorios con ambos consorcios (CB y CT).

Primeramente, se usaron 12 botellas serológicas para realizar la etapa de reducción. Cada botella contenía 90 mL de medio mineral basal suplementado con la concentración correspondiente de arseniato y de lactato, dependiendo del consorcio. El consorcio CT se alimentó con medio suplementado con 10 mM de arseniato y 10 mM de lactato, mientras que el medio del consorcio CB contenía 15 mM de arseniato y 8 mM de lactato. La diferencia se debe exclusivamente a que los experimentos de reducción de arsénico con el consorcio CB fueron realizados previamente por otro miembro del grupo de trabajo; en los resultados solo se reproducen las gráficas generadas con fines comparativos. Cabe destacar que, en esta etapa exploratoria, el interés se enfocó en la oxidación de arsenito más que en la reducción de arseniato. En estudios previos del grupo de trabajo, se ha documentado que ambos consorcios son capaces de realizar arseniato reducción satisfactoriamente si se alimentan con las mismas concentraciones de arseniato y lactato (Rios-Valenciana, et al., 2023). Los aceptores y donadores de electrones fueron suplementados a partir de soluciones stock concentradas, siendo en el caso de arseniato un stock 100 mM de arseniato de sodio, para el lactato como donador de electrones se usó lactato de sodio 1 M. Las botellas se taparon con tapones de butilo y anillos de aluminio, la atmósfera se intercambió con argón, para mantener condiciones anaerobias. El pH se ajustó a 6.5. A continuación, las botellas se esterilizaron a 121 °C durante 20 minutos. Posteriormente, las botellas fueron inoculadas con 10 mL del consorcio correspondiente (10% v/v) previamente propagado (Sección 5.3) en la campana de flujo laminar para mantener las condiciones de esterilidad. Seis botellas se inocularon con el consorcio CT y dos con el consorcio CB. El proceso de reducción de arseniato se monitoreó tomando muestras (2 mL) cada dos días en tubos Eppendorf para evaluar el consumo de arseniato y lactato y la producción de acetato.

Una vez que concluyó la etapa de reducción, se inició la etapa de oxidación. Dado que ya se contaba con el donador de electrones (arsenito) producto de la reducción en el medio de cultivo, sólo se adicionó el aceptor de electrones correspondiente. Para evaluar la oxidación de arsenito con oxígeno como aceptor de electrones, el

contenido de tres de las seis botellas serológicas en el caso del consorcio CT y una en el caso del consorcio CB, fue transferido en su totalidad a matraces Erlenmeyer de 150 mL, estériles y con tapones de algodón para mantener condiciones aerobias. Este proceso se llevó a cabo en la campana de flujo laminar. Los matraces fueron incubados a 30 °C y 170 rpm de agitación.

Para los ensayos de oxidación de arsenito con nitrato, las otras tres botellas serológicas en el caso del consorcio CT, y una de las botellas en el caso del consorcio CB, que fueron usadas para la reducción se mantuvieron en condiciones anaerobias y con el tapón de butilo, y solamente se les agregaron 15 mL de una solución stock de nitrato (350 mM de KNO_3) para obtener una concentración final de 10 mM de NO_3^- como aceptor de electrones (Fig. 5.1). Las botellas se incubaron a 30°C y sin agitación. Con este procedimiento, los experimentos realizados con el consorcio CT se evaluaron por triplicado. En contraste, en los experimentos realizados con el consorcio CB sólo se usó una botella por condición porque no se contaba con la suficiente biomasa al momento de realizar el ensayo exploratorio.

Para dar seguimiento a la oxidación de arsenito, se tomaron muestras (2 mL) de los matraces o de las botellas serológicas periódicamente (cada dos días). Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm, fueron filtradas con membranas (0.22 μm) y se almacenaron en congelación (-20°C) para evitar interferencias en las cuantificaciones. Posteriormente, se cuantificó el consumo de acetato, la producción de arseniato y en su caso el consumo de nitrato. En la Tabla 5.1 se presenta un resumen de los aceptores y donadores de electrones empleados en cada uno de los experimentos exploratorios. Cabe aclarar que tanto el acetato como el arsenito en la etapa de oxidación, son productos de la etapa de reducción. El acetato es un producto de la oxidación parcial del lactato.

Tabla 5.1. Resumen del tipo de donador y aceptor de electrones usados en cada uno de los experimentos exploratorios para evaluar la oxidación de arsenito a partir de consorcios arseniato y sulfato-reductores.

Experimento	Lactato	*Acetato	As ⁺⁵	*As ³⁺	NO ₃ ⁻
Reducción de arseniato	✓	—	✓	—	—
Oxidación de arsenito con O ₂	—	✓	—	✓	—
Oxidación de arsenito con NO ₃ ⁻	—	✓	—	✓	✓

*Tanto el acetato como el arsenito, no fueron suplementados al medio sino que provenían de la etapa anterior de reducción de arseniato.

5.4 Evaluación de cinéticas de reducción y oxidación con arsénico soluble y precipitados de sulfuros de arsénico

Una vez que se identificó que el consorcio CB tenía la capacidad de reducir y oxidar arsénico, se llevaron a cabo los experimentos para cuantificar esa capacidad usando oxígeno o nitrato como aceptores finales de electrones. Además, se exploró la posibilidad de que las bacterias que oxidan arsenito fueran capaces de tomarlo a partir de minerales de sulfuro de arsénico.

5.4.1 Evaluación de la capacidad de reducción de arseniato (As⁵⁺) y oxidación de arsenito (As³⁺)

Cada experimento consistió en dos etapas, en la primera etapa se llevó a cabo el proceso de arseniato reducción en botellas serológicas bajo condiciones anaerobias y en la segunda etapa, el medio líquido que resultó de la etapa de reducción se sometió a condiciones aerobias con oxígeno o anóxicas con nitrato como aceptor de electrones.

En un primer set de experimentos, se llevó a cabo la reducción de arseniato en nueve botellas serológicas de 200 mL de capacidad y con 150 mL de medio mineral basal suplementado con 10 mM de lactato, 10 mM de arseniato y pH inicial de 6.5. Las botellas se taparon con tapones de butilo y anillos de aluminio, la atmósfera se intercambió con argón. El medio se esterilizó como se describió anteriormente

(Sección 5.4) antes de inocular 15 mL del consorcio CB (propagado como en la sección 5.3) en cada una de las botellas. Las botellas se incubaron a 30°C por 15 días, cuando se observó que todo el As^{5+} se había reducido a As^{3+} . Para dar seguimiento a la reducción de As^{5+} cada 2 días se tomaron 2 mL de muestra de las botellas en la campana de flujo laminar. A partir de la muestra se cuantificó la concentración de arseniato, arsenito, lactato, acetato, arsénico total y pH.

Una vez que concluyó la etapa de reducción, se inició la etapa de oxidación de arsenito. Para esto, el contenido de 4 botellas serológicas (aproximadamente 90 mL c/u) se transfirió a matraces Erlenmeyer de 150 mL de capacidad, estériles y con tapones de algodón. Este paso se realizó en la campana de flujo laminar. Los matraces Erlenmeyer se incubaron a 30°C en agitación (170 rpm) para mantener condiciones aerobias. De tal forma que, en estos ensayos, el aceptor de electrones fue O_2 y el arsenito (producto de la etapa de reducción) fue el donador. Cabe recordar, que en el medio también se encontraba acetato presente como producto de la oxidación parcial de lactato de la etapa de reducción. Se tomaron muestras de los matraces periódicamente (cada 2 días) para cuantificar el consumo de acetato y la producción de As^{5+} .

Al resto de las botellas serológicas (cuatro), se les añadieron 15 mL de una solución stock de KNO_3 (350 mM). De esta forma, se inició la oxidación de arsenito en condiciones anóxicas usando nitrato como aceptor final de electrones a una concentración inicial de 10 mM. Dado que muchas bacterias desnitrificantes pueden usar acetato como donador de electrones, en estos ensayos se puso particular atención a las concentraciones de acetato y nitrato. Una vez identificado que todo el acetato se consumió, se procedió a suplementar con nitrato adicional (15 mM) para que estuviera disponible como aceptor de electrones para la oxidación de arsenito. La biomasa se cuantificó al final de la etapa de reducción y durante la etapa de oxidación. Tres de las nueve botellas no fueron muestreadas, una de estas botellas se usó para extraer ADN al final de la etapa de reducción. Las otras dos botellas se sometieron a condiciones aerobias, una con O_2 y otra con NO_3^- , al

término de la etapa de reducción y fueron usadas para extraer ADN al final de la etapa de oxidación.

5.4.2 Evaluación de la capacidad de usar arsenito como donador de electrones a partir de sulfuros minerales de arsénico

Se evaluó la capacidad de los microorganismos del consorcio CB para oxidar arsenito a partir de precipitados de sulfuros de arsénico. En este caso, se usaron precipitados de sulfuros de arsénico sintetizados biológicamente en experimentos previamente realizados por otros integrantes del grupo de trabajo. Los biominerales se obtuvieron de ensayos en lote con arseniato (10 mM), sulfato (10 mM) y lactato (10 mM) inoculados con el consorcio CB y que se formaron al menos dos meses atrás. Para recuperar los precipitados se usó una jeringa de 50 mL y se homogeneizaron en una sola botella serológica. Posteriormente, a partir de esta botella, se administraron 40 mL de precipitado a cada una de las botellas o matraces de los experimentos.

Para evaluar la oxidación de arsénico con nitrato como aceptor final de electrones, en 8 botellas serológicas de 200 mL se colocaron 150 mL de medio mineral basal, suplementado con 10 mM de nitrato, la atmósfera de las botellas se intercambió por argón, se ajustó el pH a 7.0 con HCl 1 M y se esterilizaron como se describió anteriormente (Sección 5.4). Posteriormente, a todas las botellas se les agregaron 40 mL de los sulfuros de arsénico recuperados y sólo 4 botellas se inocularon con 15 mL del consorcio CB. De esta forma, en este set de experimentos se contaba con 4 botellas para seguir el metabolismo endógeno (sin inocular), 3 botellas para evaluar por triplicado la oxidación de sulfuros de arsénico con nitrato y una botella destinada a la extracción de ADN al final del experimento. Todas las botellas se incubaron a 30°C sin agitación. Cada 2 días se cuantificó la concentración de arsenito, arseniato, arsénico total, nitrato, acetato (remanente de la etapa de reducción) y pH.

La oxidación de los sulfuros de arsénico con oxígeno se realizó en 8 matraces Erlenmeyer de 250 mL con tapones de algodón, que contenían 160 mL de medio mineral basal y 40 mL de sulfuros de arsénico. El pH del medio se ajustó a 7.0 con ácido clorhídrico 1.0 M. Los matraces y su contenido se esterilizaron antes de su uso. Se inocularon 4 matraces con 15 mL del consorcio CB, mientras que otros 4 matraces sin inocular sirvieron como experimentos endógenos. Los matraces se incubaron a 30°C y 170 rpm de agitación, para mantener el suministro constante de oxígeno. Se tomaron muestras (3 mL) inicialmente cada 2 días y posteriormente cada semana para dar seguimiento a la oxidación de arsenito. A uno de los matraces no se le tomó muestra, sino hasta el final del experimento (~ 50 días) y sirvió para realizar la extracción de ADN.

5.5 Análisis fisicoquímicos

El pH se cuantificó al final de los ensayos exploratorios (Secc. 5.4) y de forma regular en los experimentos con el consorcio CB. La densidad óptica a 600 nm se determinó mediante espectrofotometría en la muestra sin centrifugar en los ensayos de reducción y oxidación realizados con arsénico soluble e inoculados con el consorcio CB. Posteriormente, la muestra fue centrifugada para cuantificar arseniato por la técnica del azul de molibdeno y finalmente fue filtrada (0.22 μm) para la cuantificación de acetato, lactato (ácidos grasos volátiles, AGV) y nitrato por medio de electroforesis capilar. Otra parte de la muestra centrifugada y filtrada se usó para cuantificar el arsénico total mediante absorción atómica. A continuación, se proporcionan brevemente algunos detalles metodológicos.

5.5.1 Cuantificación de nitrato, lactato y acetato por electroforesis capilar

La concentración de nitrato, sulfato, lactato y acetato se cuantificó mediante electroforesis capilar (Agilent 7100) a partir de muestras previamente centrifugadas (10000 rpm, 10 minutos) y filtradas (Milipore, 0.22 μm). Para la separación se usó una columna capilar de silica fundida (Agilent, id= 50 μm , L=80.5 cm, longitud efectiva=72 cm) a una temperatura de 20°C y se aplicó un voltaje de 25 kV. El electrolito de trabajo fue un buffer básico para separar aniones (pH = 12.1). Los

analitos se determinaron por detección indirecta UV mediante un detector de arreglo de diodos, a una longitud de onda de 350 nm con una referencia a 230 nm. La concentración se determinó a partir de las curvas de calibración correspondientes (100 – 800 ppm) usando estándares de alta pureza (>98 %).

5.5.2 Cuantificación de nitrito

Para la cuantificación de nitrito se usó una técnica espectrofotométrica la cual consiste en la formación de un color rojizo-púrpura producido a pH ácido (2.0 - 2.5) al reaccionar la sulfanilamida con N-(1-Naftil) etilendiamina diclorhidrato o NEDA (Eaton et al., 1998). La aplicación del método tiene un intervalo de detección de 10-1000 $\mu\text{g NO}_2\text{-N/L}$. Se preparó una solución estándar de N-NO_2^- de 100 mg/L usando nitrito de sodio, posteriormente se realizaron las diluciones necesarias para tener soluciones patrón o estándar a concentraciones desde 0.1 a 2 mg/L de nitrito. Para la cuantificación se añadieron 10 mL de cada solución estándar a tubos de ensayo de 12 mL de capacidad, 0.2 mL de la solución de sulfanilamida y 0.2 mL de la solución NEDA. Se agitó cuidadosamente en vórtex, ya que la reacción es exotérmica, se dejó enfriar y se cuantificó la absorbancia a 543 nm. El mismo tratamiento se realizó para la muestra problema (Eaton et al., 1998).

5.5.3 Cuantificación de arseniato

Se realizó mediante espectrofotometría. Primero se preparó la curva de calibración de soluciones estándar de arseniato a distintas concentraciones (desde 1 hasta 30 μM) en un volumen final de 5 mL en tubos HACH. Posteriormente se añadieron 10 μL de HCl 6 N por cada mL de estándar o muestra, 500 μL de HCl al 2%. A continuación, se añadieron 500 μL de reactivo de color, el cual se preparó en el momento de su uso a partir de los siguientes reactivos: ácido ascórbico al 10.8%, molibdato de amonio al 3%, antimonil tartrato de potasio al 0.6% y ácido sulfúrico al 13.9% con una relación de 2:2:1:5. El reactivo de color se debe usar antes de que transcurran de 4 a 8 horas de su preparación. Los tubos se dejaron reposar en la obscuridad durante 20 minutos para el desarrollo de color, entre mayor sea la

intensidad de color azul mayor es la concentración de arseniato. Posteriormente, se lee la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 880 nm. Por la similitud que existe entre las moléculas de fosfato y arseniato pueden existir interferencias en presencia de fosfatos, por lo que la concentración de fosfato debe mantenerse por debajo de las concentraciones de arseniato (Johnson & Pilson, 1972).

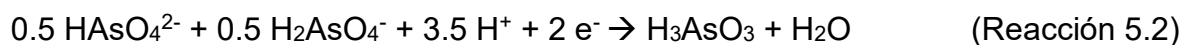
5.5.4 Cuantificación de arsénico total

La concentración de arsénico total se determinó por medio de espectroscopía de absorción atómica de flama (Varian Spectra Mod. AA 240 FS). La configuración utilizada en el equipo fue: longitud de onda de 193.7 nm, anchura de la rendija de 0.5 nm, corriente de lámpara de 10.0 mA, corrección de fondo C. El tipo de llama usada fue aire/acetileno con un flujo de aire de 13.5 L/min y un flujo de acetileno de 2.45 L/min. Para el análisis se usó un volumen de 200 o 400 μL de muestra previamente filtrada mediante un filtro de 0.22 μm y diluida con 4.8 ó 4.6 mL, respectivamente, de HNO_3 al 2%. El arsenito se determinó a partir de la diferencia entre las concentraciones de arsénico total y arseniato para cada una de las muestras.

5.5.5 Balance de electrones

Para realizar los balances de electrones se tomó en cuenta la estequiometría de las reacciones implicadas en el metabolismo del arsénico que son la reducción de arseniato con lactato como donador de electrones y su oxidación parcial a acetato (Reacción 1.3), así como la oxidación de acetato y arsenito con nitrato como aceptor de electrones (Reacción 1.2), según sea el caso. De estas reacciones se analizaron las semi-reacciones y se determinaron los miliequivalentes de electrones (meq e-) que pueden ser donados o aceptados en cada reacción (Rittman & McCarty, 2001).

Para la reducción de arseniato con lactato como donador de electrones se consideran las siguientes semi-reacciones:



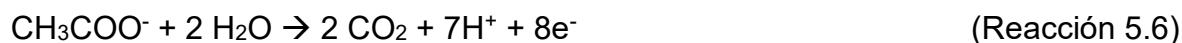
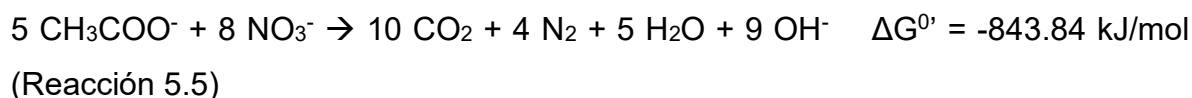
La oxidación incompleta de lactato a acetato dona 4 meq e⁻ (Reacción 5.1), mientras que la reducción de arseniato a arsenito requiere 2 meq e⁻ (Reacción 5.2). Por lo tanto, para reducir 10 mM de arseniato se requieren 5 mM de lactato.

Para la oxidación de arsenito con nitrato (Reacción 1.2) se consideran las semi-reacciones:



Por las semi-reacciones anteriores se sabe que, para oxidar 10 mM de arsenito, se requieren 4 mM de nitrato.

Para la oxidación de acetato con nitrato (Reacción 5.5) se consideran las semi-reacciones 5.6 y 5.7



Con las ecuaciones anteriores se pueden estimar cuántos electrones se donan o se aceptan por cada mol de los diversos aceptores y donadores de electrones implicados en el metabolismo del arsénico. Posteriormente, se suman los meq e⁻ donados y los meq e⁻ aceptados y se obtiene la fracción de meq e⁻ aceptados/meq

e⁻ donados, un valor de 1.0 de esta fracción indica que todos los electrones donados fueron recuperados.

5.6 Extracción de ADN y amplificación del gen 16S ARNr

Se realizó la extracción de ADN del inóculo y de la biomasa recuperada al final de los experimentos en condiciones reductoras y oxidantes. Para ello, al término de la cinética se centrifugaron 150 mL de cada una de las botellas reservadas para este fin y el pellet fue recolectado en tubos Eppendorf. La extracción de ADN se realizó con el kit ZYMO siguiendo las instrucciones del fabricante. Al finalizar la extracción, la concentración de ADN fue cuantificada con el equipo Nanodrop. Una vez corroborada la concentración del ADN y su calidad, se llevó a cabo la amplificación del gen 16S ARNr por medio de una PCR a punto final, usando primers universales para bacteria 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTCAGACTT-3'). Las concentraciones finales de los reactivos en la mezcla para la PCR (25 µL) fueron: Buffer 1X, MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 0.2 mM, primer 27F 0.25 mM, primer 1492R 0.25 µM y Taq polimerasa 0.05 U/µL. Además, se adicionaron 2 µL de DNA molde en dilución 1:10. El programa de PCR se detalla en el Anexo 2. La calidad de los productos de PCR se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa (1%, 80 V, 40 min), teñido con bromuro de etidio y observado en un fotodocumentador. Una vez que se comprobó la calidad de los productos de PCR, se enviaron muestras de ADN para secuenciación masiva (MiSeq) a un laboratorio externo (ZymoBIOMICS Targeted Sequencing Service, Zymo Research, Irvine, CA).

5.7 Identificación de genes funcionales involucrados en las transformaciones biológicas de arsénico (*aioA*, *arrA*, *arsC*)

Se determinó si en los consorcios existían microorganismos con los genes de oxidación de arsenito (*aioA*), reducción de arseniato por desintoxicación (*arsC*) y reducción de arseniato por respiración (*arrA*). Para ello, se realizó una PCR a punto final en la que se utilizaron los primers universales que se muestran en la Tabla 5.2.

Los amplicones obtenidos se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (1 %, 80 V, 40 min) teñidos con bromuro de etidio y observados en un fotodocumentador para determinar si los genes responsables de cada actividad se encontraban en las muestras correspondientes.

Tabla 5.2. Relación de primers usados para identificar los genes funcionales involucrados en la oxidación y reducción de arsénico.

Gen funcional	Nombre	Secuencia de los primers 5' – 3'	Referencia
<i>aioA</i>	aroA#1F	GTSGGBTGYGGMTAYCABGYCTA	(Inskeep et al., 2007)
	aroA#1R	TTGTASGCBGGNCGRTTTRTGRAT	
<i>arrA</i>	arrA-CVF1	CACAGCGCCATCTGCGCCGA	(Mirza et al., 2017)
	arrA-CVR1	CCGACGAACTCCYTGYTCCA	
<i>arsC</i>	arsC4f	TCHTGYCGHAGYCAAATGGCHGAAG	(Escudero et al., 2013)
	arsC4r	GCNGGATCVTCRAAWCCCCARTG	

*Las condiciones detalladas de los programas de PCR se presentan en el Anexo 1

6. Resultados y discusión

6.1 Selección del inóculo con características reductoras y oxidantes

Para seleccionar el inóculo de trabajo, a partir de experimentos exploratorios, se hizo una evaluación de los dos consorcios con los que se cuenta en el grupo de trabajo (CT y CB), con el objetivo de determinar cuál de los dos podía oxidar el arsenito producido a partir de la actividad arseniato-reductora.

En la Figura 6.1 se muestran las actividades de reducción de arseniato y de oxidación de arsenito, correspondientes al consorcio CT, usando oxígeno y nitrato. La etapa de reducción de arseniato ocurrió a lo largo de 25 días y estuvo asociada a la oxidación de lactato y producción de acetato (Figs. 6.1A y B). La reducción de arseniato ocurrió lentamente en los primeros 7 días, hacia el día 11 se había reducido 80.7 % del arseniato (Fig. 6.1 A). El lactato se oxidó incompletamente a acetato y al día 15 todo el lactato había sido oxidado incompletamente hasta acetato. En la etapa de oxidación con oxígeno como aceptor de electrones (Figs. 6.1C y D), se observó un incremento gradual y constante de la concentración de As^{5+} , que aumentó desde 0.57 mM al inicio del experimento hasta 2.91 mM al día 28 (Fig. 6.1C). El acetato residual (~2 mM) se consumió completamente a los 3 días de iniciadas las cinéticas. En el caso del nitrato como aceptor final de electrones (Figs. 6.1E y F), se observó una fase lag en la concentración de As^{5+} y, al día 14, fue de 3.22 mM (Fig. 6.1E). La Figura 6.1F muestra que el acetato (~2 mM) se consumió por completo hacia el día 3 y que el nitrato no se consumió por completo quedando 6.77 mM al día 14.

Con los resultados anteriores se demostró que el consorcio CT es eficiente (97.8 %) para reducir arseniato. Sin embargo, no resultó tan eficiente para oxidar arsenito usando como aceptores de electrones oxígeno o nitrato, ya que, si se considera que después de la etapa de reducción se encontraban presentes cerca de 8 mM de arsenito, la eficiencia de oxidación fue de ~59% para ambos aceptores de electrones (oxígeno y nitrato).

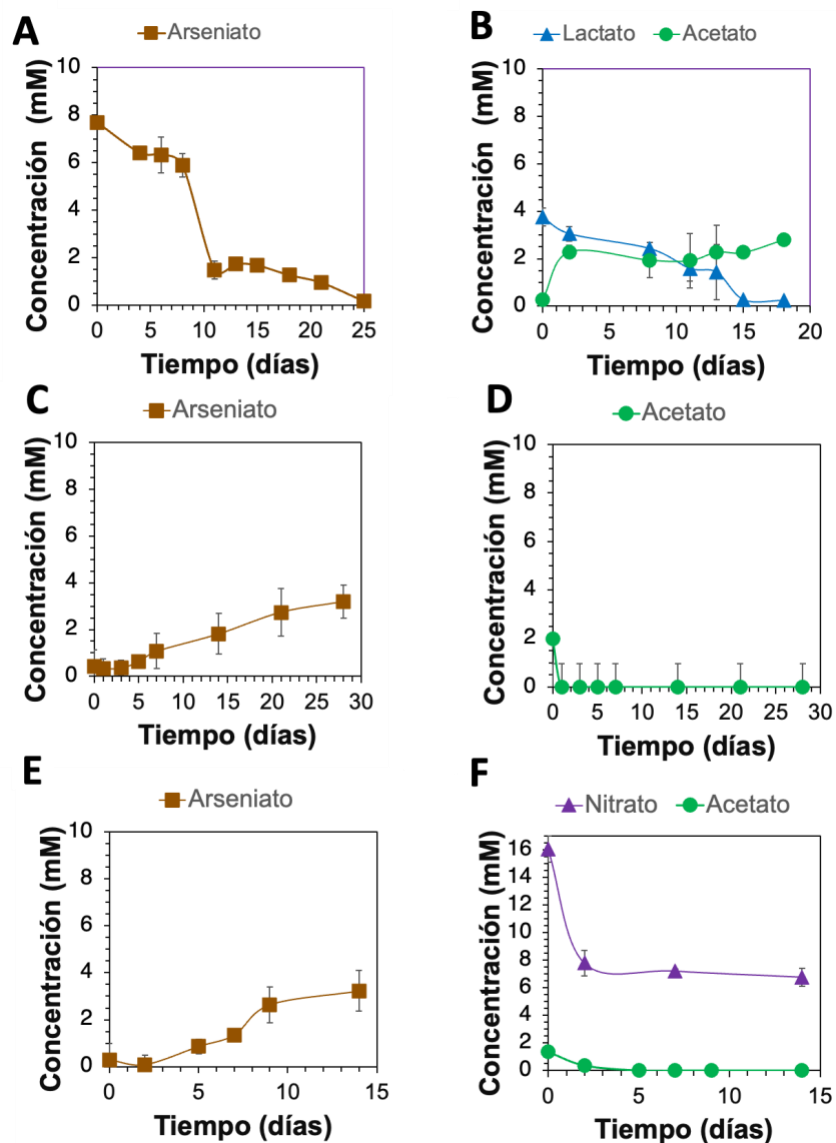


Figura 6.1. Evaluación exploratoria de las cinéticas de reducción y oxidación de arsénico con el consorcio CT. Concentraciones de A) arseniato y B) lactato y acetato en la etapa de reducción. Concentraciones de C) arseniato y D) acetato en la etapa de oxidación con O_2 como aceptor de electrones. Concentraciones de E) arseniato y F) acetato y nitrato, en la etapa de oxidación con NO_3^- como aceptor de electrones.

En cambio, tal como se observa en la Figura 6.2, el consorcio CB resultó muy eficiente tanto para reducir arseniato como para oxidar arsenito usando como aceptores de electrones nitrato u oxígeno. Con este consorcio se logró una

eficiencia de reducción de arseniato de 100 % en 25 días (Fig. 6.2A). Al igual que ocurrió con el consorcio CT, la reducción estuvo acoplada a la oxidación de lactato de forma incompleta, quedando 6.75 mM de acetato en el medio (Fig. 6.2B). En cuanto a la etapa de oxidación, con oxígeno se logró oxidar casi la totalidad del arsenito (13.7 mM) hasta As^{5+} en 28 días (Fig. 6.2C), mientras que con nitrato se logró la oxidación del 100% del arsenito (15 mM) en alrededor de 14 días.

Cabe aclarar que en estos ensayos preliminares tanto para los experimentos realizados con el consorcio CT como para los llevados a cabo con el consorcio CB solo hubo cuantificación de arseniato y no se hizo el seguimiento del arsenito, debido a que estos experimentos sólo serían de utilidad para conocer cuál era el mejor consorcio para llevar a cabo la evaluación de ambas etapas (reducción y oxidación).

A partir de los resultados de estos experimentos exploratorios, se decidió trabajar con el consorcio CB, ya que demostró tener mayor potencial para llevar a cabo la oxidación de arsenito. Cabe destacar que, aunque ambos consorcios han demostrado ser consorcios meramente arseniato reductores en experimentos anteriores (Rios-Valenciana et al., 2017, 2023; Rios-Valenciana & Celis, 2025), la capacidad de oxidar arsenito indica que en ambos consorcios existen bacterias facultativas. Por lo tanto, y a partir de los ensayos exploratorios, es muy probable que en el consorcio CB existan más géneros bacterianos con la capacidad de sobrevivir al pasar de un ambiente completamente anaerobio a uno anóxico o aerobio.

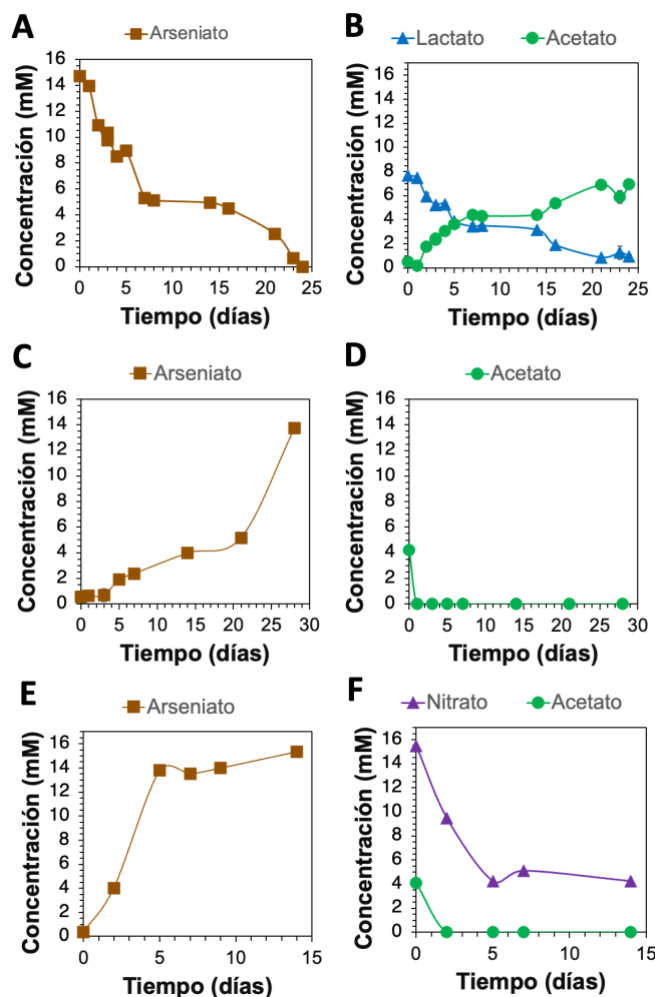


Figura 6.2. Evaluación exploratoria de las cinéticas con el consorcio CB. A) Concentración de arseniato en la etapa de reducción; B) Concentración de lactato y acetato en la etapa de reducción. Concentraciones de C) arseniato y D) acetato en la etapa de oxidación con oxígeno. Concentraciones de E) arseniato y F) nitrato y acetato en la oxidación con nitrato como aceptor de electrones.

6.2 Reducción y oxidación de arsénico con arsénico soluble

Una vez seleccionado el consorcio CB como inóculo, se realizaron nuevamente los experimentos de reducción y oxidación dando un seguimiento más puntual a la concentración de biomasa, arsenito y pH. La etapa de reducción de arseniato ocurrió satisfactoriamente, tal como se esperaba, y resultó un poco más rápida que en los experimentos exploratorios, ya que la totalidad del As^{5+} se consumió en un

periodo de 11 días. La concentración de arsenito fue estequiométrica y alcanzó aproximadamente 11 mM al final de la etapa de reducción (Fig. 6.3A). Además, la oxidación del lactato fue consistente con lo observado anteriormente, ya que al finalizar la etapa de reducción se observó acetato remanente (~2.4 mM), producto de la oxidación incompleta del lactato. Posteriormente, durante la etapa de oxidación del arsenito, el acetato se consumió al inicio de dicha etapa en aproximadamente 4 días (Fig. 6.3D). Primero se oxida el acetato remanente de la fase reductora por la acción de bacterias heterótrofas aerobias que usan oxígeno como aceptor de electrones. Una vez que se consumió la materia orgánica, comenzó la oxidación quimiolitótrofa del arsenito y el consecuente incremento de la concentración de arseniato, hasta oxidar la totalidad del arsenito (~10 mM) al cabo de 15 días (Fig. 6.3C). Ya que los matraces se encontraban en agitación continua y con tapón de algodón estéril, no existió limitación por oxígeno permitiendo que la oxidación de arsenito ocurriera después de agotar el acetato.

Para el análisis de los resultados, se descartó uno de los tres ensayos de la etapa de oxidación con oxígeno, debido a que presentó una discrepancia evidente respecto a los otros dos ensayos. Con estos resultados se confirmó que el consorcio CB2022 tiene capacidad tanto de reducir como de oxidar arsénico a concentraciones elevadas del mismo (10 mM) y que son equivalentes a 750 mg/L de arsénico.

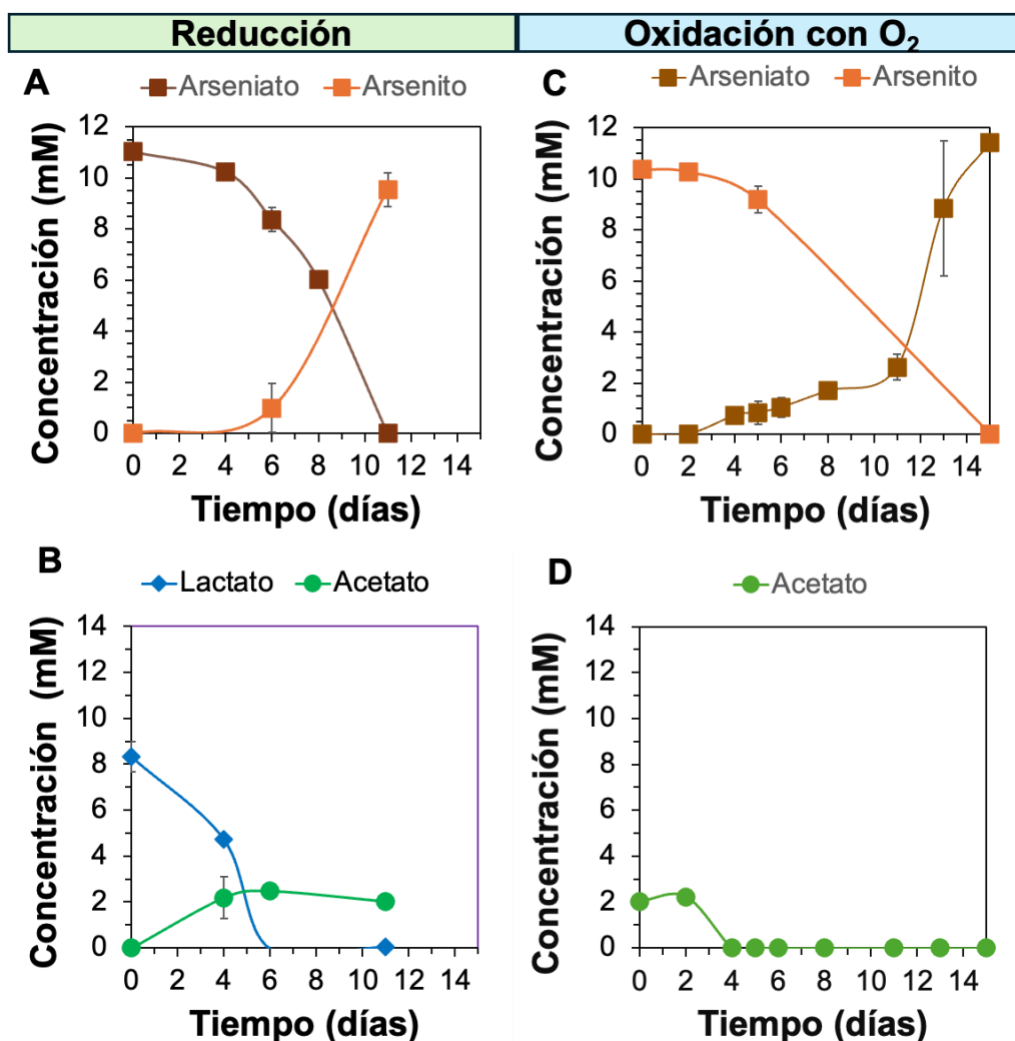


Figura 6.3. Perfiles cinéticos de reducción y oxidación de arsénico con el consorcio CB2022. Etapa de reducción: A) Consumo de arseniato (As^{5+}) y producción de arsenito (As^{3+}) y B) Consumo de lactato y producción de acetato. Etapa de oxidación con oxígeno: C) Consumo de As^{3+} y producción de As^{5+} y D) Consumo de acetato.

En cuanto a los ensayos realizados para cuantificar la oxidación de arsenito con nitrato, podemos decir que la etapa de reducción de arseniato transcurrió como lo esperado y sin mayor problema (Fig. 6.4A), de los 11.21 mM iniciales de arseniato se obtuvieron 9.75 mM de arsenito. En la etapa de oxidación de arsenito con nitrato como aceptor de electrones (Fig. 6.4C) se puede observar que el nitrato primero se usó para llevar a cabo la oxidación de acetato (Fig. 6.4D, día 4). Fue por esta razón,

que en el día 4 se adicionó más NO_3^- (~5 mM) al medio de cultivo y así lograr la oxidación del arsenito mediante la acción de las bacterias quimiolitótrofas. Dichas bacterias usaron el arsenito (9.75 mM inicial) como donador de electrones y lo oxidaron hasta arseniato (10.26 mM final) en alrededor de 10 días.

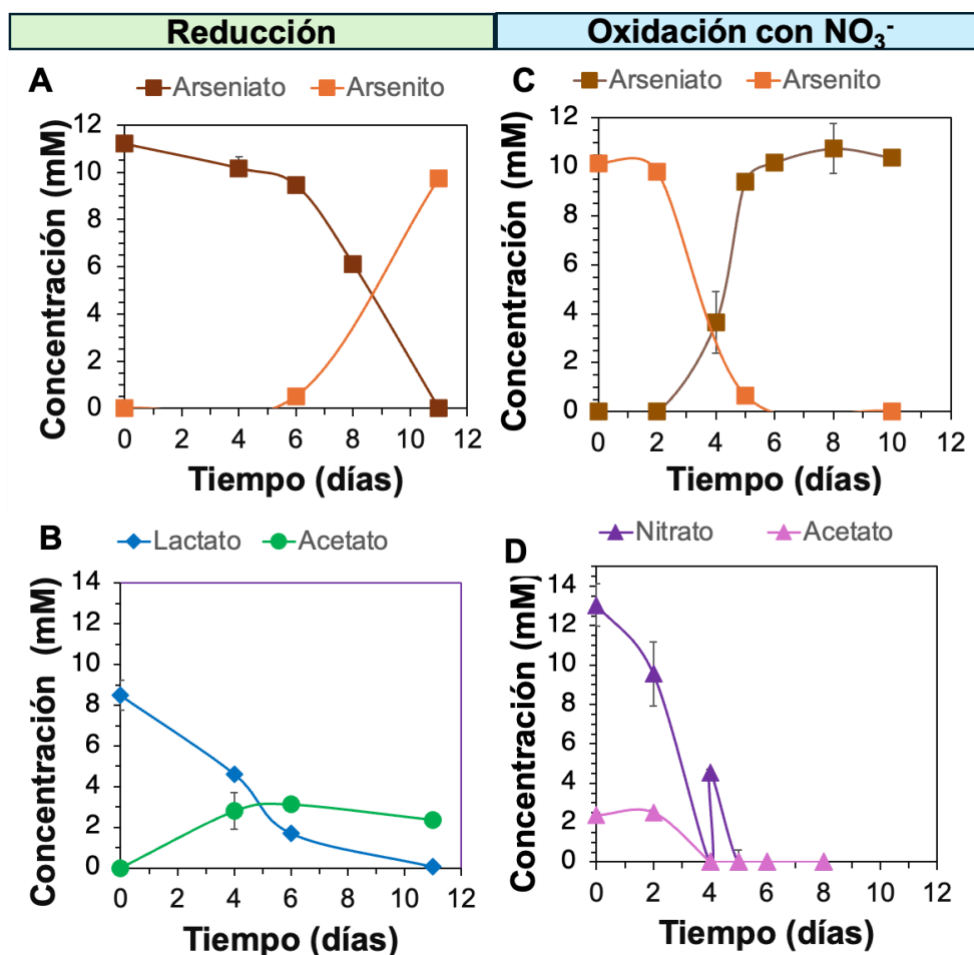


Figura 6.4. Perfiles de reducción y oxidación de arsénico con el consorcio CB y nitrato como agente oxidante. La etapa reductora se inició con 10 mM de arseniato y 8 mM de lactato como donador de electrones. Etapa de reducción: A) Concentraciones de arseniato (As^{5+}) y de arsenito (As^{3+}); B) Consumo de lactato y producción de acetato. Etapa de oxidación: C) Concentraciones de arsenito (As^{3+}) y arseniato (As^{5+}); D) Concentraciones de acetato y nitrato.

En general, se observó que la reducción de arseniato ocurrió estequiométricamente (Reacción 1.1), y se redujeron 10 mM de arseniato en 11 días. Por otra parte, los resultados obtenidos en estos ensayos mostraron que el consorcio CB, que se ha cultivado por un año y medio bajo condiciones anaerobias para reducir arsénico, tiene la capacidad de realizar el proceso inverso. Seguramente, esta capacidad se debe a la presencia de microorganismos anaerobios facultativos y quimiolitótrofos que pueden usar oxígeno u otros aceptores de electrones alternativos, por ejemplo, nitrato. Se sabe que la oxidación de arsenito tiene dos papeles primordiales en el ciclo del arsénico, i) es una estrategia de desintoxicación realizada por microorganismos heterótrofos y ii) es un metabolismo que provee energía a microorganismos quimiolitótrofos (Anand et al., 2022). En este contexto, se ha reportado la presencia de microorganismos capaces de realizar la oxidación de arsenito en ambientes que se consideran principalmente anaerobios, como lo son las aguas subterráneas (Zecchin et al., 2021).

Además, Sun et al. (2008) reportaron la oxidación de arsenito con desnitrificación en sedimentos obtenidos de una planta de tratamiento de aguas residuales y obtuvieron una oxidación completa de 0.5 mM de arsenito en 8 días, sin embargo, observaron que cuando la concentración de arsenito era mayor a 5 mM, el proceso de oxidación se inhibía debido a la toxicidad causada por el arsenito. Afortunadamente, en el presente estudio se logró la oxidación completa del arsenito contenido en el medio sin observar inhibición por las altas concentraciones de arsenito que se alcanzaron (aproximadamente 10 mM).

Tal como se observa en las cinéticas de las etapas de oxidación, resulta notable que, en todos los experimentos, el acetato se oxidó y se agotó en el medio antes que el arsenito al usar ambos aceptores de electrones (oxígeno y nitrato). Una posible explicación, desde el punto de vista termodinámico, es que las bacterias obtienen una mayor cantidad de energía al oxidar acetato en comparación con el arsenito, tal como lo indica la energía libre de Gibbs estándar ($\Delta G^{0'}$). En teoría, la energía libre de Gibbs de la desnitrificación con acetato es de -843.84 kJ/mol de

acetato (Reacción 5.5) (Albina et al., 2021; Beristain-Cardoso et al., 2008), mientras que, para la oxidación de arsenito mediante desnitrificación, el ΔG° es de -117.3 kJ/mol de arsenito (Reacción 1.2) (Oremland & Stolz, 2003). La energía libre para oxidar arsenito con oxígeno resulta mayor que con nitrato ($\Delta G^{\circ} = -256$ kJ/mol de arsenito; Reacción 1.1, Newman et al., 1998; Sun et al., 2008).

Los valores de ΔG° también indican que es más favorable la oxidación de acetato ya sea con nitrato o con oxígeno que la oxidación de arsenito. De tal forma, los resultados son consistentes, puesto que primero ocurrió la oxidación de acetato y posteriormente la oxidación de arsenito. Es importante destacar que los procesos heterotróficos son más favorables que los procesos quimiolitótrofos y si existe materia orgánica, como por ejemplo acetato, las bacterias heterótrofas podrían predominar. Sin embargo, los procesos quimiolitótrofos son primordiales en ambientes oligotróficos, como es el caso de los acuíferos, donde la materia orgánica es limitada.

Además, las velocidades de oxidación de arsenito fueron casi dos veces más rápidas (tal como se discute más adelante, Sección 6.4) al usar nitrato como aceptor final de electrones que al usar oxígeno. Por lo tanto, el consorcio CB logró un mejor desempeño en la oxidación de arsenito con nitrato como aceptor final de electrones que con oxígeno, a pesar de que, según los valores de ΔG° de las reacciones 1.1 y 1.2, resulta más favorable la oxidación de arsenito con oxígeno, lo cual puede estar relacionado con que el consorcio CB se enriqueció y se ha cultivado siempre en condiciones anóxicas.

Respecto al pH inicial y final en los experimentos (Tabla 6.1), se observó que el pH varió en las etapas de reducción y oxidación con oxígeno y con nitrato. En la etapa de reducción, el pH aumentó debido al consumo de protones del medio, como lo indica la Reacción 1.3. Por el contrario, en la etapa de oxidación, ya sea con oxígeno o con nitrato, se produce acidez porque se liberan protones, lo que tiende a disminuir el pH (Reacciones 1.1 y 1.2).

Tabla 6.1. Variación de pH en las etapas de reducción y oxidación de arsénico con el consorcio CB en experimentos con arsénico soluble.

Etapas	pH inicial	pH final
Reducción de arseniato	6.49 ± 0.030	9.39 ± 0.010
Oxidación de arsenito con O ₂	9.37 ± 0.015	7.94 ± 0.084
Oxidación de arsenito con NO ₃ ⁻	9.38 ± 0.010	7.89 ± 0.005

Al inicio de la oxidación, el pH era más bien básico, alrededor de 9.0, y aunque muy probablemente este pH no era el óptimo, el consorcio fue capaz de oxidar el arsenito de manera eficiente. Esta adaptabilidad puede atribuirse al hecho de que un consorcio presenta mayor diversidad y redundancia metabólica que un cultivo puro; es decir, en un consorcio pueden existir bacterias con la misma función metabólica, pero con un pH óptimo de crecimiento distinto. A este respecto, Wang et al. (2017) analizaron cuál era el pH óptimo para llevar a cabo la oxidación de arsenito con un consorcio bacteriano aislado de una planta de tratamiento de aguas residuales, y reportaron que el mejor desempeño se lograba con valores de pH entre 6.0 y 7.0 con oxígeno o nitrato como aceptores finales de electrones. En otro estudio, donde se usaron cepas aisladas de suelo (*Alcaligenes* sp. y *Agrobacterium* sp.) para evaluar el efecto del pH en el desempeño de las bacterias oxidadoras de arsenito, se reportó que el mejor desempeño de *Alcaligenes* sp. se logró con un pH de 9.0. Cabe aclarar que *Alcaligenes* sp. es un microorganismo alcalófilo, que pudo oxidar 120 mg/L de As³⁺ en 12 horas. En cambio, para la cepa de *Agrobacterium* sp. la fluctuación en pH no tuvo una gran influencia en la oxidación de arsenito, aun así, se observó una mejor oxidación a pH 9.0 logrando oxidar alrededor de 40 mg/L de arsenito en 96 horas (Song et al., 2012).

Por otro lado, Battaglia-Brunet et al., (2002) realizaron experimentos de oxidación de arsenito por medio de un consorcio que fue aislado de residuo minero a valores de pH de entre 2.0 a 7.0 y obtuvieron que el mejor desempeño del consorcio fue a pH neutro (entre 5.0 y 7.0). Además, también observaron que existía una disminución en el pH al transcurrir la oxidación de arsenito, debido a la liberación de protones, llegando a tener un pH final de 5.8 al iniciar con un pH de 6.5, mientras que al iniciar la oxidación con pH de 6.0, el pH disminuyó mientras transcurrió la oxidación hasta llegar a un pH de 3.5.

Con lo anteriormente expuesto se puede decir que el pH óptimo dependerá de las bacterias presentes en el consorcio. En el presente estudio, para el consorcio CB, el pH alcalino no fue un factor limitante para que las bacterias pudieran oxidar arsenito, aun cuando el inóculo se caracteriza por ser neutrofílico. Aunque cabe la posibilidad de que el consorcio muestre un mejor desempeño a un pH neutro. Sin embargo, al no ajustar el pH al finalizar la etapa de reducción de arseniato, se mantuvieron las condiciones que se tendrían en un ambiente natural, lo cual era el objetivo del presente estudio.

En la Figura 6.5 se muestra la densidad óptica durante la etapa de oxidación con nitrato y con oxígeno, se observa que la densidad óptica alcanzó 0.02 uAbs, al finalizar la etapa de reducción. Cabe recordar que los experimentos se inocularon con 15 mL del cultivo arseniato-reductor, este valor de absorbancia es consistente con lo que reportó Navarrete-Euán (2023) en experimentos de arseniato reducción y que estuvo entre 0.02 y 0.08 uAbs @ 600 nm. Por el contrario, en un estudio realizado por Macy et al. (2000) se usaron cepas aisladas de *Desulfovibrio* y *Desulfomicrobium*, donde se llegaron a obtener densidades ópticas de hasta 0.2 uAbs @ 600 nm. Sin embargo, *Desulfovibrio* solo logró reducir 3 mM de arseniato de una concentración inicial de 8 mM, mientras que *Desulfitomicrobium* llegó a oxidar 5 mM de los 10 mM iniciales de arseniato que contenían los experimentos. Por lo tanto, aun cuando con cepas aisladas se consigue obtener mayores densidades ópticas que las obtenidas con el consorcio CB, dicho consorcio logró

reducir y oxidar hasta 10 mM de arsénico. Lo anterior sugiere que no necesariamente una mayor cantidad de biomasa se traduce en una mayor capacidad de transformar arsénico. Asimismo, se infiere que la cantidad de biomasa presente en los experimentos no fue un factor limitante de la capacidad del consorcio para reducir arseniato. Probablemente el excelente desempeño del consorcio CB para reducir arseniato radica en que se trata de un consorcio altamente seleccionado y eficiente en la reducción de arseniato.

Al comenzar la etapa de oxidación, la densidad óptica comenzó a aumentar hasta llegar a un máximo de 0.06 para nitrato y 0.1 para oxígeno aproximadamente en el día 6 (Fig. 6.5). Dicho aumento, muy probablemente se debe a que los procesos aerobios o con nitrato como aceptor de electrones otorgan más energía que los procesos con otros aceptores de electrones (p. ej. arseniato). Por lo tanto, las bacterias tienen energía suficiente, no sólo para mantener su metabolismo, sino también para la producción de biomasa. Por ejemplo, Nguyen et al. (2017) realizaron experimentos de oxidación con oxígeno y nitrato con cepas puras aisladas de agua subterránea y suelo recolectadas cerca de una refinería de metales y reportaron densidades ópticas de hasta 0.051 uAbs para la oxidación de 1 mM de arsenito con nitrato, mientras que para la oxidación con oxígeno se obtuvieron densidades ópticas de hasta 0.065 uAbs oxidando 2 mM de arsenito, ambos valores máximos de densidad óptica se obtuvieron al cabo de 1 día de transcurrida la oxidación. Los valores reportados por Nguyen et al. (2017) se encuentran en un orden de magnitud similar a los de este estudio (0.06-0.1 uAbs) obtenidos de experimentos similares en donde se evaluó la oxidación quimioautótrofa tanto con oxígeno como con nitrato. Además, también observaron un decremento después de un valor máximo y una estabilización de la densidad óptica en valores entre 0.045-0.050 uAbs para ambos donadores de electrones (oxígeno y nitrato). Para el presente estudio, dicha estabilización ocurrió entre 0.055 y 0.085 uAbs.

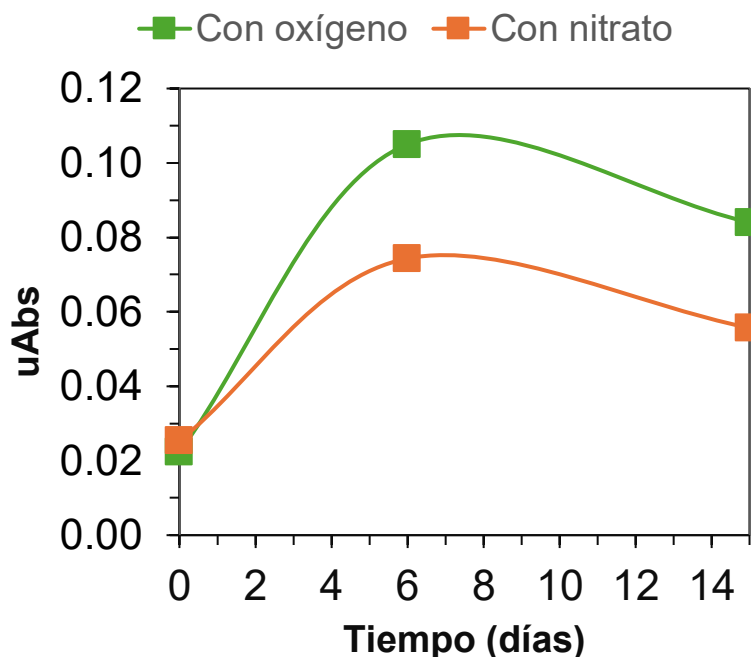


Figura 6.5. Densidad óptica cuantificada a 600 nm durante la etapa de oxidación en los experimentos realizados con arsenito soluble.

6.3 Oxidación de sulfuros de arsénico con el consorcio CB

Una vez que se corroboró que el consorcio CB tenía la capacidad de oxidar arsenito disuelto en la fase acuosa, lo siguiente que se evaluó fue la capacidad del consorcio de metabolizar arsenito a partir de un sulfuro de arsénico (sólido). En la Figura 6.6 se muestran los resultados de la oxidación de arsenito con oxígeno a partir de biominerales sintetizados previamente en ensayos en lote que contenían 10 mM de arseniato y 10 mM de sulfato. Dado que se ha comprobado que los biominerales son una fuente de microorganismos arseniato reductores, e incluso sirven para propagar los cultivos (Rios-Valenciana et al., 2023), fue necesario realizar experimentos de oxidación endógenos (sin inóculo), además de los que se inocularon con el consorcio CB.

En las botellas inoculadas se observa que la concentración de arseniato alcanzó hasta 1.70 mM después de 43 días (Fig. 6.6A), mientras que en el experimento endógeno la concentración de arseniato que se logró oxidar fue de 0.88 mM (Fig. 6.6C), siendo casi el doble en el experimento inoculado. Cabe destacar que, en el experimento endógeno, el arsénico total disuelto prácticamente se correspondió con el arseniato, lo que sugiere que los microorganismos presentes en los biominerales también fueron capaces de oxidar el arsenito.

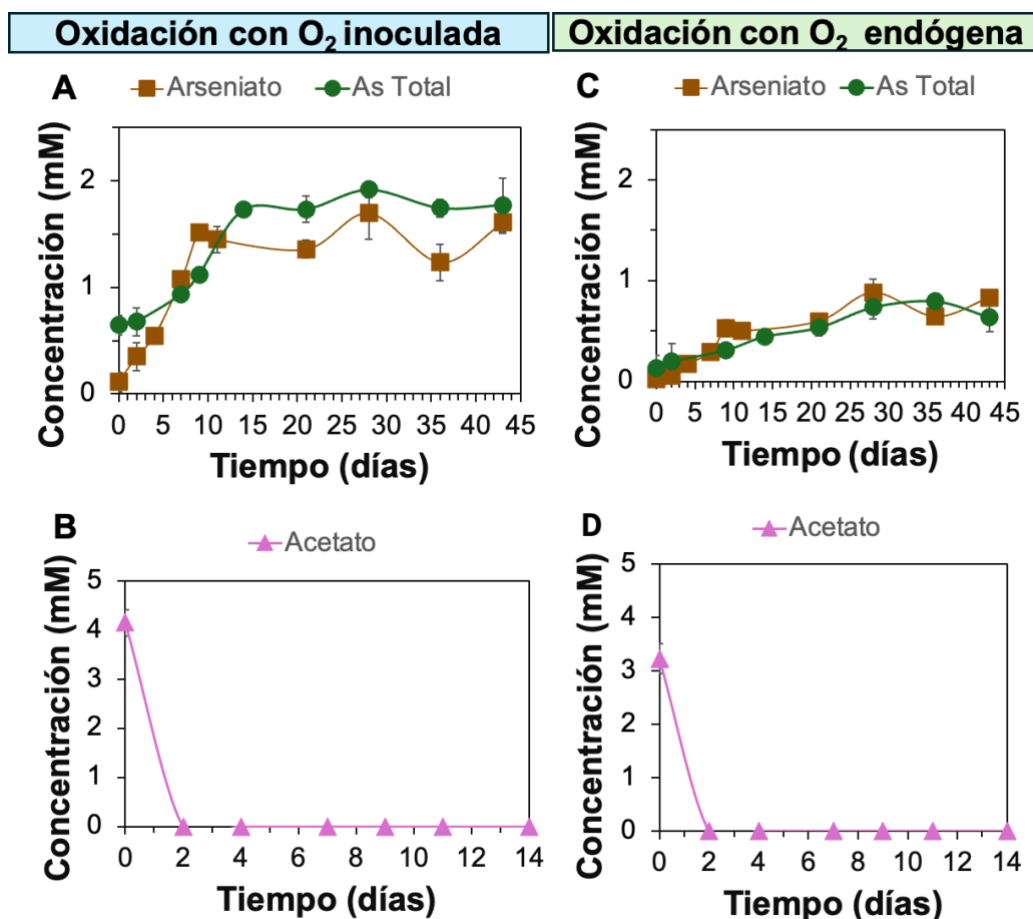


Figura 6.6. Cinéticas de oxidación de biominerales de sulfuros de arsénico usando oxígeno como aceptor final de electrones en ensayos inoculados con el Consorcio CB y en ensayos sin inocular (endógenos). A) Concentraciones de arseniato y arsénico total con inóculo; B) Concentración de acetato con inóculo; C) Concentraciones de arseniato y arsénico total sin inóculo; D) Concentración de acetato sin inóculo.

Respecto a la oxidación de arsenito contenido en precipitados de sulfuros de arsénico con nitrato como aceptor de electrones, se puede observar un comportamiento similar al de los ensayos con oxígeno. En este caso, la concentración de arseniato que se logró oxidar en el experimento inoculado con el consorcio CB fue de 1.65 mM (Fig. 6.7A), mientras que en el experimento endógeno se llegó a oxidar hasta 0.80 mM, siendo dos veces mayor la oxidación con nitrato en el experimento inoculado. El acetato tuvo el mismo comportamiento de agotarse junto con el nitrato antes de que comenzara la oxidación de arsenito (Figs. 6.7B y D), tal como sucedió en los ensayos con arsenito soluble y nitrato. Es decir, las bacterias prefieren usar acetato como donador de electrones para la reducción de nitrato antes que el arsenito, lo que concuerda con la termodinámica discutida anteriormente (Secc. 6.2).

Además, cuando se compara la concentración de arseniato alcanzada en los experimentos inoculados con biominerales y los realizados con arsenito soluble (Secc. 6.2), se observa que con los biominerales solo se obtuvieron entre 0.75 y 1.65 mM, en alrededor de 45 días. Este resultado permite comprobar que los sulfuros de arsénico son relativamente estables en condiciones oxidantes, siempre y cuando el arsenito se mantenga en el precipitado, ya que una vez disuelto, probablemente por la misma lixiviación bacteriana, es cuando puede ser usado como donador de electrones.

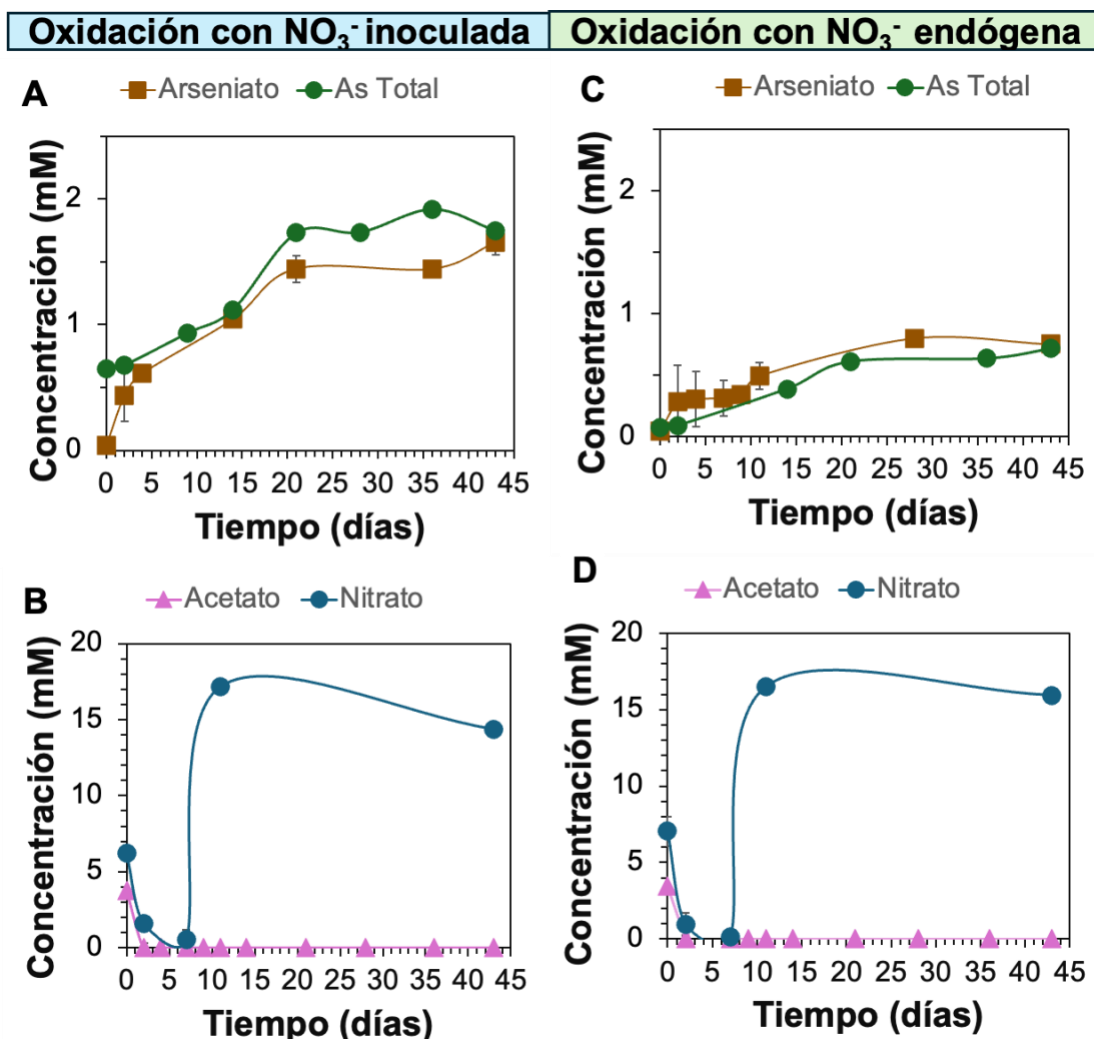


Figura 6.7. Perfiles cinéticos de los experimentos de oxidación de biominerales de sulfuro de arsénico con nitrato como aceptor final de electrones. A) Concentraciones de arseniato y arsénico total con el consorcio CB; B) Concentraciones de acetato y nitrato con el consorcio CB; C) Concentraciones de arseniato y arsénico total con nitrato sin inocular; D) Concentraciones de acetato y nitrato sin inocular.

No existen muchos reportes que evalúen la susceptibilidad de biominerales de sulfuros de arsénico para movilizar el metaloide en condiciones oxidantes mediante consorcios microbianos. Sin embargo, en un estudio realizado por Zhang et al. (2007) se evaluó la biolixiviación de arsenito a partir de rejalgar mineral purificado por métodos fisicoquímicos tradicionales, usando cultivos puros de *Acidithiobacillus*

ferrooxidans y *Acidithiobacillus thiooxidans*, tanto por separado como en conjunto. Los dos microorganismos fueron aislados de un drenaje ácido de mina de una mina de cobre abandonada (Baiyin de Gansu, China), y fueron capaces de lixiviar hasta 80 mg/L (~1 mM) de arsenito después de 20 días, que correspondía a 21% del arsenito total contenido en el mineral. Los autores atribuyeron la biolixiviación del mineral a la protonación del rejalgar mediada por los microorganismos. El estudio de Zhang et al. (2007) se realizó a pH ácido (1.8), y aunque se considera que los sulfuros de arsénico son estables en valores ácidos de pH (2 - 5), también resulta importante el potencial óxido-reducción, ya que, si existen condiciones oxidantes la oxidación se llevará a cabo, aún a pH ácido. Por lo anterior, es importante evaluar la estabilidad de los sulfuros de arsénico a pH circumneutral y en condiciones reductoras, que es el ambiente que existe en acuíferos subterráneos, tal y como se realizó en este estudio. Como se observa en la Tabla 6.2, aunque el pH del medio se ajustó a un valor de 7.0, al agregar los precipitados el pH aumentó a valores entre 8.5 y 9.0. Al final de la fase de oxidación se registraron valores muy similares, siendo el mayor de 9.2 para oxidación de arsenito con As^{3+} endógeno.

Tabla 6.2. Variación de pH en la oxidación de precipitados de sulfuros de arsénico endógenos o inoculados con oxígeno o nitrato.

Etapas	pH inicial	pH final
Oxidación de As^{3+} precipitado con O_2 endógeno	9.06 ± 0.062	9.204 ± 0.012
Oxidación de As^{3+} precipitado con O_2 inoculado	8.89 ± 0.188	8.99 ± 0.301
Oxidación de As^{3+} precipitado con NO_3^- endógeno	8.58 ± 0.074	8.59 ± 0.026
Oxidación de As^{3+} precipitado con NO_3^- inoculado	8.76 ± 0.084	8.77 ± 0.068

Cabe destacar que, como se mencionó en la introducción, pudo haber ocurrido la oxidación de sulfuro a azufre elemental o a sulfato. Como se observa en las reacciones 1.5 y 1.7, la oxidación de sulfuro a sulfato resulta incluso más favorable que la oxidación de arsenito (Reacciones 1.1, 1.2).

6.4 Velocidades de reducción y oxidación de arsénico soluble y contenido en precipitados de sulfuros de arsénico

A manera de resumen y con fines comparativos, en la Tabla 6.2, se observan las velocidades de reducción y oxidación de arsénico de todos los experimentos realizados en este estudio. La velocidad de oxidación de arsénico soluble con nitrato (5.77 mmol/L·d) resultó 2.3 veces mayor que la de reducción (2.5 mmol/L·d) y a su vez, también fue mayor que la de oxidación con oxígeno. En cambio, en los ensayos de oxidación de los biominerales, las velocidades de oxidación fueron hasta casi 20 veces menores que cuando el arsénico se encuentra de forma soluble.

Tabla 6.3. Velocidades de reducción y oxidación de arsénico soluble y de oxidación de biominerales con el consorcio CB.

Fuente de arsénico	Velocidad de reducción As^{5+} (mmol/L·d)	Velocidad de oxidación de As^{3+} (mmol/L·d)			
		Con O_2 inoculado	Con O_2 endógeno	Con NO_3^- inoculado	Con NO_3^- endógeno
Soluble	2.5 (± 0.091)	3.10 (± 1.071)	NA	5.77 (± 1.373)	NA
Precipitado	NA	0.22 (± 0.032)	0.12 (± 0.027)	0.29 (± 0.026)	0.12 (± 0.034)

NA=No Aplica

Las velocidades de oxidación resultaron ser distintas a lo reportado previamente por otros autores. Por ejemplo, en un estudio de oxidación de arsenito soluble, inoculado con las cepas puras *JHS3* perteneciente al género de *Acinetobacter* y *JHW3* perteneciente al género *Klebsiella*, aisladas de un sitio contaminado con

arsénico, usando nitrato y oxígeno como aceptores de electrones, se obtuvieron mayores velocidades de oxidación con oxígeno (2.02 mmol/L d) que con nitrato (0.11 mmol/L d) (Nguyen et al., 2017). La oxidación de arsenito con oxígeno fue hasta 20 veces más rápida que al usar nitrato, mientras que en este estudio se obtuvo lo contrario ya que la oxidación de arsenito con nitrato fue dos veces más rápida que al usar oxígeno (Tabla 6.2). La diferencia entre los resultados realizados por Nguyen et al. (2017) y los de este estudio, puede ser debido a que las cepas puras fueron aisladas y cultivadas desde el inicio en condiciones aerobias, donde existía una mayor disponibilidad de oxígeno que de nitrato y por lo tanto se logró seleccionar una cepa aerobia. En contraste, en el caso del consorcio CB, este fue seleccionado y cultivado bajo condiciones estrictamente anaerobias, por lo que existe la posibilidad de que en el consorcio CB exista una menor cantidad de bacterias con capacidad de usar oxígeno como aceptor final de electrones. De tal forma que resultó más factible que las bacterias usaran nitrato como aceptor final de electrones para llevar a cabo la oxidación de arsenito. El hecho de que el consorcio CB haya oxidado más rápidamente al arsenito con nitrato que con oxígeno, indica que, en un ambiente natural, es muy probable que ocurra preferentemente la oxidación de arsenito con nitrato, y dicha oxidación sería más rápida que con oxígeno.

Adicionalmente, en la Tabla 6.3 se presentan los balances de electrones para los experimentos de reducción y oxidación usando nitrato como aceptor de electrones con arsénico soluble y de oxidación de los precipitados de sulfuros de arsénico inoculado con el consorcio CB y sin inocular. Se observa que para el caso de la reducción de arseniato existieron electrones de lactato que no fueron usados para reducir arseniato ni producir acetato. De igual forma, en la oxidación de arsenito soluble con nitrato como donador de electrones existió un exceso de nitrato consumido que no fue usado para oxidar arsenito ni acetato. Este exceso pudo deberse a que el medio de cultivo contenía lactato en exceso para asegurar que la reducción de arseniato ocurriera sin restricciones. Sin embargo, el exceso de donador de electrones en el proceso de reducción seguramente ocasionó procesos

fermentativos. De tal forma que la relación de meq e⁻ aceptados/donados fue sólo de 47 %. En la fase de oxidación con nitrato, se obtuvo un balance de 2.23 meq e⁻ aceptados/donados, en lugar de un valor cercano a 1.0, lo cual refuerza la hipótesis de que en el medio existió un donador de electrones distinto al acetato y arsenito, que pudieron ser los productos de la fermentación de la etapa de reducción. Lamentablemente, los productos de la fermentación, como propionato no se cuantificaron. En cambio, en ausencia de productos de fermentación, en el caso de los experimentos con precipitados, el balance de meq e⁻ aceptados/donados fue cercano a 1, tanto en el caso de los experimentos inoculados (1.23) como en los endógenos (1.04), ya que sólo existía acetato en el medio producto de la etapa de reducción.

Tabla 6.4. Balance de miliequivalentes de electrones (meq e⁻) para la etapa de reducción y oxidación con arsénico soluble con nitrato, así como para los experimentos inoculados y endógenos de oxidación de los precipitados de arsénico con nitrato.

Exp.	meq e-donados			meq e- aceptados			Balance A/D*
	As ³⁺	Acetato	Lactato	Nitrato	As ⁵⁺	Acetato	
Reducción	–	–	99.97 (± 7.73)		22.28 (± 0.42)	19.31 (± 1.245)	0.47 (± 0.13)
Oxidación As soluble	20.62 (± 2.06)	19.64 (± 1.12)	–	87.86 (± 5.27)	–	–	2.23 (±0.26)
Oxidación As precip. inoculado	4.05 (± 0.15)	30.09 (± 3.47)	–	42.19 (± 5.25)	–	–	1.23 (±0.03)
Oxidación As precip. endógeno	1.60 (± 0.01)	27.56 (± 3.38)	–	30.43 (± 3.54)	–	–	1.04 (±0.05)

*Se refiere a la razón de miliequivalentes de electrones (meq e⁻) aceptados/donados. precip. = precipitado

6.6 Estructura de la comunidad microbiana en los ensayos de reducción y oxidación de arsénico

A partir de los experimentos con arsénico soluble se obtuvo un promedio de 145749 ± 5585 lecturas crudas en cada una de las muestras, de las cuales, después de filtrar, se obtuvieron en promedio 145241 ± 5585 de lecturas de mayor calidad. En contraste, de las muestras obtenidas de los experimentos con biominerales se obtuvieron en promedio 58165 ± 6823 lecturas crudas, de las cuales posterior al filtrado se redujo a una cantidad promedio de 54355 ± 7374 lecturas de calidad. Posteriormente, se realizó el análisis bioinformático correspondiente para observar los cambios en la estructura de la comunidad microbiana para cada uno de los casos, desde el inóculo hasta los experimentos de oxidación con arsénico soluble y precipitado.

Primeramente, se determinó la diversidad alfa de todas las muestras, incluida la del inóculo. En la Figura 6.8 se presentan la riqueza observada y el índice de Shannon. Las muestras en las que se encontró mayor riqueza (~60) fueron las recuperadas del inóculo y oxidación de precipitado con nitrato. En cambio, en donde se observó menor riqueza fue en los experimentos de oxidación de precipitado endógeno con oxígeno y nitrato, donde los ASVs bacterianos fueron de entre 28 y 37. En el resto de las comunidades la diversidad observada fue entre 46 y 49. En relación con el índice de Shannon, las comunidades con mayor diversidad fueron el inóculo y el experimento de reducción de arsénico. En el caso de los experimentos de oxidación, se observó una mayor diversidad en las comunidades de los experimentos de oxidación con arsénico soluble y nitrato como aceptor final de electrones y con arsénico precipitado con oxígeno como aceptor de electrones (Fig. 6.8). Por último, las comunidades con el menor índice de Shannon fueron las que se obtuvieron de la oxidación de los precipitados sin inocular, indicando en este caso el predominio de ciertos grupos bacterianos.

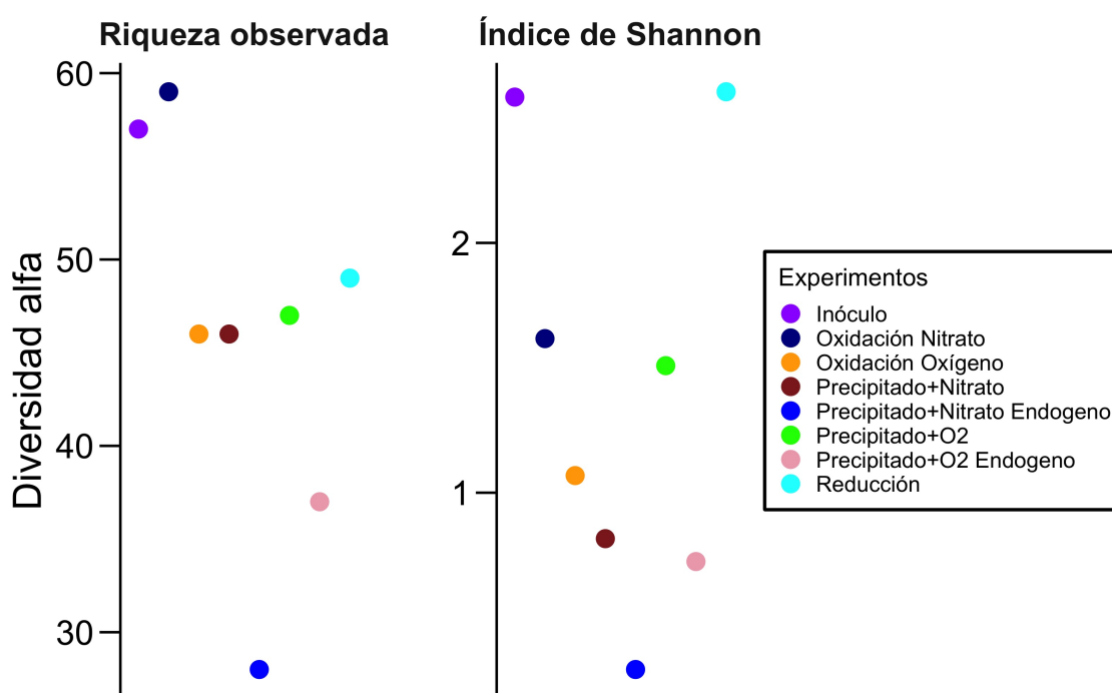


Figura 6.8. Diversidad alfa (riqueza observada e índice de Shannon) de las comunidades microbianas en los distintos experimentos. Cada color corresponde al experimento evaluado.

Los resultados obtenidos demuestran que existe una mayor diversidad en el inóculo y en el experimento de reducción, de acuerdo con lo esperado, ya que como se mencionó anteriormente, el consorcio CB que se usó como inóculo proviene de un sedimento contaminado con arsénico y fue cultivado en un ambiente completamente anaerobio. Consecuentemente, al pasar a un ambiente aerobio o anóxico, las especies bacterianas seleccionadas fueron mucho menos, ya que la mayoría de las especies presentes en el inóculo requieren de un ambiente anaerobio para sobrevivir y llevar a cabo su metabolismo energético. Por lo tanto, son pocos los géneros que se favorecen al cambiar de condiciones anaerobias a aerobias o anóxicas, lo que disminuye la diversidad bacteriana. En un estudio realizado previamente, donde se recolectaron lodos de una zona minera en Malasia, se encontró una diversidad relativamente baja (3.05 de índice de Shannon) de la

comunidad microbiana debido a la presencia de altas concentraciones de arsénico (670 mg/L ó 9 mM), los autores argumentaron que dicha diversidad se debió a que sólo pocos géneros bacterianos pueden evitar la toxicidad causada por arsénico e incluso usarlo para su metabolismo energético (Hamood Altowayti et al., 2020).

La composición taxonómica de las comunidades microbianas se analizó mediante la distribución de las abundancias relativas a nivel de filo (Fig. 6.9 y 6.11) y de géneros bacterianos (Figs. 6.10 y 6.12). Se observa que, en el inóculo el filo más abundante fue *Desulfobacterota* (45.6%), mientras que en el experimento de reducción el más abundante fue *Firmicutes* (54.26%). Al pasar a fase de oxidación se favorecieron bacterias del filo *Proteobacteria* (84.5% - 95.8%).

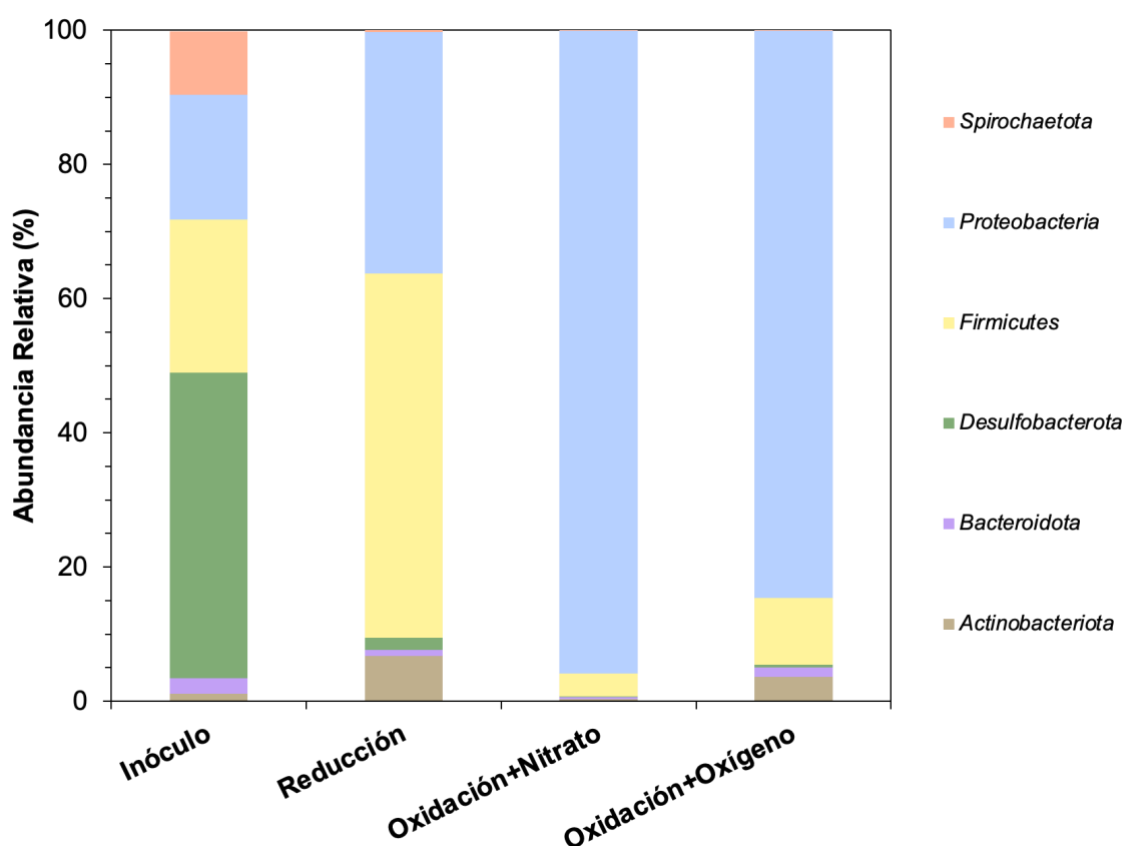


Figura 6.9. Abundancias relativas de los filos bacterianos presentes en el consorcio CB (inóculo) y al final de los experimentos con arsénico soluble.

En la Figura 6.10 se presenta la composición de la comunidad microbiana a nivel género existente en el inóculo y en los experimentos de reducción y oxidación con arsénico soluble. En el inóculo se observa que la comunidad es más diversa que las obtenidas en los ensayos, siendo los géneros más abundantes *Desulfomicrobium* (23.3%), *Desulfobulbus* (21.20%), *Desulfosporosinus* (19.91%) y *Thauera* (10.47%). En la etapa de reducción se enriqueció el género *Desulfosporosinus* (37.32%), mientras que *Thauera* también incrementó su abundancia relativa (35.70%) y en menor proporción el género *Fusibacter* (14.24%).

Desulfosporosinus es un género bacteriano reportado como sulfato-reductor, pero también tiene la capacidad de utilizar arsénico en sus procesos metabólicos.

Se ha reportado que *Desulfosporosinus*, es una bacteria Gram positiva, que puede llevar a cabo la metilación y reducción de arsénico en ambientes anaerobios (Hu et al., 2024; Sánchez Andrea et al., 2014). Este género bacteriano ha sido comúnmente encontrado en ambientes contaminados con arsénico y conduce a la formación de minerales de sulfuros de arsénico (Hu et al., 2024). En el presente estudio fue capaz de tolerar y metabolizar hasta 10 mM (750 mg/L) de arsénico. Por otra parte, *Fusibacter* se ha reportado como un género bacteriano anaerobio halotolerante, fermentativo y con capacidad de reducir arseniato (Serrano et al., 2017).

Posteriormente, al cambiar a condiciones de oxidación, cuando se usó nitrato como aceptor final de electrones inesperadamente se encontró que más de 90% de la comunidad microbiana estaba representada por miembros del género *Thauera*, que se ha reportado como una bacteria desnitrificante (Ren et al., 2021). Por otra parte, la distribución de los géneros bacterianos en los experimentos de oxidación con oxígeno, aunque también estuvo dominada por *Thauera* (64.40%), indicó el enriquecimiento de representantes del género *Rhizobium* (13.20%).

Se sabe que *Thauera* es un género bacteriano perteneciente al filo *Proteobacteria*, ha sido frecuentemente encontrado en plantas de tratamiento de aguas residuales y se ha reportado que este género se enriquece en ambientes donde la disponibilidad de carbono es baja (Ren et al., 2021). La capacidad de *Thauera* para vivir en ambientes oligotróficos le otorga una ventaja ecológica sobre otros géneros bacterianos, por ejemplo, en el presente estudio se enriqueció al pasar a la etapa de oxidación, es decir, cuando el medio era limitado en carbono y además existía arsenito a concentraciones elevadas (10 mM).

Adicionalmente, se ha descubierto que *Thauera* tiene una alta habilidad para la degradación de compuestos aromáticos que son difíciles de degradar usando nitrato como aceptor de electrones (Ren et al., 2021). Esto refleja que *Thauera* cuenta con versatilidad metabólica para usar distintos sustratos y crecer bajo ambientes tóxicos. Aunque este género no se ha reportado con la capacidad de usar arsénico como parte de su metabolismo, por lo tanto, es poco probable que esté implicado en la oxidación de arsenito, en este estudio se observó su enriquecimiento en todos los experimentos de oxidación, ya sea con arsénico soluble (Fig. 6.10) o biominerales (Fig. 6.12). Su enriquecimiento en las etapas de oxidación pudo deberse al contenido de acetato en el medio de cultivo, puesto que *Thauera* predomina al tener acetato como sustrato (Wu et al., 2023; Sun et al., 2016). Además, se ha reportado que *Thauera* es capaz de usar sulfuro como donador de electrones para llevar a cabo la desnitrificación (Zhao et al., 2019). Por lo tanto, existe la posibilidad de que haya usado el sulfuro que forma parte de los precipitados para su metabolismo energético.

Otro género bacteriano que pudo contribuir con la oxidación de arsénico puede ser *Rhizobium*, aunque se encuentra en abundancias menores (1.24-13.20%) en los experimentos con arsénico soluble y formando parte de precipitados de sulfuros de arsénico usando oxígeno y nitrato como aceptores de electrones. Se ha reportado que este género puede oxidar arsenito tanto heterotrófica como autotróficamente (Warelow et al., 2013).

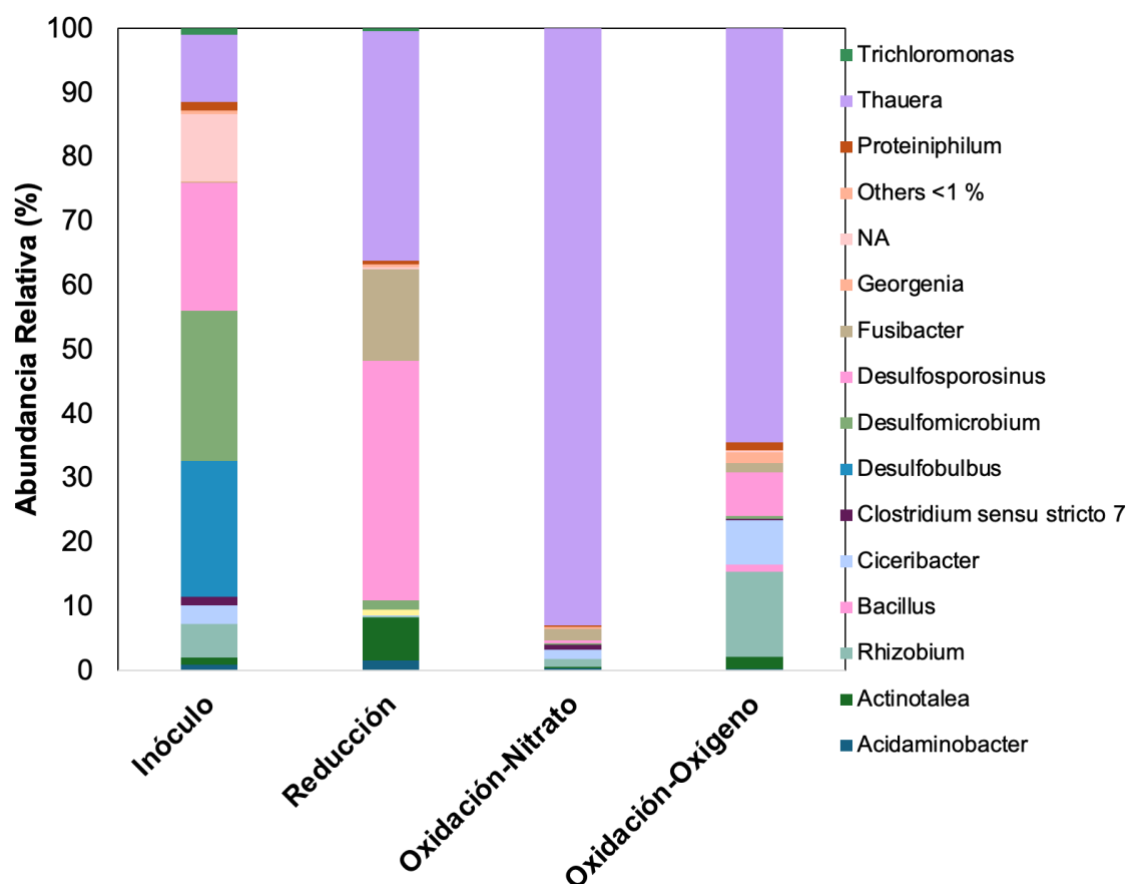


Figura 6.10. Abundancias relativas de los géneros bacterianos presentes en el inóculo (Consortio CB) y al final de los experimentos con arsénico soluble.

El análisis de la abundancia relativa a nivel filo de las muestras provenientes de los experimentos con precipitados de sulfuros de arsénico (Fig. 6.11), tanto inoculadas como endógenas, arrojó que el filo predominante en todos los experimentos fue Proteobacteria (86.6 – 97.7%), al igual que en las muestras que contenían el arsénico soluble. Además, se observaron en menor proporción filos como Bacteroidota (0.35 – 8.45%), Firmicutes (0.87-2.62%), siendo Desulfobacterota (<0.67%) y Actinobacteriota (< 2.39%) los menos representados.

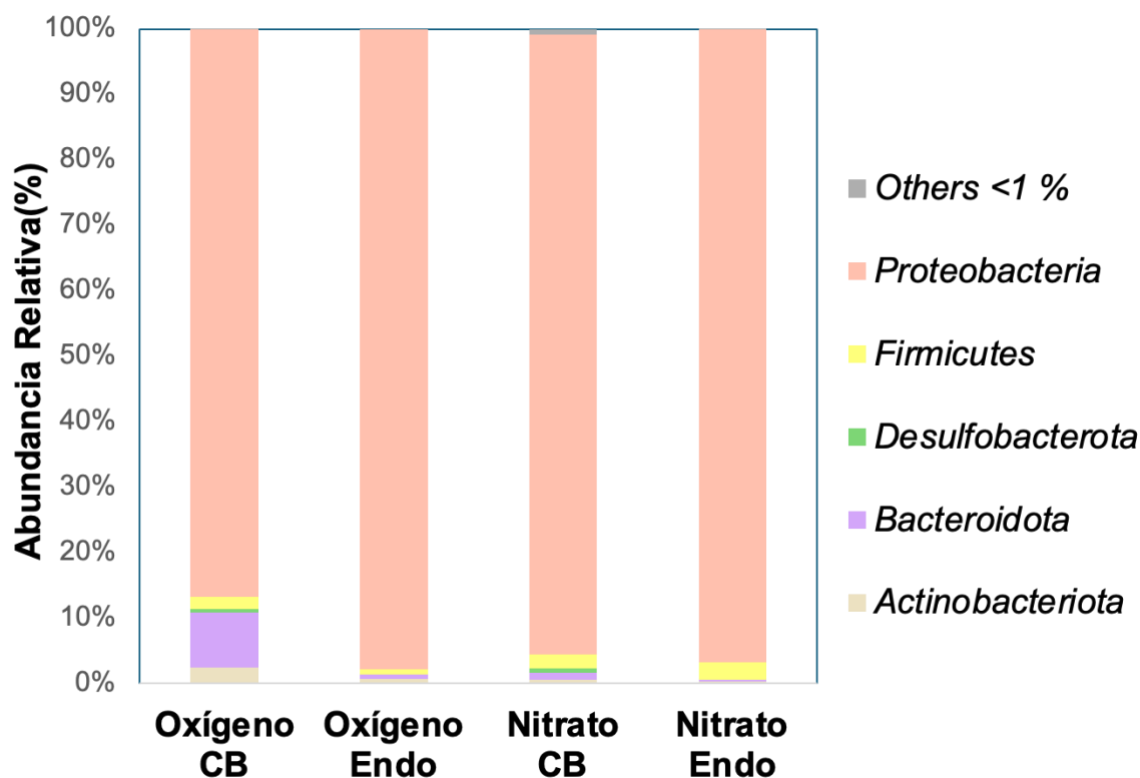


Figura 6.11. Abundancias relativas de los filos bacterianos presentes en los experimentos con arsénico precipitado en sulfuros de arsénico.

En la Figura 6.12 se muestra la comunidad microbiana a nivel género presente en los experimentos de oxidación con precipitados de sulfuros de arsénico con oxígeno y con nitrato, incluyendo los ensayos endógenos (sin inóculo). Se observa que existe una gran similitud entre las comunidades de los ensayos endógenos, así como entre los inoculados, sin importar si el aceptor fue oxígeno o nitrato. Curiosamente, en los experimentos endógenos se enriquecieron bacterias del género *Pseudomonas* (85.5 y 95.1%), mientras que en los experimentos inoculados se observó un enriquecimiento de miembros del género *Thauera* tal y como sucedió en los experimentos con arsénico soluble (55.81 y 83.81%).

Pseudomonas, que es una bacteria Gram-negativa y capaz de crecer en una amplia variedad de sustratos orgánicos bajo condiciones tanto aerobias como anaerobias, predominó en los experimentos que no fueron inoculados con el consorcio CB.

Varios reportes han documentado que *Pseudomonas* desempeña un papel clave en el metabolismo de arsénico (Vieto et al., 2021; Freikowski et al., 2010). Existen diversas cepas de este género bacteriano que tienen la capacidad tanto de reducir como de oxidar arsénico tales como *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas arsenicoxydans* y *Pseudomonas stutzeri*, entre otras (Fernández et al., 2014; Joshi et al., 2008.; Valenzuela et al., 2015). El predominio de este género bacteriano puede deberse a que los minerales de sulfuros de arsénico que se usaron en los experimentos tenían alrededor de 60 días de haberse formado y se ha reportado que *Pseudomonas* se caracteriza por su capacidad para la formación de biopelículas, por lo que el mineral pudo servir como matriz para la formación de biopelícula bacteriana (Valenzuela et al., 2015). Además, Ríos Valenciana et al., (2023) analizaron la comunidad microbiana que existía en biominerales de sulfuros de arsénico formados por medio del consorcio CB, y obtuvieron que *Pseudomonas* era uno de los géneros más abundantes en la comunidad.

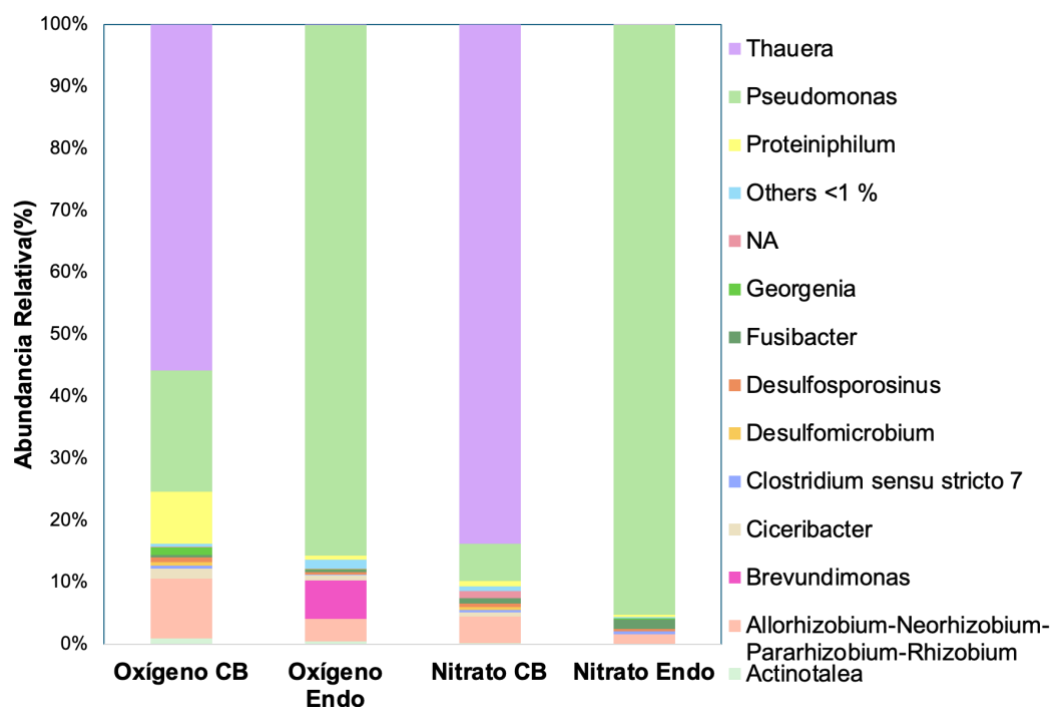


Figura 6.12. Abundancias relativas de los géneros bacterianos presentes en los experimentos realizados con precipitados de sulfuros de arsénico.

Adicionalmente, en la Figura 6.13 se muestran los cambios en abundancia de los géneros respecto al inóculo. Se observa que los cambios predominantes ocurrieron en *Desulfosporosinus*, *Thauera* y *Fusibacter* al estar en condiciones reductoras, mientras que al pasar a la fase de oxidación se enriquecieron significativamente géneros como *Thauera*, *Pseudomonas* y *Rhizobium*. La Figura 6.13 permite destacar los cambios que no fueron tan evidentes, como por ejemplo lo ocurrido en la etapa de reducción de arseniato, donde se observó un incremento en bacterias del género *Actinotalea*. Los miembros del género *Actinotalea* poseen metabolismo anaerobio facultativo organotrófico, que básicamente realizan fermentación (Semenova et al., 2022).

También merece la pena destacar lo que sucedió en el experimento de oxidación de arsenito precipitado con oxígeno endógeno, donde ocurrió el enriquecimiento de *Brevundimonas*. Este género se caracteriza por ser resistente al arsénico, y por su capacidad para metilarlo; también posee la maquinaria para desintoxicarlo por medio de reducción (Li et al., 2023). De manera similar, en el experimento de oxidación con oxígeno de arsenito precipitado inoculado con el consorcio CB se identificó el incremento del género *Proteiniphilum*. Hasta ahora, no se ha reportado este género en el metabolismo del arsénico. Sin embargo, recientemente Feng et al., (2023) encontraron que *Proteiniphillum* predomina cuando existe acetato en el medio. Por último, en el experimento de oxidación de arsenito soluble con nitrato, se observa un incremento de *Ciceribacter*. El enriquecimiento en este género pudo ser causado por el nitrato en el medio, ya que, aunque no hay reportes de que este género sea reductor de arseniato, sí los hay de que es anaerobio facultativo y desnitrificante (Deng et al., 2020).

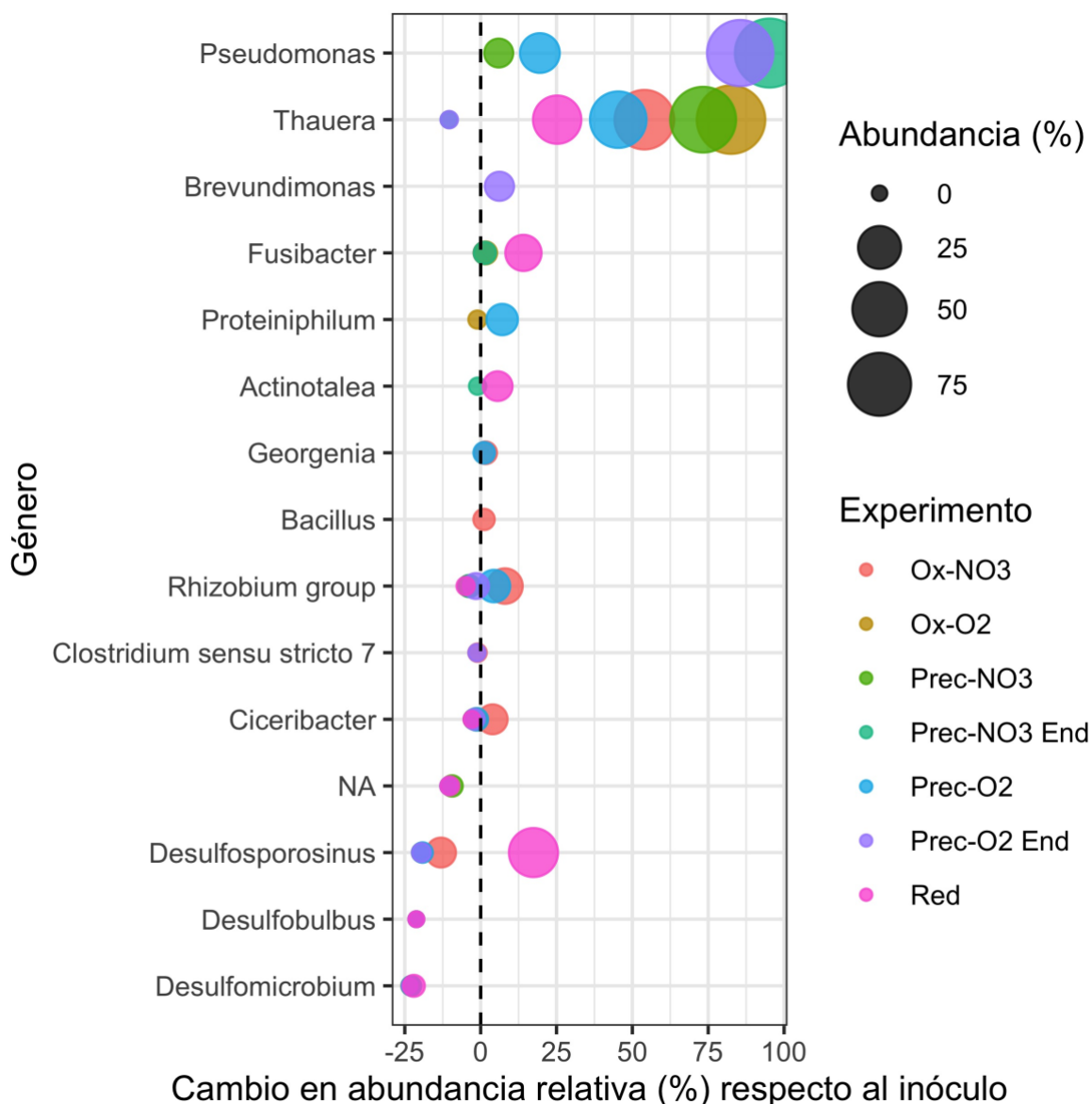


Figura 6.13. Cambios en abundancia relativa (%) respecto al inóculo de los géneros dominantes en los distintos experimentos

En el presente estudio se observó un mejor desempeño para llevar a cabo la oxidación de arsenito en los experimentos que fueron inoculados con el consorcio CB respecto al consorcio CT y los experimentos endógenos, por lo que se puede decir que en el consorcio CB existen bacterias capaces de llevar a cabo la oxidación de arsenito usando nitrato u oxígeno como aceptores de electrones. Además, anteriormente, el predominio del género *Thauera* no había sido reportado en

consorcios que metabolizan arsénico, y aunque tal vez no fue responsable de la oxidación del arsenito, si fue capaz de tolerar hasta 10 mM de arsénico total, lo que le confiere una ventaja sobre otros géneros que no son capaces de vivir en ambientes contaminados con arsénico. Para determinar si *Thauera* estuvo involucrada en el metabolismo del arsénico, sería necesario aislarla del consorcio CB y realizar experimentos con arsenito que nos permitan conocer si puede oxidarlo o sólo tolerarlo.

6.5 Genes funcionales identificados en las cinéticas de reducción y oxidación de arsénico de forma soluble y en precipitados de sulfuros de arsénico

Se hizo el esfuerzo de identificar la presencia de los genes funcionales relacionados con el ciclo biogeoquímico del arsénico: *arrA*, *arsC* y *aioA*, y que son relevantes para confirmar que la reducción y oxidación de arsénico se llevaron a cabo de manera biótica mediante las bacterias presentes en el consorcio CB. La presencia de los genes funcionales fue meramente cualitativa, y se obtuvo a partir de PCR a punto final realizadas con el ADN que se extrajo al final de cada experimento.

En la Tabla 6.5 se presenta un resume de los experimentos en los que se logró amplificar cada uno de los genes funcionales.

Además, en las Figuras 6.13 a 6.16 se presentan los geles de agarosa mediante los cuales se detectaron los genes correspondientes. En algunos de los experimentos se logró detectar la coexistencia de genes que participan en la movilización del arsénico, es decir, dentro del consorcio existen microorganismos que pueden llevar a cabo tanto la reducción como la oxidación de arsénico. En el inóculo, el gen *aioA* para la oxidación de arsénico no fue detectado (Fig. 6.13 y Tabla 6.4), muy probablemente debido a la baja abundancia de bacterias con la capacidad de oxidar arsenito.

Tabla 6.5. Genes funcionales detectados en los experimentos de reducción y oxidación de arsénico.

Experimento	Gen funcional		
	<i>aioA</i>	<i>arrA</i>	<i>arsC</i>
Inóculo	—	++	+
Reducción	—	++	++
Oxidación con O ₂	—	—	+
Oxidación con NO ₃ [—]	—	—	+
Oxidación de precipitado con O ₂ (inoculado)	—	+	+
Oxidación de precipitado con O ₂ (endógeno)	+	+	+
Oxidación de precipitado con NO ₃ [—] (inoculado)	+	+	+
Oxidación de precipitado con NO ₃ [—] (endógeno)	—	—	+

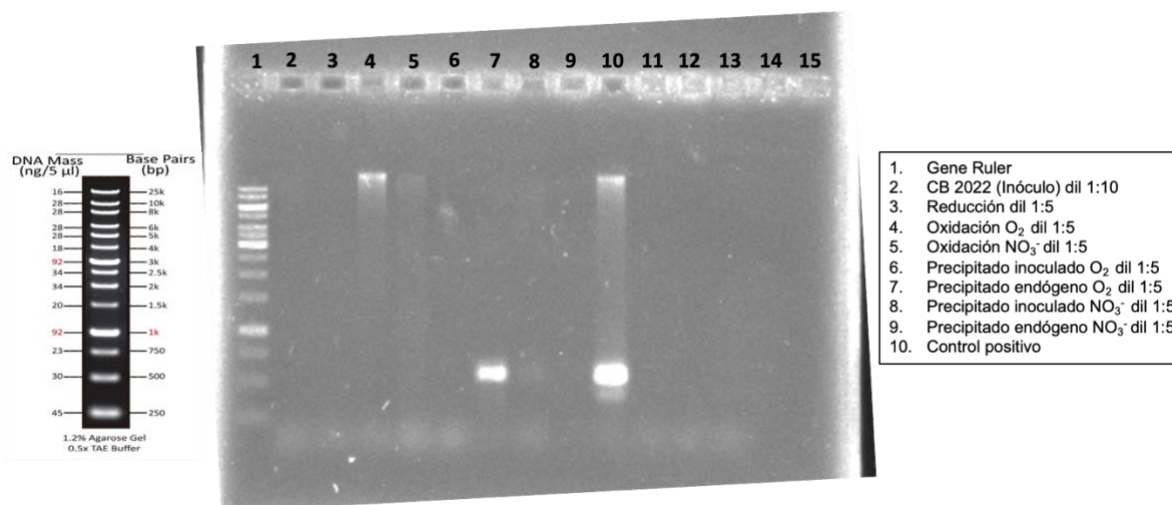


Figura 6.14. Gel de agarosa (1.0 %) que muestra los productos de PCR de la amplificación del gen *aioA* en las muestras del inóculo y de los experimentos de reducción de arsénico, así como de oxidación de arsénico soluble y de precipitados de sulfuros de arsénico con oxígeno o nitrato.

En cambio, sí se detectó la presencia de los genes funcionales *arsC* y *arrA* (Figuras 6.14 y 6.15) involucrados en la desintoxicación y reducción de arseniato, respectivamente (Saltikov et al., 2003). En concordancia con lo que se presenta en la Tabla 6.4, el inóculo es rico en *Desulfosporosinus*, *Desulfobulbus* y *Desulfitomicrobium*, estos géneros bacterianos no destacan por su capacidad de oxidar arsenito, por lo tanto, no existen reportes en los cuales se mencione que estos géneros contengan el gen *aioA*. Previamente, se ha reportado la presencia de los genes *arsC* y *arrA* involucrados en la desintoxicación y la reducción de arsénico en géneros como *Desulfosporosinus* y *Desulfitomicrobium* (Mazumder et al., 2020). Similarmente al inóculo, en la etapa de reducción de arseniato solo se detectó la presencia de los genes *arsC* y *arrA*, muy probablemente también por la baja abundancia de microorganismos oxidadores de arsénico debida a las condiciones impuestas.

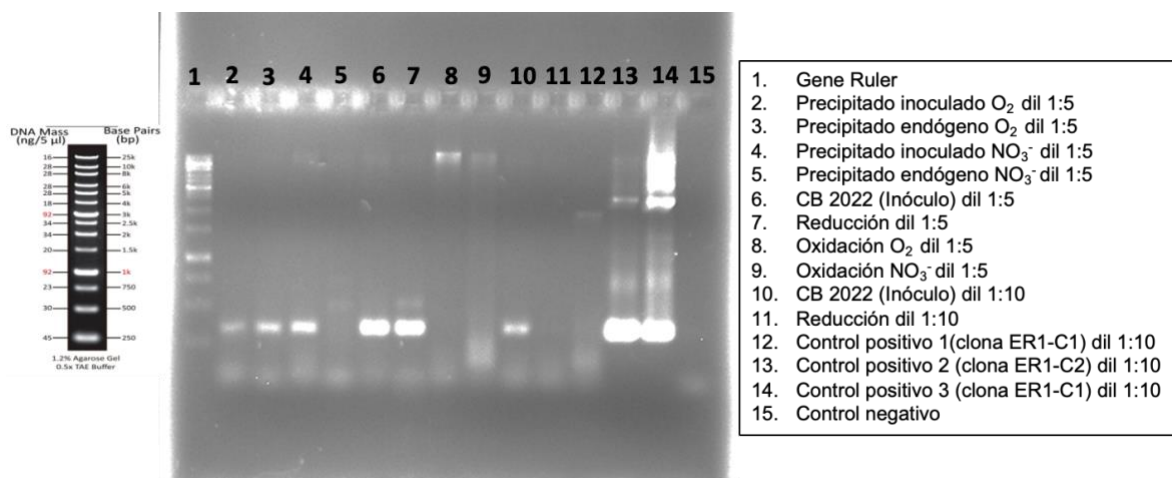


Figura 6.15. Gel de agarosa (1.0%) con los productos de amplificación del gen *arrA* en las muestras del inóculo, arsénico soluble en etapas de reducción y oxidación y precipitados de sulfuros de arsénico en etapa de oxidación.

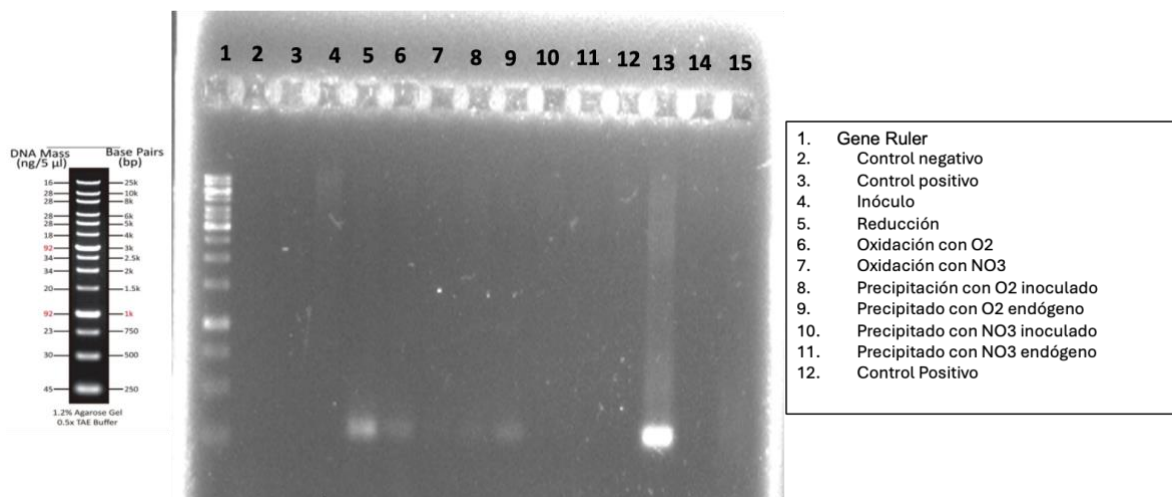


Figura 6.16. Gel de agarosa (1.0%) de la amplificación del gen *arsC* en las muestras del inóculo, arsénico soluble (reducción y oxidación) y precipitados de sulfuros de arsénico (oxidación).

Al pasar a la etapa de oxidación, el único gen que se detectó en los experimentos con arsénico soluble fue el *arsC* (Figuras 6.15 y 6.16), este gen regula las enzimas

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 14 15

DNA sizes (ng/5 µl) Size Pairs (bp)

14 275k
20 150k
25 100k
28 75k
30 50k
35 35k
40 25k
45 20k
50 15k
55 10k
60 7.5k
65 5k
70 3.5k
75 2.5k
80 2k
85 1.5k
90 1k
95 750
100 500
105 250

0.2% Agarose Gel
0.5x TBE Buffer

- Gene Ruler
- CB 2022 (Inóculo) dil 1:10
- Reducción dil 1:5
- Oxidación O_2 dil 1:5
- Oxidación NO_3^- dil 1:5
- Precipitado inoculado O_2 dil 1:5
- Precipitado endógeno O_2 dil 1:5
- Precipitado inoculado NO_3^- dil 1:5
- Precipitado endógeno NO_3^- dil 1:5
- Control positivo 1 (clona ER1-C1) dil 1:10
- Control positivo 2 (clona ER1-C2) dil 1:10
- Control negativo

Previamente, se ha detectado la coexistencia de genes involucrados en el ciclo biogeoquímico del arsénico en un solo género bacteriano. Se reportó que diversas especies de *Pseudomonas* son capaces de llevar a cabo tanto la reducción como la

oxidación de arsénico (Zhang et al., 2016), ya que el género *Pseudomonas* cuenta simultáneamente con los tres genes relevantes para la desintoxicación (*arsC*), reducción (*arrA*) y oxidación (*aioA*) de arsénico, lo que le confiere una resistencia excepcional a este metaloide (Freikowski et al., 2010; Cai et al., 2009).

En este estudio, se encontró la presencia del género *Pseudomonas* en los experimentos endógenos, en los cuales, aunque si se observó que se llevó a cabo la oxidación, esta fue menor y más lenta comparada con los experimentos inoculados con el consorcio CB. Sin embargo, los únicos experimentos donde se encontró la coexistencia de los tres genes involucrados en la reducción y oxidación de arsénico fueron el experimento endógeno de oxidación de precipitados con oxígeno y el de oxidación con nitrato como aceptor de electrones e inoculado con el consorcio CB (Tabla 6.4).

En su conjunto, los resultados demuestran que el consorcio CB fue capaz de llevar a cabo tanto la reducción como la oxidación de arsénico, es decir, cuenta con dualidad metabólica lo cual puede afectar el proceso de biorremediación basado en la formación de sulfuros de arsénico al existir condiciones ambientales fluctuantes, lo cual puede tener implicaciones en el ciclo biogeoquímico del arsénico. Vale la pena recordar que el consorcio CB fue recuperado de sedimentos y enriquecido bajo condiciones estrictamente anaerobias. El cultivo y mantenimiento del consorcio se realizaron mediante transferencias sucesivas para promover los bioprocesos de reducción de arseniato y sulfato. En este estudio, se encontró que el consorcio CB es capaz de ciclar el arsénico reducido al oxidarlo en presencia de oxígeno y nitrato. Lo anterior demuestra que los microorganismos de sitios contaminados con arsénico están perfectamente adaptados a la presencia de este metaloide en su entorno y pueden metabolizarlo en condiciones tanto reductoras como oxidantes. Por lo anterior, es importante diseñar estrategias de biorremediación de arsénico que abarquen el estudio de todas las reacciones rédox que ocurren en la interfase sólido-líquido, considerando que los biominerales son una fuente de arsénico y su estabilidad se puede afectar dependiendo de las condiciones ambientales

existentes. En la Figura 6.18 se ilustra lo que podría suceder en un acuífero si existen promotores de la oxidación, tales como NO_3^- y O_2 .

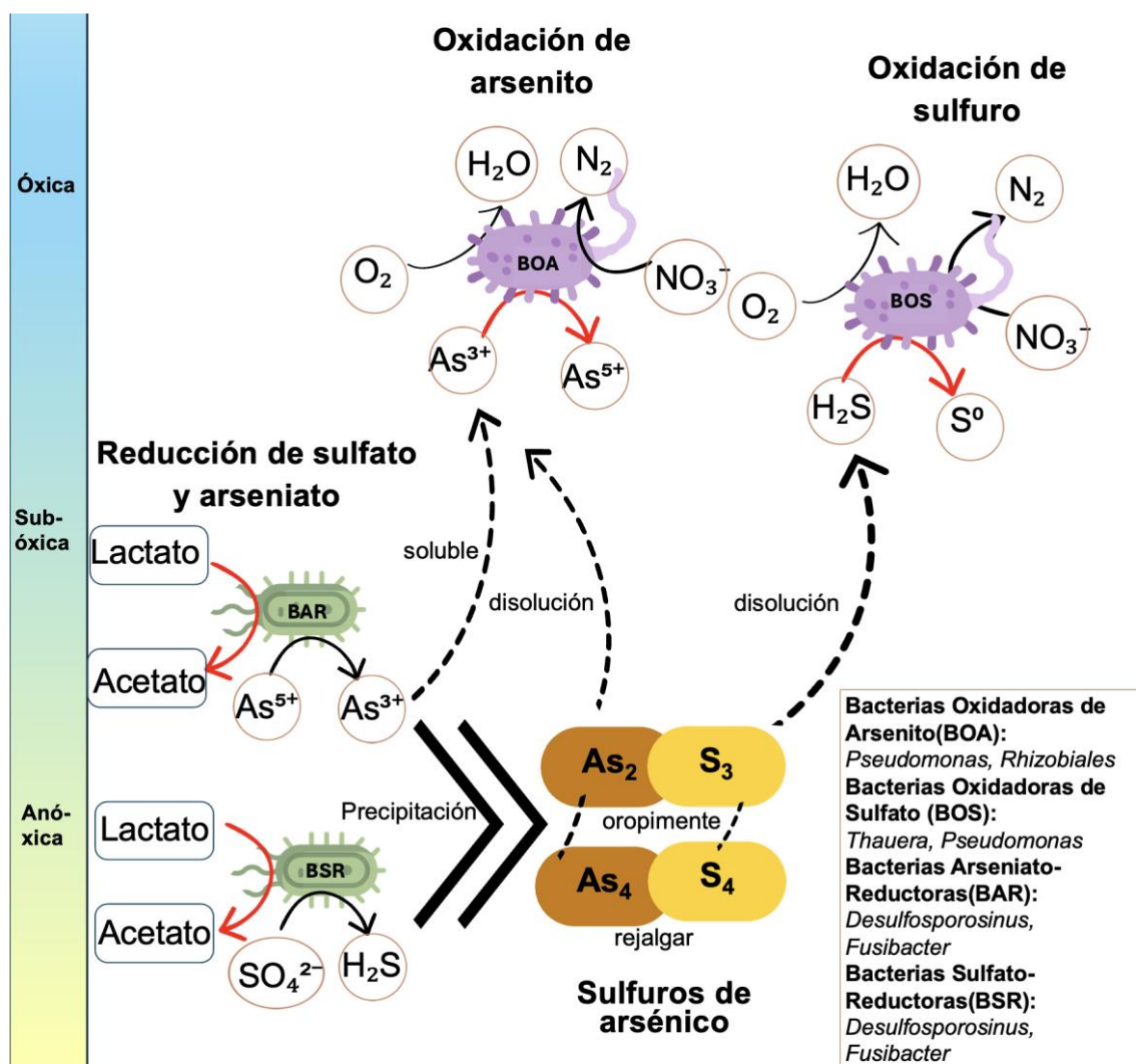


Figura 6.18. Diagrama que ilustra la reducción y oxidación de arsénico en un acuífero pobre en hierro y rico en sulfato.

7. Conclusiones

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la versatilidad metabólica de un consorcio microbiano especializado en arseniato reducción bajo condiciones reductoras y oxidantes, con el fin de determinar si esta dualidad metabólica podría impactar en la disolución de sulfuros de arsénico previamente formados bajo condiciones reductoras, afectando la estabilidad de estos y contribuyendo a la movilización de arsénico.

Se confirmó que el consorcio arseniato-reductor es capaz de llevar a cabo la reducción de 10 mM de arsénico usando lactato como donador de electrones. Además, se demostró que al proporcionar los aceptores de electrones apropiados (O_2 y NO_3^-) la comunidad microbiana fue capaz de adaptarse rápidamente y llevar a cabo la oxidación de arsenito. Dicha oxidación fue posible con arsénico soluble (como arsenito), así como con arsénico que no se encontraba en solución y que formaba parte de sulfuros de arsénico (As_2S_3/As_4S_4). Se logró una mayor y más rápida oxidación en los experimentos realizados con el arsénico soluble. Además, el nitrato resultó ser mejor aceptor de electrones que el oxígeno para llevar a cabo la oxidación de arsenito.

Se observaron cambios en la estructura de la comunidad microbiana con respecto al inóculo en las etapas de reducción y oxidación, lo que indica que el consorcio cuenta con bacterias que pueden reducir y oxidar arsénico. Además, los géneros bacterianos predominantes dependerán de las condiciones ambientales que existan.

El filo abundante en todos los experimentos fue *Proteobacteria*, mientras que a nivel de género los más abundantes en el inóculo fueron *Desulfosporosinus*, *Desulfomicrobium* y *Rhizobium*, en la etapa de reducción la comunidad se enriqueció en géneros como *Desulfosporosinus*, *Thauera* y *Fusibacter*. Mientras que al pasar a la etapa de oxidación con arsénico soluble hubo un notable decremento en la diversidad alfa, ya que la comunidad se enriqueció con el género

Thauera (93 % en abundancia relativa) en el caso de la oxidación con nitrato, mientras que para la oxidación con oxígeno la abundancia de *Thauera* fue alrededor de 64.3 %; en menor proporción existieron géneros como *Rhizobium* y *Desulfosporosinus*. Lo anterior indica que, aunque la comunidad bacteriana del consorcio CB es capaz de adaptarse a distintas condiciones ambientales, la fase de oxidación ejerce una presión selectiva muy fuerte sobre la comunidad.

En los experimentos con precipitados de sulfuros de arsénico, las comunidades de los ensayos inoculados con el consorcio CB también estuvieron dominadas por el género *Thauera* (55-84 %), mientras que en los experimentos endógenos el género predominante fue *Pseudomonas*.

Se corroboró la presencia de los genes funcionales involucrados en el metabolismo del arsénico (*aioA*, *arsC* y *arrA*), aunque no se detectaron todos los genes en todos los experimentos, en cada uno de ellos existía al menos uno de estos genes, lo cual es un indicio de que el consorcio CB posee versatilidad metabólica.

Finalmente, los resultados del estudio indican que la estabilidad de los bioprecipitados de sulfuros de arsénico formados bajo condiciones anaerobias podría afectarse en condiciones oxidantes debido a la acción de microorganismos quimiolitótrofos oxidadores de arsenito. Por lo tanto, es necesario buscar estrategias para la correcta disposición de los sulfuros de arsénico que permitan evitar o limitar la actividad bacteriana permitiendo que el método de biorremediación de formación de sulfuros de arsénico sea exitoso para la remoción de arsénico del agua.

8. Perspectivas

Futuras investigaciones se podrían centrar en el aislamiento de las bacterias dominantes que se enriquecieron en cada una de las etapas para confirmar el papel que tienen en la reducción y oxidación de arsénico, respectivamente. Con ello, se lograría describir mejor a los géneros clave para llevar a cabo la oxidación de arsénico y ayudaría a buscar estrategias para evitar la presencia o limitar la actividad de estos géneros bacterianos en un consorcio que se use para llevar a cabo la arseniato-reducción como método de biorremediación de arsénico del agua.

Adicionalmente, al tener bacterias aisladas podríamos conocer si una sola bacteria es capaz de llevar a cabo la reducción de arseniato y oxidación de arsenito según las condiciones ambientales que se presenten, ya que, esto nos daría indicios de la versatilidad metabólica existente en un solo género bacteriano.

Además, respecto a *Thauera*, género que anteriormente no se había reportado implicado en el ciclo biogeoquímico del arsénico, e incluso no se había reportado que pudiera existir en ambientes contaminados con arsénico, sería necesario aislarlo para conocer si puede llevar a cabo la reducción y/o oxidación de arsénico, o a través de qué mecanismo puede tolerar ambientes contaminados con altas concentraciones de arsénico (10 mM).

Por otra parte, aunque para la identificación de los genes relacionados con el metabolismo del arsénico (*arsC*, *arrA* y *aioA*) se usaron primers que se consideran universales, podrían existir sesgos en su amplificación. Lo anterior, abre la posibilidad que no se haya detectado alguno de los genes aun cuando en la comunidad original existiera algún microorganismo capaz de desintoxicar, respirar u oxidar arsénico. De tal forma que en trabajos futuros se propone usar distintos pares de primers que amplifiquen un mismo gen pero que hayan sido diseñados a partir de microorganismos filogenéticamente diversos.

Finalmente, esta información nos serviría para contar con consorcios especializados en arseniato reducción, para llevar a cabo la formación de sulfuros de arsénico y evitar su disolución limitando la presencia de géneros bacterianos que lleven a cabo la oxidación de arsénico.

Referencias

- Ahmad, H. A., Ni, S. Q., Ahmad, S., Zhang, J., Ali, M., Ngo, H. H., Guo, W., Tan, Z., & Wang, Q. (2020). Gel immobilization: A strategy to improve the performance of anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacteria for nitrogen-rich wastewater treatment. *Bioresource Technology*, 313. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2020.123642>
- Anand, V., Kaur, J., Srivastava, S., Bist, V., Singh, P., & Srivastava, S. (2022). *Arsenotrophy: A pragmatic approach for arsenic bioremediation*. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(3), 107528. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107528>
- Alarcón-Herrera, M. T., Martín-Alarcon, D. A., Gutiérrez, M., Reynoso-Cuevas, L., Martín-Domínguez, A., Olmos-Márquez, M. A., & 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>
- Albina, P., Durban, N., Bertron, A., Albrecht, A., Robinet, J. C., & Erable, B. (2021). Nitrate and nitrite bacterial reduction at alkaline pH and high nitrate concentrations, comparison of acetate versus dihydrogen as electron donors. *Journal of Environmental Management*, 280. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111859>
- Andres, J., & Bertin, P. N. (2016a). The microbial genomics of arsenic. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(2), 299–322. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUV050>
- Barral-Fraga, L., Barral, M. T., MacNeill, K. L., Martiñá-Prieto, D., Morin, S., Rodríguez-Castro, M. C., Tuulaikhuu, B. A., & Guasch, H. (2020). Biotic and Abiotic Factors Influencing Arsenic Biogeochemistry and Toxicity in Fluvial Ecosystems: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(7). <https://doi.org/10.3390/IJERPH17072331>
- Battaglia-Brunet, F., Dictor, M.-C., Garrido, F., Crouzet, C., Morin, D., Dekeyser, K., Clarens, M., & Baranger, P. (2002). *An arsenic(III)-oxidizing bacterial population: selection, characterization, and performance in reactors*.
- Beristain-Cardoso, R., Texier, A. C., Sierra-Álvarez, R., Field, J. A., Razo-Flores, E., & Gómez, J. (2008). Simultaneous sulfide and acetate oxidation under denitrifying conditions using an inverse fluidized bed reactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83(9), 1197–1203. <https://doi.org/10.1002/jctb.1921>
- Bhardwaj, A. (2022). Understanding the diversified microbial operon framework coupled to arsenic transformation and expulsion. In *Biologia* (Vol. 77, Number 12, pp. 3531–3544). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s11756-022-01198-1>
- Biswas, R., Paul, D., Maity, S., & Sarkar, A. (2023). Microbial community composition analysis to decipher the possible role of inherent bacteria for in-situ arsenic (As) bioremediation. *3 Biotech*, 13(6). <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03612-0>

- Bruneel, O., Héry, M., Laroche, E., Dahmani, I., Fernandez-Rojo, L., & 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>
- Cardoso, R. B., Sierra-Alvarez, R., Rowlette, P., Flores, E. R., Gómez, J., & Field, J. A. (2006). Sulfide oxidation under chemolithoautotrophic denitrifying conditions. *Biotechnology And Bioengineering*, 95(6), 1148–1157. <https://doi.org/10.1002/bit.21084>
- Castro-Severyn, J., Pardo-Esté, C., Mendez, K. N., Fortt, J., Marquez, S., Molina, F., Castro-Nallar, E., Remonsellez, F., & Saavedra, C. P. (2021). Living to the High Extreme: Unraveling the Composition, Structure, and Functional Insights of Bacterial Communities Thriving in the Arsenic-Rich Salar de Huasco Altiplanic Ecosystem. *Microbiology Spectrum*, 9(1).
<https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.00444-21>
- Chaudhary, M. M., Hussain, S., Du, C., Conway, B. R., & Ghori, M. U. (2024). Arsenic in Water: Understanding the Chemistry, Health Implications, Quantification and Removal Strategies. *ChemEngineering*, 8(4), 78. <https://doi.org/10.3390/chemengineering8040078>
- Chen, Q. Y., & Costa, M. (2021). Arsenic: A Global Environmental Challenge. <https://doi.org/10.1146/Annurev-Pharmtox-030220-013418>, 61, 47–63.
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHARMTOX-030220-013418>
- Crognale, S., Amalfitano, S., Casentini, B., Fazi, S., Petruccioli, M., & 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>
- Danczak, R. E., Johnston, M. D., Kenah, C., Slattery, M., & Wilkins, M. J. (2019). Capability for arsenic mobilization in groundwater is distributed across broad phylogenetic lineages. *PLoS ONE*, 14(9).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221694>
- Deng, T., Qian, Y., Chen, X., Yang, X., Guo, J., Sun, G., & Xu, M. (2020). *Ciceribacter ferrooxidans* sp. nov., a nitrate-reducing Fe(II)-oxidizing bacterium isolated from ferrous ion-rich sediment. *The Journal Of Microbiology*, 58(5), 350–356. <https://doi.org/10.1007/s12275-020-9471-2>
- Drewniak, L., & Sklodowska, A. (2013a). 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>
- Eaton, A. D., Clesceri, L. S., & Greenberg, A. E. (Eds.). (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (20th ed.). American Public Health Association, American Water Works Association & Water Environment Federation.
- Escudero, L. V., Casamayor, E. O., Chong, G., Pedrós-Alió, C., & 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>

- Fashola, M. O., Ngole-Jeme, V. M., & Babalola, O. O. (2016). Heavy metal pollution from gold mines: Environmental effects and bacterial strategies for resistance. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 13, Number 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijerph13111047>
- Fernández, M., Udaondo, Z., Niqui, J. L., Duque, E., & Ramos, J. L. (2014). Synergic role of the two ars operons in arsenic tolerance in *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology Reports*, 6(5), 483–489. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12167>
- Feng, G., Zeng, Y., Wang, H., Chen, Y., & Tang, Y. (2023). Proteiniphilum and Methanotrix harundinacea became dominant acetate utilizers in a methanogenic reactor operated under strong ammonia stress. *Frontiers In Microbiology*, 13, 1098814. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1098814>
- Freikowski, D., Winter, J., & 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>
- Gorny, J., Billon, G., Lesven, L., Dumoulin, D., Madé, B., & Noiriél, C. (2015). Arsenic behavior in river sediments under redox gradient: A review. *Science of the Total Environment*, 505, 423–434. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.011>
- Hamood Altowayti, W. A., Almoalemi, H., Shahir, S., & 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>
- Hassan, Z., Braster, M., Röling, W. F. M., & Westerhoff, H. V. (2023). Microbes-Assisted Arsenate Reduction Activity in Bangladesh Drinking Water Wells as Revealed by Enrichment Cultivation. *Geomicrobiology Journal*, 40(2), 161–171. <https://doi.org/10.1080/01490451.2022.2133195>
- Hassan, Z., Sultana, M., van Breukelen, B. M., Khan, S. I., & Röling, W. F. M. (2015). Diverse arsenic- and iron-cycling microbial communities in arsenic-contaminated aquifers used for drinking water in Bangladesh. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(4), 1–9. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv026>
- Hoeft, S. E., Blum, J. S., Stolz, J. F., Tabita, F. R., Witte, B., King, G. M., Santini, J. M., & Oremland, R. S. (2007). *Alkalilimnicola ehrlichii* sp. nov., a novel, arsenite-oxidizing haloalkaliphilic gammaproteobacterium capable of chemoautotrophic or heterotrophic growth with nitrate or oxygen as the electron acceptor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(3), 504–512. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64576-0>
- Hu, L., Huang, F., Qian, Y., Ding, T., Yang, Y., Shen, D., & Long, Y. (2024). Pathways and contributions of sulfate reducing-bacteria to arsenic cycling in landfills. *Journal of Hazardous Materials*, 473, 134582. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2024.134582>
- Inskeep, W. P., Macur, R. E., Hamamura, N., Warelow, T. P., Ward, S. A., & Santini, J. M. (2007). Detection, diversity and expression of aerobic

- bacterial arsenite oxidase genes. *Environmental Microbiology*, 9(4). <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01215.x>
- James, K. A., Meliker, J. R., & Nriagu, J. O. (2016). Arsenic. In *International Encyclopedia of Public Health* (pp. 170–175). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803678-5.00025-4>
- Jiang, Z., Shen, X., Shi, B., Cui, M., Wang, Y., & Li, P. (2019). Arsenic mobilization in a high-arsenic groundwater revealed by metagenomic and genomic analyses. *Scientific Reports*, 9, 4924. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49365-w>
- Johnson, D. L., & Pilson, M. E. Q. (1972). *SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF ARSENITE, ARSENATE, AND PHOSPHATE IN NATURAL WATERS*.
- Joshi, D. N., Patel, A. J. S., Flora, A. S. J. S., & Kalia, A. K. (2008). Arsenic accumulation by *Pseudomonas stutzeri* and its response to some thiol chelators. <https://doi.org/10.1007/s12199-008-0038-9>
- Kabiraj, A., Biswas, R., Halder, U., & Bandopadhyay, R. (2022). Bacterial Arsenic Metabolism and Its Role in Arsenic Bioremediation. In *Current Microbiology* (Vol. 79, Number 5). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02810-y>
- Kumari, N., & Jagadevan, S. (2016). Genetic identification of arsenate reductase and arsenite oxidase in redox transformations carried out by arsenic metabolising prokaryotes – A comprehensive review. In *Chemosphere* (Vol. 163). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.044>
- Lebrun, E., Brugna, M., Baymann, F., Muller, D., Lièvremon, D., Lett, M. C., & Nitschke, W. (2003). Arsenite oxidase, an ancient bioenergetic enzyme. *Molecular Biology and Evolution*, 20(5), 686–693. <https://doi.org/10.1093/molbev/msg071>
- Li, C., Zong, G., Chen, X., Tan, M., Gao, W., Fu, J., Zhang, P., Wang, B., & Cao, G. (2023). Bifunctional protein ArsRM contributes to arsenite methylation and resistance in *Brevundimonas* sp. M20. *BMC Microbiology*, 23(1), 134. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02876-z>
- Lièvremon, D., Bertin, P. N., & 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>
- Lugtu, R. T., Choi, S. C., & Oh, Y. S. (2009). Arsenite oxidation by a facultative chemolithotrophic bacterium SDB1 isolated from mine tailing. *Journal of Microbiology*, 47(6). <https://doi.org/10.1007/s12275-009-0279-3>
- Macy, J. M., Santini, J. M., Pauling, B. V., O'Neill, A. H., & 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., & Villalobos, M. (2013). Arsenic mobility controlled by solid calcium arsenates: A case study in

- Mexico showcasing a potentially widespread environmental problem. *Environmental Pollution*, 176. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.12.025>
- Mazumder, P., Sharma, S. K., Taki, K., Kalamdhad, A. S., & Kumar, M. (2020). Microbes involved in arsenic mobilization and respiration: a review on isolation, identification, isolates and implications. *Environmental Geochemistry and Health*, 42(10), 3443–3469. <https://doi.org/10.1007/S10653-020-00549-8/FIGURES/5>
- Mirza, B. S., Sorensen, D. L., Dupont, R. R., & McLean, J. E. (2016). New Arsenate Reductase Gene (arrA) PCR Primers for Diversity Assessment and Quantification in Environmental Samples. *Applied And Environmental Microbiology*, 83(4). <https://doi.org/10.1128/aem.02725-16>
- Mukhopadhyay, R., & Rosen, B. P. (2002). *Arsenate reductases in prokaryotes and eukaryotes*. *Environmental Health Perspectives*, 110(Suppl. 5), 745–748. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110s5745>
- Newman, D. K., Ahmann, D., & Morel, F. M. M. (1998). A brief review of microbial arsenate respiration. *Geomicrobiology Journal*, 15(4), 255–268. <https://doi.org/10.1080/01490459809378082>
- Nguyen, V. K., Tran, H. T., Park, Y., Yu, J., & Lee, T. (2017). Microbial arsenite oxidation with oxygen, nitrate, or an electrode as the sole electron acceptor. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 44(6). <https://doi.org/10.1007/s10295-017-1910-7>
- Oremland, R. S., & Stolz, J. F. (2003). The ecology of arsenic. *Science*, 300(5621), 939–944. <https://doi.org/10.1126/science.1081903>
- Pandey, N., & Keshavkant, S. (2019). Characterization of arsenic resistant plant-growth promoting indigenous soil bacteria isolated from Center-East regions of India. *Journal of Basic Microbiology*, 59(8), 807–819. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800658>
- Plant, J. A., Bone, J., Voulvoulis, N., Kinniburgh, D. G., Smedley, P. L., Fordyce, F. M., & Klinck, B. (2014). Arsenic and Selenium. *Treatise on Geochemistry: Second Edition*, 11, 13–57. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-095975-7.00902-5>
- Raturi, G., Chaudhary, A., Rana, V., Mandlik, R., Sharma, Y., Barvkar, V., Salvi, P., Tripathi, D. K., Kaur, J., Deshmukh, R., & Dhar, H. (2023). Microbial remediation and plant-microbe interaction under arsenic pollution. In *Science of the Total Environment* (Vol. 864). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160972>
- Razo, I., Carrizales, L., Castro, J., Díaz-Barriga, F., & Monroy, M. (2004). Arsenic and heavy metal pollution of soil, water and sediments in a semi-arid climate mining area in Mexico. *Water, Air, and Soil Pollution*, 152(1–4). <https://doi.org/10.1023/B:WATE.0000015350.14520.c1>
- Ren, T., Chi, Y., Wang, Y., Shi, X., Jin, X., & Jin, P. (2021). Diversified metabolism makes novel *Thauera* strain highly competitive in low carbon wastewater treatment. *Water Research*, 206, 117742. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2021.117742>
- Rios-Valenciana, E. E., Briones-Gallardo, R., Cházaro-Ruiz, L. F., Martínez-Villegas, N., & Celis, L. B. (2017). Role of indigenous microbiota from heavily contaminated sediments in the bioprecipitation of arsenic. *Journal*

- of *Hazardous Materials*, 339, 114–121.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.06.019>
- Rios-Valenciana, E. E., & Celis, L. B. (2025). Bioprecipitation of arsenic sulfide nanofibers in synthetic groundwater by indigenous bacterial consortia from arsenic-polluted sediments. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 13(3), 117032. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2025.117032>
- Rios-Valenciana, E. E., Moreno-Perlin, T., Briones-Gallardo, R., Sierra-Alvarez, R., & 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>
- Rittmann, B. E., & McCarty, P. L. (2001). *Environmental biotechnology: Principles and applications*. New York: McGraw-Hill.
- Rueangmongkolrat, N., et al. (2024). *The role of microbiomes in cooperative detoxification mechanisms of arsenate reduction and arsenic methylation in surface agricultural soil*. PeerJ, 12, e18383. <https://doi.org/10.7717/peerj.18383>
- Sánchez-Andrea, I., Sanz, J. L., Bijmans, M. F., & Stams, A. J. (2014). Sulfate reduction at low pH to remediate acid mine drainage. *Journal Of Hazardous Materials*, 269, 98-109. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.12.032>
- Saltikov, C. W., & Newman, D. K. (2003). *Genetic identification of a respiratory arsenate reductase*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100(19), 10983–10988. <https://doi.org/10.1073/pnas.1834303100>
- Secretaría de Salud. (2022). *Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-2021, agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de la calidad del agua*. Diario Oficial de la Federación.
- Semenova, E., Grouzdev, D., Sokolova, D., Tourova, T., Poltarau, A., Potekhina, N., Shishina, P., Bolshakova, M., Avtukh, A., Ianutsevich, E., Tereshina, V., & Nazina, T. (2022). Physiological and Genomic Characterization of *Actinotalea subterranea* sp. nov. from Oil-Degrading Methanogenic Enrichment and Reclassification of the Family Actinotaleaceae. *Microorganisms*, 10(2), 378. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020378>
- Serrano, A. E., Escudero, L. V., Tebes-Cayo, C., Acosta, M., Encalada, O., Fernández-Moroso, S., & Demergasso, C. (2017). First draft genome sequence of a strain from the genus *Fusibacter* isolated from Salar de Ascotán in Northern Chile. *Standards In Genomic Sciences*, 12(1), 43. <https://doi.org/10.1186/s40793-017-0252-4>
- Sevak, P., & Pushkar, B. (2023). Bacterial responses towards arsenic toxicity and in-depth analysis of molecular mechanism along with possible on-field application. In *Journal of Environmental Chemical Engineering* (Vol. 11, Number 4). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.110187>
- Sevak, P., & Pushkar, B. (2024). Arsenic pollution cycle, toxicity and sustainable remediation technologies: A comprehensive review and bibliometric analysis. *Journal of Environmental Management*, 349, 119504. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2023.119504>

- Shaji, E., Santosh, M., Sarath, K. V., Prakash, P., Deepchand, V., & Divya, B. V. (2021). Arsenic contamination of groundwater: A global synopsis with focus on the Indian Peninsula. *Geoscience Frontiers*, 12(3). <https://doi.org/10.1016/j.gsf.2020.08.015>
- Shinoda, K., Tanno, T., Nakata, Y., & Suzuki, S. (2023). Characterization of the Incorporation and Adsorption of Arsenate and Phosphate Ions into Iron Oxides in Aqueous Solutions. *Materials Transactions*, 64(2), 307–317. <https://doi.org/10.2320/matertrans.MT-M2022104>
- Smedley, P. L., & Kinniburgh, D. G. (2002). A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry*, 17(5), 517–568. [https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(02\)00018-5](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(02)00018-5)
- Song, B., Chyun, E., Jaffé, P. R., & Ward, B. B. (2009). Molecular methods to detect and monitor dissimilatory arsenate-respiring bacteria (DARB) in sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, 68(1), 108–117. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00657.x>
- Song, W., Deng, Q., Bin, L., Wang, W., & Wu, C. (2012). Arsenite oxidation characteristics and molecular identification of arsenic-oxidizing bacteria isolated from soil. *Applied Mechanics and Materials*, 188, 313–318. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.188.313>
- Sonthiphand, P., Rattanaroongrot, P., Mek-yong, K., Kusonmano, K., Rangsiwutisak, C., Uthaipaisanwong, P., Chotpantararat, S., & Termsaithong, T. (2021). Microbial community structure in aquifers associated with arsenic: analysis of 16S rRNA and arsenite oxidase genes. *PeerJ*, 9, e10653. <https://doi.org/10.7717/peerj.10653>
- Stolz, J. F., & Oremland, R. S. (1999). *Bacterial respiration of arsenic and selenium*. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(5), 615–627. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1999.tb00416.x>
- Sun, W., Sierra, R., & Field, J. A. (2008). Anoxic oxidation of arsenite linked to denitrification in sludges and sediments. *Water Research*, 42(17). <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.08.004>
- Sun, Y., Polishchuk, E. A., Radoja, U., & Cullen, W. R. (2004). Identification and quantification of *arsC* genes in environmental samples by using real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 58(3), 335–349. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.04.015>
- Valenzuela, C., Moraga, R., Leon, C., Smith, C. T., Mondaca, M.-A., & Campos, V. L. (2015). *Arsenite Oxidation by Pseudomonas arsenicoxydans Immobilized on Zeolite and Its Potential Biotechnological Application*. <https://doi.org/10.1007/s00128-015-1495-7>
- Vera-Espíndola, F., Jeison, D., Gentina, J. C., Muñoz, J., & González, E. (2024). Reviewing arsenic biomineralization: An upcoming strategy for mining wastewater treatment. *Science of The Total Environment*, 954, 176538. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2024.176538>
- Vieto, S., Rojas-Gätjens, D., Jiménez, J. I., & Chavarria, M. (2021). *The potential of Pseudomonas for bioremediation of oxyanions*. *Environmental Microbiology Reports*, 13(6), 773–789. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12999>

- Wang, J., Wan, J., Wu, Z., Li, Hongli, Li, Haisong, Dagot, C., & Wang, Y. (2017). Flexible biological arsenite oxidation utilizing NO_x and O₂ as alternative electron acceptors. *Chemosphere*, 178, 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.044>
- Warelow, T. P., Oke, M., Schoepp-Cothenet, B., Dahl, J. U., Bruselat, N., Sivalingam, G. N., Leimkühler, S., Thalassinos, K., Kappler, U., Naismith, J. H., & Santini, J. M. (2013). *The respiratory arsenite oxidase: Structure and the role of residues surrounding the Rieske cluster*. PLoS ONE, 8(8), e72535. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072535>
- World Health Organization. (2022). *Guidelines for drinking-water quality: Fourth edition*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240045064>
- Xu, R., Huang, D., Sun, X., Zhang, M., Wang, D., Yang, Z., Jiang, F., Gao, P., Li, B., & Sun, W. (2021). Diversity and metabolic potentials of As(III)-oxidizing bacteria in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(23). <https://doi.org/10.1128/AEM.01769-21>
- Zecchin, S., Crognale, S., Zaccheo, P., Fazi, S., Amalfitano, S., Casentini, B., Callegari, M., Zanchi, R., Sacchi, G. A., Rossetti, S., & 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, J.-H., Zhang, X., Ni, Y.-Q., Yang, X.-J., & Li, H.-Y. (2007). *Bioleaching of arsenic from medicinal realgar by pure and mixed cultures*. *Process Biochemistry*, 42(9), 1265–1271
- Zhang, J., Liu, J., Zheng, F., Yu, M., Shabala, S., & Song, W. Y. (2022). Comparative Analysis of Arsenic Transport and Tolerance Mechanisms: Evolution from Prokaryote to Higher Plants. In *Cells* (Vol. 11, Number 17). <https://doi.org/10.3390/cells11172741>
- Zhang, L., Qin, X., Tang, J., Liu, W., & 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, S.-Y., Zhao, F.-J., Sun, G.-X., Su, J.-Q., Yang, X.-R., Li, H., & Zhu, Y.-G. (2015). Diversity and abundance of arsenic biotransformation genes in paddy soils from southern China. *Environmental Science and Technology*, 49(7), 4138–4146. <https://doi.org/10.1021/ACS.EST.5B00028>
- Zhang, Z., Zhang, C., Yang, Y., Zhang, Zhuowei, Tang, Y., Su, P., & Lin, Z. (2022). A review of sulfate-reducing bacteria: Metabolism, influencing factors and application in wastewater treatment. *Journal of Cleaner Production*, 376, 134109. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.134109>
- Zhu, Y.-G., Xue, X.-M., Kappler, A., Rosen, B. P., Meharg, A. A., Sci, E., & Author, T. (2017). Linking Genes to Microbial Biogeochemical Cycling: Lessons from Arsenic HHS Public Access Author manuscript. *Environ Sci Technol*, 51(13), 7326–7339. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00689>
- Zhu, Y.-G., Yoshinaga, M., Zhao, F.-J., & 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>

Zhuang, F., Huang, J., Li, H., Peng, X., Xia, L., Zhou, L., Zhang, T., Liu, Z., He, Q., Luo, F., Yin, H., & Meng, D. (2023). Biogeochemical behavior and pollution control of arsenic in mining areas: A review. *Frontiers In Microbiology*, 14, 1043024. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1043024>

Anexos

Anexo 1. Programas usados para la PCR de los genes involucrados en la oxidación y reducción de arsénico (*arrA*, *arsC*, *aioA*). Diseño de los primers universales.

Las concentraciones finales de los reactivos en la mezcla para las PCR (25 µL) fueron: Buffer 1X, MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 0.2 mM, primers 0.25 µM y Taq polimerasa 0.05 U/µL, además, se adicionaron 3 µL de DNA molde diluido 1:5.

Para el gen *arrA* se realizó la PCR con los primers CVF1-CVR1 con un programa modificado de Mirza et al., (2007) llamado 4ERVARRA dentro del termociclador.

Para el diseño de los primers se usaron 762 secuencias de *arrA*, incluyendo secuencias de organismos cultivados y no cultivados (Mirza et al., 2017).

Tabla A1. Condiciones de la PCR para la amplificación del gen *arrA*. Modificado de Mirza et al., (2007).

CVF1-CVR1

DESNATURALIZACIÓN INICIAL	3 min	95 °C
40	cycles	
DESNATURALIZACIÓN	45 s	94 °C
ALINEAMIENTO	45 s	60 °C
EXTENSIÓN	60 s	72°C
EXTENSIÓN FINAL	7 min	72°C

Tabla A2. Condiciones de la PCR para amplificación del gen *arsC*. Modificado de Escudero et al., (2013). En el termociclador BioRad C1000 el programa se llama *arsC-Trx1a*. Para el diseño de los primers se usaron 6 pares de primers que se obtuvieron a partir de secuencias bacterianas de *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*, *Geobacillus kaustophilus*, *Bacillus clausii*, *Oceanobacillus iheyensis* y *Bacillus halodurans* (Escudero et al., 2013).

ARSC4F-ARSC4R

DESNATURALIZACIÓN INICIAL	5 min	95 °C
35	cycles	
DESNATURALIZACIÓN	90 s	95 °C
ALINEAMIENTO	90 s	54 °C
EXTENSIÓN	3 min	72°C
EXTENSIÓN FINAL	5 min	72°C

Tabla A3. Condiciones de la PCR para la amplificación del gen *aioA* Tomado de Zhang et al. (2015). El programa se identifica con el nombre de AIOAKTC en el termociclador BioRadC1000. Para el diseño de los primers se usaron regiones conservadas de genes presentes en las siguientes especies bacterianas *Rhizobium* sp. str. NT26 (AARO5656), *Thermus thermophilus* str. HB8 (BAD71923), *Chloroflexus aurantiacus* (ZP_00356732), *Hermimiimonas arsenicoxydans* (ULPAs1) (AAN05581), *Alcaligenes faecalis* (AAQ19838), *Thiomonas* sp. str. VB-2002 (CAD53341), y *Agrobacterium tumefaciens* str. 5A (ABB51928) (Inskeep et al., 2007).

AROAF-AROAR

DESNATURALIZACIÓN INICIAL	5 min	95°C
40	cycles	
DESNATURALIZACIÓN	30 s	95°C
ALINEAMIENTO	35 s	60°C
EXTENSIÓN	1 min	72°C
EXTENSIÓN FINAL	10 min	72°C

Anexo 2. Programa usado para la PCR del gen 16S ARNr

Tabla A4. Programa usado para la PCR del gen 16S ARNr

ARNr 16S

DESNATURALIZACIÓN INICIAL	4 min	95°C
35	cycles	
DESNATURALIZACIÓN	60 s	95°C
ALINEAMIENTO	60 s	54°C
EXTENSIÓN	3 min	72°C
EXTENSIÓN FINAL	7 min	72°C