



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Magíster en Ciencias con Mención Microbiología

**Abatimiento de la toxicidad de compuestos arsenicales
presentes en suelos agrícolas, a través de un sistema
de tratamiento biológico aeróbico secuencial**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias con Mención
Microbiología

JAVIERA FRANCISCA RAVANAL PINEDA
CONCEPCIÓN-CHILE
2018

Profesor Guía: Víctor Campos Araneda
Dpto. de Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

©2018, JAVIERA FRANCISCA RAVANAL PINEDA

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.



Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dr. Víctor Campos Araneda
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

Dr. Carlos Smith
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción



Dr. Miguel Martínez Poblete
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Víctor Hernández
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Director de Programa

Dr. Víctor Campos Araneda
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción



“El techo de cristal en ciencia se ha movido, pero no se ha roto”
M^a Ángeles Durán

A mi familia, en especial a mis sobrinas, a quienes espero enseñarles que
“No hay barrera, cerradura, ni cerrojo que puedas imponer
a la libertad de mi mente”
Virginia Woolf

AGRADECIMIENTOS

Desde siempre, transitar por el camino de un postgrado ha sido un enorme desafío personal, profesional y académico. Para mí, el desarrollo de este magíster ha sido el período de mi vida de mayor aprendizaje y crecimiento personal. Viví los momentos más difíciles y también lo más felices. Culminar este periodo con cuentas positivas, ha sido gracias a que en este camino ha habido personas que me enseñaron, me apoyaron, me tendieron su mano y me brindaron su amistad.

En primer lugar, agradezco al Dr. Víctor Campos, tutor de esta tesis, por darme la oportunidad de continuar trabajando en las investigaciones desarrolladas en el Laboratorio de Microbiología Ambiental durante la ejecución de mi postgrado. Por su apoyo, guía y generosidad.

A la Dra. María Angélica Mondaca, tutora de mi tesis de pregrado, quien me dio la oportunidad de integrar el equipo de investigación del Laboratorio de Microbiología Ambiental. Por su compromiso en el desarrollo de mi trabajo, por su paciencia, preocupación y, especialmente, por sus consejos y apoyo cuándo postulé por primera vez al programa de magíster y decidí esperar un año para postular nuevamente.

A la Dra. Carla León, por brindarme su apoyo y amistad en los momentos difíciles, en los momentos confusos y en los momentos felices. Por su apoyo científico-académico en el desarrollo de mi trabajo, por su gran disposición y colaboración.

A quienes fueron y son mis compañeros y amigos del Laboratorio de Microbiología Ambiental. En especial a Luis Pereira, por su cariño, su interés constante en colaborar y discutir ideas científicas y políticas. A Cristian Valenzuela, por las tantas conversaciones y por tener siempre una actitud agradable. A Benner Giacomozzi, por ser mi amigo durante su paso por el laboratorio y enseñarme lo que sé sobre curvas de crecimiento, calidad de agua

y rigurosidad experimental. A Juan Pablo Cuevas por su simpatía y compañía durante las interminables horas de trabajo. A Verónica Albornoz, por su carisma, ayuda y disposición.

A mis compañeros de magíster por los gratos momentos vividos a pesar del cansancio. Especialmente a Cristian Tapia, Romina Carvajal y Javiera Llanos.

A las funcionarias y funcionarios de la Facultad de Ciencias Biológicas y el Departamento de Microbiología. Por su fundamental trabajo, su cordialidad y su trato siempre cariñoso.

A mis Bioamigos, me siento inmensamente agradecida por su apoyo, empatía y presencia en los momentos agotadores.

A mis amigos, especialmente a Camila, Pedro y Daniela. Gracias por escucharme, quererme, retarme, apoyarme, reír y llorar conmigo.

A mis abuelas(os), tías(os) y primas(os), por siempre estar pendientes e interesados en lo que estaba realizando.

Agradezco a Juan, especialmente por ser mi apoyo emocional durante el periodo más difícil del desarrollo de este postgrado. Por compartir conmigo su paciencia y su amor. Por ser mi amigo y compañero en igualdad.

A mis sobrinas, por enseñarme que se puede amar a alguien por el simple hecho de existir. Por enseñarme que las niñas y niños deben ser tratados como personas independientes y por motivarme a aprender más sobre educación y desarrollo cognitivo.

A mis padres y a mi hermana, por su amor y apoyo incondicional. Por enseñarme a ser independiente, fuerte y que lo más importante es la felicidad. Por creer en mí y darme la confianza para soñar. Mi cimiento como persona son ustedes y son a quienes más amo.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xviii
RESUMEN	xxii
ABSTRACT	xxv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Arsénico orgánico e inorgánico	4
2. Introducción de arsénico al ambiente por la industria avícola	6
3. Introducción de arsénico al ambiente por la agricultura.....	12
4. Arsénico en suelos de cultivo	17
5. Ciclo Biogeoquímico del arsénico	20
6. Transformación biológica de compuestos organoarsenicales.....	25
7. Transformación bacteriana de arsénico inorgánico	28
8. Precipitación de carbonato de calcio inducida por microorganismos (MICP).....	34
9. Biomineralización acoplada a la oxidación de arsenito e interacción calcita-arsénico	35
10. Tratamiento biológico de aguas contaminadas con arsénico	38
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	43
11. Hipótesis	43
12. Objetivos	45

III. METODOLOGÍA	46
13. Caracterización del consorcio bacteriano crecido en presencia de compuestos organoarsenicales	46
13.1 Consorcio Bacteriano	46
13.2 Condiciones de cultivo del consorcio bacteriano	48
13.3 Cinética de crecimiento del consorcio bacteriano	49
13.4 Reducción de compuestos organoarsenicales	49
14. Caracterización de la actividad ureolítica-calcificante y arsenito-oxidante de <i>Pseudomonas arsenicoxydans</i>	50
14.1 <i>Pseudomonas arsenicoxydans</i>	50
14.2 Actividad ureolítica de <i>P. arsenicoxydans</i>	51
14.3 Precipitación de calcita microbiológicamente inducida (MICP) por <i>P. arsenicoxydans</i>	52
14.4 Condiciones de cultivo de <i>P. arsenicoxydans</i>	53
14.5 Cultivos de <i>P. arsenicoxydans</i> en estado planctónico	53
14.6 Cultivos de <i>P. arsenicoxydans</i> en estado sésil	55
14.7 Cinética de crecimiento de <i>P. arsenicoxydans</i>	56
14.8 Capacidad de remover arsénico de <i>P. arsenicoxydans</i>	57
14.9 Biopelícula y cristales de calcita formados durante la MICP	57
14.10 Cultivo de <i>P. arsenicoxydans</i> en presencia de efluente abatido por consorcio bacteriano	58
15. Sistema de tratamiento biológico aeróbico secuencial	59

15.1	Cinéticas de crecimiento del consorcio bacteriano y <i>P. arsenicoxydans</i>	61
15.2	Reducción de compuestos organoarsenicales y oxidación/co-precipitación de arsénico.....	61
15.3	Análisis de la biopelícula del biorreactor semi-continuo.....	62
15.4	Evaluación de la toxicidad del efluente final del sistema de tratamiento biológico aeróbico secuencial	63
16.	Determinación analítica de cinéticas de aparición y oxidación de arsénico a través de HPLC-HG-AAS	64
17.	Análisis estadísticos y parámetros cinéticos.....	65
IV.	RESULTADOS.....	67
18.	Caracterización de Consorcio bacteriano	67
18.1	Cinética de crecimiento del consorcio bacteriano en presencia de compuestos organoarsenicales.....	67
18.2	Reducción de compuestos organoarsenicales mediada por el consorcio bacteriano	71
19.	<i>Pseudomonas arsenicoxydans</i>	76
19.1	Actividad ureolítica y precipitación de CaCO ₃ de <i>P. arsenicoxydans</i>	76
19.2	Cinética de crecimiento y de remoción de arsénico por <i>P. arsenicoxydans</i> en estado planctónico en presencia de arsénico inorgánico	80

19.3 Cinética de crecimiento de <i>P. arsenicoxydans</i> en estado planctónico y en presencia de arsénico orgánico	87
19.4 Cinética de crecimiento y de remoción de arsénico de <i>P. arsenicoxydans</i> en estado sésil y en presencia de arsénico inorgánico.....	90
20. Sistema de tratamiento aeróbico secuencial	103
20.1 Cinéticas de crecimiento del consorcio bacteriano y de <i>P. arsenicoxydans</i>	103
20.2 Transformación de compuestos arsenicales orgánicos e inorgánicos.....	107
20.3 Evaluación de la toxicidad en el sistema de tratamiento aeróbico secuencial.....	117
V. DISCUSIÓN	120
21. Crecimiento del consorcio bacteriano y transformación de organoarsenicales.....	120
22.Crecimiento de <i>P. arsenicoxydans</i> y oxidación/co-precipitación de arsénico	126
23. Sistema de tratamiento aeróbico secuencial	144
VI. CONCLUSIONES	148
VII. PROYECCIONES	149
VIII. REFERENCIAS	150

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros cinéticos de crecimiento del consorcio bacteriano cultivado en presencia de ROX (0.5 mM), NIT (0.5 mM), MSMA (0.5 mM) y ROX-NIT-MSMA (0.5 mM cada uno).....	69
Tabla 2. Test de Tukey de comparación múltiple de las velocidades máximas de crecimiento (k) del consorcio bacteriano cultivado en presencia de ROX (0.5 mM), NIT (0.5 mM), MSMA (0.5 mM) y ROX-NIT-MSMA (0.5 mM cada uno).....	70
Tabla 3. Parámetros cinéticos de aparición de arsénico inorgánico a partir de la reducción de compuestos organoarsenicales mediada por el consorcio bacteriano cultivado en presencia de ROX (0.5 mM), NIT (0.5 mM), MSMA (0.5 mM) y ROX-NIT-MSMA (0.5 mM cada uno).....	73
Tabla 4. Concentración relativa (C/C_0) de los compuestos organoarsenicales a partir de la reducción mediada por el consorcio bacteriano cultivado en presencia de ROX (0.5 mM), NIT (0.5 mM), MSMA (0.5 mM) y ROX-NIT-MSMA (0.5 mM cada uno).....	73
Tabla 5. Test de Tukey de comparación múltiple de las concentraciones relativas (C/C_0) de los compuestos organoarsenicales a partir de la reducción mediada por el consorcio bacteriano cultivado en presencia de ROX (0.5 mM), NIT (0.5 mM), MSMA (0.5 mM) y ROX-NIT-MSMA (0.5 mM cada uno).....	74

Tabla 6. Compuestos organoarsenicales transformados a arsénico inorgánico a partir de la reducción mediada por el consorcio bacteriano cultivado en presencia de ROX (0.5 mM), NIT (0.5 mM), MSMA (0.5 mM) y ROX-NIT-MSMA (0.5 mM cada uno).....	75
Tabla 7. Test de Tukey de comparación múltiple del porcentaje de organoarsenical transformado a arsénico inorgánico a partir de la reducción mediada por el consorcio bacteriano cultivado en presencia de ROX (0.5 mM), NIT (0.5 mM), MSMA (0.5 mM) y ROX-NIT-MSMA (0.5 mM cada uno).....	76
Tabla 8. Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>P. arsenicoxydans</i> cultivada en estado planctónico en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y en presencia de As(III) (0.5 mM), As(V) (0.5 mM) y As(III)-As(V) (0.5 mM cada uno).....	82
Tabla 9. Parámetros cinéticos de remoción de arsénico a partir de la oxidación de arsenito y co-precipitación de calcita-arsénico mediada por <i>P. arsenicoxydans</i> cultivada en estado planctónico en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y en presencia de As(III) (0.5 mM), As(V) (0.5 mM) y As(III)-As(V) (0.5 mM cada uno).....	85
Tabla 10. Concentración relativa (C/C_0) de arsénico inorgánico a partir de la oxidación de arsenito y co-precipitación de calcita-arsénico mediada por <i>P. arsenicoxydans</i> cultivada en estado planctónico en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y en presencia de As(III) (0.5 mM), As(V) (0.5 mM) y As(III)-As(V) (0.5 mM cada uno).....	85

Tabla 11. Test de Tukey de comparación múltiple de las concentraciones relativas (C/C_0) de arsénico inorgánico a partir de la oxidación de arsenito y co-precipitación de calcita-arsénico mediada por *P. arsenicoxydans* cultivada en estado planctónico en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y en presencia de As(III) (0.5 mM), As(V) (0.5 mM) y As(III)-As(V) (0.5 mM cada uno).....86

Tabla 12. Arsénico total removido del medio a partir de la oxidación de arsenito y co-precipitación de calcita-arsénico mediada por *P. arsenicoxydans* cultivada en estado planctónico en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y en presencia de As(III) (0.5 mM), As(V) (0.5 mM) y As(III)-As(V) (0.5 mM cada uno).....87

Tabla 13. Parámetros cinéticos de crecimiento de *P. arsenicoxydans* cultivada en estado planctónico en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y en presencia de ROX (0.5 mM), NIT (0.5 mM), MSMA (0.5 mM), ROX-NIT-MSMA (0.5 mM cada uno).....90

Tabla 14. Parámetros cinéticos de crecimiento de la biopelícula de *P. arsenicoxydans* cultivada en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y en presencia de As(III) (0.5 mM), As(V) (0.5 mM) y As(III)-As(V) (0.5 mM cada uno).....92

Tabla 15. Parámetros cinéticos de remoción de arsénico a partir de la oxidación de arsenito y co-precipitación de calcita-arsénico mediada por la biopelícula de *P. arsenicoxydans* cultivada en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y

en presencia de As(III) (0.5 mM), As(V) (0.5 mM) y As(III)-As(V) (0.5 mM cada uno)..... 95

Tabla 16. Concentración relativa (C/C_0) de arsénico inorgánico a partir de la oxidación de arsenito y co-precipitación de calcita-arsénico mediada por la biopelícula de *P. arsenicoxydans* cultivada en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y en presencia de As(III) (0.5 mM), As(V) (0.5 mM) y As(III)-As(V) (0.5 mM cada uno).....95

Tabla 17. Test de Tukey de comparación múltiple de las concentraciones relativas (C/C_0) de arsénico inorgánico a partir de la oxidación de arsenito y co-precipitación de calcita-arsénico mediada por la biopelícula de *P. arsenicoxydans* cultivada en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y en presencia de As(III) (0.5 mM), As(V) (0.5 mM) y As(III)-As(V) (0.5 mM cada uno).....96

Tabla 18. Arsénico total removido del medio a partir de la oxidación de arsenito y co-precipitación de calcita-arsénico mediada por la biopelícula de *P. arsenicoxydans* cultivada en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y en presencia de As(III) (0.5 mM), As(V) (0.5 mM) y As(III)-As(V) (0.5 mM cada uno).....97

Tabla 19. Parámetros cinéticos de crecimiento del consorcio bacteriano cultivado en el reactor discontinuo y en presencia de una mezcla de ROX (0.5 mM), NIT (0.5 mM) y MSMA (0.5 mM) (concentraciones finales). El tiempo de operación total del reactor fue de 144 h.....105

Tabla 20. Parámetros cinéticos de crecimiento de la biopelícula de <i>P. arsenicoxydans</i> cultivada en el reactor semi-continuo implementado con medio Battaglia-Brunet modificado para MICP. Los parámetros cinéticos fueron obtenidos a partir del análisis de los datos de las primeras 96 horas de funcionamiento del reactor.....	107
Tabla 21. Parámetros cinéticos de la aparición de arsénico inorgánico a partir de la reducción de compuestos organoarsenicales mediada por el consorcio bacteriano cultivado en el reactor discontinuo en presencia de una mezcla de en presencia de una mezcla de ROX (0.5 mM), NIT (0.5 mM) y MSMA (0.5 mM) (concentraciones finales). El tiempo de operación total del reactor fue de 144 horas.....	109
Tabla 22. Compuestos organoarsenicales transformados a arsénico inorgánico a partir de la reducción mediada por el consorcio bacteriano cultivado en el reactor discontinuo en presencia de una mezcla de en presencia de una mezcla de ROX (0.5 mM), NIT (0.5 mM) y MSMA (0.5 mM) (concentraciones finales). El tiempo de operación total del reactor fue de 144 h.....	110
Tabla 23. Parámetros cinéticos de la remoción de arsénico inorgánico a partir de la oxidación de arsenito y co-precipitación de calcita-arsénico mediada por la biopelícula de <i>P. arsenicoxydans</i> cultivada en el reactor semi-continuo. Los parámetros fueron obtenidos a partir de la cinética de remoción desde las 288 h (última renovación de afluente que se realizó utilizando una solución de medio Battaglia-Brunet modificado para MICP (88% v/v) y el efluente proveniente del	

reactor discontinuo del consorcio bacteriano (12% v/v)) hasta las 408 h de operación del reactor.....115

Tabla 24. Arsénico total removido del medio a partir de la oxidación de arsenito y co-precipitación de calcita-arsénico mediada por la biopelícula de *P. arsenicoxydans* cultivada en el reactor semi-continuo desde las 288 h (última renovación de afluente que se realizó utilizando una solución de medio Battaglia-Brunet modificado para MICP (88% v/v) y el efluente proveniente del reactor discontinuo del consorcio bacteriano (12% v/v)) hasta las 408 h de operación del reactor.....116



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de metilación, desmetilación y detoxificación del arsénico.....	27
Figura 2. Organización de los clúster genéticos relacionados al arsénico, observados en diferentes procariotas.....	33
Figura 3. Microfotografía del consorcio bacteriano después de 48 h de incubación, obtenida por microscopía electrónica de barrido (SEM).....	47
Figura 4. Microfotografía de <i>P. arsenicoxydans</i> , mostrando los múltiples flagelos polares de la cepa, obtenida por microscopía electrónica de barrido.....	51
Figura 5. Sistema de tratamiento biológico aeróbico secuencial de dos etapas para el abatimiento de la toxicidad de compuestos arsenicales.....	60
Figura 6. Cinética de crecimiento del consorcio bacteriano cultivado en presencia de compuestos organoarsenicales.....	68
Figura 7. Cinética de aparición de arsénico inorgánico a partir de la reducción de compuestos organoarsenicales mediada por el consorcio bacteriano.....	72

Figura 8. Actividad ureolítica de <i>P. arsenicoxydans</i> en Agar Base Christensen.....	78
Figura 9. Cristales de calcita precipitados por <i>P. arsenicoxydans</i> luego de 24 h de incubación.....	79
Figura 10. Cinética de crecimiento de <i>P. arsenicoxydans</i> cultivada en estado planctónico en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y en presencia de arsénico inorgánico.....	81
Figura 11. Cinética de remoción de arsénico a partir de la oxidación de arsenito y co-precipitación de calcita-arsénico mediada por <i>P. arsenicoxydans</i> cultivada en estado planctónico en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y en presencia de As(III) (0.5 mM), As(V) (0.5 mM) y As(III)-As(V) (0.5 mM cada uno).....	84
Figura 12. Cinética de crecimiento de <i>P. arsenicoxydans</i> cultivada en estado planctónico en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y en presencia de compuestos organoarsenicales.	89
Figura 13. Cinética de crecimiento de la biopelícula de <i>P. arsenicoxydans</i> cultivada en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y en presencia de arsénico inorgánico.....	91
Figura 14. Cinética de remoción de arsénico a partir de la oxidación de arsenito y co-precipitación de calcita-arsénico mediada por la biopelícula de <i>P. arsenicoxydans</i> cultivada en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y en presencia de de As(III) (0.5 mM), As(V) (0.5 mM) y As(III)-As(V) (0.5 mM cada uno).....	94

Figura 15. Microfotografía de la biopelícula formada por <i>P. arsenicoxydans</i> cultivada en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y en presencia de arsénico inorgánico, obtenida mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).....	99
Figura 16. Detección de arsénico y calcio en la biopelícula de <i>P. arsenicoxydans</i> cultivada en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y en presencia de arsénico inorgánico, a través espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS).....	100
Figura 17. Crecimiento de <i>P. arsenicoxydans</i> en presencia de concentraciones crecientes (6, 12, 25, 50, 70 y 100% v/v) del efluente del consorcio bacteriano (ECB).....	102
Figura 18. Cinética de crecimiento del consorcio bacteriano cultivado en el reactor discontinuo y en presencia de compuestos organoarsenicales.....	104
Figura 19. Cinética de crecimiento de la biopelícula de <i>P. arsenicoxydans</i> cultivada en el reactor semi-continuo implementado con medio Battaglia-Brunet modificado para MICP	106
Figura 20. Cinética de aparición de arsénico inorgánico a partir de la reducción de compuestos organoarsenicales mediada por el consorcio bacteriano cultivado en el reactor discontinuo.	108
Figura 21. Fluctuación de la concentración de arsénico inorgánico en el medio de cultivo (fase líquida) durante las primeras 240 horas de operación del reactor semi-continuo donde la biopelícula de <i>P. arsenicoxydans</i> fue cultivada en medio	

Battaglia-Brunet modificado para MICP.....	112
Figura 22. Fluctuación de la concentración de arsénico inorgánico en el medio de cultivo (fase líquida) durante el tiempo total de operación del reactor semi-continuo donde la biopelícula de <i>P. arsenicoxydans</i> fue cultivada en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP.....	113
Figura 23. Cinética de remoción de arsénico inorgánico a partir de la oxidación de arsenito y co-precipitación de calcita-arsénico mediada por la biopelícula de <i>P. arsenicoxydans</i> cultivada en el reactor semi-continuo.....	114
Figura 24. Viabilidad de células endoteliales de venas de cordón umbilical humano (HUVEC, por su nombre en inglés Human Umbilical Vein Endothelial Cells) en presencia de los afluentes y el efluente final del sistema de tratamiento biológico aeróbico secuencial.....	118

RESUMEN

Durante muchos años, compuestos orgánicos que contienen arsénico en su estructura (organoarsenicales) han sido utilizados como aditivos alimenticios en la industria avícola. Utilizar el estiércol de las aves como fertilizante en cultivos, es una práctica común que aumenta la concentración de arsénico en los suelos, ya que los organoarsenicales se liberan inalterados en las heces de los animales. En la agricultura, durante décadas se utilizaron pesticidas inorgánicos y orgánicos de arsénico en cultivos. El impacto generado en este período ha sido el aumento de la concentración de arsénico en los suelos. Actualmente aún se permite el uso de algunos pesticidas como el metanoarsenato monosódico y en países asiáticos aún se utilizan compuestos organoarsenicales en la industria avícola.

En el suelo, los compuestos organoarsenicales sufren transformaciones mediadas por microorganismos produciendo arsénico inorgánico, principalmente arsenito (As(III)) y arseniato (As(V)), siendo el primero más tóxico, soluble y móvil. Debido a su naturaleza, estas especies de arsénico pueden lixiviar o movilizarse por escorrentía, llegando a fuentes hidrológicas de uso humano y generar problemas sanitarios, pues el arsénico es carcinogénico y se asocia a enfermedad cardiovascular, hiperqueratosis y déficit neurocognitivo.

La transformación biológica de organoarsenicales mediada por microorganismos, es una alternativa para el abatimiento de estos compuestos desde el suelo y/o el agua. Sin embargo, se genera arsenito y arseniato como productos de estas transformaciones por lo que es necesario desarrollar alternativas que logren abatir tanto los compuestos organoarsenicales, como el arsénico inorgánico generado.

La precipitación de carbonato de calcio mediada por microorganismos (MICP), específicamente por bacterias ureolíticas, es un proceso mediante el

cual bacterias metabolizan la urea generando amonio y bicarbonato, provocando un aumento del pH en el medio extracelular. Si existen iones calcio en el medio, se desencadena la precipitación de carbonato de calcio o Calcita, que es un mineral con la capacidad de adsorber y/o co-precipitar arsénico inorgánico, principalmente arseniato.

El objetivo de esta investigación fue implementar un sistema de tratamiento biológico aeróbico secuencial para el abatimiento de la toxicidad de compuestos arsenicales. Para ello, se caracterizó la reducción de compuestos organoarsenicales a arsénico inorgánico, por un consorcio bacteriano utilizando los parámetros cinéticos obtenidos mediante curvas de crecimiento, y curvas de reducción de mediante la detección de arsénico inorgánico. Luego, se caracterizó la producción de calcita y la oxidación/co-precipitación de arsénico inorgánico por *Pseudomonas arsenicoxydans* en un medio de cultivo modificado para la MICP utilizando los parámetros cinéticos obtenidos mediante curvas de crecimiento en estado planctónico y sésil. Finalmente, se implementó un sistema de tratamiento biológico aeróbico secuencial a escala de laboratorio, para estudiar el abatimiento de la toxicidad de arsénico de un afluyente artificial suplementado con arsénico orgánico. Este sistema de tratamiento se dividió en 2 etapas, la primera fue un sistema discontinuo donde se cultivó el consorcio bacteriano aeróbico con el fin de reducir los compuestos organoarsenicales roxarsona, nitarsona y metanoarsenato monosódico, hasta arsénico inorgánico. En la segunda etapa, el efluente del primer sistema fue alimentado en un sistema semi-continuo en el que se cultivó *P. arsenicoxydans* en un medio modificado para la MICP, con el fin de abatir el arsénico presente en el efluente mediante la simultánea oxidación de arsenito y co-precipitación de arsénico en la calcita producida a través de MIPC. La toxicidad del efluente final fue evaluada a través de un ensayo de viabilidad con células HUVEC.

Los resultados demuestran que a las 144 h de operación de la primera etapa del sistema de tratamiento se alcanzó un 96,70% de transformación de

compuestos organoarsenicales a arsénico inorgánico con una velocidad máxima de aparición de arsénico inorgánico de $0,033 \pm 0,001 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. El efluente de este reactor fue diluido al 12% v/v y usado para alimentar el biorreactor de la segunda etapa. A partir de las 72 h de operación de esta segunda etapa, la remoción de arsénico del medio líquido fue de 100% con una velocidad de remoción de $0,033 \pm 8,750\text{e-}007 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. El $99,3 \pm 0,51\%$ de las células HUVEC fue viable al ser expuestas al efluente final del sistema de tratamiento.

Se puede concluir que el sistema de tratamiento biológico es capaz de abatir la toxicidad de compuestos arsenicales orgánicos e inorgánicos presentes en los afluentes ensayados, utilizando el sistema de tratamiento aeróbico secuencial con biotecnología de oxidación de arsenito y co-precipitación de calcita-arsénico.



ABSTRACT

During decades, organic compounds containing arsenic in their structure (organoarsenicals) have been used as food additives in the poultry industry. The use of manure from poultry as a fertilizer is a common practice that increases the concentration of arsenic in soils, because the organoarsenicals are released unaltered in the feces. In agriculture, inorganic and organic arsenic compounds have been used as a pesticide in crops. Years of use of these compounds have been increased the arsenic concentration in soils. At present, the use of some pesticides such as monosodium methanoarsonate is still allowed, and in Asian countries organoarsenical compounds are still used in the poultry industry.

Once in soil, the organoarsenic compounds undergo transformations mediated by microorganisms producing inorganic arsenic, mainly arsenite (As^3+) and arsenate (As^5+). Being arsenite more toxic, soluble and mobile. Due to their nature, these species of arsenic can leach or move by runoff, reaching hydrological sources for human use. The consumption inorganic arsenic generates health problems, like cancer, cardiovascular disease, neurocognitive deficit and hyperkeratosis.

The biological transformation of organoarsenicals mediated by microorganisms is an alternative for the abatement of these compounds from the soil and/or water. However, arsenite and arsenate are generated as products of these transformations. Thus, development of alternatives is necessary to reduce both the organoarsenic compound and the generated inorganic arsenic.

Microbiologically induced calcite precipitation (MICP), specifically by ureolytic bacteria, is a process by which bacteria metabolize urea generating ammonium and bicarbonate, therefore increasing of extracellular pH. If there are calcium ions in the medium, precipitation of calcium carbonate or Calcite, is

triggered. Calcite is a mineral with the ability to adsorb and / or co-precipitate inorganic arsenic, mainly arsenate.

The main goal of this study was to implement a sequential aerobic biological treatment system for the abatement of the toxicity of arsenical compounds. The reduction of organoarsenic compounds to inorganic arsenic by a bacterial consortium was characterized using growth curves and inorganic arsenic appearance curves. Then, it was characterized the production of calcite and the oxidation/co-precipitation of inorganic arsenic by *Pseudomonas arsenicoxydans* in a culture medium adapted for MICP using growth curves in planktonic and sessile state. Finally, a sequential aerobic biological treatment system was implemented, at laboratory scale, for the abatement of the arsenic toxicity from an artificial effluent supplemented with organic arsenic. This treatment system was divided into 2 stages. First one, was a batch bioreactor where the bacterial consortium was cultivated in order to reduce the organoarsenic compounds roxarsone, nitarsone and monosodium methanoarsonate into inorganic arsenic. In the second stage, the effluent of the first system was fed in a fed-batch bioreactor where *P. arsenicoxydans* was cultivated in a medium adapted for MICP, in order to remove the arsenic present in the affluent by the simultaneous oxidation of arsenite and co-precipitation of arsenic in the calcite produced through MIPC. The toxicity of the final effluent was evaluated through a viability assay with HUVEC cells.

The organoarsenic compounds transformation into inorganic arsenic, was 96.70% at 144 h of operation of the batch bioreactor with a maximum inorganic arsenic appearance rate of $0.033 \pm 0.001 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Then, the effluent from this reactor was diluted to 12% v / v and used to feed the fed-batch bioreactor. The removal of arsenic was 100% after 72 hours of operation of fed-batch bioreactor, with an arsenic removal rate of $0.033 \pm 8.750\text{e-}007 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. After exposition to the final effluent, the HUVEC cells assay resulted on viability of $99.3 \pm 0.51\%$.

In conclusion, is possible to abate the toxicity of organic and inorganic arsenical compounds using the sequential aerobic treatment system with arsenite-oxidation/calcite-arsenic co-precipitation biotechnology.



I. INTRODUCCIÓN

El arsénico (As) es un metaloide tóxico que causa diversas enfermedades, entre ellas cáncer de pulmón, vejiga y piel (ATSDR, 2010). Puede encontrarse en el ambiente en sus formas inorgánicas arsenito (As(III)) y arseniato (As(V)), o bien como compuestos organoarsenicales.

Los compuestos orgánicos de As existen naturalmente y también han sido introducidos por fuentes antropogénicas tales como el uso de herbicidas y suplementos veterinarios usados en la industria avícola. La toxicidad y comportamiento geoquímico del As dependen principalmente de su estado de oxidación. Arsenito es más soluble, móvil y tóxico que arseniato, este último es más estable y predomina en ambientes aeróbicos y condiciones oxidantes, mientras arsenito se encuentra principalmente en ambientes anaeróbicos y condiciones reductoras (Oremland y Stolz, 2003).

Los compuestos organoarsenicales son transformados en el ambiente por la acción de microorganismos capaces de reducir estas especies, transformándolas en nuevas moléculas de As orgánico, o bien degradándolas hasta arsenito y arseniato (Stolz y col., 2007). Debido a esto, la introducción y degradación de compuestos organoarsenicales genera un problema ambiental ya que las formas inorgánicas de As pueden movilizarse por procesos de lixiviación y esorrentía (Rutherford y col., 2003). Cuando esto ocurre As(III) y

As(V) pueden llegar a fuentes hidrológicas que finalmente tendrán contacto con el ser humano, ya sea como agua potable o bien como agua de riego de cultivos destinados a la alimentación, dónde además se facilita la movilidad de las especies tóxicas de arsénico a suelos no contaminados naturalmente con el metaloide.

Existen tratamientos químicos para abatir el arsénico presente en las aguas, los cuales se basan en la pre oxidación de arsenito a arseniato. Luego se pueden aplicar diferentes tecnologías para la remoción del arseniato, tales como coagulación-filtración, intercambio iónico, adsorción en alúmina activada y ósmosis inversa (Bahar y col., 2013). Sin embargo este tipo de tratamientos tiene las limitaciones típicas de los procesos químicos, entre ellas el alto costo de inversión y mantenimiento, y la generación de desechos tóxicos (Rivera y Piña, 2005). Por otro lado, se encuentra la alternativa de tratamiento biológico de residuos mediado principalmente por microorganismos, la cual es una estrategia actualmente utilizada para la remediación de diversos compuestos que contaminan el ambiente (Zouboulis y Latsoyiannis, 2005).

Diversos estudios han evaluado la transformación biológica de compuestos organoarsenicales como roxarsona, *p*-ácido arsenílico y ácido 4-hidroxi 3-aminofeniarsonico (HAPA), entre otros. Estas investigaciones han evidenciado que la degradación de estos compuestos genera compuestos

organoarsenicales reducidos, arsenito y arseniato (Cortinas y col., 2006; Stolz y col., 2007; Makris y col., 2008).

Debido a que los tratamientos biológicos actuales para el abatimiento de compuestos organoarsenicales generan arsenito y arseniato, es que se deben buscar alternativas de tratamiento, o bien la mejora de los ya existentes, con el fin de abatir estos productos inorgánicos tóxicos de arsénico.

Bajo este contexto, el objetivo general del proyecto fue implementar un sistema de tratamiento biológico aeróbico secuencial para la degradación de compuestos organoarsenicales y la biomineralización de arsénico inorgánico, mediante un consorcio bacteriano y una cepa bacteriana capaz de llevar a cabo el proceso de Precipitación de Carbonato de calcio Inducida por Microorganismos (MIPC). Primero, se alimentó un biorreactor con un medio de cultivo suplementado con compuestos organoarsenicales y cuya biomasa fue un consorcio bacteriano aeróbico capaz de transformar los compuestos organoarsenicales hasta especies inorgánicas de arsénico (arsenito y/o arseniato). Luego, el efluente obtenido de este biorreactor, fue tratado en un segundo biorreactor con una cepa bacteriana capaz de llevar a cabo el proceso de MIPC, que consiste en la precipitación de carbonato de calcio (Calcita) mediante la acción de la enzima ureasa. En presencia de calcita, las especies inorgánicas de arsénico, presentes en el medio de cultivo del biorreactor, co-precipitaron con este mineral, obteniéndose un efluente final libre de arsénico.

1. Arsénico orgánico e inorgánico

El arsénico es un metaloide que posee los estados de oxidación -3, 0,+3 y +5. Las formas oxidadas, arsenito (As(III)) y arseniato (As(V)), son las más comunes y pueden encontrarse como compuestos orgánicos o inorgánicos.

El arsénico inorgánico que se encuentra en el ambiente de forma natural, formando compuestos con Mn, Fe, Co, Ni, Ag o Sr en la superficie de rocas. A menudo, se encuentra asociado en minerales como rejalgar (AsS), oropimente (As₂S₃), arsenopirita (FeAsS), o asociado/presente como una impureza traza en la pirita (FeS₂), calcopirita (CuFeS₂), y galena (PbS) (Smedley y Kinniburgh, 2002; Bertoldi y col., 2013). Las formas inorgánicas de arsénico se difunden naturalmente debido a emisiones producidas por la actividad volcánica, hidrotermal y la erosión de rocas.

Por otro lado, entre las fuentes antropogénicas de arsénico, están la fundición de metales a escala industrial y el uso de plaguicidas, fertilizantes y conservantes de la madera que contienen arsénico (Oremland y Stolz, 2003; Ravenscroft y col., 2009). En Chile, la minería y la fundición del cobre son actividades humanas reconocidas como importantes fuentes generadoras de arsénico en el Norte de Chile (Sancha y O' Ryan, 2008).

En el ambiente, As(V) se encuentra a la forma de los oxianiones dihidrógeno arseniato (H₂AsO₄⁻) e hidrógeno arseniato (HAsO₄²⁻), y As(III) como

los oxianiones ácido arsenioso (H_3AsO_3) y di-hidrógeno arsenito (H_2AsO_3^-). La toxicidad del arsénico depende de la forma química, siendo arsenito 100 veces más tóxico que arseniato (Saluja y col., 2011).

As(V) imita al fosfato, por lo tanto puede ingresar a las células a través de transportadores destinados a este nutriente, y una vez dentro interferir con los procesos de generación de energía a base de fosfato, por ejemplo, inhibiendo la fosforilación oxidativa. As(III), por otra parte, entra a través de una ruta diferente (porinas aqua-glicerol) y se dirige a una gama más amplia de procesos celulares, uniéndose a los grupos tiol en proteínas celulares importantes, tales como la piruvato deshidrogenasa y la 2-oxoglutarato deshidrogenasa (Oremland y Stolz, 2003).

El arsénico orgánico también se encuentra en el ambiente de forma natural. Estos compuestos orgánicos se forman a partir de la interacción entre el arsénico inorgánico presente y microorganismos que modifican el metaloide, dando lugar a moléculas como las arsinas, el ácido monometilarsónico (MMA) o el ácido dimetilarsónico (DMA). Luego, el arsénico orgánico puede ser reducido hasta arsénico inorgánico por los microorganismos presentes ya sea en el suelo o agua. Estas especies inorgánicas introducidas/producidas se pueden bioacumular en los cultivos vegetales o bien mobilizarse por procesos de lixiviación y escorrentía, pudiendo llegar a aguas superficiales y a fuentes hidrológicas (Rutherford y col., 2003). En caso de que el arsénico se

bioacumule en cultivos destinados a la alimentación humana, o bien difunda hasta aguas que serán utilizadas para el consumo, existe un potencial riesgo sanitario, debido a que el arsénico es un elemento carcinogénico (IARC, 2004).

Se ha demostrado que la exposición a largo plazo, a bajos niveles de arsénico inorgánico, causa cáncer de pulmón, vejiga, riñón y piel, así como también, enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2, déficits neurocognitivos, resultados adversos durante el parto y alteraciones endocrinas (ATSDR, 2010; Fisher y col., 2015).



2. Introducción de arsénico al ambiente por la industria avícola

En la industria avícola, actualmente se implementan las operaciones de alimentación de animales confinados (Concentrated Animal Feeding Operations, CAFOs), una estrategia para ampliar el margen de beneficio en la producción, que se caracteriza por aumentar con eficiencia la cantidad de animales por espacio. Sin embargo, este tipo de instalaciones plantean cada vez más problemas ambientales y de salud para las comunidades vecinas, ya que los desechos que producen representan un gran potencial de contaminación del aire, agua y suelos (NCSL, 2016). Si bien, esta práctica aumenta la densidad de la población de aves y disminuye los costos de

mantenimiento asociados, también aumenta el riesgo de enfermedades e infecciones en las aves (Mangalgi y col., 2015).

Los compuestos organoarsenicales son utilizados como aditivos alimenticios en la avicultura con el fin de acelerar el crecimiento, aumentar la eficiencia de la alimentación, mejorar la pigmentación de la carne de las aves y prevenir enfermedades e infecciones (Christen, 2001; Chapman y Johnson, 2002). Los compuestos orgánicos de arsénico utilizados como aditivos alimenticios para aves de corral son roxarsona (ROX, ácido 4-hidroxi-3-nitrofenilarsónico), ácido arsenílico (ASA, ácido 4-aminofenilarsónico), nitarsona (NIT, ácido 4-nitrofenilarsónico) y carbasona (CAR, ácido 4-carbamoilaminofenilarsónico) (Chen y col., 2011). Estos compuestos son derivados del ácido fenilarsónico, es decir, poseen un grupo arseniato en la posición uno y, sustituciones de grupos orgánicos en las posiciones *ortho*- y *para*-.

CAR es una droga antiprotozaria que fue utilizada para tratar la amebiasis en humanos hasta 1991 (Chen y col., 2011) y para aumentar el peso y prevenir la histomoniasis (enfermedad de cabeza negra) en pavos. La dosis sugerida para aves es de $75 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Worden y Wood, 1973), siendo en 2013 prohibido su uso como suplemento alimenticio en aves para alimento humano por la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (Food and Drug Administration, FDA) (FDA, 2013).

ASA es utilizado para el control de la coccidiosis, la ganancia de peso y mejorar la eficiencia de la alimentación en aves de corral (Craig, 1986). La dosis comúnmente administrada es de $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de ASA en el alimento (Silbergeld y Nachman, 2008). Muchas evidencias científicas apuntan a que el uso de ASA como suplemento alimenticio es beneficioso como estimulador del crecimiento en la industria avícola y porcina (Frost y col., 1955) y fue demostrado que ASA era excretado inalterado y que no existía evidencia de arsénico inorgánico liberado en las aves (Moody y Williams, 1962), y, finalmente, se evidenció que ASA es estable en las aves de corral y que no existe presencia de compuestos reducidos de arsénico en los tejidos estas (Overby y Fredrickson, 1963).

Sin embargo, estudios más recientes mostraron que existe distribución del ASA en el hígado y riñones de pollos, detectándose productos metabólicos del compuesto en las heces, orina y bilis, lo que sugiere absorción, distribución y procesamiento metabólico significativo del organoarsenical (Aschbacher y Feil, 1991). También se demostró que el arsénico se deposita en huevos, riñones, hígado y el corazón de aves de corral luego de la administración de ASA (Desheng y Niya, 2006). Debido a estos últimos estudios, es que en 2013 la FDA establece la prohibición del uso de este fármaco en la industria avícola (FDA, 2013).

ROX se empleó por primera vez en la década de 1940 (Anderson y Chamblee, 2001) y se utiliza para promover el crecimiento, potenciar la

conversión del alimento, el tratamiento de la coccidiosis en aves de corral y prevenir infecciones del tracto gastrointestinal. Fue el primer compuesto organoarsenical aprobado por la FDA para uso veterinario. La dosis mayormente usada es de 20-50 mg de ROX por kg de alimento (Jones, 2007). Nachman y col. (2012) estimaron que el 88% de los pollos de engorde producidos en Estados Unidos eran alimentados con ROX, la cual es excretada principalmente inalterada en el estiércol. Cerca de 900 toneladas métricas de ROX, incluyendo 2.5 toneladas métricas de arsénico, presentes en el estiércol de pollos broiler, son liberadas anualmente al ambiente en EE.UU (Garbarino, 2003) cuyo contenido de arsénico oscila entre 14 y 76 mg·kg⁻¹ (Jackson y Bertsch, 2001; Jackson, 2003). Actualmente la FDA no permite su uso, ya que encontraron niveles de arsénico inorgánico en el hígado de pollos tratados con el fármaco que aumentaban proporcionalmente al aumentar la concentración de la dosis (FDA, 2013), sin embargo, ROX sigue siendo producida a nivel mundial y es utilizada en muchas granjas avícolas de muchos países (Yang y Rosen, 2016), como China dónde el compost comercial se produce a partir desechos de aves de corral cuya alimentación aún es suplementada con ROX (Yang y col., 2017).

NIT es un antiprotozario, utilizado para combatir la histomoniasis, enfermedad causada por el protozoo *Histomonas meleagridis* y nematodos, que afecta a pavos y pollos. La dosis sugerida para NIT es 375 mg·kg⁻¹. Aunque

esta dosis es más alta que la descrita para ROX y ASA, NIT no se suministra continuamente a los pollos (Mangalgiri y col., 2015).

Hasta el año 2015, NIT era el único suplemento en base a arsénico permitido por la FDA para ser administrado en animales de la agroindustria, esta diferencia en la regulación con respecto a los otros tres compuestos se debía principalmente a que la razón por la cual se utilizaba NIT era contrarrestar la histomoniasis, y no para promover el crecimiento de las aves de corral (Mangalgiri y col., 2015). En 2014, las empresas Zoetis, Inc. y Huvepharma AD (distribuidoras suplementos organoarsenicales en E.E.U.U.) retiraron voluntariamente todas las aprobaciones de nuevos medicamentos veterinarios y suplementos alimenticios para su uso en la alimentación animal basados en ROX, ASA y CAR, retirándolos también del mercado. En 2015 Zoetis Inc. anunció el retiro del mercado de Histostat-50 (NIT), que dejó de estar disponible en la estación de crecimiento de las aves de 2016 (FDA, 2014).

Los suplementos arsenicales destinados a aves de corral, nunca han sido aprobados para su uso en la Unión Europea, pero al día de hoy son ampliamente utilizados en China, dónde el límite de la dosis permitida para alimentar aves de corral es de $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Foust y col., 2018; Hu y col., 2017; Yao y col., 2016).

Es importante señalar que la industria avícola a nivel mundial está en constante crecimiento. El año 2000 el consumo de pollos fue de $11 \text{ kg}\cdot\text{persona}^{-1}$

$1 \cdot \text{año}^{-1}$ aumentando gradualmente hasta llegar a $14,5 \text{ kg} \cdot \text{persona}^{-1} \cdot \text{año}^{-1}$ en 2011 (OCDE/FAO, 2013) y se proyecta un crecimiento de un 24% en la producción de carne de ave para el año 2024 (OCDE-FAO, 2015). Por ende, el desarrollo de esta industria durante las últimas décadas, a pesar de las restricciones actuales para el uso de compuestos organoarsenicales, ha contribuido significativamente en la introducción de arsénico en al ambiente, pues más del 90% de los compuestos organoarsenicales administrados a las aves de corral son excretados sin cambios (Morrison, 1969) y una de las alternativas más económicas y utilizadas para la disposición de los desechos de las aves es su uso como fertilizante en cultivos agrícolas (Silbergeld y Nachman, 2008).



Algunos compuestos arsenicales detectados en los desechos de aves de corral son el ácido 4-hidroxifenilarsónico, ácido fenilarsónico y especies metiladas de arsénico (Moody y Williams, 1964; Jackson y Bertsch, 2001; Pavkov y Goessler, 2001; Garbarino y col., 2003; Jackson y col., 2003). Los residuos animales no están clasificados como residuos peligrosos, y la aplicación de estiércol contaminado con compuestos orgánicos como fertilizante es una práctica común en campos de cultivos cercanos a criaderos de aves y cerdos (Sierra-Alvarez y col., 2010).

Los compuestos organoarsenicales se ven sometidos a transformaciones bióticas y abióticas cuando son almacenados, durante la producción de

compost a partir de estiércol y cuando son aplicados como fertilizantes (Christen, 2001; Garbarino y col., 2003; Jackson y col., 2003), lo que puede dar lugar a compuestos de mayor toxicidad y movilidad. Investigaciones han determinado que el uso de estiércol de aves de corral como fertilizantes genera la introducción de especies orgánicas e inorgánicas de As en el ambiente (Gupta y Karuppiah, 1996; Wershaw y col., 1999; Hancock y col., 2001). ROX, por ejemplo, puede ser transformada hasta ácido 4-hidroxi 3-aminofeniarsonico (HAPA) y especies de arsénico inorgánico, como As (III) y As (V), mediante reducción microbiana en ambientes anaeróbicos (Cortinas y col., 2006; Stolz y col., 2007; Makris y col., 2008), por lo que la aplicación de desechos de aves de corral con ROX como fertilizante aumenta la concentración de As en los suelos (Fisher y col., 2015). Es decir, la utilización como fertilizante de los desechos de aves de corral tratadas con compuestos organoarsenicales introduce compuestos de As al ambiente, aumentando los niveles del metaloide en el suelo (Nachman y col., 2005).

3. Introducción de arsénico al ambiente por la agricultura

En la industria agrícola, el arsénico ha sido utilizado históricamente en una gama de aplicaciones, incluyendo pesticidas, herbicidas, insecticidas, desecantes de algodón, defoliantes y esterilizantes de suelo (IARC, 2012).

Durante el comienzo y la mitad del siglo 20, los pesticidas en base a arsénico inorgánico, incluyendo arseniato de plomo, arseniato de cobre y arseniato de calcio, fueron utilizados ampliamente para controlar insectos en la agricultura (Li y col., 2016). Los pesticidas inorgánicos en base a arsénico más utilizados en agricultura entre 1800 y 1900 fueron el Verde de Paris (un arsenical basado en cobre), y el Púrpura de Londres. En los años posteriores se amplió el uso de los arseniatos de plomo y el arseniato de calcio. En particular el arseniato de calcio, que tuvo un amplio uso entre 1920 y 1950, fue usado para combatir plagas en cultivos de algodón, pero también fue utilizado como insecticida general sobre una variedad de cultivos de hortalizas y patatas blancas en todo los EE.UU, y el arseniato de plomo fue utilizado principalmente para la protección contra insectos que atacan las frutas y verduras (Murphy y Aucott, 1998).

El apogeo de uso de pesticidas inorgánicos arsenicales ocurrió aproximadamente desde 1930 hasta fines de 1940 (aprox. 60.000.000 lb·año⁻¹ de cada uno). Hacia la década del 60, el consumo de estos pesticidas era menor a la mitad de lo consumido durante el peak máximo (aprox. 10.000.000 lb·año⁻¹ de cada uno). Este descenso continuó durante la década de 1970, probablemente debido al acceso facilitado a nuevos pesticidas sintéticos de mayor eficacia (Murphy y Aucott, 1998). Los últimos usos de compuestos inorgánicos de arsénico en la agricultura fueron descontinuados voluntariamente a finales de 1980 y principios de 1990, estos incluían el

arseniato de plomo utilizado como regulador del crecimiento de los cítricos, arseniato de calcio utilizado como herbicida en el césped, el arsenito de sodio utilizado como fungicida en las uvas y el ácido arsénico utilizado como desecante de okra para las semillas y el algodón.

Históricamente, el uso de ácido arsénico en cultivos de algodón fue tan alto que llegó a 6.8 millones de libras de ingrediente activo por año (USEPA, 2006). Esta gran cantidad de pesticidas en base de arsénico inorgánico utilizado durante décadas ha conducido a la contaminación grave por arsénico en el medio ambiente (Datta y Sarkar, 2005). Los pesticidas inorgánicos de arsénico no se han utilizado con fines agrícolas en EE.UU. desde 1993 (IARC, 2012).

Los pesticidas orgánicos de arsénico en EE.UU. se registraron para su uso como herbicidas en la década de 1950 (metanoarsenato disódico (DSMA)) y en 1960 los organoarsenicales metanoarsenato monosódico (MSMA), ácido de calcio metanoarsenato (CAMA) y ácido cacodílico. En 2006, la USEPA inventariaba aproximadamente 90 productos que contienen MSMA, 25 que contienen DSMA, 4 que contienen CAMA, y 35 que contienen ácido cacodílico. En 2009, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA) emitió una orden de cancelación para eliminar y reducir progresivamente el uso de pesticidas arsenicales orgánicos para el año 2013 (USEPA, 2009). La única

excepción a la orden fue el MSMA, que continúa aprobado para su uso en cultivos de algodón, campos de golf y granjas de césped.

Antes de 2006, se usaban aproximadamente 1,4 millones de kg de MSMA cada año (USEPA, 2006). En general, los compuestos arsenicales se mantienen en el ambiente durante largos periodos de tiempo, por ejemplo, el MMA tiene una vida media promedio de 240 días en ambientes aeróbicos (Yoshinaga y col., 2011). Los microorganismos de suelo transforman estos compuestos en distintos derivados del As de manera bidireccional entre compuestos orgánicos e inorgánicos, por lo que compuestos como el MMA pueden ser desmetilados para transformarse en especies de arsénico inorgánico, que es más tóxico, móvil y biodisponible (USEPA, 2014).

Otras fuentes de arsénico utilizadas en la agricultura son el compost y los fertilizantes que contienen arsénico. Según la Norma Chilena 2880 “Compost-Clasificación y requisitos” (NCh 2880, 2005), el compost es un producto inocuo y libre de efectos fitotóxicos que resulta del proceso de compostaje, constituido principalmente por materia orgánica estabilizada. El compostaje es una alternativa para gestionar residuos orgánicos generados por actividades agrícolas, forestales, agroindustriales y lodos provenientes del tratamiento de aguas servidas y de residuos líquidos industriales de algunos procesos productivos (NCh 2880, 2005). La NCh 2880, establece que el límite máximo de concentración de arsénico que pueden tener los compost es de $15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de

compost (peso seco), y que residuos orgánicos de origen animal pueden ser considerados como materia prima del compost, por lo que estiércol contaminado con organoarsenicales podría ser utilizado, pudiendo llegar a cultivos agrícolas.

Los fertilizantes no tienen como principal componente algún compuesto arsenical, pero si presentan concentraciones del metaloide. Molina y col. (2009) estudiaron la concentración de elementos traza de distintos tipos de fertilizantes, entre ellos, fertilizantes fosforados, fertilizantes nitrogenados, fertilizantes de potasio y abono NK. Determinaron que el contenido de elementos traza de los fertilizantes es altamente variable, lo que se relaciona con el origen del material. En particular, los fertilizantes triple-superfosfatos, presentaron altas concentraciones de arsénico en su composición. Estos fertilizantes, junto a otros que contienen fósforo, son obtenidos desde rocas fosfóricas, que poseen concentraciones variables de elementos traza según su origen (McLaughlin y col., 1996), y generalmente más altas que en la corteza terrestre (McBride y Spiers, 2001).

En algunos sistemas agrícolas la entrada de elementos traza al suelo, como As, a través de la aplicación de fertilizantes puede ser mayor que la salida por bioacumulación y lixiviación. Por lo que, el uso a largo plazo de estos fertilizantes puede provocar el aumento de la concentración de As en la capa arable de los suelos agrícolas. Algunos países han establecido tasas máximas

de entrada de estos contaminantes en los suelos agrícolas y límites máximos de concentración en los fertilizantes (CFIA, 1997; USEPA, 1999; California Code of Regulations, 2001; USEPA, 2002; AAPFCO, 2007). En Chile, la Resolución N°1035 (Rs. N°1035, 2011), establece los márgenes de tolerancia en el contenido de elementos traza en fertilizantes, donde se establece que los fertilizantes importados pueden declarar un contenido de hasta $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de arsénico con un margen de tolerancia del 10%.

4. Arsénico en suelos de cultivo

En suelos no contaminados, los niveles de arsénico van de $<0,1$ a $95 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, con una media mundial menor a $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Adriano, 2001; Kabata-Pendias, 2001). Sin embargo, en suelos contaminados o situados cerca de minas que contienen As, se han reportado concentraciones superiores a $600 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de As (Dudas, 1984; Adriano, 2001; Kabata-Pendias, 2001). En el suelo, As se encuentra principalmente a la forma de especies inorgánicas, pero también están presentes compuestos organoarsenicales que se interconvierten gracias a reacciones bióticas y abióticas, como la metilación (Adriano, 2001). El arsénico se puede dispersar en suelos de cultivo después del uso de fertilizantes fosfatados debido a la utilización de pesticidas que contengan arsénico, defoliantes, y conservantes (Bertoldi y col., 2013).

La solubilidad del arsénico en la solución del suelo, y por tanto su disponibilidad, se ve afectada por factores como el potencial redox, pH, la presencia de Mn, Al, óxidos de hierro, presencia de materia orgánica y la actividad biológica (Dudas, 1984). En la solución de los suelos, los estados de oxidación más comunes de arsénico son +3 y +5. As(III) es más soluble, móvil, y tóxico que As(V), que es la forma dominante y más estable en suelos aeróbicos. Aunque los minerales y compuestos de arsénico son relativamente solubles, la mayor parte del arsénico encontrado en el suelo no es particularmente móvil ni está disponible, ya que generalmente se encuentra fuertemente asociado con Fe, Mn y óxidos de aluminio en suelos ácidos, y con Ca en suelos alcalinos y calcáreos (Dudas, 1984; Kabata-Pendias, 2001; Wenzel y col., 2001).

En condiciones aeróbicas, la desorción de As(V) desde el suelo aumenta al aumentar el pH como consecuencia del aumento de las cargas negativas de los coloides del suelo (Dudas, 1984; Smith y col., 1999). Sin embargo, una disminución del pH, en la rizósfera por ejemplo, puede dar lugar a la disolución de los óxidos e hidróxidos de Fe y Al, con la consiguiente co-disolución del As(V) unido a esta fracción (Fitz y Wenzel, 2002). Por otro lado, la adsorción de As(III) aumenta al aumentar el pH (Dudas, 1984). El arsénico es fuertemente adsorbido por los óxidos cristalinos y amorfos de Fe, Mn, y Al principalmente a pH <6, cuando estos óxidos muestran una carga superficial positiva (Sadiq, 1995). En suelos ácidos sulfatados se han reportado concentraciones de

arsénico de hasta $290 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ debido a la erosión de la pirita presente en el material matriz del suelo (Dudas, 1987).

Fosfato y As(V) son oxianiones que se comportan de manera similar y compiten entre sí por los sitios de adsorción. En suelos agrícolas, la fertilización con fosfato podría aumentar la solubilización de arsénico (Reynolds y col., 1999), ya que cuando en un suelo contaminado con arsénico se realiza una excesiva fertilización con fosfato, este desplazará al arseniato acumulado de sus sitios de adsorción, dejándolo disponible para el consumo de las plantas, pudiendo llegar a la cadena alimentaria tanto de animales como de humanos. Un riesgo adicional asociado a la fertilización con fosfato es que en presencia de agua suficiente para lixiviar, el arsénico liberado podría penetrar a lugares más profundos del suelo, pudiendo llegar incluso a napas subterráneas (Peryea y Creger, 1994). Estudios han demostrado que un exceso en la aplicación de fertilizantes fosfatados ($>400 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) en suelos contaminados con arsénico tiene un efecto directo sobre la concentración del metaloide en la solución del suelo, desplazando entre el 67-92% del arsénico total y haciéndolo fitodisponible (Woolson, 1973; Violante y Pigna, 2002; Bolan y col., 2013). El agua de riego con un alto contenido de fósforo podría generar un efecto similar al del fertilizante y contribuir a la liberación del arsénico desde las partículas del suelo (Venegas y CIAP-UTFSM, 2014).

Se ha determinado que la concentración de arsénico en tejidos de las plantas cultivadas en suelos no contaminados varía de 9 a 1500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso seco (Kabata-Pendias, 2001). Una concentración superior a 2,000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso seco se considera fitotóxica (Pais y Jones, 1997). El arsénico se acumula principalmente en las raíces y hojas viejas, mientras que la translocación a las frutas y semillas es mínima (Woolson, 1973; Aguilar y col., 1987; Baxter y col., 1997; Galani-Nikolakaki y col., 2002; Baroni y col., 2004; Kment y col., 2005; Ko y col., 2007; Fiket y col., 2010; Bertoldi y col., 2011).



5. Ciclo Biogeoquímico del arsénico

Los microorganismos juegan un rol fundamental en el ciclo ambiental del arsénico, ya que transforman los compuestos arsenicales de una forma a otra. As(V) y As(III) son interconvertidos por reducción y oxidación, dando lugar a un ciclo redox de arsénico. La reducción de As(V) a As(III) es llevada a cabo por microorganismos que expresan las arseniato reductasas *ArsC* y *ArrAB* que participan en procesos de resistencia y respiración anaeróbica del arseniato, respectivamente. La reducción de arseniato en el ambiente provoca un aumento en la movilidad del arsénico (como As(III)) a partir de sedimentos ricos en As(V) , contaminando aguas subterráneas y el suelo. Por otro lado, el As(III) puede ser oxidado a As(V) por la acción de microorganismos que expresan las

arsenito oxidasas AioAB y ArxAB, que participan en la oxidación anclada a la respiración aeróbica/anaeróbica y anaeróbica, respectivamente. Esta oxidación resulta en la precipitación y/o adsorción del arseniato a los minerales de sedimentos marinos y/o de agua dulce (Andres y Bertin, 2016).

Además, el arsénico inorgánico puede ser metilado, dando lugar a compuestos organoarsenicales mucho más tóxicos. La metilación es llevada a cabo por microorganismos que expresan la ArsM, una S-adenosilmetionina (SAM) As(III) metiltransferasa (AsMT), que metila el arsenito formando especies monometiladas (MMAs(III) o monometilarsenito), dimetiladas (DMAs(III) o dimetilarsenito), y trimetiladas (TMAs(III) o trimetilarsina). Todos los organismos vivos poseen ortólogos de *arsM*, en humanos es AS3MT, que se encuentra en el hígado y genera MMAs(III) y DMAs(III), las dos especies más tóxicas entre todas las especies inorgánicas y orgánicas de arsénico, consideradas carcinogénicas y responsables de la mayoría de las enfermedades humanas ligadas al As (Yang y Rosen, 2016). La ArsM posee estructuras para los ligandos SAM, arsenito y también, para compuestos organoarsenicales aromáticos como el fenilarsenito (PhAs(III) o PAO) y la roxarsona trivalente (ROX(III)). La metilación de arsénico es un proceso metabólico común a todos los organismos vivos, que genera MMAs(III) y DMAs(III), tóxicos y TMAs(III) volátiles.

Sin embargo, en el ambiente la mayoría del arsénico encontrado es inorgánico, esto se debe a que en comunidades microbianas en las que hay miembros que metilan el arsénico inorgánico, también existen microorganismos que han desarrollado mecanismos de desmetilación para sobrevivir. Este proceso es llevado a cabo por Arsl, una dioxigenasa no dependiente de hierro hemo con actividad liasa, que cliva el enlace C-As convirtiendo el arsenito metilado (MAS(III)) en As(III). A partir de la evidencia existente del clivaje del enlace C-As en una amplia gama de organoarsenicales trivalentes (Von Endt y col., 1968; Garbarino y col., 2003; Feng y col., 2005; Stolz y col., 2007; Makris y col., 2008), Yang y Rosen (2016) sugieren que los organoarsenicales aromáticos pentavalentes como ROX(V) y NIT(V), también son sometidos a una vía secuencial de 2 pasos que involucra, primero, la activación mediante reducción (hasta ROX(III) y NIT(III)) y segundo, el rompimiento del enlace C-As mediado por Arsl, ambos procesos llevados a cabo por comunidades microbianas, y tal como ocurre con el MSMA, que se degrada hasta arsénico inorgánico en una vía secuencial de reducción-desmetilación (Yoshinaga, Cai y Rosen, 2011).

Por lo tanto, compuestos arsenicales aromáticos (ROX(V), (NIT(V), p-ASA) y metilados (MMAs(V), MSMA) serían activados por reducción (pasando de nula a alta toxicidad), para luego ser degradados a arsénico inorgánico en el ambiente (toxicidad intermedia).

Los procesos anteriores ocurren en comunidades microbianas donde algunos microorganismos se encargan de metilar arsénico como un mecanismo de competencia, y otros de desmetilarlo para sobrevivir a la alta toxicidad de estos compuestos, sin embargo, también hay miembros de estas comunidades capaces de sobrevivir mediante la oxidación de organoarsenicales trivalentes como son los MAs(III) y las especies activadas por reducción de ROX(III), NIT(III) y p-ASA. Estos microorganismos codifican una enzima llamada ArsH, una metilarsenito oxidasa que se encarga de la oxidación de organoarsenicales trivalentes tóxicos hasta especies pentavalentes no tóxicas, dando lugar a un mecanismo de resistencia alternativo a la desmetilación vía Arsl. La expresión de ArsH por sí sola (sin otros genes del operon *ars*) es suficiente para la detoxificación de las formas trivalentes activadas del herbicida MSMA y de ROX (Yang y Rosen, 2016).

Las fuentes antropogénicas, como fertilizantes, pesticidas y suplementos alimenticios animales que contienen arsénico introducen principalmente MMAs y DMAs (Burló y col. 1999) al ambiente, los que terminan degradándose hasta compuestos inorgánicos de arsénico. Este proceso ocurre en diversos entornos como el suelo (Von Endt y col., 1968; Woolson y col., 1982; Akkari y col., 1986; Gao y Buran 1997; Feng y col., 2005; Maki y col., 2006a; Huang y col., 2007), los lodos (Sierra-Alvarez y col. 2006), los sedimentos (Hanaoka y col., 1990), el mar (Sanders 1979) y lagos (Maki y col., 2004; 2006b; 2009), donde la principal forma de arsénico es As(V), y se biotransforma a arsenozúcares en las algas.

Algunos animales y vegetales son capaces de bioacumular las formas metiladas de arsénico presentes en su entorno, reincorporándolo al ambiente a través de sus desechos.

El ciclo del arsénico tiene varios puntos dónde el arsénico tiene contacto directo e indirecto con el ser humano. Entre estos puntos encontramos los cultivos que bioacumulan arsénico, como por ejemplo, el arroz (Bakhat y col., 2017), y el contacto con el metaloide de forma natural, debido a que se ubican en zonas geográficas ricas en arsénico. El contacto también puede deberse a la actividad antropogénica, como el uso de fertilizantes y herbicidas arsenicales, entre ellos el abono proveniente de desechos de animales que fueron suplementados con ROX o MSMA.

De estos mismos cultivos, dónde existen comunidades microbianas capaces de resistir, detoxificar o metabolizar el arsénico en sus distintas formas, es que especies inorgánicas de arsénico pueden transportarse por lixiviación o escorrentía hasta napas subterráneas de agua que son utilizadas para el uso y consumo humano, tal como ocurre en los asentamientos del norte de Chile (Caceres y col., 2005; Steinmaus y col., 2016; Smith y col., 2017), dónde además esta agua se utiliza para el riego en la agricultura, generándose un ciclo en que el arsénico vuelve a los suelos de plantaciones y luego se pone nuevamente en contacto con los seres humanos.

6. Transformación biológica de compuestos organoarsenicales

El tratamiento biológico de residuos mediado por microorganismos es una estrategia utilizada actualmente para la remediación de compuestos que contaminan el ambiente. La degradación de ROX se da tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Producto de la reducción y transformación de ROX, se producen compuestos orgánicos como ácido 4-hidroxi-3-amino fenil arsénico (HAPA), ácido monometilarsénico (MMAs(V)), ácido monometilarsonoso (MMAs(III)), ácido dimetilarsínico (DMAs(V)), ácido dimetilarsinoso (DMAs(III)) y óxido de trimetilarsina (TMAs(III)) y también inorgánicos como arsenito y, en mayor medida, arseniato (Cortinas y col., 2006; Stolz y col., 2007; Andra y col., 2010). Un estudio de la degradación de ROX y determinación de especies intermediarias evidenció trazas de NIT como producto de la metabolización (Conklin y col., 2012), por lo que es posible que NIT sea un intermediario metabólico de la transformación de ROX a arsénico inorgánico (Guzmán-Fierro, 2014).

Algunos de los autores que han trabajado en la evaluación de la transformación biológica de ROX incluyen a Cortinas y col. (2006), Stolz y col. (2007), Fisher y col. (2008), Liang y col. (2014), Liu y col. (2014), Shi y col. (2014), Zhang y col. (2014), Fisher y col. (2015), Guzmán-Fierro y col. (2015), Mafla y col. (2015). Zhang y col. (2014) caracterizaron la degradación anaeróbica de ROX mediada por bacterias en un sistema de lodos granulares

determinando que a las 12 h casi el 100% de ROX había sido removida del sistema siendo transformada en HAPA que finalmente también fue transformado casi al 100% a las 40 h de tratamiento. Mafla y col. (2015) evidenciaron que microcosmos incubados en condiciones anaeróbicas eran capaces de degradar el 90% de ROX en 15 días, en contraste a los microcosmos aeróbicos que alcanzaron un porcentaje de degradación máxima de 85%. Guzmán-Fierro y col. (2015) determinaron que la velocidad de crecimiento de un consorcio aeróbico, aislado desde suelo agrícola fertilizado con estiércol de ave de corral, fue mayor en presencia de ROX.

Aunque no existen estudios que caractericen la cinética de crecimiento de otros consorcios bacterianos anaeróbicos aislados desde el ambiente en presencia de compuestos organoarsenicales, si hay estudios de monocultivos anaeróbicos aislados, que crecidos en presencia de ROX, también presentan un mayor crecimiento (Stolz y col., 2007; Fisher y col., 2015).

Los mecanismos genéticos de detoxificación de compuestos organoarsenicales conocidos hasta ahora incluyen a *arsM*, gen que codifica una As(III) S-adenosilmetionina metiltransferasa, *arsI*, gen que codifica una liasa de C-As, y a *arsH*, gen que codifica una metilarsenito oxidasa (Yang y Rosen, 2016). Estas tres enzimas forman lo que Yang y Rosen (2016), describen como un nuevo ciclo de metilación, desmetilación y detoxificación del arsénico (Figura 1), donde *ArsM* transforma el arsenito inorgánico en una especie

organoarsenical altamente tóxica que mata por competencia a otras especies bacterianas y que también puede ser la responsable de la carcinogénesis en animales (MAs(III)).

Las especies microbianas en competencia han respondido a esta presión ambiental mediante la evolución de los mecanismos de detoxificación de MAs(III). Algunas producen ArsI, que desmetila las MAs(III) produciendo As(III) menos tóxico, mientras que otras producen ArsM que oxida las MAs(III) hasta MAs(V) no tóxicas. Es probable que estos procesos ocurran en comunidades microbianas ambientales.

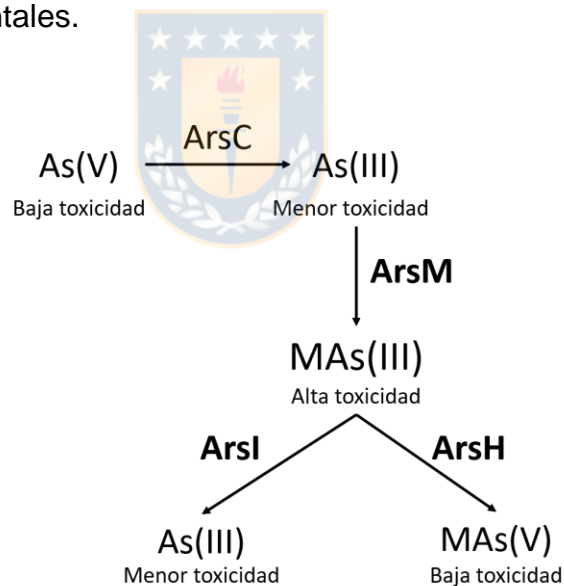


Figura 1. Ciclo de metilación, desmetilación y detoxificación del arsénico. En negrita enzimas que transforman especies organoarsenicales. ArsM: Arsenito metiltransferasa, ArsI: liasa de enlace C-As, ArsH: oxidasa organoarsenical. Modificada de Yang y Rosen (2016).

7. Transformación bacteriana de arsénico inorgánico

Los microorganismos han desarrollado múltiples estrategias para tolerar y resistir la presencia de arsénico en el ambiente. La primera de ellas es la reducción de arseniato hasta arsenito, un mecanismo de resistencia evolutivamente conservado y presente en bacterias, arqueas y eucariontes de varios orígenes ecológicos. En procariontes, está genéticamente constituido por *arsRBC*, un operón simple que confiere tolerancia basal al arsénico, *ArsC* corresponde a una arseniato reductasa citoplasmática que media la reducción de As(V) a As(III) con glutaredoxina, glutatión o tiroredoxina suministrando el poder reductor para esta transformación (Silver y Phung, 2005). *ArsB* es una bomba de eflujo antiporte dependiente de ATP que excreta el As(III) al medio extracelular, y *ArsR* corresponde al regulador del operón. Los genes que codifican estas proteínas, a menudo se localizan en plásmidos (Lloyd y Oremland, 2006).

Es común que el operón *arsRBC* presente otros genes que lo flanquean y que se relacionan con la resistencia al arsénico, entre ellos los que codifican para *ArsA*, una ATPasa que se une a *ArsB* haciéndola más eficiente y *ArsD*, que reprime el operón y actúa como una chaperona de arsenito. Menos comúnmente se pueden encontrar genes que codifican para *ArsH*, *ArsN* (Acetiltransferasa putativa) y *ArsT/ArsX* (Sistema tiroredoxin), entre otras que han sido descritas tanto de forma experimental, es decir pesquisando los genes

ars y comprobando su actividad reductasa, como a través de la secuenciación de genomas de varias especies bacterianas.

En segundo lugar está la reducción vía *arr*, un mecanismo de reducción deasimilatoria del arseniato, directamente relacionado con el metabolismo energético de las bacterias. El operón *arrAB* codifica una arseniato reductasa de membrana que es responsable de la respiración anaeróbica periplásmica de As(V), utilizando varias fuentes de electrones, ArrA corresponde a la subunidad mayor y ArrB a la subunidad menor de la reductasa. Este sistema es más especie- o nicho-específico que la resistencia al arsénico (*arsRBC*) (Andres y Bertin, 2016).

Una tercera estrategia es la oxidación de arsenito, que corresponde a un mecanismo de detoxificación presente en bacterias heterótrofas (oxidan el arsenito en el periplasma para evitar su absorción) y en bacterias quimiolitotrofas (cuando la oxidación del As(III) puede proveer electrones para la respiración por oxígeno, nitrato o clorato conservando la energía obtenida para el crecimiento y para fijar el CO₂) (Lloyd y Oremland, 2006). La oxidación de arsenito es conferida por el sistema *aio* que se extiende filogenética y ecológicamente tanto en bacterias como arqueas, y en bacterias la mayoría de los genomas que poseen los genes *aio* presentes en bases de datos, pertenecen al filo *Proteobacteria*.

El operón *aioBA* codifica una arsenito oxidasa constituida por una subunidad mayor (AioA) y una subunidad menor (AioB) y el ordenamiento del operón es conservado en todas las bacterias oxidantes de As(III) analizadas (Slyemi y Bonnefoy, 2012). En algunos casos el operón *aioBA* es flanqueado por otros genes, cuyo orden difiere entre distintos organismos. Estos genes se ubican río abajo del operón y entre ellos están el gen *aioC* (o *cytC*) que codifica citocromo tipo C, *aioD* (o *moeA*) que codifica un cofactor de molibdeno, y gen el *nitR*, que codifica una nitroreductasa. Además, río arriba del operón, es posible encontrar el sistema *aioXSR* que codifica un sistema regulatorio de dos componentes y una proteína periplásmica de unión a As(III), y que puede estar en la misma dirección del operón *aioBA* o bien en dirección contraria, dependiendo si se trata de Alfa- o Beta-proteobacteria, respectivamente (Li y col., 2013a).

Cabe destacar que, bacterias que poseen los operones *aioBA* y *arsRBC* a la vez, parecen ser más resistentes al arsénico que teniendo sólo el operón *ars* (Cai y col., 2009). Recientemente se ha descrito el gen *aioE*, que codifica un nuevo transportador de electrones asociado a la producción de NADH. Este gen fue descrito en *Agrobacterium tumefaciens*, y se demostró que al ser deletado, la oxidación de arsenito no ocurre disminuyendo la resistencia a As(III) (Wang y col., 2017).

Finalmente, existe un segundo sistema de oxidación mediada por los genes *arx*, dónde se lleva a cabo la oxidación anaeróbica de As(III) combinada con la respiración vía nitrato o integrada en la cadena transportadora de electrones de la fotosíntesis anoxigénica (Zargar y col., 2012). Este sistema sólo se ha descrito en 4 especies pertenecientes a la clase Gamma-proteobacteria, dentro de las cuales sólo se ha comprobado experimentalmente la oxidación de arsenito en *Alkalilimnicola ehrlichii* MLHE-1 (Zargar y col., 2010), y en las otras sólo se han pesquisado los genes *arx* por secuenciación y técnicas bioinformáticas.

El operón *arxB'AB*, codifica la arsenito oxidasa anaeróbica, constituida por una subunidad molibdopterina (*ArxA*) y una subunidad sulfuro-fierro. Aún se desconoce la función de *arxB'*, que corresponde a un homólogo de *arxB* localizado río abajo de *arxA*. Flanqueando el operón, es posible encontrar genes adicionales como, *arxC* que codifica una proteína involucrada en el anclaje de la oxidasa y en el proceso de transferencia de electrones, *arxD* que codifica una chaperona, y el sistema *arxXSR*, que se encuentra río abajo del operón y en dirección opuesta, y codifica 3 proteínas putativas: una proteína periplásmica de unión a As(III) (*ArxX*), una histidina quinasa de transducción de señales de 2 componentes (*ArxS*) y un regulador de respuesta (*ArxR*).

En la Figura 2 están representados los principales clústeres de resistencia, detoxificación y metabolización de arsénico conocidos a la fecha.

Es interesante notar que el sistema *arxCD* es similar al sistema *arrCD* y que el sistema *arxXSR* es similar al sistema *aioXSR*. Por otro lado, la gran similitud que existe entre las secuencias de *arx*, *arr* y *aio* dejan en evidencia la posibilidad de que *ArxA* sea una variante de *Arr* que cataliza la reacción inversa.



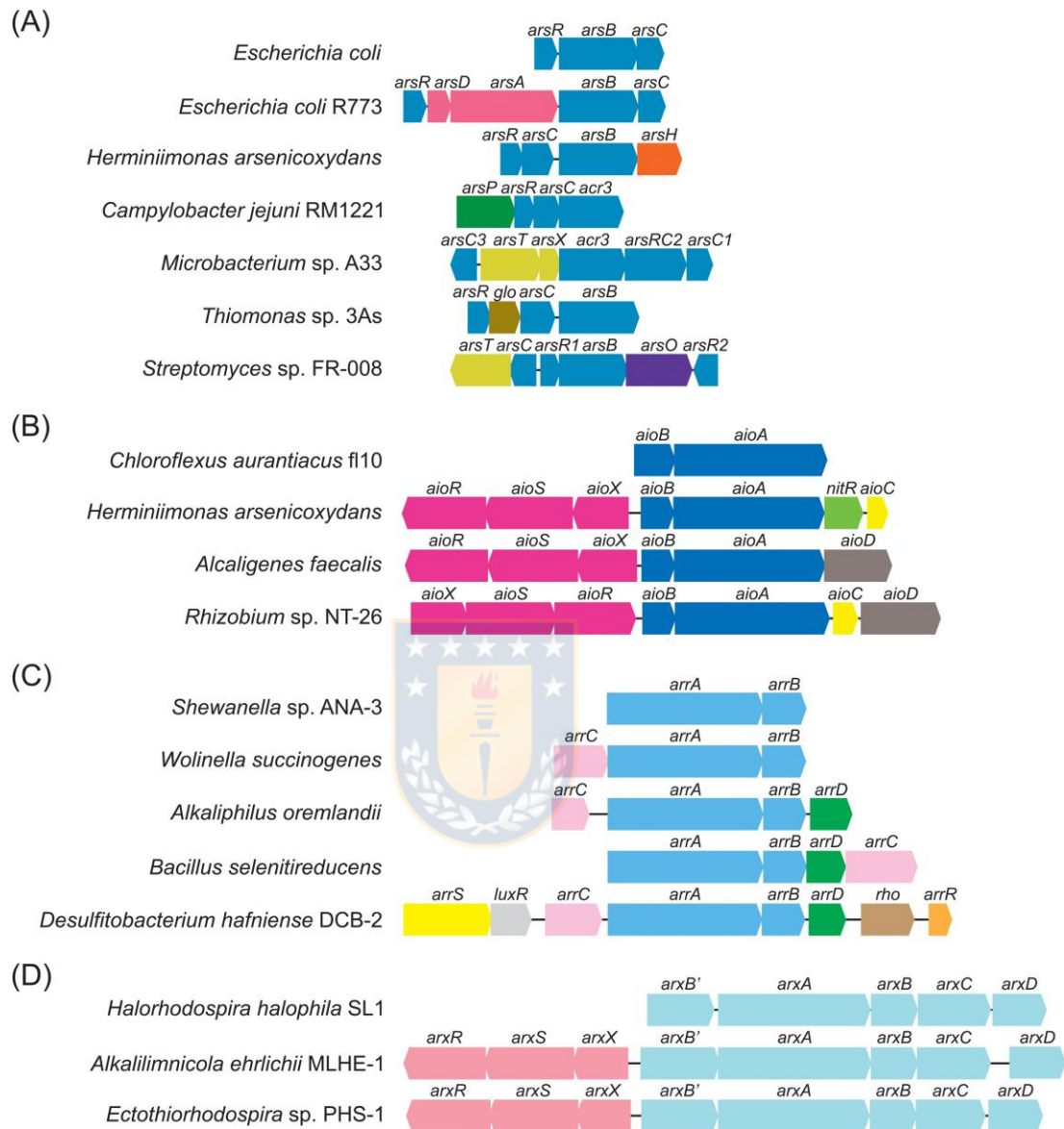


Figura 2. Organización de los clústeres genéticos relacionados al arsénico, observados en diferentes procariontas. (A)-(D), organización de los clúster genéticos *ars*, *aio*, *arr* y *arx*, respectivamente. Estos clúster pertenecen a organismos cuya capacidad de llevar a cabo las correspondientes reacciones ha sido demostrada experimentalmente. Fuente: Andres y Bertin (2016).

8. Precipitación de carbonato de calcio inducida por microorganismos (MICP)

La precipitación biológica de carbonato de calcio mediada por microorganismos es un proceso regido por 4 factores clave: la concentración de calcio, la concentración de carbono inorgánico disuelto (DIC), el pH y la disponibilidad de sitios de nucleación (Hammes y Verstraete, 2002). Puede ocurrir producto de distintos procesos metabólicos como la fotosíntesis (Dupraz y col., 2004), ureolisis (Fujita y col., 2000), desnitrificación (Van Paassen y col., 2010), amonificación (Rodríguez-Navarro y col., 2003), reducción de sulfato (Braissant y col., 2007) y la oxidación de metano (Reeburgh, 2007). Además, se ha reportado que la pared celular y el exopolisacárido (EPS) sirven de molde para la precipitación de carbonatos (Obst y col., 2009). En la naturaleza este proceso media la cementación de sistemas naturales (Zhu y Dittrich, 2016).

La mayoría de los estudios de MICP con fines biotecnológicos se basan en la ureolisis (De Muynck y col., 2013; Kumari y col., 2014a). En la MIPC mediada por bacterias ureolíticas, las bacterias hidrolizan la urea hasta amoníaco y ácido carbónico, y ambos son liberados al medio. En el medio extracelular, estos compuestos llegan al equilibrio con sus especies iónicas bicarbonato (HCO_3^-) e hidroxilo (OH^-), aumentando así el pH. Si hay suficiente calcio en el medio, se va a ver favorecida la precipitación de carbonato de calcio que ocurre en la superficie de la bacteria. Esto ocurre gracias a la presencia de

distintos grupos funcionales como carboxilos, fosfatos y aminas, que le dan una carga neta negativa a la superficie, y que facilitan la adsorción de cationes como calcio (aumentando su concentración en el microambiente bacteriano) y por ende, la precipitación del carbonato. Estas características hacen de la superficie celular bacteriana una estructura altamente efectiva como templado de la precipitación de carbonato (Warren y col., 2001).

La habilidad de las bacterias ureolíticas-calcificantes de precipitar carbonato de calcio actualmente está siendo estudiada con fines biotecnológicos, como por ejemplo, la remoción de calcio de aguas residuales, biorremediación de metales pesados, captación pasiva de dióxido de carbono atmosférico, biocementación de materiales arenosos y suelos, biomineralización de cemento, restauración de construcciones y grietas, entre otros (Dhami y col., 2013).

9. Biomineralización acoplada a la oxidación de arsenito e interacción calcita-arsénico

La biomineralización es el proceso mediante el cual organismos forman minerales (Lowenstam y Weiner, 1989; Ben Omar y col., 1997; Gadd, 2010). La mayoría de los procesos de biomineralización hacen referencia a la Mineralización Inducida Biológicamente (BIM, por su nombre en inglés

Biologically Induced Mineralization) (Kumari y col., 2016), en la cual el organismo que mineraliza modifica su microambiente local para crear condiciones fisicoquímicas apropiadas para la precipitación de minerales (Gadd, 2010; Gadd y col., 2012; 2014).

El carbonato de calcio es el mayor producto en procesos de biomineralización (Berman y col., 1990; Perito y Mastromei, 2011; Lakshminarayanan y col., 2002). La calcita es un mineral de carbonato de calcio (CaCO_3) muy estable en condiciones ambientales y su formación es un fenómeno mediado por microorganismos común en la biosfera (Ehrlich, 1998; Castanier y col., 1999). Existen estudios que han sugerido que los minerales de carbonato, como la calcita, a un pH alto podrían tener un rol fundamental en el control de la concentración de arsénico en el agua subterránea contaminada (Yokoyama y col., 2012).

Dependiendo del pH y condiciones ambientales el arsénico se encuentra en sus distintas formas químicas. En ambientes aeróbicos y de condiciones oxidantes, predomina arseniato, y en ambientes anaeróbicos y de condiciones reductoras predomina arsenito (Oremland y Stotz, 2003). Además, en función de las condiciones óxido-reductoras y del pH del ambiente, parte del arsénico puede ser retenido en superficies minerales, como hidróxidos de hierro, hidróxidos de aluminio, arcillas y calcita (Sadiq, 1995; Manning y Goldberg, 1997). Arsenito, es la forma inorgánica de arsénico más tóxica, y se adsorbe

menos a la superficie de los minerales, por lo que tiene una mayor movilidad y biodisponibilidad (Cullen y Reimer, 1989; Kulp y col., 2004).

Hay dos ideas completamente diferentes acerca de arsenito inmovilizado en calcita a pH neutral o circumneutral. Cheng y col. (1999) concluyeron que el As(III) es adsorbido y co-precipitado con calcita, mientras que Yokoyama y col. (2012) observaron una insignificante absorción y co-precipitación de As(III) con calcita a pH inferiores a 8.0. Según Yokoyama y col. (2012), As(V) se incorpora en la calcita en un amplio intervalo de pH (7.0-12.0), y el As(III) sólo a pH cercano a 9.0.



En un estudio más reciente (Renard y col., 2015), se realizaron análisis de la interacción de las especies inorgánicas de arsénico con calcita utilizando un microscopio de fuerza atómica (AFM) y espectroscopía de absorción de rayos X (XAS). As(V) mostró una fuerte interacción con la superficie de la calcita incorporándose la mayor parte del compuesto en la estructura del mineral. As(III) demostró mucho menos impacto en el crecimiento de la calcita y se observó una incorporación menor de esta especie en su estructura. Los resultados de la XAS indicaron que As(III) se oxidó parcialmente a As(V) antes de ser incorporado en la calcita, y el contenido resultante en la calcita fue de 36% As(III) y 64% As(V). Este resultado confirma que As(V) interactúa más fuertemente con la calcita que As(III). Por lo tanto, en procesos de co-precipitación, As(V) se incorpora a la calcita en un amplio rango de pH (7.0 a

12) y, por otra parte As(III) se incorpora a la calcita, principalmente a pH cercano a 9.0 (Yokoyama y col., 2012).

La biomineralización del As se basa en bacterias capaces de secretar productos metabólicos que promuevan la formación de minerales que adsorban las formas inorgánicas del metaloide, y que a la vez, puedan transformar el As(III) o As(V) (ya sea por reducción u oxidación) resultando en la co-precipitación del As con las partículas minerales.

La calcita puede adsorber fuertemente a su superficie cristalina elementos como el arseniato, así como también incorporar As(V) a su estructura cristalina al ocurrir el intercambio del grupo carbonato por As(V) (Renard y col., 2015). Se han realizado estudios utilizando bacterias ureolíticas resistentes a arsénico (Achal y col., 2012a, 2012b, 2014), donde la mineralización se produce debido a la actividad metabólica bacteriana de la enzima ureasa (Achal y col., 2009, 2014; Kumari y col., 2016). El uso de bacterias ureolíticas arsenito-oxidantes podría facilitar la implementación de sistemas biológicos de remoción de arsénico inorgánico eficientes.

10. Tratamiento biológico de aguas contaminadas con arsénico

En el norte de Chile, el arsénico está presente en los suelos volcánicos de la cordillera de los Andes de forma natural, y se moviliza por lixiviación hasta

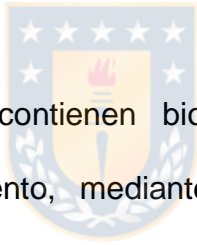
las cuencas hidrográficas de la zona, lo que resulta en altas concentraciones de arsénico (100-1500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) en las aguas (León y col., 2018). La Organización Mundial de la Salud y la Norma Chilena 409/1, han establecido un límite máximo de 10 $\mu\text{g As/L}$ de agua potable (INN, 2005; WHO, 2011).

La exposición crónica a arsénico se relaciona directamente con la incidencia de enfermedades como hipertensión, hiperpigmentación de la piel, algunas neuropatías, cáncer de hígado, de pulmón, de piel, de vejiga, de próstata y de riñón (IARC, 2012). En el norte de Chile, la mortalidad por cáncer de pulmón, vejiga y riñón, es entre 1,75 y 6,43 veces mayor que en otras regiones, y se relaciona directamente con la ingesta de arsénico presente en el agua potable (Smith y col., 2017). El impacto económico del cáncer en Chile es de 2100 millones de dólares anuales (Cid y col., 2016), es decir, que para los 3099 nuevos casos de cáncer registrados en la Región de Antofagasta (MINSAL, 2012), el impacto económico anual es de 200MUSD.

En esta zona del país, una parte del agua potable se obtiene desde las aguas cordilleranas, que tienen altos niveles de arsénico. Para removerlo, las potabilizadoras de agua, utilizan procesos de coagulación-filtración y osmosis reversa, procesos que implican el uso de químicos y/o filtros, son costosos y contaminan el ambiente (Aguas Antofagasta, 2018). La concentración de arsénico en el agua potable en la II Región, actualmente fluctúa entre 10 y 60 $\mu\text{g As/L}$ (Smith y col., 2017), es decir que, aún después de ser tratada, el agua

tiene concentraciones que sobrepasan el límite máximo de arsénico permitido en el agua potable.

Es evidente la necesidad de terminar con este problema que, sólo en la región de Antofagasta, afecta la salud de 550 mil personas, y para ello es necesario contar con un proceso que elimine el arsénico del agua de manera eficiente. Actualmente los procesos para remover el arsénico de afluentes, utilizan químicos y filtros, son costosos, contaminan el ambiente y no eliminan todo el arsénico dejando remanentes de entre 10 y 60 $\mu\text{g As/L}$ de agua potable (Smith A H y col., 2017).



Los reactores que contienen biopelículas pueden ser una buena estrategia para el tratamiento, mediante bioacumulación, de aguas poco contaminadas. Las biopelículas son conjuntos complejos formados por poblaciones únicas o mixtas de microorganismos, que se unen a superficies bióticas o abióticas a través de una matriz extracelular (Kruger y col., 2013). En comparación con sus homólogos planctónicos, estas células sésiles suelen ser más resistentes a muchos compuestos tóxicos, incluidos los metales pesados y los metaloides (Beveridge y col., 1997). La secreción de exopolímeros, que inmovilizan metales y metaloides por secuestro pasivo, es una estrategia de resistencia de las células en un biofilm. Varios estudios han demostrado que algunas bacterias, en presencia de arsénico, producen grandes cantidades de exopolisacárido (EPS) (Bryan y col., 2009; Marchal y col., 2011; Michel y col.,

2007, 2011). Estas propiedades atractivas se pueden usar para desarrollar métodos de remediación, como los biorreactores basados en biopelículas (Chang y col., 2006; Harrison y col., 2006).

Diferentes formas de abatir el arsénico microbiológicamente han sido descritas a la fecha (Battaglia-Brunet y col., 2002, 2006; Michel y col., 2007; Michon y col., 2010; Dastidar y Wang 2012; Ito y col., 2012; Corsini y col., 2014; Liu y col., 2017b; Biswas y Sarkar, 2018; Lu y col., 2018; Biswas y col., 2019). Uno de los métodos más estudiados es la utilización de biopelículas Fe-oxidantes. Esta reacción mediada por microorganismos aumenta la eficiencia de remoción de arsénico a través de la oxidación simultánea de arsenito (Katsoyiannis and Zouboulis, 2004; Tani y col., 2004; Katsoyiannis y col., 2004, 2007; Casiot y col., 2006). También se han realizado diversos estudios sobre la aplicación biotecnológica de biopelículas bacterianas en el abatimiento de arsénico en los procesos de tratamiento de aguas residuales (Battaglia-Brunet y col., 2006; Dastidar y Wang, 2009; Michon y col., 2010; Ahsan y col., 2012; Prabha y Natarajan, 2012; Srivastava y col., 2012; Majumder y col., 2013; Prieto y col., 2013)

La Precipitación Microbiológicamente Inducida de Calcita (MICP, por su nombre en inglés Microbially Induced Calcite Precipitation) también ha sido estudiada con proyección de uso para el tratamiento de afluentes contaminados con arsénico. Achal y col. (2012a) aislaron la bacteria *Sporosarcina ginsengisoli*

CR5 desde suelos contaminados con As, y determinaron que esta bacteria es capaz de llevar a cabo la MICP y a su vez ser resistente a una concentración de 50 mM de arsénico. Al estudiar diferentes fracciones del suelo estudiado, determinaron que la fracción de calcita tenía una mayor concentración de arsénico que otras fracciones estudiadas.

Zhu y col. (2018) diseñaron un sistema de tratamiento de aguas residuales basado en biochar y perifiton (Biochar and Periphyton-Based system, BPS), compuesto por una columna de biochar y un biorreactor de perifiton, para disminuir la toxicidad asociada al As(III) presente en afluentes. Aproximadamente el 60% del As(III) se trató previamente (adsorbió) en la columna de biochar y la remoción del As (III) restante se atribuyó al biorreactor de perifito. El porcentaje de remoción de arsenito obtenido fue de ~90.2–95.4% utilizando una concentración inicial de As (III) de 2.0 mg·l⁻¹. Determinaron además, que la calcita en las superficies de biopelículas perifíticas junto a los grupos OH y CO contribuyeron a la eliminación de As(III).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

11. Hipótesis

Compuestos organoarsenicales como roxarsona (ROX), nitarsona (NIT) y metanoarsenato monosódico (MSMA) han sido utilizados durante décadas en la industria avícola y la agricultura. Aunque el uso de ellos haya sido restringido actualmente, diversos estudios demuestran que estas prácticas han contribuido al aumento de la concentración de arsénico en fuentes hidrológicas y suelos. Los tratamientos actuales para el abatimiento de arsénico corresponden a tratamientos químicos caracterizados por su alto costo y la producción de otros contaminantes que son liberados al ambiente. El tratamiento biológico de compuestos organoarsenicales es ambientalmente compatible y menos costoso, sin embargo, también tiene la desventaja de producir arsénico inorgánico como producto final. Es por ello que se requiere innovar en el tratamiento para abatir la toxicidad del arsénico, e incorporar nuevas tecnologías que tengan la capacidad de remover el arsénico inorgánico que se obtiene como producto de los actuales tratamientos biológicos, tales como el tratamiento de compuestos organoarsenicales. La precipitación bacteriana mediada por microorganismos, es un proceso biológico llevado a cabo principalmente por bacterias, el cual genera cristales de calcita. Este proceso se estudia para ser utilizado en diversas aplicaciones biotecnológicas como la biocementación y consolidación de arenas. Sin embargo, la estructura cristalina

de la calcita le confiere la capacidad de ser utilizada como un mineral capaz de co-precipitar compuestos metálicos y semi-metálicos. Entre estos compuestos el arsenito y arseniato han sido estudiados durante procesos de co-precipitación con carbonato de calcio (calcita), determinándose que el arseniato tiene un alto potencial de adsorción a este mineral a un amplio rango de pH.

La investigación propuesta en este trabajo plantea la siguiente hipótesis:

Los microorganismos capaces de transformar compuestos arsenicales orgánicos e inorgánicos, presentes en suelos agrícolas, son capaces de abatir la toxicidad de estos, mediante la implementación de un sistema de tratamiento biológico aeróbico secuencial.



12. Objetivos

General:

Implementar un sistema de tratamiento biológico aeróbico secuencial para el abatimiento de la toxicidad de compuestos arsenicales presentes en suelos.

Específicos:

1. Caracterizar la transformación de compuestos organoarsenicales, por un consorcio bacteriano aeróbico aislado de un suelo agrícola, en condición discontinua.
2. Caracterizar la producción de calcita y la oxidación de arsenito por *Pseudomonas arsenicoxydans* en condición discontinua.
3. Implementar y evaluar un sistema de tratamiento biológico aeróbico secuencial, a escala de laboratorio, para el abatimiento de la toxicidad de compuestos arsenicales orgánicos e inorgánicos, presentes en suelos agrícolas.

III. METODOLOGÍA

13. Caracterización del consorcio bacteriano crecido en presencia de compuestos organoarsenicales

13.1 Consorcio Bacteriano

Se utilizó un consorcio bacteriano aislado por Guzmán-Fierro (2011) desde una muestra de suelo agrícola fertilizado con estiércol de ave de corral. El consorcio bacteriano corresponde a una comunidad heterogénea con predominio de especies bacilares (Figura 3), en la cual predominan cuatro grupos bacterianos: *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* y *Firmicutes*. *Alphaproteobacteria* y *Firmicutes* son los grupos dominantes dentro del consorcio, siendo *Firmicutes* el grupo mayormente representado (Guzmán-Fierro y col., 2015).

A través del análisis de la cinética de crecimiento bacteriano, Guzmán-Fierro y col. (2015) demostraron que en presencia de ROX la velocidad de crecimiento aumentó 1,4 veces respecto al crecimiento en ausencia del compuesto ($k=0.01689 \text{ OD}\cdot\text{h}^{-1}$ y $k=0.01190 \text{ OD}\cdot\text{h}^{-1}$, respectivamente), por lo que postularon que el consorcio utilizó este compuesto como fuente de carbono. Además, demostraron que luego de 168 h de cultivo, el consorcio fue capaz de degradar el 81,04% de la ROX presente en el medio de cultivo a una velocidad de

0.09582 OD nm·h⁻¹, y que el arseniato fue la especie inorgánica predominante luego de la degradación.

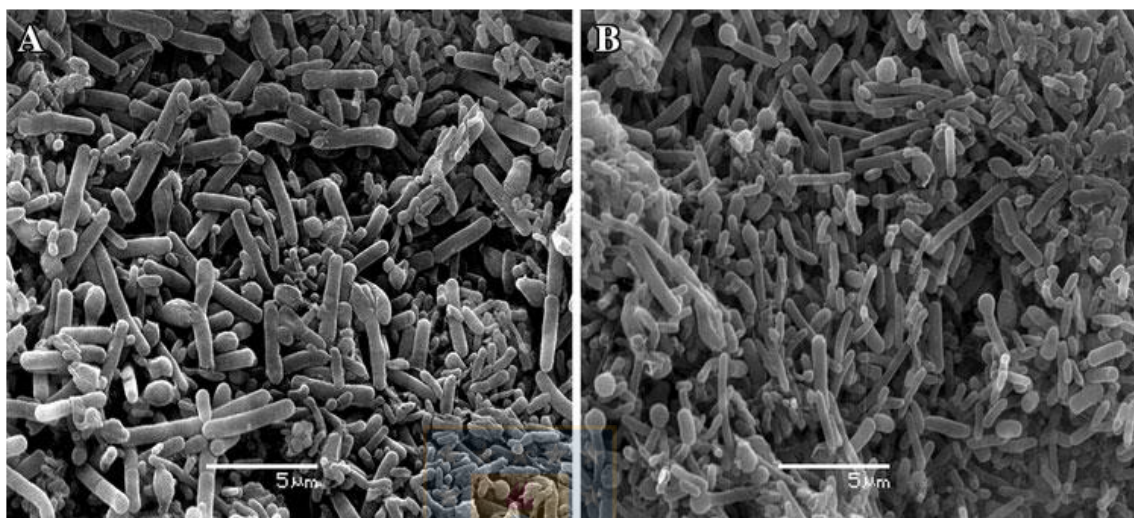


Figura 3. Microfotografía del consorcio bacteriano después de 48 h de incubación, obtenida por microscopía electrónica de barrido (SEM). A: consorcio bacteriano sin ROX. B: consorcio bacteriano con ROX. Fuente: Guzmán-Fierro y col. (2015).

Para el desarrollo de los experimentos se utilizó un medio químicamente definido descrito por Stolz y col. (2007) (MQD) suplementado con lactato 1 ml·L⁻¹ (pH 7.3). Los inóculos fueron preparados usando cultivos en fase exponencial de crecimiento (48 h) y luego se hicieron diluciones con agua miliQ estéril, hasta conseguir una concentración final de 0,5 Mac Farland (1-1.5 x10⁸ ufc·ml⁻¹), con

la cual se inocularon los matraces experimentales con una concentración de inóculo de 1% v/v (concentración final). Luego se incubaron los matraces a 37°C, bajo condiciones aeróbicas (Guzmán-Fierro, 2014). Estas corresponden a las condiciones generales de cultivo.

13.2 Condiciones de cultivo del consorcio bacteriano

Para evaluar el crecimiento del consorcio en presencia de compuestos organoarsenicales se utilizó la metodología descrita por Guzmán-Fierro (2014). Desde un matraz con el consorcio bacteriano previamente cultivado por 48 h, 1 ml de cultivo fue traspasado a 100 ml de MQD y se incubó bajo las condiciones generales de cultivo descritas en el punto anterior.

Se hicieron cinco cultivos discontinuos (batch): consorcio cultivado en presencia de ROX (0,5 mM, 37,4606 PPM As equivalentes), consorcio cultivado presencia de NIT (0,5 mM, 37,4606 PPM As equivalentes), consorcio cultivado presencia de MSMA (0,5 mM, 37,4605 PPM As equivalentes), consorcio cultivado en presencia de ROX, NIT y MSMA (0,5 mM cada organoarsenical, 112,3817 PPM As equivalentes) y consorcio cultivado ausencia de compuestos organoarsenicales (Control biótico).

Los controles abióticos de este experimento fueron: MQD sin adición de compuestos organoarsenicales, MQD suplementado con ROX (0,5 mM,

37,4606 PPM As equivalentes), MQD suplementado con NIT (0,5 mM, 37,4606 PPM As equivalentes), MQD suplementado con MSMA (0,5 mM, 37,4605 PPM As equivalentes) y MQD suplementado con ROX, NIT y MSMA (0,5 mM cada organoarsenical, 112,3817 PPM As equivalentes). En total se montaron 10 sistemas discontinuos.

13.3 Cinética de crecimiento del consorcio bacteriano

El estudio del crecimiento celular se realizó a través de curvas de crecimiento en microplacas, tomando muestras por triplicado, para determinar la densidad óptica a 600 nm. Las cinéticas de crecimiento fueron ajustadas con modelos matemáticos (Zwietering y col., 1990), usando el programa GraphPad Prism 5. Se escogió uno de los modelos evaluando el valor de R^2 , siendo el modelo con mayor R^2 el escogido. A partir del modelo seleccionado se determinaron las velocidades de crecimiento bacteriano (k), biomasa inicial (Y_0) y biomasa máxima alcanzada (Y_m).

13.4 Reducción de compuestos organoarsenicales

La reducción de compuestos organoarsenicales a arsénico inorgánico fue evaluada mediante la obtención de muestras en triplicados, durante tiempos

específicos de incubación, del consorcio bacteriano en cada una de las condiciones ensayadas. Se tomaron muestras y se filtraron (0.2 μm). Luego se cuantificó la concentración de arsénico inorgánico total presente en cada muestra durante el crecimiento bacteriano, a través de HPLC-HG-AAS.

14. Caracterización de la actividad ureolítica-calcificante y arsenito-oxidante de *Pseudomonas arsenicoxydans*

14.1 *Pseudomonas arsenicoxydans*

La cepa bacteriana fue aislada desde sedimentos del Río Camarones, Desierto de Atacama Norte de Chile (Lat. 18°57' S, Long. 69°30' W), el cuál es un sector con altas concentraciones de arsénico tanto en el agua (1100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) como en sedimentos (550 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). *P. arsenicoxydans* es una bacteria Gram negativa, aeróbica, oxidasa y catalasa positiva, con forma bacilar, 5.5 μm de largo y 0.5–1.0 μm de diámetro (Figura 4), móvil (flagelos múltiples polares), tolerante a arsenito (4 mM) y capaz de oxidar el 100% de As(III) a As(V) presente en el medio de cultivo, gracias a que posee y expresa los genes *aiO*.

La identificación molecular basada en la secuenciación del gen ADNr 16S, sumada a las características quimiotaxonómicas y fenotípicas (análisis polifásico), arrojó que *P. arsenicoxydans* corresponde a una nueva especie del

género *Pseudomonas*, y se propuso designarla como *Pseudomonas arsenicoxydans* (CCUG 58201T; CECT 7543T) (Campos y col., 2010). Valenzuela y col. (2015) determinaron que *P. arsenicoxydans* es capaz de crecer en estado sésil (biopelícula) sobre el soporte mineral zeolita. Además, demostraron que en este estado su capacidad oxidativa ($12.86 \mu\text{g As(III)} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) es mayor que en estado planctónico ($10.07 \mu\text{g As(III)} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) y que la actividad arsenito oxidasa se localiza en el periplasma bacteriano.

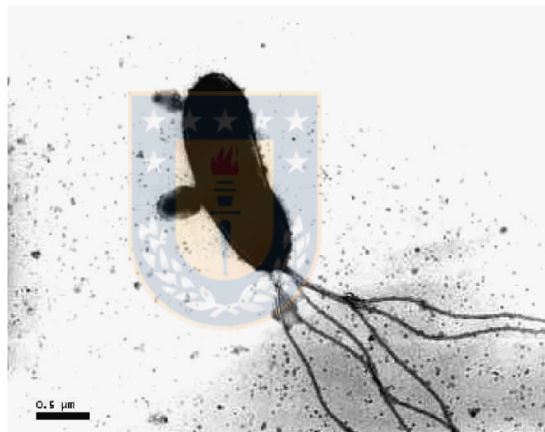


Figura 4. Microfotografía de *P. arsenicoxydans*, mostrando los múltiples flagelos polares de la cepa, obtenida por microscopía electrónica de barrido. La barra indica $0,5 \mu\text{m}$. Fuente: Campos y col. (2010).

14.2 Actividad ureolítica de *P. arsenicoxydans*

Se analizó cualitativamente la capacidad ureolítica de *P. arsenicoxydans* utilizando Agar Base Christensen, un medio de cultivo que contiene urea y que

detecta, mediante el viraje de color, la capacidad bacteriana de hidrolizar la urea. A partir de una colonia, se sembró *P. arsenicoxydans* por estriado en agar urea y se incubó por 48 h a 25°C. El viraje de color amarillo a fucsia en este agar indica actividad ureolítica positiva. Como control negativo se utilizó *E. coli* 25922 y como control positivo *K. pneumoniae*.

14.3 Precipitación de calcita microbiológicamente inducida (MICP) por *P. arsenicoxydans*

Se inoculó *P. arsenicoxydans* en los medios de cultivo descritos por Hammes y col. (2003) y Achal y col. (2009), que corresponden a medios de cultivo químicamente definidos que permiten detectar la capacidad bacteriana de precipitar calcita (CaCO₃). En su composición ambos tienen urea y una fuente inorgánica de calcio. Después de 48 h de incubación, las muestras fueron evaluadas utilizando un microscopio óptico para observar la formación de cristales de calcita, los que se reconocen por su tono verdoso (Hammes y col., 2003).

14.4 Condiciones de cultivo de *P. arsenicoxydans*

P. arsenicoxydans fue cultivada en un medio descrito por Bataglia-Brunett y col. (2002) modificado para conseguir la MICP. Para ello se adicionó urea (33 mM) y cloruro de calcio (30 mM) al medio, y se incubó a 25 °C en agitación (90 rpm) por 60 h. Los inóculos fueron preparados usando cultivos en fase exponencial de crecimiento (24 h) y luego se hicieron diluciones con agua miliQ estéril, hasta conseguir una concentración final de 0,5 Mac Farland ($1-1.5 \times 10^8$ ufc·ml⁻¹), con la cual se inocularon los matraces experimentales a una concentración de inóculo de 1% v/v.



14.5 Cultivos de *P. arsenicoxydans* en estado planctónico

Para evaluar el crecimiento *P. arsenicoxydans* en estado planctónico y en presencia de arsénico inorgánico se hicieron 3 cultivos discontinuos (batch): uno suplementado con arsenito (0.5 mM, 37.4608 PPM As equivalentes), uno suplementado con arseniato (0.5 mM, 37.4608 PPM As equivalentes) y uno suplementado con ambos en mezcla (0.5 mM de cada especie arsenical, 74.9216 PPM As equivalentes).

Como control biótico se cultivó *P. arsenicoxydans* en ausencia de arsénico inorgánico. Los 4 controles abióticos fueron medio Bataglia-Brunett modificado para MICP sin cultivar: uno suplementado con arsenito (0.5 mM, 37.4608 PPM

As equivalentes), uno suplementado con arseniato (0.5 mM, 37.4608 PPM As equivalentes), uno suplementado con ambos en mezcla (0.5 mM de cada especie arsenical, 74,9216 PPM As equivalentes) y uno en ausencia de arsénico inorgánico. En total se montaron 8 sistemas discontinuos con *P. arsenicoxydans* cultivada en estado planctónico y en presencia de arsénico inorgánico.

Luego, se evaluó el crecimiento de *P. arsenicoxydans* en estado planctónico, y en presencia de compuestos organoarsenicales. Para ello se hicieron 4 cultivos discontinuos: *P. arsenicoxydans* en presencia de ROX (0,5 mM, 37,4606 PPM As equivalentes), *P. arsenicoxydans* en presencia de NIT (0,5 mM, 37,4606 PPM As equivalentes), *P. arsenicoxydans* en presencia de MSMA (0,5 mM, 37,4605 PPM As equivalentes), *P. arsenicoxydans* en presencia de ROX, NIT y MSMA (0,5 mM cada organoarsenical, 112,3817 PPM As equivalentes). Como control biótico se cultivó *P. arsenicoxydans* en ausencia de compuestos organoarsenicales. Los 5 controles abióticos fueron medio Bataglia-Brunett modificado para MICP sin cultivar: sin adición de compuestos organoarsenicales, suplementado con ROX (0,5 mM, 37,4606 PPM As equivalentes), suplementado con NIT(0,5 mM, 37,4606 PPM As equivalentes), suplementado con MSMA (0,5 mM, 37,4605 PPM As equivalentes) y suplementado con ROX, NIT y MSMA (0,5 mM cada organoarsenical, 112,3817 PPM As equivalentes). En total se montaron 10 sistemas discontinuos con *P.*

arsenicoxydans cultivada en estado planctónico y en presencia de arsénico orgánico.

14.6 Cultivos de *P. arsenicoxydans* en estado sésil

Para evaluar el crecimiento *P. arsenicoxydans* en estado sésil (biopelícula) y en presencia de arsénico inorgánico, se cultivó la bacteria en las mismas condiciones descritas anteriormente y adicionando un soporte para favorecer la formación de biopelícula. El soporte utilizado fue zeolita y se agregó 5 g cada 100 ml de medio (Flores, 2007). Se hicieron 3 cultivos discontinuos (batch): uno suplementado con arsenito (0.5 mM, 37.4608 PPM As equivalentes), uno suplementado con arseniato (0.5 mM, 37.4608 PPM As equivalentes) y uno suplementado con ambos en mezcla (0.5 mM de cada especie arsenical, 74.9216 PPM As equivalentes).

Como control biótico se cultivó *P. arsenicoxydans* en ausencia de arsénico inorgánico. Los 4 controles abióticos fueron medio Bataglia-Brunett modificado sin cultivar: uno suplementado con arsenito (0.5 mM, 37.4608 PPM As equivalentes), uno suplementado con arseniato (0.5 mM, 37.4608 PPM As equivalentes), uno suplementado con ambos en mezcla (0.5 mM de cada especie arsenical, 74,9216 PPM As equivalentes) y uno en ausencia de

arsénico inorgánico. En total se montaron 8 sistemas discontinuos con *P. arsenicoxydans* cultivada en estado sésil y en presencia de arsénico inorgánico.

14.7 Cinética de crecimiento de *P. arsenicoxydans*

El estudio del crecimiento celular se realizó a través de curvas de crecimiento que fueron obtenidas mediante la técnica de microgotas tomando muestras por triplicado durante 60 h. Además se monitorearon los resultados determinando la densidad óptica a 600 nm en microplacas.

Las muestras correspondientes a *P. arsenicoxydans* cultivada en estado sésil fueron tratadas previamente para poder analizar sólo la cinética de crecimiento de las células adheridas a la zeolita (biopelícula). Para ello se tomaron muestras de zeolita de 1 ml y se lavaron tres veces con PBS 1X (10.000 rpm por 5 min). Posteriormente las muestras fueron sonicadas a temperatura ambiente por 15 minutos, con el fin de desprender la biomasa adherida. Se centrifugaron las muestras a 5000 rpm por 5 minutos, y del sobrenadante se tomaron las muestras para realizar la técnica de microgota.

Las cinéticas de crecimiento fueron ajustadas con modelos matemáticos, usando el programa GraphPad Prism 5. Se escogió uno de los modelos evaluando el valor de R^2 . A partir del modelo seleccionado, se determinaron las

velocidades de crecimiento bacteriano (k), biomasa inicial (Y_0) y biomasa máxima alcanzada (Y_m) (Zwietering y col., 1990).

14.8 Capacidad de remover arsénico de *P. arsenicoxydans*

La remoción de arsénico llevada a cabo a través de la oxidación/co-precipitación de arsénico mediada por *P. arsenicoxydans*, fue analizada a través de curvas de remoción de arsénico total. Se tomaron muestras del medio de cultivo líquido en triplicado, durante las 60 h de incubación, luego se filtraron (0.2 μm) y se cuantificó la concentración de arsénico total durante el crecimiento bacteriano mediante HPLC-HG-AAS.

14.9 Biopelícula y cristales de calcita formados durante la MICP

La biopelícula y los cristales de calcita formados por MICP, fueron observados a través de microscopía electrónica de barrido (SEM, por su nombre en inglés Scanning Electron Microscopy). Finalizada la incubación de *P. arsenicoxydans*, se tomaron muestras de zeolita que fueron lavadas tres veces con PBS 1X (5000 rpm por 5 min) para desprender las células no adheridas. Luego las muestras fueron fijadas con glutaraldehído al 2,5% para su posterior análisis por SEM y espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS,

por su nombre en inglés Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy) utilizando un equipo JEOL, modelo JSM-638 OLV, 2005.

14.10 Cultivo de *P. arsenicoxydans* en presencia de efluente abatido por consorcio bacteriano

Para la obtención del efluente abatido por el consorcio bacteriano, el consorcio bacteriano fue cultivado en MQD suplementado con lactato $1 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH 7.3) y con los compuestos organoarsenicales ROX, NIT y MSMA (0.5 mM cada organoarsenical, 112,3817 PPM As equivalentes). Se incubó a 37°C por 168 h. El cultivo del consorcio fue centrifugado a 9000 rpm por 15 minutos, luego se descartó el pellet, y el sobrenadante se filtró ($0.22 \mu\text{m}$) para eliminar las células bacterianas que quedasen suspendidas. El sobrenadante corresponde al efluente de consorcio bacteriano (ECB) utilizado posteriormente, y que fue almacenado a 4°C hasta su utilización.

Se adicionaron concentraciones volumétricas (%v/v) crecientes de ECB al medio descrito por Battaglia-Brunet y col. (2002) modificado para MICP. Se cultivó *P. arsenicoxydans* en presencia del efluente en 7 distintas concentraciones de ECB (6, 12, 25, 50, 70 y 100% v/v). Como control biótico se cultivó *P. arsenicoxydans* en ausencia de ECB. Como controles negativos se incubaron matraces con medio Battaglia-Brunet modificado para MICP en

ausencia de bacteria, para cada concentración de ECB (6, 12, 25, 50, 70 y 100% v/v) y en ausencia de ECB.

15. Sistema de tratamiento biológico aeróbico secuencial

El sistema de tratamiento utilizado, fue un sistema biológico aeróbico secuencial de dos etapas, el cual es representado en la Figura 5. La primera etapa corresponde a un biorreactor discontinuo (batch) (R1) que fue alimentado por un afluente artificial compuesto de MQD suplementado con ROX, NIT y MSMA (0,5 mM cada organoarsenical, 112,3817 PPM As equivalentes), la biomasa de este reactor correspondió al consorcio bacteriano aeróbico. El tiempo de operación total del biorreactor fue de 144 h.

Para la segunda etapa se utilizó un biorreactor semi-continuo (feed-batch) (R2), en el cual el afluente (A2) fue renovado a intervalos de 48 h, entre los que se operó como reactor discontinuo. El afluente de este reactor (E1) correspondió al efluente centrifugado (9000 rpm por 15 min) y filtrado (0.22 μm) del biorreactor de la primera etapa, mezclado con medio Battaglia-Brunet modificado para MICP a una concentración de 12% v/v (concentración final del efluente). La biomasa de este reactor correspondió a *P. arsenicoxydans* y se cultivó como biopelícula adherida a zeolita. El tiempo de operación total de este

biorreactor fue de 408 horas, adicionándose el medio de cultivo modificado con el efluente de R1 a las 288 h de operación.

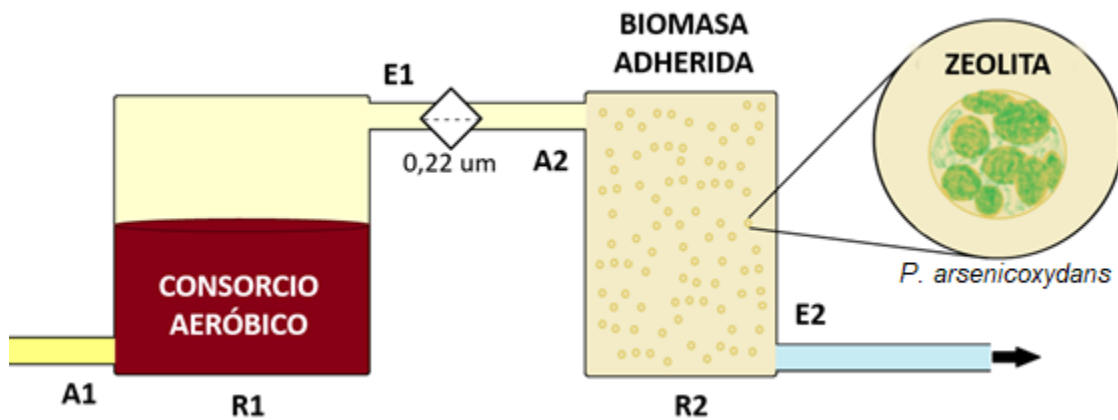


Figura 5. Sistema de tratamiento biológico aeróbico secuencial de dos etapas para el abatimiento de la toxicidad de compuestos arsenicales. A1: Afluente inicial de MQD suplementado con ROX, NIT y MSMA (0.5 mM cada compuesto); R1: Biorreactor discontinuo para cultivo del consorcio bacteriano; E1: Efluente de cultivo del consorcio; A2: Afluente de medio Battaglia-Brunet modificado para MIPC y suplementado con efluente de R1 (12% v/v); R2: Biorreactor semi-continuo para cultivo de *P. arsenicoxydans* adherida a zeolita. E2: Efluente final. Fuente: Elaboración propia.

15.1 Cinéticas de crecimiento del consorcio bacteriano y *P. arsenicoxydans*

El estudio del crecimiento celular del consorcio bacteriano fue realizado a través de curvas de crecimiento en microplacas, tomando muestras por triplicado, para determinar la densidad óptica a 600 nm. El análisis del crecimiento celular de *P. arsenicoxydans* fue realizado a través de curvas de crecimiento que fueron obtenidas por la técnica de microgotas tomando muestras por triplicado. Las muestras fueron previamente sonicadas para obtener la biomasa adherida.

Las cinéticas de crecimiento fueron ajustadas con modelos matemáticos, usando el programa GraphPad Prism 5. Se escogió uno de los modelos evaluando el valor de R^2 . A partir del modelo seleccionado, se determinaron las velocidades de crecimiento bacteriano (k), biomasa inicial (Y_0) y biomasa máxima alcanzada (Y_m) (Zwietering y col., 1990).

15.2 Reducción de compuestos organoarsenicales y oxidación/co-precipitación de arsénico

La reducción de los compuestos organoarsenicales mediada por el consorcio bacteriano, fue analizada cuantificando el arsénico inorgánico total

generado. Para ello se tomaron muestras en triplicado durante 144 h de incubación, luego se filtraron (0.2 μm) y se analizaron mediante HPLC-HG-AAS.

La oxidación de arsenito y co-precipitación de arsénico llevadas a cabo por *P. arsenicoxydans*, fueron analizadas a través de curvas de oxidación cuantificando la concentración de arsenito y arseniato, y curvas de arsénico total, respectivamente. Para ello, se tomaron muestras en triplicado durante las 408 h de incubación, luego se filtraron (0.2 μm) y se analizaron mediante HPLC-HG-AAS.



15.3 Análisis de la biopelícula del biorreactor semi-continuo

La biopelícula y los cristales de calcita formados por MICP, fueron observados a través de SEM. Se tomaron muestras de zeolita, que fueron lavadas tres veces con PBS 1X (5000 rpm por 5 minutos) para desprender las células no adheridas, finalmente se fijaron con glutaraldehído al 2,5% y se almacenaron a 4 °C para su posterior análisis por SEM-EDS utilizando un equipo JEOL, modelo JSM-638 OLV, 2005).

15.4 Evaluación de la toxicidad del efluente final del sistema de tratamiento biológico aeróbico secuencial

Para estudiar el efecto tóxico del afluente inicial (A1), el afluente del segundo biorreactor (A2) y el efluente final (E2) del sistema de tratamiento biológico aeróbico secuencial, se aislaron células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) utilizando una digestión de venas de cordón umbilical (HUVEC) con 0,25 mg·ml⁻¹ de colagenasa tipo II de *Clostridium histolyticum* (Boehringer, Mannheim, FRG) y fueron cultivadas hasta la confluencia (González y col., 2004; Casanello y col., 2009). Los experimentos fueron realizados con D-glucosa normal (5 mM) o D-glucosa alta (25 mM) en presencia o ausencia (24 horas) de los afluentes o efluente respectivos. Después de este período de incubación, las células fueron expuestas a 1 µM de la sonda fluorescente 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato acetyl éster (Molecular Probes, Leiden, Inglaterra) durante 30 minutos, tiempo en el que es sensible a la oxidación al aumentar las especies reactivas de oxígeno (ROS) (La Favor y col., 2014). La fluorescencia fue medida utilizando un lector de microplacas (Bio-Rad) a 485 nm de excitación y 583 nm de emisión. Los porcentajes de viabilidad obtenidos fueron analizados estadísticamente utilizando el programa GraphPad Prism 5 (Guzmán-Fierro y col., 2015).

16. Determinación analítica de cinéticas de aparición y oxidación de arsénico a través de HPLC-HG-AAS

Para determinar la capacidad de reducir compuestos organoarsenicales del consorcio bacteriano, se midió la aparición de arsénico inorgánico total durante el crecimiento del consorcio en presencia de ROX, NIT y MSMA. Para determinar la capacidad de oxidar arsenito y co-precipitar arsénico con la calcita por parte de *Pseudomonas arsenicoxydans*, se midió arsenito, arseniato y arsénico total durante el crecimiento bacteriano en presencia de As(III) y As(V). Se realizó tomando muestras en triplicado de forma periódica, durante el crecimiento de los cultivos, que luego se filtraron (0.22 μm) y fueron almacenadas a -20 °C hasta su análisis. Las muestras fueron analizadas mediante HPLC-HG-AAS, sistema que consiste en la unión de una técnica de separación cromatográfica (HPLC), un proceso de generación de hidruros (HG) y su posterior detección por espectrofotometría de absorción atómica en cubeta de cuarzo (QAAS) (Arias, 2005). Los análisis gráficos, cinéticas de aparición de arsénico y cinéticas de oxidación, fueron realizados con el software GraphPad Prism 5 (© 1992-201 GraphPad Software, Inc.).

17. Análisis estadísticos y parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos fueron calculados desde los resultados obtenidos a partir de las curvas de crecimiento bacteriano, las cinéticas de aparición de arsénico inorgánico y las cinéticas de remoción de arsénico inorgánico. Se obtuvieron las velocidades de crecimiento bacteriano (k), el porcentaje de organoarsenical transformado a arsénico inorgánico, el porcentaje de arsénico inorgánico removido, las velocidades máximas de aparición de arsénico y las velocidades máximas de remoción de arsénico.

Los porcentajes de transformación a arsénico inorgánico fueron calculados como la razón entre el As inorgánico y el As orgánico inicial. Las velocidades máximas de reducción de organoarsenicales y de remoción de arsénico fueron calculadas a través del modelamiento matemático con el modelo de Weibull, con el cual se obtuvieron los R^2 mayores para el modelamiento de los datos en todos los casos. Para comparar entre los ensayos del consorcio con los distintos organoarsenicales, las velocidades máximas arsenicales fueron racionalizadas con la concentración inicial del arsénico orgánico, lo cual fue denominado concentración relativa (C/C_0) (Selim y col., 1977).

Para comparar entre los ensayos de *P. arsenicoxydans* cultivada en presencia de las distintas especies de arsénico inorgánico, las velocidades máximas arsenicales fueron racionalizadas con la concentración inicial del arsénico inorgánico, obteniendo la concentración relativa (C/C_0).

Los parámetros fueron evaluados a través del análisis de varianza (ANOVA) de una vía y posteriormente se seleccionó el test de Tukey para separar las medias. La comparación individual de las medias de los parámetros cinéticos, se realizó a través del test t de Student. Los análisis estadísticos fueron realizados en el programa GraphPad Prism 5.0 (© 1992-201 GraphPad Software, Inc.). Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados como diferencia estadística significativa.



IV. RESULTADOS

18. Caracterización de Consorcio bacteriano

18.1 Cinética de crecimiento del consorcio bacteriano en presencia de compuestos organoarsenicales

El consorcio bacteriano alcanzó su máximo crecimiento a las 24 h, iniciando la fase exponencial a las 4 horas de cultivo (Figura 6). En la Tabla 1 se observan los parámetros cinéticos del consorcio crecido en presencia de los compuestos organoarsenicales. En orden creciente las velocidades de crecimiento (k) fueron NIT, ROX-NIT-MSMA, MSMA, CONTROL y ROX. Sin embargo, no existen diferencias estadísticamente significativas entre las k de ROX y el control ($p > 0.05$). Por otro lado, la k disminuyó significativamente cuando se adicionó NIT ($p < 0.001$), los tres organoarsenicales en mezcla ($p < 0.001$) y MSMA ($0.01 < p > 0.05$). La biomasa final (y_m) no varió al adicionar MSMA ($p > 0.05$) alcanzando su máximo crecimiento a las 40 h, pero aumentó significativamente al adicionar los tres organoarsenicales en mezcla ($p < 0.001$) alcanzando el máximo crecimiento a las 44 h, ROX ($0.001 < p > 0.01$) alcanzando el máximo crecimiento a las 21 h, y NIT ($0.01 < p > 0.05$) alcanzando el máximo crecimiento observado a las 60 h. Por otro lado, la biomasa inicial (Y_0) no presentó diferencias estadísticamente significativas entre ninguna de las condiciones ensayadas ($p > 0.05$). Es importante señalar que existieron

diferencias estadísticamente significativas entre las velocidades de crecimiento del consorcio crecido en presencia de MSMA, NIT y la mezcla de organoarsenicales respecto del control, sin embargo no existió diferencia significativa entre las k del consorcio crecido en presencia de ROX y crecido en ausencia de compuestos organoarsenicales (Tabla 2).

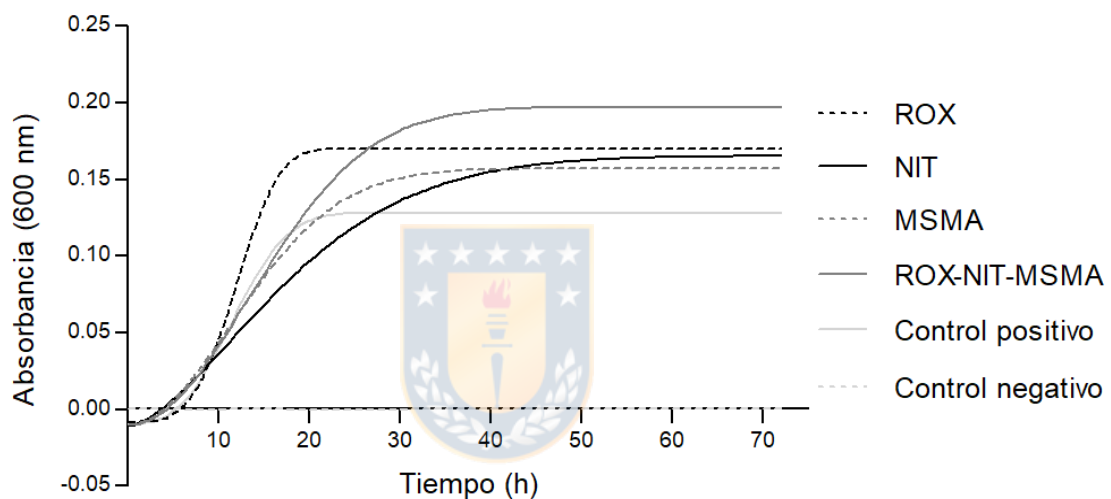


Figura 6. Cinética de crecimiento del consorcio bacteriano cultivado en presencia de compuestos organoarsenicales. Se cultivó el consorcio en presencia de ROX (0.5 mM), NIT (0.5 mM), MSMA (0.5 mM) y ROX-NIT-MSMA (0.5 mM cada uno). El control positivo corresponde al consorcio cultivado en ausencia de organoarsenicales y el control negativo es el medio sin inocular. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 1. Parámetros cinéticos de crecimiento del consorcio bacteriano cultivado en presencia de ROX (0.5 mM), NIT (0.5 mM), MSMA (0.5 mM) y ROX-NIT-MSMA (0.5 mM cada uno). Fuente: Elaboración propia.

	Control	ROX	NIT	MSMA	ROX-NIT-MSMA
Y_m (OD _{600nm})	0,128±0,004	0,170±0,006	0,165±0,008	0,157±0,006	0,197±0,007
Y_0 (OD _{600nm})	-0,009±0,006	-0,008±0,008	-0,011±0,007	-0,010±0,007	-0,010±0,007
k (OD _{600nm} · h ⁻¹)	0,075±0,004	0,075±0,003	0,048±0,003	0,061±0,004	0,054±0,003
R^2	0,951	0,952	0,956	0,959	0,965

Los parámetros cinéticos fueron obtenidos a través del modelo matemático de Weibull. Se presentan resultados con su respectiva desviación estándar. Y_m , biomasa máxima alcanzada; Y_0 , biomasa inicial; k , velocidad máxima de crecimiento.



Tabla 2. Test de Tukey de comparación múltiple de las velocidades máximas de crecimiento (k) del consorcio bacteriano cultivado en presencia de ROX (0.5 mM), NIT (0.5 mM), MSMA (0.5 mM) y ROX-NIT-MSMA (0.5 mM cada uno).
Fuente: Elaboración propia.

	Diferencia entre las medias	Significancia estadística	
Control Positivo vs ROX	8,333e-005	No	ns
Control Positivo vs NIT	0,026	Si	***
Control Positivo vs MSMA	0,013	Si	*
Control Positivo vs ROX-NIT-MSMA	0,021	Si	***
ROX vs NIT	0,026	Si	***
ROX vs MSMA	0,013	Si	*
ROX vs ROX-NIT-MSMA	0,021	Si	***
NIT vs MSMA	-0,013	Si	*
NIT vs ROX-NIT-MSMA	-0,005	No	ns
MSMA vs ROX-NIT-MSMA	0,008	No	ns

*** $p < 0.001$; ** $0.001 < p < 0.01$; * $0.01 < p < 0.05$; ns $p > 0.005$

18.2 Reducción de compuestos organoarsenicales mediada por el consorcio bacteriano

En la Figura 7 se representa la cinética de aparición de arsénico inorgánico durante la reducción de compuestos organoarsenicales mediada por el consorcio bacteriano. Las velocidades máximas de aparición de arsénico (C) en orden decreciente fueron ROX-NI-MSMA, MSMA, ROX y NIT (Tabla 3). Sin embargo, al realizar la normalización de las C fraccionándolas por la concentración inicial de organoarsenical (Tabla 4), el análisis estadístico comprobó que no existieron diferencias significativas entre las máximas velocidades de aparición de arsénico de los ensayos (Tabla 5).

Como se aprecia en la gráfica de la Figura 7 la máxima concentración alcanzada (C_m) por el consorcio crecido en presencia de la mezcla de organoarsenicales es mayor a la C_m alcanzada por el consorcio ensayado en las otras tres condiciones ($p < 0,05$), lo que se confirmó al obtener los parámetros cinéticos mediante el modelamiento matemático, donde la C_m alcanzada por ROX-NIT-MSMA es 2,9 veces la C_m de ROX, cuya concentración máxima alcanzada fue la menor de entre todos los ensayos. Sin embargo, sólo existieron diferencias estadísticamente significativas entre los ensayos ROX vs ROX-NIT-MSMA ($p = 0,0001$), NIT vs ROX-NIT-MSMA ($p = 0,0009$) y MSMA vs ROX-NIT-MSMA ($p = 0,0015$).

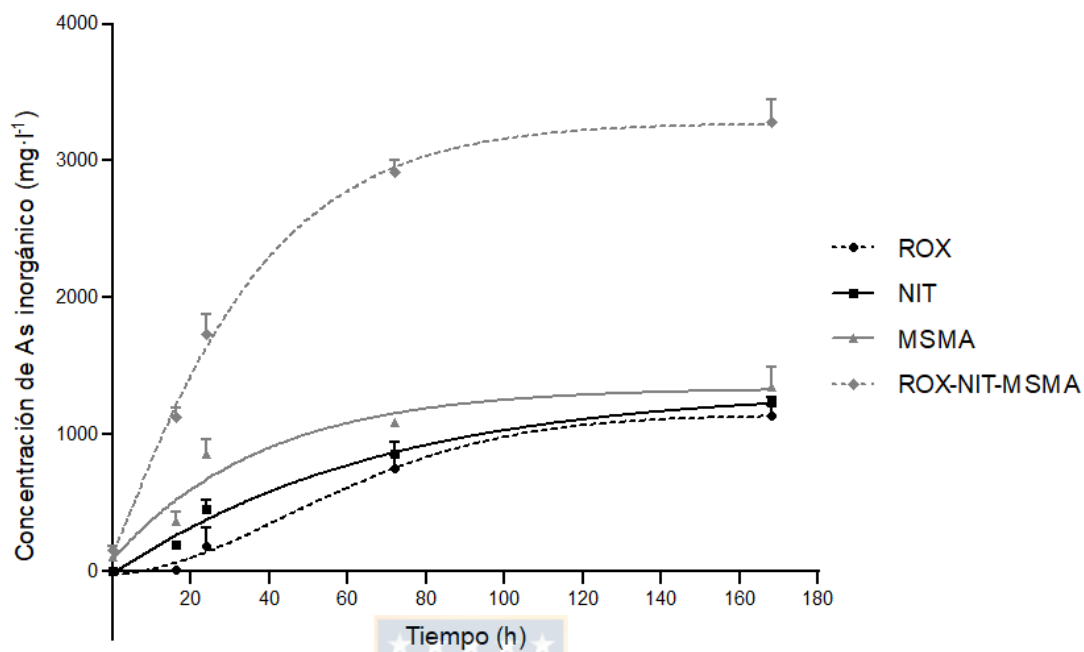


Figura 7. Cinética de aparición de arsénico inorgánico a partir de la reducción de compuestos organoarsenicales mediada por el consorcio bacteriano. El gráfico representa la aparición de arsénico inorgánico total. Se cultivó el consorcio en presencia de ROX (0.5 mM), NIT (0.5 mM), MSMA (0.5 mM) y ROX-NIT-MSMA (0.5 mM cada uno). Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3. Parámetros cinéticos de aparición de arsénico inorgánico a partir de la reducción de compuestos organoarsenicales mediada por el consorcio bacteriano cultivado en presencia de ROX (0.5 mM), NIT (0.5 mM), MSMA (0.5 mM) y ROX-NIT-MSMA (0.5 mM cada uno). Fuente: Elaboración propia.

	ROX	NIT	MSMA	ROX-NIT-MSMA
C_m (mg·l ⁻¹)	1141±55.13	1327±120.0	1341±117.4	3276±75.27
C_0 (mg·l ⁻¹)	-17,39±47.45	-7,801±41.89	91,04±88.73	146,4±69.11
C (mg·l ⁻¹ ·h ⁻¹)	0,015±0.001	0,015±0.003	0,026±0.007	0,029±0.002
R^2	0,974	0,981	0,919	0,992

Los parámetros cinéticos fueron obtenidos a través del modelo matemático de Weibull. Se presentan resultados con su respectiva desviación estándar. C_m , concentración máxima alcanzada; C_0 , concentración inicial; C , velocidad máxima de aparición de arsénico inorgánico.

Tabla 4. Concentración relativa (C/C_0) de los compuestos organoarsenicales a partir de la reducción mediada por el consorcio bacteriano cultivado en presencia de ROX (0.5 mM), NIT (0.5 mM), MSMA (0.5 mM) y ROX-NIT-MSMA (0.5 mM cada uno). Fuente: Elaboración propia.

Organoarsenical	C/C0
ROX	0,039±0,004
NIT	0,038±0,010
MSMA	0,088±0,027
ROX-NIT-MSMA	0,026±0,004

Se presentan resultados con su respectiva desviación estándar.

Tabla 5. Test de Tukey de comparación múltiple de las concentraciones relativas (C/C_0) de los compuestos organoarsenicales a partir de la reducción mediada por el consorcio bacteriano cultivado en presencia de ROX (0.5 mM), NIT (0.5 mM), MSMA (0.5 mM) y ROX-NIT-MSMA (0.5 mM cada uno). Fuente: Elaboración propia.

	Diferencia entre las medias	Significancia estadística	
ROX vs NIT	0,001	No	ns
ROX vs MSMA	-0,050	No	ns
ROX vs ROX-NIT-MSMA	0,012	No	ns
NIT vs MSMA	-0,050	No	ns
NIT vs ROX-NIT-MSMA	0,011	No	ns
MSMA vs ROX-NIT-MSMA	0,062	No	ns

*** $p < 0.001$; ** $0.001 < p < 0.01$; * $0.01 < p < 0.05$; ns $p > 0.05$

En la Tabla 6 se encuentran los porcentajes finales de reducción de los compuestos organoarsenicales a arsénico inorgánico. Los porcentajes de reducción en orden decreciente fueron MSMA, NIT, ROX y ROX-NIT-MSMA, sin embargo no existieron diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Tabla 7), excepto entre MSMA vs ROX-NIT-MSMA ($0,01 < p < 0,05$).

Tabla 6. Compuestos organoarsenicales transformados a arsénico inorgánico a partir de la reducción mediada por el consorcio bacteriano cultivado en presencia de ROX (0.5 mM), NIT (0.5 mM), MSMA (0.5 mM) y ROX-NIT-MSMA (0.5 mM cada uno). Fuente: Elaboración propia.

Organoarsenical	Organoarsenical transformado (%)
ROX	96,69±0,131
NIT	96,95±0,056
MSMA	97,21±0,169
ROX-NIT-MSMA	96,57±0,094

Se presentan resultados con su respectiva desviación estándar.



Tabla 7. Test de Tukey de comparación múltiple del porcentaje de organoarsenical transformado a arsénico inorgánico a partir de la reducción mediada por el consorcio bacteriano cultivado en presencia de ROX (0.5 mM), NIT (0.5 mM), MSMA (0.5 mM) y ROX-NIT-MSMA (0.5 mM cada uno). Fuente: Elaboración propia.

	Diferencia entre las medias	Significancia estadística	
ROX vs NIT	-0,264	No	ns
ROX vs MSMA	-0,518	No	ns
ROX vs ROX-NIT-MSMA	0,116	No	ns
NIT vs MSMA	-0,254	No	ns
NIT vs ROX-NIT-MSMA	0,381	No	ns
MSMA vs ROX-NIT-MSMA	0,635	Si	*

*** $p < 0.001$; ** $0.001 < p < 0.01$; * $0.01 < p < 0.05$; ns $p > 0.05$

19. *Pseudomonas arsenicoxydans*

19.1 Actividad ureolítica y precipitación de CaCO_3 de *P. arsenicoxydans*

Como se aprecia en la Figura 8, mediante el test de la ureasa se observó que *P. arsenicoxydans* fue capaz de hidrolizar la urea. Al probar dos medios de cultivo previamente descritos para la precipitación de cristales de calcita

(CaCO₃) (Hammes y col., 2003 y Achal y col., 2009), como se muestra en la Figura 9, se evidenció que *P. arsenicoxydans* fue capaz de generar cristales de calcita en ambos medios de cultivo, sin embargo, los cristales generados a partir de la incubación en medio de cultivo descrito por Achal y col. (2009) generó cristales con las características deseadas observables al microscopio, es decir, cristales de tono verdoso.

Para los análisis posteriores mediante HPLC, fue necesario utilizar un medio de cultivo que no interfiriera con los compuestos químicos utilizados por la técnica. El trabajo previo de Valenzuela y col. (2015), con *P. arsenicoxydans*, demostró que el medio descrito por Battaglia-Brunet y col. (2002) es adecuado para estos análisis. Dado este antecedente y la evidencia obtenida con el experimento llevado a cabo en este trabajo, se decidió modificar el medio de cultivo Battaglia-Brunet, adicionándole urea y CaCl₂ a la misma concentración final con la que se prepara el medio de cultivo descrito por Achal y col. (2009) para las pruebas posteriores con *P. arsenicoxydans*.

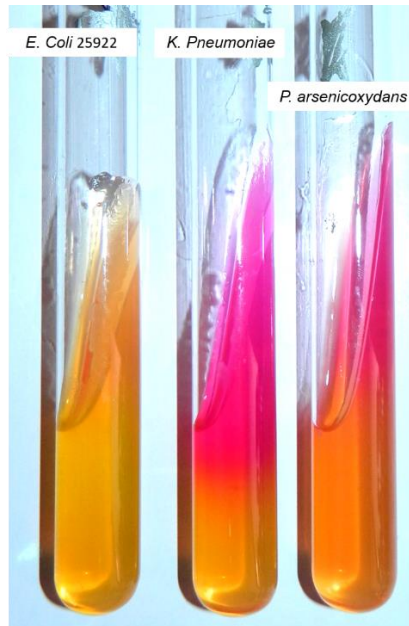


Figura 8. Actividad ureolítica de *P. arsenicoxydans* en Agar Base Christensen. *E. coli* 25922 control negativo; *K. pneumoniae* control positivo. Fuente: Elaboración propia.

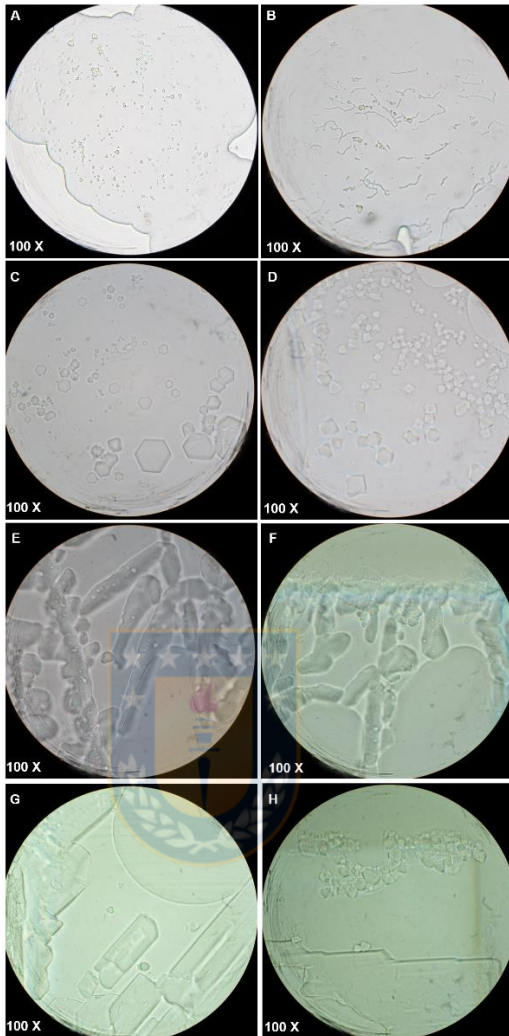


Figura 9. Cristales de calcita precipitados por *P. arsenicoxydans* luego de 24 h de incubación. A y B: cultivo en medio Achal; C y D: cultivo en medio Achal con As(III) 0.5 mM; E y F: cultivo en medio Hammes; G y H: cultivo en medio Hammes con As(III) 0.5 mM. Fuente: Elaboración propia.

19.2 Cinética de crecimiento y de remoción de arsénico por *P. arsenicoxydans* en estado planctónico en presencia de arsénico inorgánico

P. arsenicoxydans alcanzó su máximo crecimiento a las 53,5 h (Figura 10), iniciando la fase exponencial a las 12 h y a las 19 h alcanzó la velocidad máxima de crecimiento. Las velocidades de crecimiento (k) (Tabla 8) en orden creciente fueron As(III), As(V), control y As(III)-As(V) existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellas ($p < 0,0001$). La biomasa máxima alcanzada (Y_m) presentó diferencias significativas entre la mayoría de los ensayos, excepto entre el control y el cultivo suplementado con As(III)-As(V) ($p = 0,4583$), alcanzando la mayor biomasa el ensayo en presencia de As(V), seguido del control, y As(III)-As(V) y As(III) en orden decreciente. El ensayo As(III)-As(V), sin embargo, alcanzó la Y_m a las 46 h, es decir, 7,5 h antes que el control. Por otro lado, As(III) y As(V) alcanzaron la Y_m pasadas las 60 h de crecimiento.

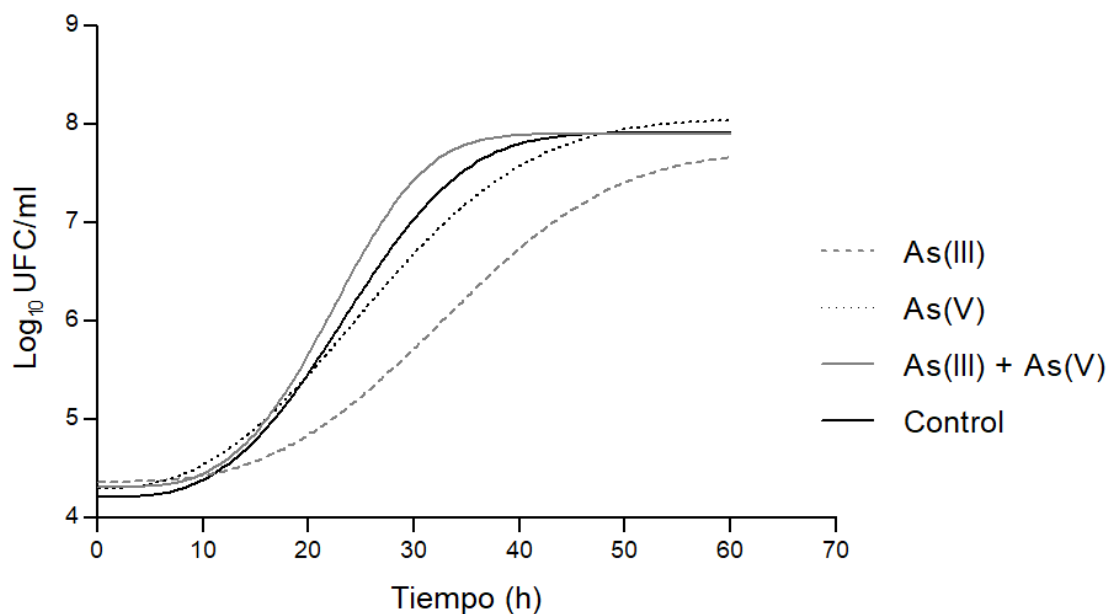


Figura 10. Cinética de crecimiento de *P. arsenicoxydans* cultivada en estado planctónico en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y en presencia de arsénico inorgánico. Se cultivó en presencia de As(III) (0.5 mM), As(V) (0.5 mM) y As(III)-As(V) (0.5 mM cada uno). El control positivo corresponde a la bacteria cultivada en ausencia de arsénico. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 8. Parámetros cinéticos de crecimiento de *P. arsenicoxydans* cultivada en estado planctónico en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y en presencia de As(III) (0.5 mM), As(V) (0.5 mM) y As(III)-As(V) (0.5 mM cada uno). Fuente: Elaboración propia.

	CONTROL	As(III)	As(V)	As(III)+As(V)
Y_m (Log ₁₀ UFC·ml ⁻¹)	7,916±0,026	7,719±0,111	8,054±0,066	7,903±0,030
Y_0 (Log ₁₀ UFC·ml ⁻¹)	4,210±0,022	4,369±0,025	4,300±0,043	4,314±0,027
k (Log ₁₀ UFC·ml ⁻¹ ·h ⁻¹)	0,038±0,000	0,027±0,002	0,033±0,001	0,041±0,000
R^2	0,997	0,994	0,990	0,996

Los parámetros cinéticos fueron obtenidos a través del modelo matemático de Weibull. Se presentan resultados con su respectiva desviación estándar. Y_m , biomasa máxima alcanzada; Y_0 , biomasa inicial; k , velocidad máxima de crecimiento.

En la Figura 11 se muestra la cinética de remoción de arsénico resultado de la oxidación de arsenito y co-precipitación de arsénico-calcita, mediada por *P. arsenicoxydans* cultivada en estado planctónico. La velocidad de remoción (C) fue mayor en el ensayo en presencia de ambas especies de arsénico, luego en presencia de As(V) y finalmente de As(III) (Tabla 9). Al racionalizar la C por la C_0 se obtuvieron las concentraciones relativas (C/C_0) que permitieron la comparación estadística directa de las medias de la velocidad máxima de crecimiento. Se comprobó que el orden creciente de las C/C_0 fue As(III)-As(V), As(III) y As(V) (Tabla 10), y que existieron diferencias significativas entre las velocidades máximas alcanzadas en cada uno de los ensayos ($p < 0.001$) (Tabla

11). Con respecto a la concentración máxima alcanzada (C_m), existieron diferencias significativas entre el ensayo realizado en presencia de ambas especies inorgánicas de arsénico y cada uno de los otros dos ensayos (en presencia de As(III) ($p=0,0003$) y en presencia de As(V) ($p=0,0192$)), sin embargo, no existieron diferencias entre las C_m obtenidas en los ensayos realizados en presencia de As(III) y As(V) ($p=0,4866$), aunque si existieron diferencias estadísticamente significativas entre la concentración inicial de ambos ensayos ($p < 0,0001$).

Como se presenta en la Tabla 12, se calculó el porcentaje de remoción de arsénico, que fue de un 100% a las 60 h de incubación en los tres ensayos, las mediciones poseen una desviación estándar igual a cero, dado que en las tres mediciones de la muestra hechas a las 60 h de incubación no se detectó arsénico inorgánico, por lo que se graficó como $0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de arsénico inorgánico total. Sin embargo el límite de detección del equipo es de $0,5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ por lo que se debe considerar la posibilidad de que aún existiera una concentración de arsénico inorgánico igual o inferior a $0,5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a las 60 h. Sin embargo, como se muestra en la Figura 11, existió una cinética de remoción de arsénico durante el cultivo, lo que se corrobora con el aumento de los porcentajes de remoción en el tiempo (Tabla 12).

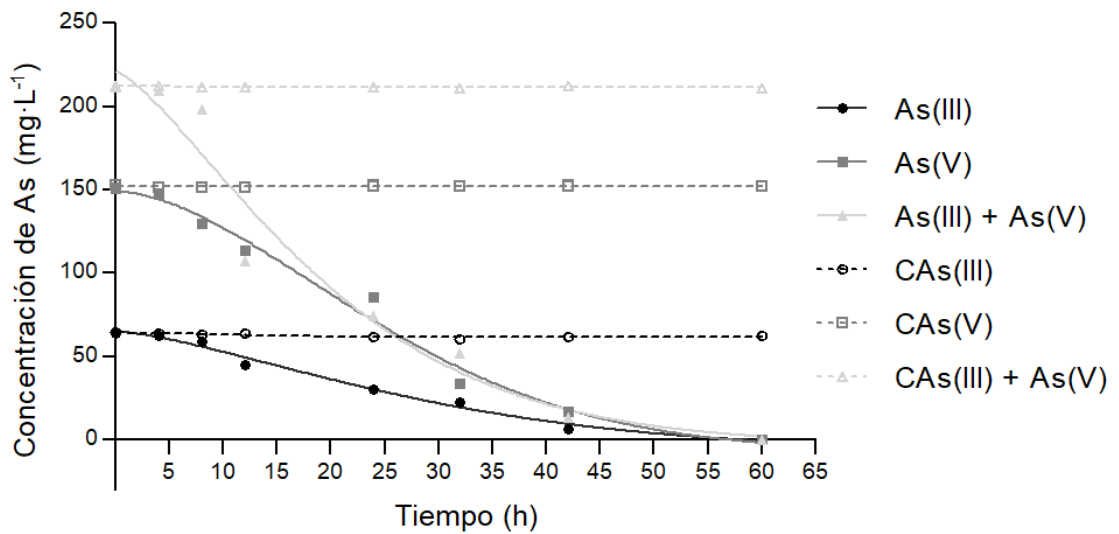


Figura 11. Cinética de remoción de arsénico a partir de la oxidación de arsenito y co-precipitación de calcita-arsénico mediada por *P. arsenicoxydans* cultivada en estado planctónico en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y en presencia de As(III) (0.5 mM), As(V) (0.5 mM) y As(III)-As(V) (0.5 mM cada uno). C: controles abióticos. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 9. Parámetros cinéticos de remoción de arsénico a partir de la oxidación de arsenito y co-precipitación de calcita-arsénico mediada por *P. arsenicoxydans* cultivada en estado planctónico en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y en presencia de As(III) (0.5 mM), As(V) (0.5 mM) y As(III)-As(V) (0.5 mM cada uno). Fuente: Elaboración propia.

	As(III)	As(V)	As(III) + As(V)
C_m (mg·l ⁻¹)	-6,327±4,473	-7,113±7,218	-2,666±14,77
C_0 (mg·l ⁻¹)	65,03±1,444	149,0±3,445	220,9±9,841
C (mg·l ⁻¹ ·h ⁻¹)	0,032±0,03	0,034±0,002	0,045±0,006
R^2	0,988	0,986	0,958

Los parámetros cinéticos fueron obtenidos a través del modelo matemático de Weibull. Se presentan resultados con su respectiva desviación estándar. C_m , concentración máxima alcanzada; C_0 , concentración inicial; C , velocidad máxima de remoción de arsénico.

Tabla 10. Concentración relativa (C/C_0) de arsénico inorgánico a partir de la oxidación de arsenito y co-precipitación de calcita-arsénico mediada por *P. arsenicoxydans* cultivada en estado planctónico en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y en presencia de As(III) (0.5 mM), As(V) (0.5 mM) y As(III)-As(V) (0.5 mM cada uno). Fuente: Elaboración propia.

Especie arsenical	C/C_0
As(III)	0,084±0,000
As(V)	0,090±0,000
As(III)-As(V)	0,060±0,000

Se presentan resultados con su respectiva desviación estándar.

Tabla 11. Test de Tukey de comparación múltiple de las concentraciones relativas (C/C_0) de arsénico inorgánico a partir de la oxidación de arsenito y co-precipitación de calcita-arsénico mediada por *P. arsenicoxydans* cultivada en estado planctónico en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y en presencia de As(III) (0.5 mM), As(V) (0.5 mM) y As(III)-As(V) (0.5 mM cada uno). Fuente: Elaboración propia.

	Diferencia entre las medias	Significancia estadística	
As(III) vs As(V)	-0,005	Si	***
As(III) vs As(III)-As(V)	0,024	Si	***
As(V) vs As(III)-As(V)	0,029	Si	***

*** $p < 0.001$; ** $0.001 < p < 0.01$; * $0.01 < p < 0.05$; ns $p > 0.005$

Tabla 12. Arsénico total removido del medio a partir de la oxidación de arsenito y co-precipitación de calcita-arsénico mediada por *P. arsenicoxydans* cultivada en estado planctónico en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y en presencia de As(III) (0.5 mM), As(V) (0.5 mM) y As(III)-As(V) (0.5 mM cada uno). Fuente: Elaboración propia.

Tiempo (h)	% arsenical removido		
	As (III)	As(V)	As(III)-As(V)
0	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
4	1,788±0,9581	2,050±0,9871	1,141±0,170
8	7,283±0,3202	13,78±2,134	6,311±0,250
12	29,61±0,4719	24,59±1,175	49,34±0,196
24	52,64±0,8688	43,30±0,422	64,77±0,679
32	64,32±0,2700	77,52±0,380	75,32±0,665
42	89,62±0,4636	88,60±0,311	93,73±0,331
60	100,0±0,000	100±0,000	100±0,000

Se presentan resultados con su respectiva desviación estándar.

19.3 Cinética de crecimiento de *P. arsenicoxydans* en estado planctónico y en presencia de arsénico orgánico

Con el fin de comprobar la factibilidad de crecimiento de *P. arsenicoxydans* en presencia de los compuestos organoarsenicales que posiblemente se encontrarían en el efluente del primer reactor del sistema de

tratamiento secuencial, se ensayó el crecimiento de la bacteria adicionando los compuestos organoarsenicales que se utilizarían como afluente del primer reactor en el sistema de tratamiento. Estos compuestos fueron ROX, NIT y MSMA. Como se ve en la Figura 12, *P. arsenicoxydans* fue capaz de crecer en presencia de los tres compuestos organoarsenicales por separado, pero presentó una cinética de muerte bacteriana en presencia de la mezcla de estos compuestos. Las velocidades de crecimiento (k) presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí ($p < 0,0001$). En orden ascendente las velocidades de crecimiento fueron ROX, NIT, control, MSMA (Tabla 13). La k de muerte en presencia de la mezcla ROX-NIT-MSMA fue de $-0,026 \pm 0,002 \text{ Log}_{10}\text{UFC}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Cabe destacar que la máxima biomasa alcanzada (Y_m) entre algunas de las condiciones ensayadas tuvo diferencias significativas: control vs. NIT ($p < 0,0001$), Control vs. MSMA ($p = 0,0007$) y NIT vs. MSMA ($p = 0,0043$). Además, el control, ROX, NIT y MSMA mostraron diferencias significativas respecto del ensayo frente a la mezcla de organoarsenicales ($p < 0,05$). La biomasa alcanzada al final del experimento (Y_m) en el ensayo en presencia de la mezcla de compuestos fue de $2,957 \pm 0,134 \text{ Log}_{10}\text{UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$.

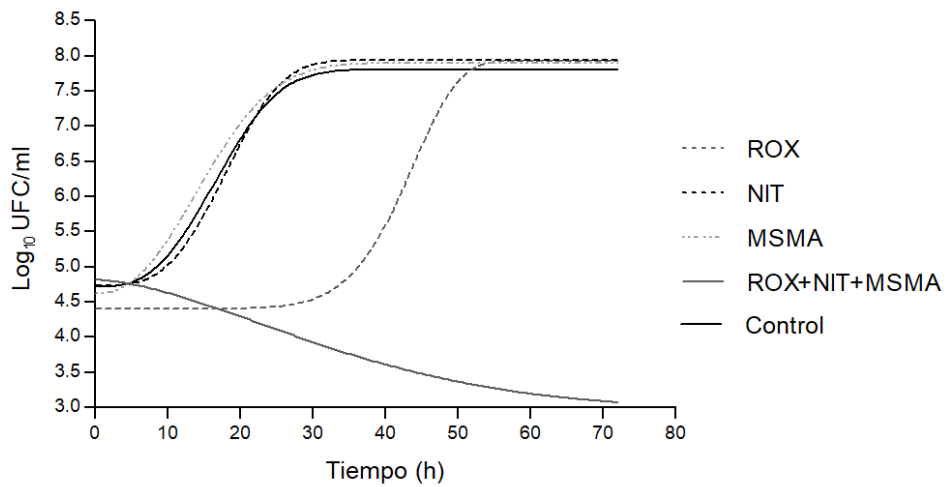
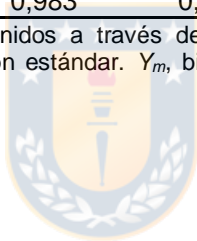


Figura 12. Cinética de crecimiento de *P. arsenicoxydans* cultivada en estado planctónico en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y en presencia de compuestos organoarsenicales. Se cultivó la bacteria en presencia de ROX (0.5 mM), NIT (0.5 mM), MSMA (0.5 mM), ROX-NIT-MSMA (0.5 mM cada uno). El control positivo corresponde a la cepa cultivada en ausencia de organoarsenicales. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 13. Parámetros cinéticos de crecimiento de *P. arsenicoxydans* cultivada en estado planctónico en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y en presencia de ROX (0.5 mM), NIT (0.5 mM), MSMA (0.5 mM), ROX-NIT-MSMA (0.5 mM cada uno). Fuente: Elaboración propia.

	CONTROL	ROX	NIT	MSMA	ROX+NIT+MSMA
Y_m (Log ₁₀ UFC·ml ⁻¹)	7,804±0,018	7,929±0,080	7,939±0,027	7,901±0,020	2,957±0,134
Y_0 (Log ₁₀ UFC·ml ⁻¹)	4,719±0,030	4,402±0,042	4,732±0,042	4,620±0,036	4,813±0,046
k (Log ₁₀ UFC·ml ⁻¹ ·h ⁻¹)	0,052±0,000	0,022±0,000	0,050±0,001	0,057±0,001	-0,026±0,002
R ²	0,997	0,983	0,994	0,996	0,968

Los parámetros cinéticos fueron obtenidos a través del modelo matemático de Weibull. Se presentan resultados con su respectiva desviación estándar. Y_m , biomasa máxima alcanzada; Y_0 , biomasa inicial; k , velocidad máxima de crecimiento.



19.4 Cinética de crecimiento y de remoción de arsénico de *P. arsenicoxydans* en estado sésil y en presencia de arsénico inorgánico

La biopelícula bacteriana de *P. arsenicoxydans* cultivada en zeolita como soporte alcanzó su máximo crecimiento a las 38 horas (Figura13), 15,5 h antes que en estado planctónico, iniciando la fase exponencial a las 18 h y a las 23 h alcanzó la velocidad máxima de crecimiento. Las velocidades de crecimiento (k) (Tabla 14) en orden creciente fueron control, As(III), As(III)-As(V) y As(V), existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellas ($p < 0,0001$), excepto entre As(III) y As(III)-As(V) ($p = 0,3121$). La biomasa máxima alcanzada

(Y_m) presentó diferencias significativas entre la mayoría de los ensayos ($p=0,0001$), excepto entre As(V) y As(III)-As(V) ($p=0,1099$), alcanzando la mayor biomasa el ensayo en presencia de As(III), seguido de As(III)-As(V), As(III) y el control, en orden decreciente.

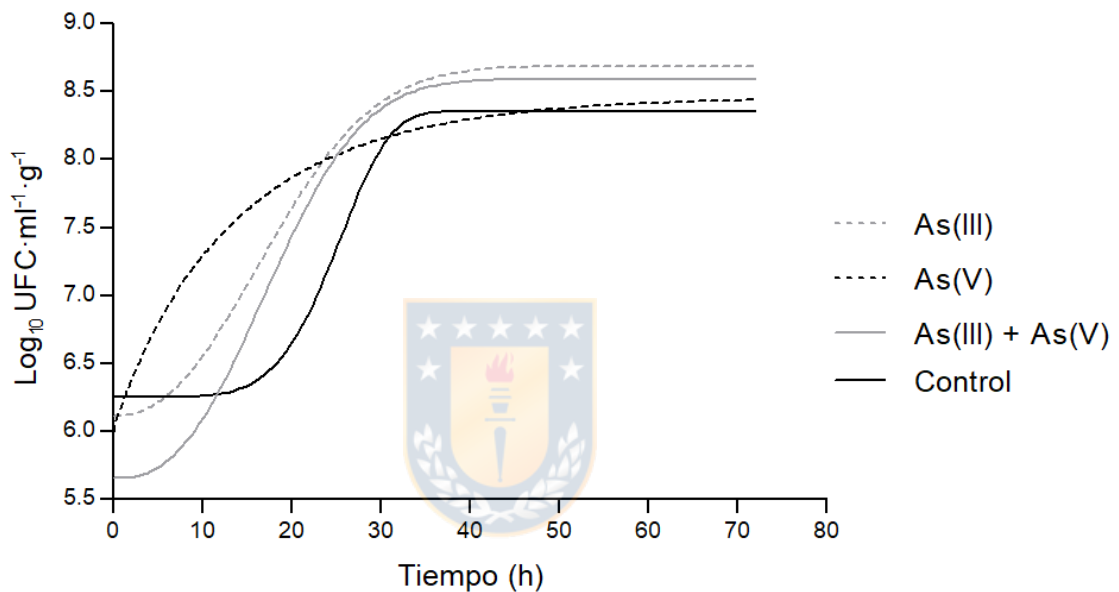


Figura 13. Cinética de crecimiento de la biopelícula de *P. arsenicoxydans* cultivada en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y en presencia de arsénico inorgánico. Se cultivó en presencia de As(III) (0.5 mM), As(V) (0.5 mM) y As(III)-As(V) (0.5 mM cada uno). El control positivo corresponde a la bacteria cultivada en ausencia de arsénico. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 14. Parámetros cinéticos de crecimiento de la biopelícula de *P. arsenicoxydans* cultivada en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y en presencia de As(III) (0.5 mM), As(V) (0.5 mM) y As(III)-As(V) (0.5 mM cada uno). Fuente: Elaboración propia.

	CONTROL	As(III)	As(V)	As(III)+As(V)
Y_m (Log ₁₀ UFC·g ⁻¹)	8,354±0,062	8,688±0,027	8,461±0,031	8,592±0,058
Y_0 (Log ₁₀ UFC·g ⁻¹)	6,252±0,061	6,115±0,049	5,996±0,035	5,656±0,092
k (Log ₁₀ UFC·g ⁻¹ ·h ⁻¹)	0,038±0,001	0,048±0,001	0,073±0,003	0,049±0,002
R^2	0,978	0,992	0,994	0,974

Los parámetros cinéticos fueron obtenidos a través del modelo matemático de Weibull. Se presentan resultados con su respectiva desviación estándar. Y_m , biomasa máxima alcanzada; Y_0 , biomasa inicial; k , velocidad máxima de crecimiento.

En la figura 14 se muestra la cinética de remoción de arsénico resultado de la oxidación de arsenito y co-precipitación de arsénico-calcita, mediada por *P. arsenicoxydans* cultivada en estado sésil. La velocidad de remoción (C) fue mayor en el ensayo en presencia de ambas especies de arsénico, luego en presencia de As(III) y finalmente de As(V) (Tabla 15). Al racionalizar la C por la C_0 se obtuvieron las concentraciones relativas (C/C_0) que permitieron la comparación estadística directa de las medias de la velocidad máxima de crecimiento. Se comprobó que el orden creciente de las C/C_0 fue As(III)-As(V), As(V) y As(III) (Tabla 16), y que existieron diferencias significativas entre las velocidades máximas alcanzadas entre los ensayos ($0.001 < p < 0.01$ para As(III) vs As(V); $p < 0.001$ para As(III) vs As(III)-As(V); $0.01 < p < 0.05$ para As(V) vs

As(III)-As(V)) (Tabla 17). Con respecto a la concentración máxima (C_m) alcanzada, existieron diferencias significativas entre los tres ensayos realizados ($p=0,0001$). Como se presenta en la Tabla 18, se calculó el porcentaje de remoción de arsénico, que fue de un 100% a las 60 h de incubación en los tres ensayos, las mediciones poseen una desviación estándar igual a cero, dado que en las tres mediciones de la muestra hechas a las 60 h de incubación, no se detectó arsénico inorgánico, por lo que se graficó como $0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de arsénico inorgánico total. Sin embargo el límite de detección del equipo es de $0,5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ por lo que se debe considerar la posibilidad de que aún existiera una concentración de arsénico inorgánico igual o inferior a $0,5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a las a las 60 h. Sin embargo, como se muestra en la Figura 14, existe una cinética de remoción del arsénico durante el cultivo, lo que se corrobora con el aumento de los porcentajes de remoción en el tiempo (Tabla 18).

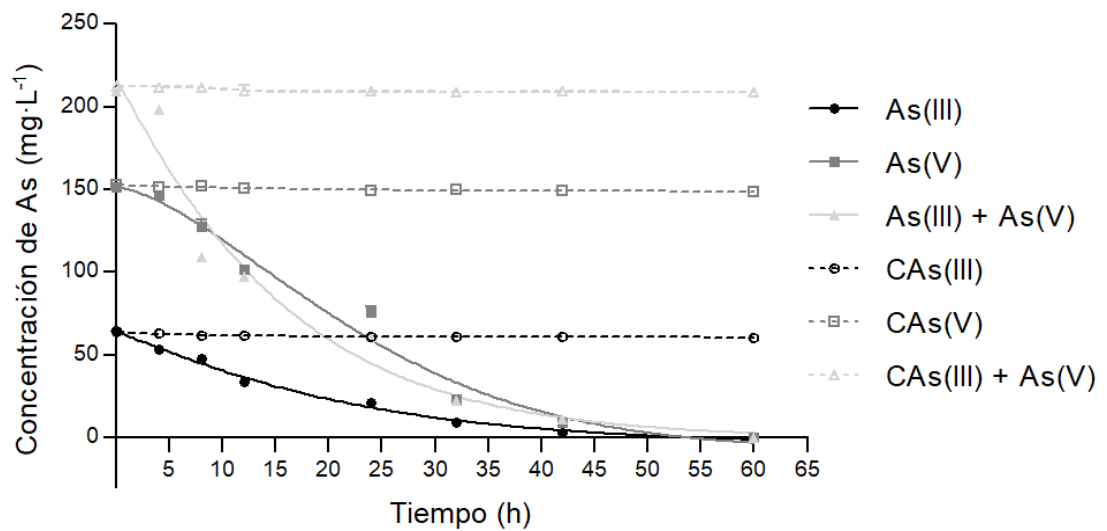


Figura 14. Cinética de remoción de arsénico a partir de la oxidación de arsenito y co-precipitación de calcita-arsénico mediada por la biopelícula de *P. arsenicoxydans* cultivada en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y en presencia de de As(III) (0.5 mM), As(V) (0.5 mM) y As(III)-As(V) (0.5 mM cada uno). C: controles abióticos. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 15. Parámetros cinéticos de remoción de arsénico a partir de la oxidación de arsenito y co-precipitación de calcita-arsénico mediada por la biopelícula de *P. arsenicoxydans* cultivada en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y en presencia de As(III) (0.5 mM), As(V) (0.5 mM) y As(III)-As(V) (0.5 mM cada uno). Fuente: Elaboración propia.

	As(III)	As(V)	As(III) + As(V)
C_m (mg·l ⁻¹)	-3,997±2,504	-7,414±7,688	-0,491±11,39
C_0 (mg·l ⁻¹)	63,83±1,272	151,2±4,368	216,1±8,881
C (mg·l ⁻¹ ·h ⁻¹)	0,046±0,003	0,038±0,002	0,063±0,008
R^2	0,992	0,981	0,964

Los parámetros cinéticos fueron obtenidos a través del modelo matemático de Weibull. Se presentan resultados con su respectiva desviación estándar. C_m , concentración máxima alcanzada; C_0 , concentración inicial; C , velocidad máxima de remoción de arsénico.

Tabla 16. Concentración relativa (C/C_0) de arsénico inorgánico a partir de la oxidación de arsenito y co-precipitación de calcita-arsénico mediada por la biopelícula de *P. arsenicoxydans* cultivada en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y en presencia de As(III) (0.5 mM), As(V) (0.5 mM) y As(III)-As(V) (0.5 mM cada uno). Fuente: Elaboración propia.

Especie arsenical	C/C_0
As(III)	0,122 ± 0,005
As(V)	0,102 ± 0,002
As(III)-As(V)	0,085 ± 0,005

Se presentan resultados con su respectiva desviación estándar. C_0 , concentración inicial (mg·l⁻¹); C , velocidad máxima de remoción de arsénico (mg·l⁻¹·h⁻¹).

Tabla 17. Test de Tukey de comparación múltiple de las concentraciones relativas (C/C_0) de arsénico inorgánico a partir de la oxidación de arsenito y co-precipitación de calcita-arsénico mediada por la biopelícula de *P. arsenicoxydans* cultivada en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y en presencia de As(III) (0.5 mM), As(V) (0.5 mM) y As(III)-As(V) (0.5 mM cada uno). Fuente: Elaboración propia.

	Diferencia entre las medias	Significancia estadística	
As(III) vs As(V)	0,020	Si	**
As(III) vs As(III)-As(V)	0,038	Si	***
As(V) vs As(III)-As(V)	0,017	Si	*

*** $p < 0.001$; ** $0.001 < p < 0.01$; * $0.01 < p < 0.05$; ns $p > 0.05$

Tabla 18. Arsénico total removido del medio a partir de la oxidación de arsenito y co-precipitación de calcita-arsénico mediada por la biopelícula de *P. arsenicoxydans* cultivada en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y en presencia de As(III) (0.5 mM), As(V) (0.5 mM) y As(III)-As(V) (0.5 mM cada uno). Fuente: Elaboración propia.

Tiempo (h)	% arsenical removido		
	As (III)	As(V)	As(III)-As(V)
0	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
4	17,11±2,257	3,405±1,459	5,141±0,458
8	25,91±1,843	15,94±3,074	47,83±0,832
12	47,09±1,998	32,93±1,072	53,35±0,595
24	66,62±2,846	50,02±2,381	70,93±1,196
32	85,56±1,900	84,53±1,088	89,35±0,557
42	95,62±1,202	93,79±0,663	94,48±0,672
60	100,0±0,000	100±0,000	100±0,000

Se presentan resultados con su respectiva desviación estándar.

En la Figura 15 se puede ver la estructura de la biopelícula formada por *P. arsenicoxydans* adherida a las partículas de zeolita en cada condición ensayada. Se apreciaron diferencias en la conformación de la biopelícula, dónde el ensayo control muestra una estructura que no evidencia la calcificación de las células bacterianas. Por otro lado, en los tres ensayos en

presencia de arsénico inorgánico se apreció una estructura calcificada de la biopelícula, evidenciando la co-precipitación de calcita y arsénico. Para comprobar que los cristales de calcita observados en la biopelícula son efectivamente formados por CaCO_3 y poseen arsénico en su composición, se realizó una EDS que demostró que efectivamente los cristales observados en la biopelícula contenían arsénico y estaban compuestos de calcio (Figura 16).



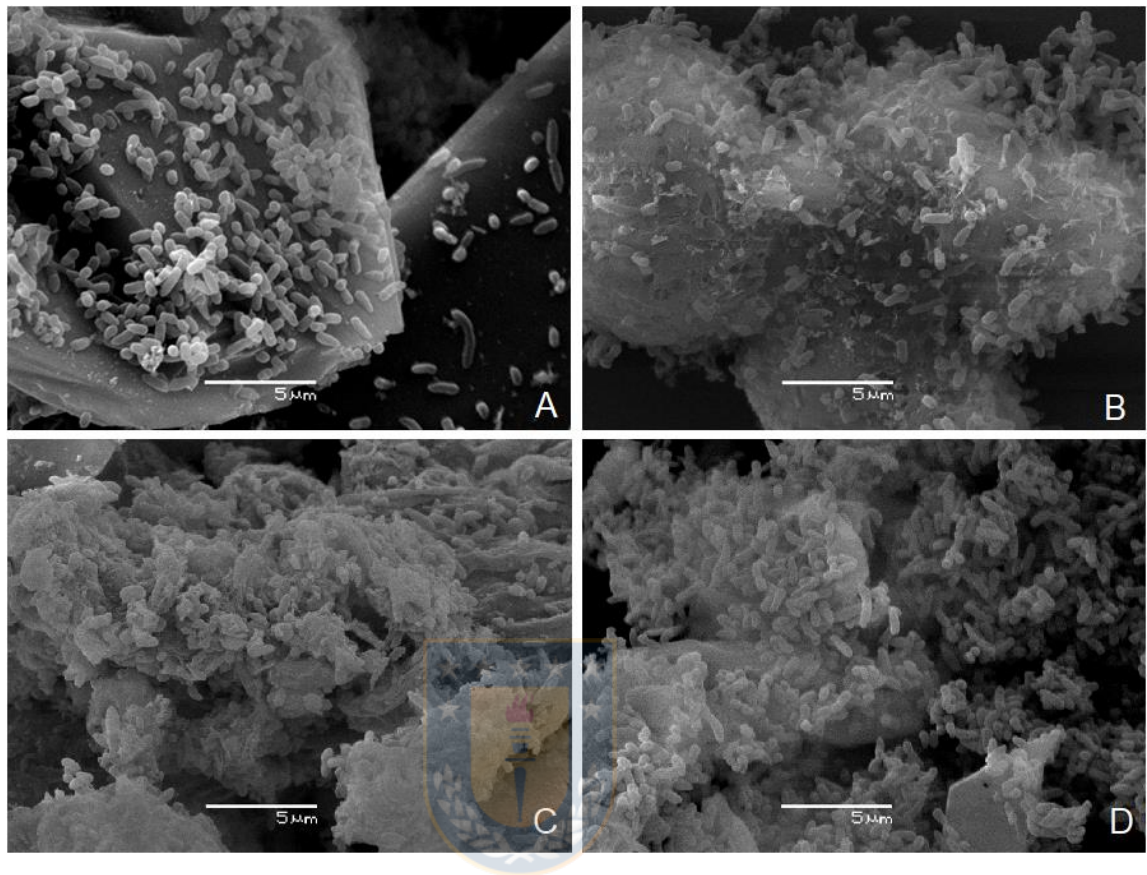


Figura 15. Microfotografía de la biopelícula formada por *P. arsenicoxydans* cultivada en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y en presencia de arsénico inorgánico, obtenida mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). A: control. B: adición de As(III) (0,5 mM). C: adición de As(V) (0,5 mM). D: adición de As(III) + As (V) (0,5 mM cada especie). Fuente: Elaboración propia.

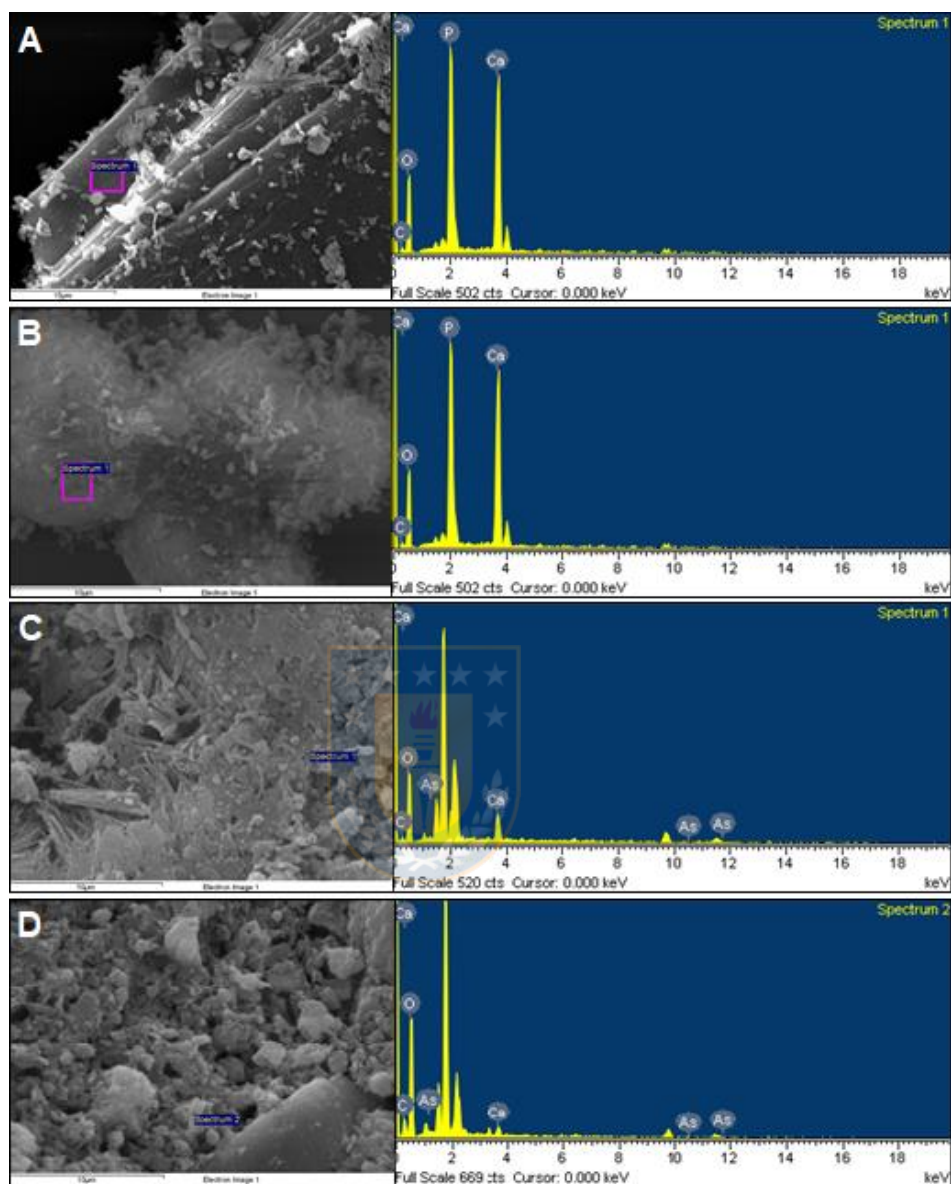


Figura 16. Detección de arsénico y calcio en la biopelícula de *P. arsenicoxydans* cultivada en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP y en presencia de arsénico inorgánico, a través espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS). A: control. B: adición de As(III) (0,5 mM). C: adición de As(V) (0,5 mM). D: adición de As(III) + As (V) (0,5 mM cada especie). Fuente: Elaboración propia.

Posteriormente se hizo crecer la bacteria en presencia de efluente de consorcio bacteriano (ECB) obtenido durante la caracterización de este, luego de 144 horas de incubación.

El crecimiento de *P. arsenicoxydans* en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP suplementado con ECB fue mayor que el control positivo en la mayoría de las concentraciones, sólo al ensayar el crecimiento en 100% v/v ECB, no hubo crecimiento. Cuatro de las concentraciones ensayadas mostraron un mayor aumento de biomasa que el control biótico. En orden creciente estas concentraciones fueron 50, 70, 12 y 6% v/v (Figura 17). El análisis estadístico mediante la prueba de t de Student arrojó diferencias significativas respecto al control para las concentraciones 6% v/v ($p=0,0023$), 12% v/v ($p=0,0053$) y 70% v/v ($p=0,0152$). No hubo diferencias significativas entre la concentración 50% v/v y el control biótico ($p=0,3598$).

El objetivo de este ensayo fue escoger una concentración de ECB para implementarla en el reactor semi-continuo del sistema de tratamiento biológico aeróbico secuencial dónde la biomasa correspondió a *P. arsenicoxydans*. Es necesario recalcar que el escalado de cultivos bacterianos a cultivos de mayor volumen muchas veces presenta inconvenientes de reproducibilidad (Neubauer y Junne, 2010). Por lo tanto, se decidió no utilizar la mayor concentración de ECB en que se obtuvo mayor crecimiento estadísticamente significativo (70% v/v) que el control biótico, pues la drástica disminución de nutrientes al 30% v/v

podría afectar negativamente el crecimiento de la biomasa. Por lo tanto, se escogió la concentración 12% v/v de ECB como condición a implementar en el reactor semi-continuo.

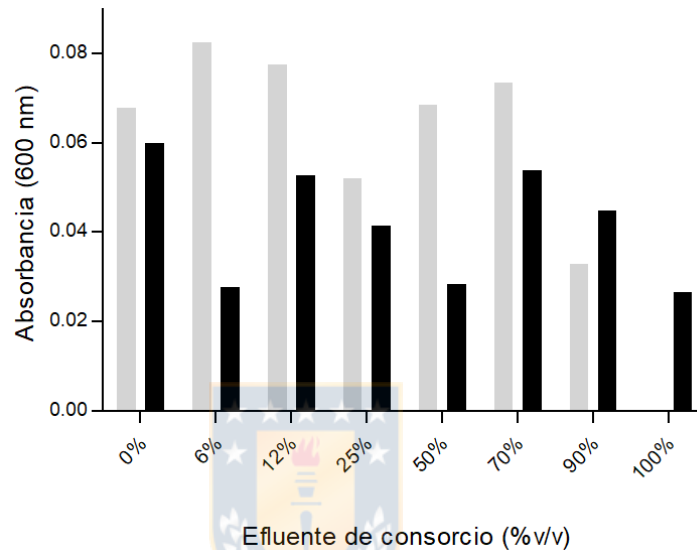


Figura 17. Crecimiento de *P. arsenicoxydans* en presencia de concentraciones crecientes (6, 12, 25, 50, 70 y 100% v/v) del efluente del consorcio bacteriano (ECB). Barras grises: cultivo en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP. Barras negras: cultivo en medio Battaglia-Brunet sin modificar. Como controles bióticos (0% v/v) se cultivó *P. arsenicoxydans* en ausencia de ECB. Fuente: Elaboración propia.

20. Sistema de tratamiento aeróbico secuencial

20.1 Cinéticas de crecimiento del consorcio bacteriano y de *P. arsenicoxydans*

El sistema de tratamiento aeróbico secuencial fue constituido con dos reactores. El primero de ellos fue un reactor discontinuo implementado para el crecimiento del consorcio bacteriano, el cual fue alimentado con un único afluente artificial con una mezcla de ROX, NIT y MSMA. El segundo, correspondió a un reactor semi-continuo implementado para el cultivo de *P. arsenicoxydans* en estado sésil (biopelícula) utilizando zeolita como soporte, el cual se alimentó con el efluente del reactor discontinuo diluido al 12% v/v en medio de cultivo descrito por Battaglia-Brunet y col. (2002) modificado para MICP.

La Figura 18 muestra la cinética de crecimiento del consorcio bacteriano en el reactor discontinuo durante las 144 h de funcionamiento del reactor. La biomasa máxima (Y_m) fue alcanzada a las 65 h de funcionamiento y la velocidad máxima de crecimiento fue de $0,038 \pm 0,001 \text{ OD}_{600\text{nm}} \cdot \text{h}^{-1}$ (Tabla 19).

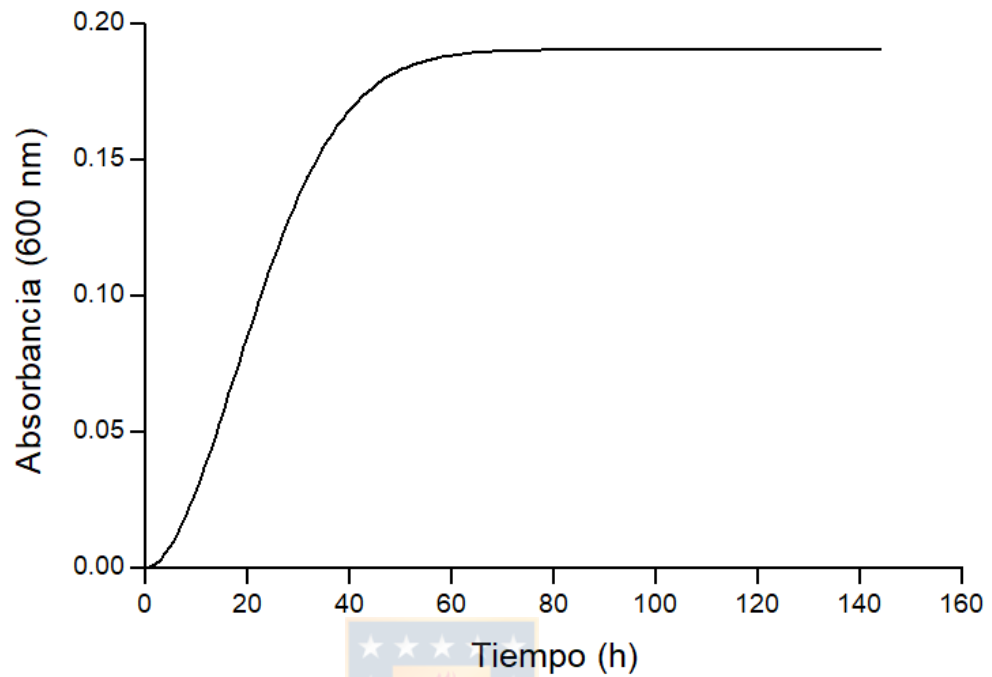


Figura 18. Cinética de crecimiento del consorcio bacteriano cultivado en el reactor discontinuo y en presencia de compuestos organoarsenicales. Se cultivó el consorcio en presencia de una mezcla de ROX (0.5 mM), NIT (0.5 mM) y MSMA (0.5 mM) (concentraciones finales). El tiempo de operación total del reactor fue de 144 h. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 19. Parámetros cinéticos de crecimiento del consorcio bacteriano cultivado en el reactor discontinuo y en presencia de una mezcla de ROX (0.5 mM), NIT (0.5 mM) y MSMA (0.5 mM) (concentraciones finales). El tiempo de operación total del reactor fue de 144 h. Fuente: Elaboración propia.

	Biorreactor discontinuo
$Y_m(\text{OD}_{600\text{nm}})$	0,190±0,003
$Y_0(\text{OD}_{600\text{nm}})$	0,000±0,004
$k(\text{OD}_{600\text{nm}} \cdot \text{h}^{-1})$	0,038±0,001
R^2	0,990

Los parámetros cinéticos fueron obtenidos a través del modelo matemático de Weibull. Se presentan resultados con su respectiva desviación estándar. Y_m , Biomasa máxima alcanzada; Y_0 , biomasa inicial; k , velocidad máxima de crecimiento.

Durante la operación del reactor semi-continuo se realizaron cambios del medio de cultivo cada 48 horas. A las 288 horas de operación el recambio de medio fue realizado con medio de cultivo Battaglia-Brunet modificado para MIPC suplementado con efluente del reactor discontinuo del consorcio bacteriano (12% v/v). La cinética de crecimiento de *P. arsenicoxydans* en el reactor fue determinada con el recuento de biomasa adherida durante las primeras 96 h de funcionamiento del reactor (Figura 19 A), y el reactor tuvo un tiempo de operación total de 408 h. La biomasa máxima (Y_m) fue alcanzada a las 78,8 h de funcionamiento, manteniéndose estable durante las 408 h de

operación del reactor (Figura 19 B), y la velocidad máxima de crecimiento fue de $0,050 \pm 0,002 \text{ Log}_{10}\text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (Tabla 20).

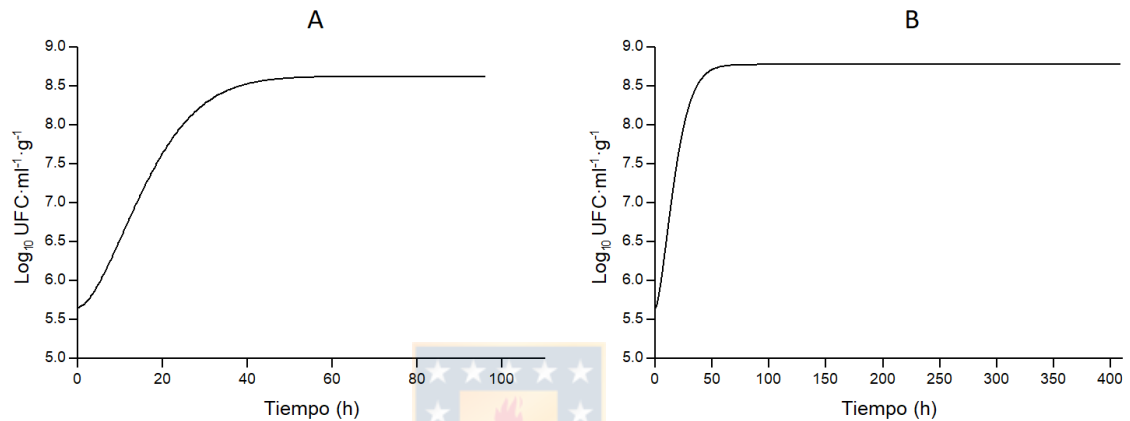


Figura 19. Cinética de crecimiento de la biopelícula de *P. arsenicoxydans* cultivada en el reactor semi-continuo implementado con medio Battaglia-Brunet modificado para MICP. A: Cinética de las primeras 96 horas de funcionamiento del reactor. B: Cinética durante el tiempo de operación total del reactor (408 h). Fuente: Elaboración propia.

Tabla 20. Parámetros cinéticos de crecimiento de la biopelícula de *P. arsenicoxydans* cultivada en el reactor semi-continuo implementado con medio Battaglia-Brunet modificado para MICP. Los parámetros cinéticos fueron obtenidos a partir del análisis de los datos de las primeras 96 horas de funcionamiento del reactor. Fuente: Elaboración propia.

	Biorreactor semi-continuo
Y_m (Log ₁₀ UFC·g ⁻¹)	8,753±0,048
Y_0 (Log ₁₀ UFC·g ⁻¹)	5,641±0,066
k (Log ₁₀ UFC·g ⁻¹ ·h ⁻¹)	0,050±0,002
R^2	0,988

Los parámetros cinéticos fueron obtenidos a través del modelo matemático de Weibull. Se presentan resultados con su respectiva desviación estándar. Y_m , Biomasa máxima alcanzada; Y_0 , biomasa inicial; k , velocidad máxima de crecimiento.

20.2 Transformación de compuestos arsenicales orgánicos e inorgánicos

En la Figura 20 se presenta la cinética de aparición de arsénico inorgánico durante la reducción de compuestos organoarsenicales a arsénico inorgánico mediada por el consorcio bacteriano en el tiempo total de operación del reactor discontinuo. Según el modelamiento matemático la velocidad máxima de aparición de arsénico (C) fue de $0,033\pm 0,001$ mg·l⁻¹·h⁻¹, la concentración inicial (C_0) fue de $4,7545\pm 53,75$ mg·l⁻¹ y la concentración máxima de arsénico

alcanzada (C_m) fue de $3352 \pm 32,46 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ medida a las 144 h de operación del reactor (Tabla 21). La concentración relativa (C/C_0) fue $0,007 \pm 0,000 \text{ h}^{-1}$. El porcentaje de compuestos organoarsenicales transformados a arsénico inorgánico fue de $96,70 \pm 0,04201\%$ a las 144 h de operación del reactor discontinuo (Tabla 22).

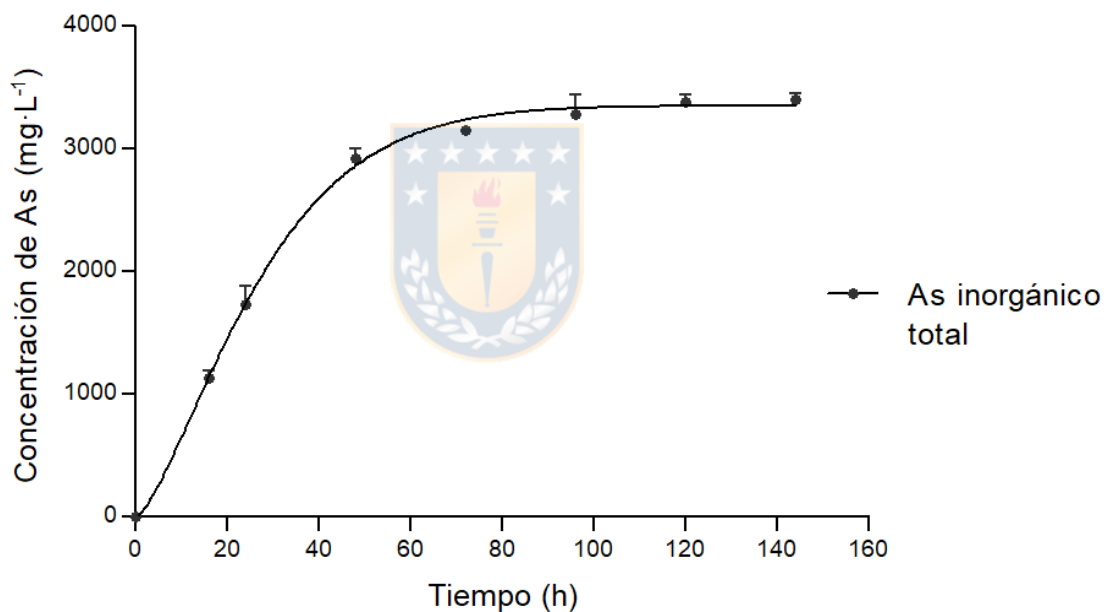


Figura 20. Cinética de aparición de arsénico inorgánico a partir de la reducción de compuestos organoarsenicales mediada por el consorcio bacteriano cultivado en el reactor discontinuo. El gráfico representa la aparición de arsénico inorgánico total. Se cultivó el consorcio en presencia de una mezcla de ROX (0.5 mM), NIT (0.5 mM) y MSMA (0.5 mM) (concentraciones finales). El tiempo de operación total del reactor fue de 144 h. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 21. Parámetros cinéticos de la aparición de arsénico inorgánico a partir de la reducción de compuestos organoarsenicales mediada por el consorcio bacteriano cultivado en el reactor discontinuo en presencia de una mezcla de en presencia de una mezcla de ROX (0.5 mM), NIT (0.5 mM) y MSMA (0.5 mM) (concentraciones finales). El tiempo de operación total del reactor fue de 144 horas. Fuente: Elaboración propia.

Biorreactor discontinuo	
C_m (mg·l ⁻¹)	3352±32,46
C_0 (mg·l ⁻¹)	-4,754±53,75
C (mg·l ⁻¹ ·h ⁻¹)	0,033±0,001
R^2	0,995

Los parámetros cinéticos fueron obtenidos a través del modelo matemático de Weibull. Se presentan resultados con su respectiva desviación estándar. C_m , concentración máxima alcanzada; C_0 , concentración inicial; C , velocidad máxima de aparición de arsénico inorgánico.

Tabla 22. Compuestos organoarsenicales transformados a arsénico inorgánico a partir de la reducción mediada por el consorcio bacteriano cultivado en el reactor discontinuo en presencia de una mezcla de en presencia de una mezcla de ROX (0.5 mM), NIT (0.5 mM) y MSMA (0.5 mM) (concentraciones finales). El tiempo de operación total del reactor fue de 144 h. Fuente: Elaboración propia.

Tiempo (h)	Porcentaje de organoarsenicales transformados a arsénico inorgánico (%)
0	0,000±0,000
16	90,01±0,573
24	93,49±0,544
48	96,15±0,106
72	96,43±0,007
96	96,57±0,163
120	96,68±0,058
144	96,70±0,042

Se presentan resultados con su respectiva desviación estándar.

La fluctuación de arsenito y arseniato durante las primeras 240 horas operación se observan en la Figura 21. Durante este periodo de operación, los recambios de medio de cultivo fueron hechos a las 48 h y 96 h con medio Battaglia-Brunet suplementado con arsenito (0.5 mM, 37.4608 PPM As equivalentes) y a las 168 h y 216 h fueron ejecutados con medio Battaglia-Brunet modificado para MICP sin arsenito.

A las 288 h se realizó un último recambio de medio de cultivo con medio Battaglia-Brunet modificado para MIPC suplementado con el efluente del reactor discontinuo (12% v/v). Como se observa en la Figura 22, la concentración de arsénico inorgánico presente en el medio del reactor semi-continuo aumentó 55,2 veces debido a la adición del efluente del primer reactor. Utilizando las concentraciones de arsénico inorgánico total durante el periodo desde que se hizo el recambio de medio suplementado con el efluente del reactor semi-continuo hasta el tiempo final de operación del reactor (288-408 h), se determinó la cinética de remoción de arsénico, resultado de la oxidación de arsenito y co-precipitación de arsénico-calcita mediada por *P. arsenicoxydans* cultivada en estado sésil (Figura 23).

La velocidad de remoción (C) de arsénico fue $0,033 \pm 8,750e-007$ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, la concentración inicial (C_0) de arsénico fue $3386 \pm 0,053$ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ y la concentración máxima (C_m) de arsénico alcanzada fue $-0,031 \pm 0,031$ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Tabla 23). El porcentaje de remoción de arsénico al final de la operación del reactor fue de un 100% (Tabla 24), las mediciones tuvieron una desviación estándar igual a cero, dado que en las tres mediciones de la muestra hechas a partir de las 360 h de incubación, no se detectó arsénico inorgánico, por lo que se graficó como 0 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de arsénico inorgánico total. Sin embargo el límite de detección del equipo es de $0,5$ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ por lo que se debe considerar la posibilidad de que aún existiera una concentración de arsénico inorgánico igual o inferior a $0,5$ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a partir de las 360 h. Como se muestra en la Figura 23,

existió una cinética de remoción del arsénico durante el cultivo, lo que se corroboró con el aumento de los porcentajes de remoción en el tiempo (Tabla 24). La remoción al 100% se consiguió a las 72 horas desde la incorporación del efluente del reactor discontinuo (a las 360 h de operación total del reactor).

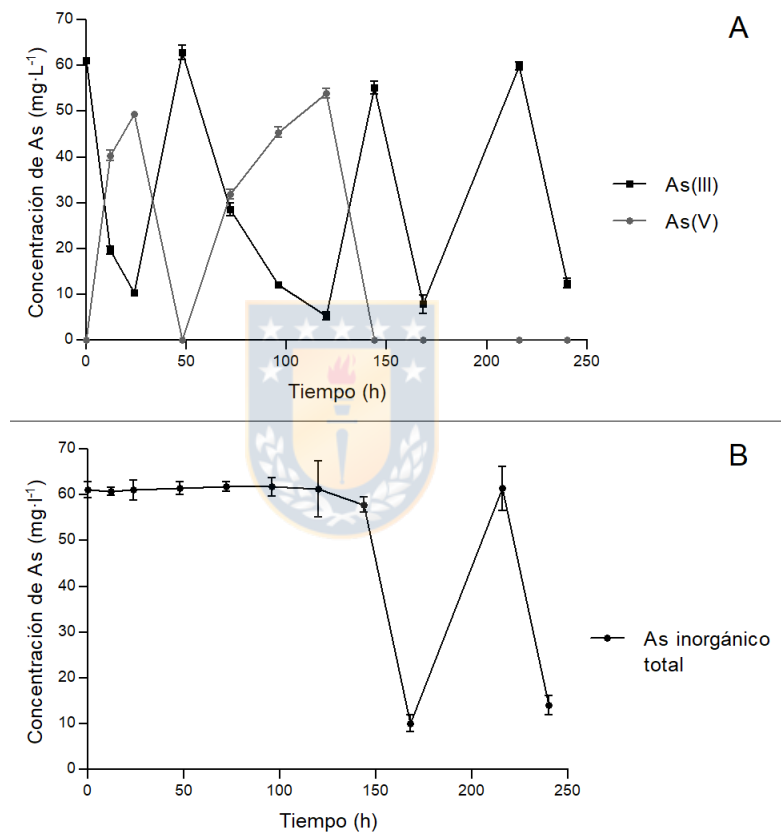


Figura 21. Fluctuación de la concentración de arsénico inorgánico en el medio de cultivo (fase líquida) durante las primeras 240 horas de operación del reactor semi-continuo donde la biopelícula de *P. arsenicoxydans* fue cultivada en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP. El afluente fue renovado cada 48 horas. A: Fluctuación de arsenito y arseniato. B: Fluctuación de arsénico total. Fuente: Elaboración propia.

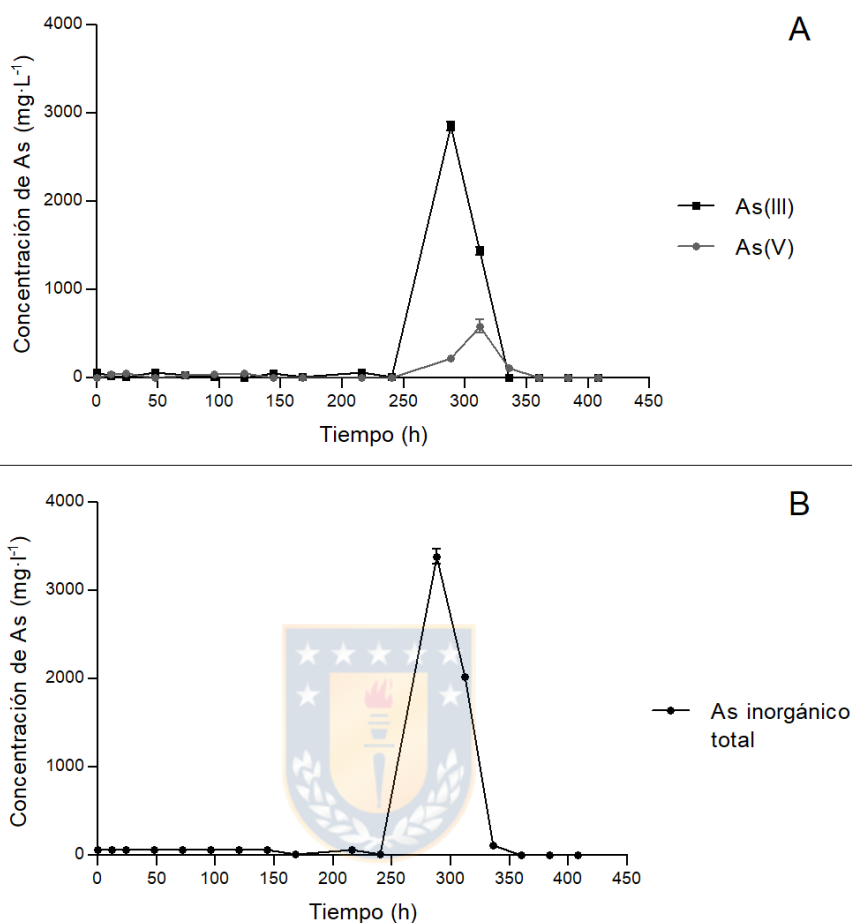


Figura 22. Fluctuación de la concentración de arsénico inorgánico en el medio de cultivo (fase líquida) durante el tiempo total de operación del reactor semi-continuo donde la biopelícula de *P. arsenicoxydans* fue cultivada en medio Battaglia-Brunet modificado para MICP. El afluente fue renovado cada 48 horas. A las 288 horas el afluente fue renovado por última vez con una solución de medio Battaglia-Brunet modificado para MICP (88% v/v) y el efluente proveniente del reactor discontinuo del consorcio bacteriano (12% v/v). A: fluctuación de arsenito y arseniato. B: fluctuación de arsénico inorgánico total. Fuente: Elaboración propia.

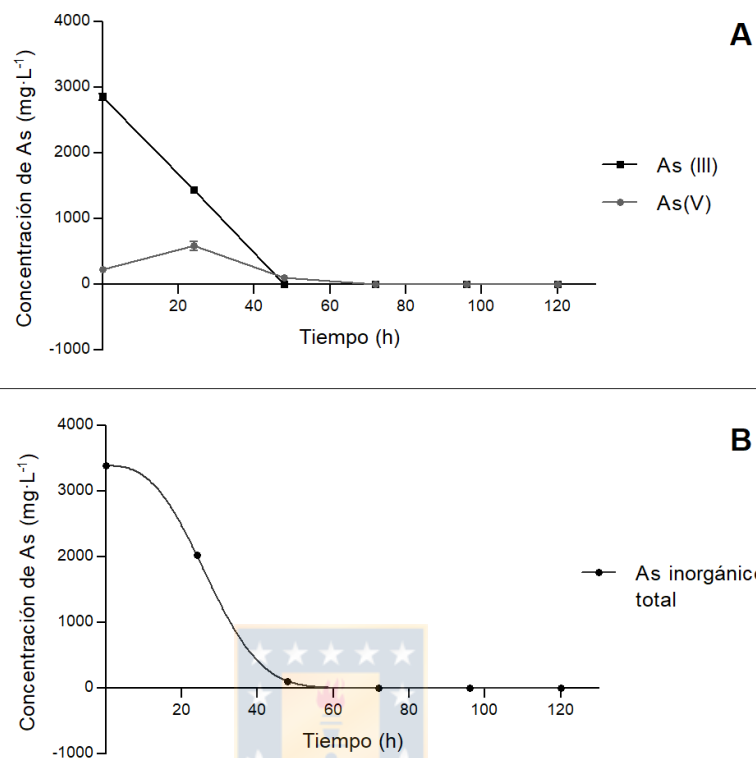



Figura 23. Cinética de remoción de arsénico inorgánico a partir de la oxidación de arsenito y co-precipitación de calcita-arsénico mediada por la biopelícula de *P. arsenicoxydans* cultivada en el reactor semi-continuo. Los gráficos muestran las concentraciones de arsénico desde las 288 h (última renovación de afluente que se realizó utilizando una solución de medio Battaglia-Brunet modificado para MICP (88% v/v) y el efluente proveniente del reactor discontinuo del consorcio bacteriano (12% v/v)) hasta las 408 h de operación del reactor (intervalo de tiempo representado como las 0 h hasta las 120 h, respectivamente). A: fluctuación de arsenito y arseniato. B: modelamiento matemático de la fluctuación de arsénico inorgánico total. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 23. Parámetros cinéticos de la remoción de arsénico inorgánico a partir de la oxidación de arsenito y co-precipitación de calcita-arsénico mediada por la biopelícula de *P. arsenicoxydans* cultivada en el reactor semi-continuo. Los parámetros fueron obtenidos a partir de la cinética de remoción desde las 288 h (última renovación de afluente que se realizó utilizando una solución de medio Battaglia-Brunet modificado para MICP (88% v/v) y el efluente proveniente del reactor discontinuo del consorcio bacteriano (12% v/v)) hasta las 408 h de operación del reactor. Fuente: Elaboración propia.

 Biorreactor semi-continuo	
C_m (mg·l ⁻¹)	-0,031±10,43
C_0 (mg·l ⁻¹)	3386±18,04
C (mg·l ⁻¹ ·h ⁻¹)	0,033±0,0003
R^2	0,999

Los parámetros cinéticos fueron obtenidos a través del modelo matemático de Weibull. Se presentan resultados con su respectiva desviación estándar. C_m , concentración máxima alcanzada; C_0 , concentración inicial; C , velocidad máxima de remoción de arsénico inorgánico.

Tabla 24. Arsénico total removido del medio a partir de la oxidación de arsenito y co-precipitación de calcita-arsénico mediada por la biopelícula de *P. arsenicoxydans* cultivada en el reactor semi-continuo desde las 288 h (última renovación de afluente que se realizó utilizando una solución de medio Battaglia-Brunet modificado para MICP (88% v/v) y el efluente proveniente del reactor discontinuo del consorcio bacteriano (12% v/v)) hasta las 408 h de operación del reactor. Fuente: Elaboración propia.

Tiempo (h)	Arsénico inorgánico removido (%)
288	0,000±0,000
312	0,674±0,042
336	30,62±0,708
360	100±0,000
384	100±0,000
408	100±0,000

Se presentan resultados con su respectiva desviación estándar.

20.3 Evaluación de la toxicidad en el sistema de tratamiento aeróbico secuencial

El ensayo de viabilidad celular utilizando células HUVEC es una vía indirecta para medir la toxicidad de los afluentes y efluente final del sistema de tratamiento. Esto debido a que en el ensayo se mide el porcentaje de viabilidad de las células en comparación con el número inicial de células viables, antes de la adición de los afluentes y el efluente, y no es posible determinar específicamente cuál es el compuesto que genera la toxicidad, ni tampoco es posible saber cuál es la vía por la cual se produce la muerte celular. Sin embargo, es una técnica actualmente usada y aceptada, ya que se mide la viabilidad de las células en presencia de los afluentes y el efluente final, dando una aproximación de la toxicidad de estos al contacto con las personas.

En la Figura 24 se observa el porcentaje de viabilidad celular en los tres puntos críticos del sistema de tratamiento aeróbico secuencial. El afluente inicial del sistema de tratamiento (A1) corresponde al afluente artificial inicial suplementado con ROX, NIT y MSMA (0,5 mM concentración final de cada especie), A2 corresponde al afluente que alimentó al segundo biorreactor del sistema de tratamiento, en el cuál *P. arsenicoxydans* fue cultivada. Este afluente fue una mezcla del medio Battaglia-Brunet modificado para MICP con el efluente del primer biorreactor del sistema de tratamiento y contenía altas concentraciones de arsénico inorgánico (Figura 20) producto de la reducción

de los compuestos organoarsenicales inicialmente administrados al sistema. El efluente final (E2), corresponde al efluente final del sistema de tratamiento, que fue obtenido luego de terminadas las 408 horas de operación del segundo biorreactor. La viabilidad celular en presencia de E2 fue de $99,3 \pm 0,51\%$, en presencia de A2 fue de $33,3 \pm 2,03\%$ y en presencia de A1 fue de $99,1 \pm 0,49\%$. Existieron diferencias estadísticamente significativas entre A1 y A2, y entre A2 y E2 ($p < 0,0001$), pero no entre A1 y E2 ($p = 0,6640$).

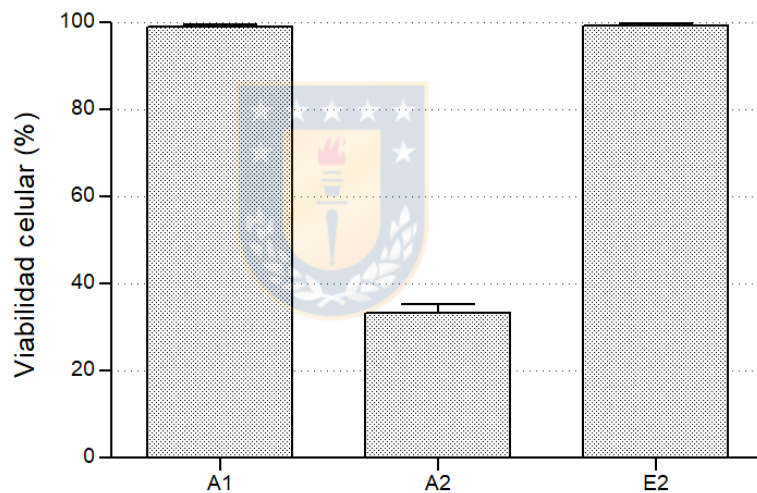


Figura 24. Viabilidad de células endoteliales de venas de cordón umbilical humano (HUVEC, por su nombre en inglés Human Umbilical Vein Endothelial Cells) en presencia de los afluentes y el efluente final del sistema de tratamiento biológico aeróbico secuencial. A1: Afluente inicial que alimenta al biorreactor discontinuo, corresponde a medio de cultivo suplementado con una mezcla de ROX (0.5 mM), NIT (0.5 mM) y MSMA (0.5 mM) (concentraciones finales); A2: Afluente que alimenta al biorreactor semi-continuo, corresponde a una solución

de medio Battaglia-Brunet modificado para MICP (88% v/v) y el efluente proveniente del reactor discontinuo del consorcio bacteriano (12% v/v); E2: Efluente final del sistema de tratamiento. Fuente: Elaboración propia.



V. DISCUSIÓN

21. Crecimiento del consorcio bacteriano y transformación de organoarsenicales

El consorcio bacteriano utilizado para la implementación del sistema de tratamiento fue aislado y caracterizado previamente (Guzmán-Fierro, 2011; Guzmán-Fierro, 2014; Guzmán-Fierro y col., 2015). La caracterización inicial del consorcio bacteriano se realizó con el fin de determinar si el consorcio bacteriano mantenía su cinética de crecimiento y de degradación de ROX y NIT, y además para caracterizar su crecimiento y la degradación en presencia de MSMA.

El consorcio, mantenido en el laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad de Concepción, fue crecido en MQD descrito por Stolz y col. (2007), cuya fuente de carbono fue lactato, y se inoculó en fase exponencial en sistemas discontinuos en presencia de ROX, NIT y MSMA, por separado y en mezcla, utilizando una concentración final de 0,5 mM de cada compuesto por sistema.

Las cinéticas de crecimiento obtenidas demostraron que no existe diferencia significativa entre las velocidades de crecimiento (k) de los cultivos con ROX y el CONTROL ($P > 0.05$). Sin embargo, la k disminuye significativamente cuando se adiciona NIT ($P < 0.001$), los tres organoarsenicales en mezcla ($P < 0.001$) y MSMA ($0.01 < P > 0.05$).

Concretamente, la velocidad de crecimiento disminuye 1,2 veces al adicionar MSMA, 1,4 veces al adicionar la mezcla ROX-NIT-MSMA y 1,6 veces al adicionar NIT. Por otro lado, la biomasa máxima alcanzada (Y_m) fue alcanzada a las 40 h en presencia de NIT y en el CONTROL, en presencia de NIT a las 60 h, en presencia de ROX a las 21 h y en presencia de la mezcla a las 44 h.

La velocidad de crecimiento bacteriano es una magnitud física vectorial que entrega información de la tasa a la cual las células se dividen en el tiempo durante la fase exponencial del cultivo bacteriano. En el caso de ser medida por absorbancia, como se hizo con el consorcio bacteriano, su unidad de medida es $OD_{600nm} \cdot h^{-1}$. Sin embargo, para realizar un análisis comparativo entre cultivos bacterianos, k debe utilizarse en conjunto con las magnitudes escalares obtenidas de la cinética de crecimiento, es decir, la biomasa máxima alcanzada y la biomasa inicial del cultivo (Y_0), ambas en OD_{600nm} , una unidad de medida de densidad bacteriana, que nos entrega información sobre la cantidad de células bacterianas por unidad de volumen cultivado. Tomando en cuenta las tres magnitudes obtenidas a partir de la determinación de la cinética de crecimiento bacteriano del consorcio, es posible apreciar que, aunque no existen diferencias entre la k del control y el cultivo crecido en presencia de ROX como describió previamente Guzmán-Fierro (2014), si se evidencia que al encontrarse en presencia de ROX, el consorcio es capaz de aumentar 1,3 veces su biomasa máxima dos horas antes que el control. Es decir, en el punto temporal en que el consorcio control ya no puede aumentar su biomasa (40

horas de cultivo), en presencia de ROX el crecimiento celular continúa ocurriendo. Este hecho reafirma que ROX podría estar siendo utilizada por el consorcio como una fuente de carbono adicional a la presente en el MQD (Guzmán-Fierro y col., 2015).

Con respecto al porcentaje de organoarsenical transformado a arsénico inorgánico, se obtuvo que el $96,69 \pm 0,131\%$ de la ROX fue transformada a arsénico inorgánico por el consorcio, no existiendo diferencias estadísticamente significativas con lo obtenido por Guzmán-Fierro (2014) ($p=0,8560$).

Al igual que en el trabajo de Guzmán-Fierro (2014), en este trabajo se obtuvo que la k del consorcio en presencia de NIT fue la más baja de entre los compuestos probados. Alcanzó un porcentaje de transformación de organoarsenical de $96,95 \pm 0,056\%$, no existiendo diferencias significativas con el porcentaje de transformación obtenido por Guzmán-Fierro (2014) ($p=0,4187$).

En presencia de MSMA el consorcio alcanzó una transformación a arsénico inorgánico de $97,21 \pm 0,169\%$ y en presencia de la mezcla de ROX-NIT-MSMA $96,57 \pm 0,094\%$. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de transformación de organoarsenical a arsénico inorgánico en los ensayos realizados ($p>0,05$), excepto entre los ensayo realizados en presencia de MSMA vs la mezcla de organoarsenicales ($0,01<p<0,05$).

Las velocidades máximas de aparición de arsénico inorgánico (C) producto de la degradación de los compuestos organoarsenicales mediada por

el consorcio bacteriano, en orden creciente fueron ROX ($0,015 \pm 0.001 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), NIT ($0,015 \pm 0.003 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), MSMA ($0,026 \pm 0.007 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) y ROX-NIT MSMA ($0,029 \pm 0.002 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$). Las concentraciones relativas (C/C_0) que permiten comparar entre consorcios, en orden creciente, fue ROX-NIT-MSMA ($0,026 \pm 0,004 \text{ h}^{-1}$), NIT ($0,038 \pm 0,010 \text{ h}^{-1}$), ROX ($0,039 \pm 0,004 \text{ h}^{-1}$) y MSMA ($0,088 \pm 0,027 \text{ h}^{-1}$), no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellas. Guzmán-Fierro (2014) determinó que la C/C_0 del consorcio crecido en presencia de ROX fue de $0,0202 \pm 0,001089 \text{ h}^{-1}$ y crecido en presencia de NIT fue de $0,020470 \pm 0,003728 \text{ h}^{-1}$, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellas según el post test de Tukey realizado. Al comparar estas C/C_0 con las obtenidas en el presente estudio, se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas entre la concentración relativa del consorcio crecido en presencia de ROX ($p=0,0014$), siendo la C/C_0 obtenida en este estudio, 1,9 veces mayor a la obtenida por Guzman-Fierro (2014). Además, existen diferencias significativas entre la concentración relativa del consorcio crecido en presencia de NIT ($p= 0,0466$), siendo la C/C_0 obtenida en este estudio, 1,8 veces mayor. Las diferencias entre las concentraciones relativas obtenidas para el crecimiento en presencia de ROX y NIT podrían estar relacionadas con algún proceso de aclimatación de la comunidad del consorcio bacteriano. Varios estudios han demostrado que la presencia de ROX modula la diversidad de comunidades microbianas en suelos y tratamientos biológicos disminuyendo la diversidad microbiana, pero potenciando el

crecimiento de algunos grupos bacterianos (Chen y col., 2018; Guzmán-Fierro y col., 2015; Jiang y col., 2013; Liu y col., 2017a; Mafla y col., 2015). Guzmán-Fierro y col. (2015) demostraron que la estructura del consorcio bacteriano cambia en presencia de ROX, disminuyendo el porcentaje de similitud de la comunidad bacteriana de un 70% a un 50% en presencia del compuesto. Jiang y col. (2013) demostraron que comunidades bacterianas aisladas desde suelos, son sensibles metabólicamente a la ROX disminuyendo hasta en un 95% la utilización de aminoácidos y polímeros y afectando la diversidad de la comunidad debido a la pérdida de bacterias sensibles. Al probar la influencia de la ROX en procesos de remoción de nitrógeno con comunidades bacterianas, Chen y col. (2018) determinaron que, además de disminuir la remoción de nitrógeno en un 52,4%, la presencia de ROX durante el proceso, redujo la actividad bacteriana debido a que disminuyeron los miembros parte de los géneros *Acinetobacter* y *Methylophilaceae*, pero aumentaron los pertenecientes al grupo de las *Aeromonas*, lo que conllevó a la supresión de los procesos de nitrificación y desnitrificación. En un estudio donde se evaluó el efecto de un gradiente de concentración de ROX sobre la comunidad microbiana de suelos, se determinó que la comunidad cultivada en ausencia de ROX posee un índice de diversidad mayor que la comunidad en presencia de ROX, lo que implica que la presencia de este organoarsenical inhibe algunos grupos bacterianos (Liu y col., 2017a). Sin embargo esta inhibición no es asociada a la ROX propiamente tal, sino a los compuestos derivados de la degradación de esta (Mafla y col.,

2015), como el arsenito y arseniato, entre otros. Los cambios que la presencia de ROX induce en la diversidad de comunidades microbianas, responden a un aumento en la especialización metabólica de la comunidad.

Fei y col. (2018) han identificado carencias en el conocimiento y las necesidades de investigación respecto de compuestos como la ROX, entre ellas hace falta investigar para dilucidar en mayor profundidad las vías metabólicas o de degradación, cuáles son los productos de dicha degradación, y los impactos de toxicidad de los compuestos organoarsenicales.

Como proyección, se propone continuar el estudio de este consorcio bacteriano a nivel de la codificación y expresión de genes que estén involucrados en el metabolismo bacteriano de tolerancia y resistencia de compuestos organoarsenicales y arsénico inorgánico. Entre estos, se encuentra el gen que codifica para la oxidoreductasa ArsH, una enzima dependiente de NADPH-FMN que oxida las especies de MAs(III) hasta metilarsenatos como el MSMA (Chen y col., 2015); y, entre otros, la bomba de eflujo ArsP, caracterizada en *Campylobacter jejuni* por Chen y col. (2015), y cuya función es expulsar de la célula bacteriana especies trivalentes de arsénico orgánico como la ROX y el metil arsenito (MAs(III)). Cabe mencionar que *C. jejuni* es una especie comúnmente encontrada en los desechos de aves de corral, pero que, sin embargo, no fue detectada en el consorcio bacteriano ensayado a través de la técnica de DGGE en el estudio de Guzmán-Fierro (2014), por lo que también se propone ensayar medios de cultivo que permitan aislar a los miembros del

consorcio con el fin de probar los niveles de tolerancia a cada especie arsenical y así conocer mejor su posible rol dentro de la comunidad y pesquisar la presencia de genes como *arsP* demostrando su función en otra especie bacteriana además de *C. jejuni*, realizando detección de metabolitos para contribuir a la clarificación de rutas metabólicas.

22. Crecimiento de *P. arsenicoxydans* y oxidación/co-precipitación de arsénico

La cepa bacteriana utilizada para oxidar y co-precipitar el arsénico inorgánico en el sistema de tratamiento fue *Pseudomonas arsenicoxydans*, bacteria que fue aislada y caracterizada previamente (Campos y col., 2010; Valenzuela y col., 2015). Esta bacteria es un bacilo Gram negativo flagelado, resistente a arseniato y arsenito. Es capaz de crecer adherida a soportes zeolita como anteriormente demostraron anteriormente por Valenzuela y col. (2015), y cómo se probó en el presente trabajo.

Como el objetivo general de este trabajo fue implementar un sistema de tratamiento para abatir la toxicidad de compuestos arsenicales presentes en suelos de cultivos, se caracterizó la capacidad ureolítica, la formación de cristales de calcita, el crecimiento bacteriano y la oxidación/co-precipitación de arsénico-calcita llevada a cabo por *P. arsenicoxydans* en presencia de compuestos arsenicales. Se demostró que *P. arsenicoxydans* oxida arsenito y

genera cristales de calcita que co-precipitan arsénico. Por lo tanto, es una alternativa microbiológica para detoxificar afluentes contaminados con arsénico inorgánico y disminuir su toxicidad.

La cepa *P. arsenicoxydans* mantenida en el Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad de Concepción, fue cultivada en el medio descrito por Battaglia-Brunet y col. (2002) modificado para la MICP, a través de la adición de urea 33 mM y cloruro de calcio 30 mM. Se inoculó en fase exponencial en sistemas discontinuos en estado planctónico y en estado sésil (utilizando zeolita como soporte) en presencia de arsénico orgánico (ROX, NIT, MSMA y ROX-NIT-MSMA) y en presencia de arsénico inorgánico (As(III), As(V) y As(III)-As(V)), utilizando una concentración final de 0,5 mM de cada compuesto por sistema.

Se evidenció que *P. arsenicoxydans* tiene actividad ureolítica y es capaz de formar cristales de calcita. Posteriormente se estudió el crecimiento de *P. arsenicoxydans* en estado planctónico y en presencia de compuestos arsenicales orgánicos e inorgánicos.

Posteriormente, se demostró que *P. arsenicoxydans* es capaz de crecer en estado planctónico en presencia de arsénico orgánico e inorgánico y en estado sésil en presencia de arsénico inorgánico. Las velocidades de crecimiento (k) en presencia de arsénico inorgánico aumentaron al crecer la bacteria en estado sésil. Las k aumentaron 2,2 veces en presencia de As(V), 1,8 veces en presencia de As(III) y 1,2 veces en presencia de la mezcla As(III)-

As(V). En ausencia de arsénico (Control) la k no varió. Por otro lado la biomasa máxima alcanzada (Y_m) aumentó 1,1 veces en presencia y ausencia de arsénico en todos los sistemas ensayados.

Varios estudios han analizado el crecimiento y la oxidación de arsenito de bacterias cultivadas en presencia de arsénico. Biswas y col. (2019) aislaron y caracterizaron una cepa bacteriana quimiolitotrófa facultativa arsenito oxidante, identificada como *Delftia* spp. BAs29. La cepa mostró un porcentaje de oxidación de As (III) (100 μ M inicial) de 91,04% a las 16 h de crecimiento. Además, la presencia de As (III) mejoró el crecimiento hasta en un 40% con respecto al control, mientras que la adición de As (V) redujo la tasa de crecimiento en un 12%. Estos autores, relacionan el aumento en la tasa de crecimiento durante la fase de oxidación de As (III) al hecho de que la bacteria puede obtener energía del proceso de oxidación de As (III), siendo un paso limitante para el crecimiento. León y col. (2017) determinaron que luego de 24 h de incubación, la cepa *Pseudomonas marginalis* EM-6 tuvo velocidades de crecimiento (k) de 0.07802 $\text{Log}_{10}\text{UFC}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ en presencia de 5 mM de As(III) y de 0.07917 $\text{Log}_{10}\text{UFC}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ en presencia de 20 mM de As(V), sin diferencias estadísticamente significativas comparadas con el control, cuya k fue de 0.08137 $\text{Log}_{10}\text{UFC}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Luego probaron la cepa bacteriana en un medio de cultivo modificado para MICP, dónde se obtuvieron parámetros cinéticos similares. Los autores indican que la adaptación de la cepa tanto a arsenito como a arseniato se debe a la presencia de los genes *aoi* y *arsC* involucrados

en la oxidación de As(III) y la reducción de As(V) respectivamente, ambos descritos como mecanismos de tolerancia a arsénico (Andres y Bertin, 2016). En este estudio, se analizó la remoción de As(III) y As(V) mediada por *P. marginalis* EM-6 a través de la MICP. Los resultados demostraron que la cepa bacteriana es capaz de remover el 100% del arsénico inorgánico presente en los cultivos luego de 72 h de incubación, por otro lado, determinaron que en el medio no modificado para MIPC (ausencia de urea) la remoción de arsénico alcanzó un porcentaje de 92% luego de 72 h de incubación. León y col. (2018) determinaron que cepas aisladas en sedimentos de un río contaminado con arsénico son capaces de oxidar arsenito en porcentajes entre 68 y 100% dependiendo del sitio de aislamiento, siendo las cepas aisladas de lugares con mayor contaminación de arsénico, capaces de oxidar el arsenito en un mayor porcentaje (90-100%). Battaglia-Brunet y col. (2002) caracterizaron la oxidación de arsenito mediada por una comunidad aislada desde un ambiente altamente contaminado con arsénico. Determinaron que la tasa de oxidación de arsénico en presencia de $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de arsenito, fue de $12 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ a las 45 h de operación del reactor continuo en que se ensayó a la comunidad bacteriana. Valenzuela y col. (2015) determinaron que *P. arsenicoxydans*, la cepa bacteriana utilizada en el presente trabajo, cultivada en presencia de $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ tiene una velocidad de oxidación de arsenito de $12,86 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ en estado sésil oxidando el 100% del arsenito en 36 h, y en estado planctónico tiene una

velocidad de oxidación de arsenito de $10,07 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ oxidando el 100% del arsenito en 48 h.

En el presente estudio, *P. arsenicoxydans* tuvo una mayor k en presencia de As(V) que en presencia de As(III). En estado planctónico, estas velocidades de crecimiento fueron $0,027 \pm 0,002 \text{ Log}_{10}\text{UFC}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ en presencia de As(III) y $0,033 \pm 0,001 \text{ Log}_{10}\text{UFC}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ en presencia de As(V), y en estado sésil, fueron $0,048 \pm 0,001 \text{ Log}_{10}\text{UFC}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ en presencia de As(III) y $0,073 \pm 0,003 \text{ Log}_{10}\text{UFC}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ en presencia de As(V). Al contrastar, los resultados obtenidos con el estudio realizado por Biswas y col. (2019), vemos que coinciden en el hecho de que en presencia de arsenito el crecimiento es mayor que en presencia de arseniato. En el estudio realizado por León y col. (2017) *P. marginalis* EM-6 fue cultivada en estado sésil. Al comparar los resultados obtenidos, es posible apreciar que *P. arsenicoxydans* presenta una velocidad de crecimiento menor en presencia de ambas especies inorgánicas de arsénico. Aunque *P. arsenicoxydans* tiene una menor k , logra remover el arsénico presente en el medio 12 horas antes que *P. marginalis*. Este hecho tiene ventajas en la aplicación biotecnológica de *P. arsenicoxydans*, pues no obstante de tener una menor tasa de crecimiento, el uso de recursos utilizados en un futuro proceso industrial sería menor al necesario para implementar un sistema con la cepa *P. marginalis* EM-6, disminuyendo así los costos de operación totales.

Por otro lado las velocidades de remoción de arsénico obtenidas por *P. arsenicoxydans* fueron de $0,032 \pm 0,03 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ en presencia de As(III) y $0,034 \pm 0,002 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ en presencia de As(V) en estado planctónico, y $0,046 \pm 0,003 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ en presencia de As(III) y $0,038 \pm 0,002 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ en presencia de As(V) en estado sésil. Alcanzando en ambos estados de crecimiento, el 100% de remoción de arsénico a las 60 h de incubación. De los estudios citados anteriormente, sólo *P. marginalis* y una cepa aislada por León y col. (2018) mostraron una remoción de arsénico del 100% al igual que *P. arsenicoxydans*. Cabe destacar, que en el estudio realizado por Valenzuela y col. (2015) *P. arsenicoxydans* logró oxidar el 100% del arsénico presente en el medio de cultivo (fase acuosa) a las 36 h obteniendo además una velocidad de remoción de arsénico mayor. Si se analizan en conjunto los resultados obtenidos en este estudio, en el estudio de Valenzuela y col. (2015) y en el estudio de León y col. (2017) es posible explicar esta disminución de la velocidad de remoción de arsénico debido a que en el presente estudio *P. arsenicoxydans* fue cultivada en las mismas condiciones utilizadas por Valenzuela y col. (2015), pero el medio se adaptó para la MICP. Es decir, la oxidación/co-precipitación de calcita y arsénico podrían representar un proceso que disminuye la velocidad de crecimiento de la bacteria. Sin embargo, el proceso de co-precipitación que ocurre durante el crecimiento en un medio modificado para la MICP, es ventajoso puesto que permite remover el 100% del arsénico de la fase acuosa del medio de cultivo a través de la co-precipitación con la calcita, a diferencia de

la sola oxidación de arsenito, que si bien reduce la toxicidad, dado que arseniato es menos tóxico que arsenito, no permite la remoción del arsénico de la fase acuosa medio de cultivo.

La Precipitación de Calcita Inducida Microbiológicamente (MICP) es un proceso en el cual las células bacterianas, a través de la ureolisis y en presencia de calcio en el medio circundante, aumentan el pH extracelular provocando la precipitación de carbonato de calcio (calcita). La calcita producida a través de MICP puede biomineralizar metales y metaloides presentes en el medio extracelular. Es por esto, que este proceso ha sido ampliamente estudiado con el fin de encontrar soluciones biotecnológicas para secuestrar metales y metaloides desde afluentes. La calcita es capaz de biomineralizar cobre, cadmio, zinc, plomo, estroncio y arsénico (Achal y col. 2011, 2012a, 2012b, 2013; Li y col., 2013b; Kang y col. 2014; Kumari y col., 2014b; Kang y col. 2015)

El metabolismo ureolítico de *P. arsenicoxydans* permite que al existir urea y calcio en el medio de cultivo, se generen cristales de calcita en el medio circundante a la célula bacteriana. Este proceso microbiológico se denomina precipitación de calcita inducida microbiológicamente (MICP). Estos cristales biomineralizan el arsénico co-precipitándolo en su estructura y adsorbiéndolo en su superficie. *P. arsenicoxydans* es una bacteria capaz de oxidar el arsenito hasta arseniato. Se ha demostrado que en presencia de arsenito y arseniato, la calcita adsorbe en mayor medida el arseniato (Yokoyama y col. 2012; Renard y

col., 2015). Como se observó, la velocidad de crecimiento (k) de *P. arsenicoxydans* no varió al ser cultivada en estado sésil y en ausencia de arsénico, y la biomasa máxima alcanzada (Y_m) aumento 1,1 veces. Al crecer en estado sésil se espera un aumento de biomasa máxima alcanzada debido a que la bacteria crece como biopelícula, por lo que debería existir una densidad poblacional mayor (Costerton y col, 1995; Marshall KC, 2013). En las cinéticas de crecimiento de *P. arsenicoxydans*, este hecho se ve reflejado. En estado planctónico y en presencia de arsénico, las k en orden creciente fueron As(III), As(III)-As(V) y As(V), y en estado sésil y en presencia de arsénico las k en orden creciente fueron As(III), As(III)-As(V) y As(V). Cómo se aprecia, en ambos ensayos el orden se mantuvo. La mayor k se obtuvo al cultivar a *P. arsenicoxydans* en presencia de As(V), dónde en el ensayo en estado sésil la velocidad aumentó 2,2 veces en comparación con la k obtenida en estado planctónico. Luego, en presencia de la mezcla As(III)-As(V), en el ensayo en estado sésil la velocidad aumentó 1,2 veces en comparación con la k obtenida en estado planctónico. Finalmente en presencia de As(III) en el ensayo en estado sésil la velocidad aumentó 1,8 veces en comparación con la k obtenida en estado planctónico. Estos resultados se deben analizar tomando en cuenta que la calcita posee mayor afinidad con el arseniato que con el arsenito (Renard y col., 2015; Yokoyama y col., 2012), que el arsenito es un catión de mayor toxicidad que arseniato (Saluja y col., 2011) y que el crecimiento en estado sésil (biopelícula) aumenta la densidad celular presente en el medio en las

mismas condiciones de cultivo (Costerton y col, 1995; Marshall, 2013). *P. arsenicoxydans* es una bacteria resistente a arsenito y a arseniato, cuya principal estrategia de resistencia a arsénico se basa en la oxidación de arsenito hasta arseniato en el periplasma para evitar su absorción gracias a la presencia del operon *aioBA* que codifica una arsenito oxidasa (Valenzuela y col., 2015). En este contexto, en los ensayos realizados, el metabolismo de oxidación ocurre en paralelo a la formación de cristales de calcita (vía ureolisis) en el medio circundante a las células bacterianas. Como la calcita tiene alta afinidad con arseniato en la biomineralización, es posible que en el ensayo realizado en presencia de As(V), la absorción de este catión de arsénico se produzca desde el inicio de la producción de los cristales de calcita y del crecimiento bacteriano. Por otro lado, al ser menor la afinidad de la calcita con arsenito, en el ensayo en presencia de As(III) la biomineralización no se produce de manera instantánea, manteniéndose altas concentraciones de arsenito en el medio durante un tiempo prolongado, lo que afectaría el crecimiento bacteriano debido a su toxicidad y a que *P. arsenicoxydans* al estar frente a la presión selectiva que significa la presencia de arsenito, debe activar el metabolismo de oxidación codificado en los genes *aio*. La activación de esta vía metabólica durante el crecimiento representa un gasto energético para la célula que se ve reflejado en una velocidad de crecimiento menor en comparación a los ensayos en presencia de As(V) y en una concentración mínima inhibitoria de arsenito menor a la de arseniato (Simeonova y col., 2004;

Madsen, 2005; Cai y col., 2009; Sarkar y col., 2013; Das y col., 2014; Corsini y col., 2015; Melody y Jhonston, 2015; Dey y col., 2016; Zeng y col., 2016; Overmann y col., 2017).

En los sistemas ensayados (As(III), As(V) y As(III)-As(V)) la remoción de arsénico fue del 100% a las 60 horas de cultivo tanto en estado planctónico como en estado sésil. Es importante considerar que el límite de detección de la técnica utilizada para detectar el arsénico es de $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ por lo que existe la posibilidad de que aún exista una concentración de arsénico inorgánico igual o inferior a $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a las 60 h. Pese a esto, cabe resaltar que esta concentración ($0,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) es 20 veces menor que la concentración máxima de arsénico en el agua potable ($10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y permitida por la Norma Chilena de Calidad de Agua (INN, 2005; WHO, 2011).

El hecho de que la velocidad de remoción de arsénico en presencia de As(V) sea mayor a la alcanzada en presencia de As(III), al comparar velocidades máximas de remoción de arsénico (C) producto de la oxidación/Biomineralización de arsénico mediada por *P. arsenicoxydans* cultivada en estado planctónico, es una evidencia más de que en presencia de arseniato la biomineralización podría estar ocurriendo en un punto temporal previo que en presencia de arsenito, o bien, que en presencia de arsenito la biomineralización ocurre de manera retardada debido a que para remover el arsénico mediante este proceso, As(III) primero debe ser oxidado hasta As(V).

Por otro lado, al analizar las velocidades máximas de remoción de arsénico (C) producto de la oxidación/biomineralización de arsénico mediada por *P. arsenicoxydans* cultivada en estado sésil, se demuestra que la biomineralización de arsénico no ocurre de la misma manera que en estado planctónico, siendo mayor la velocidad de remoción en presencia de As(III). Es posible apreciar que en estado sésil la concentración relativa aumenta 1,1 veces en presencia de As(V), 1,4 veces en presencia de As(III)-As(V) y 1,5 en presencia de As(III), con respecto a las concentraciones relativas de los cultivos crecidos en estado planctónico.

Se ha descrito que la formación de biopelículas bacterianas se relaciona a la resistencia a metales pesados (Harrison y col., 2005; Teitzel y Parsek, 2003), donde el exopolisacárido (EPS), excretado por las células bacterianas para la formación de la biopelícula, tiene una función protectora frente a iones metálicos, ya que puede unirlos y retardar su difusión al interior de la biopelícula (Teitzel y Parsek, 2003). La combinación de cargas positivas y negativas en la matriz de EPS restringe la difusión de los iones metálicos debido a que el número de sitios de unión electrostáticos disponibles para la biosorción de metales es 20 a 30 veces mayor en los polímeros extracelulares que en las células planctónicas (Liu y Fang, 2002). Esta biosorción de metales tóxicos provoca su secuestro en la matriz extracelular y, por lo tanto, puede disminuir su biodisponibilidad, retrasar su difusión y, en consecuencia, reducir la exposición celular y aumentar la resistencia bacteriana (Harrison y col., 2005;

Grumbein y col., 2015). Diversos estudios han demostrado que, en algunas cepas bacterianas, la formación de biopelícula bacteriana aumenta la biomasa bacteriana debido a la función protectora del EPS frente al arsénico (Battaglia-Brunet y col, 2002; Marchal y col. 2010, 2011; Rastelli y col., 2015; Koechler y col., 2017; Das y Sarkar, 2018; Ramírez-Aldaba y col., 2018; Roychowdhury y col., 2018; Biswas y col., 2019). Los mecanismos químicos de toxicidad de metales pesados y metaloides afectan de manera distinta a cultivos en estado planctónico y sésil, debido a que las biopelículas alteran su fisiología para proteger los blancos celulares sensibles a metales y metaloides tóxicos (Harrison y col., 2005). Las características de las biopelículas que les confieren resistencia y tolerancia a metales son: la heterogeneidad metabólica debido a la estructuración heterogénea de la población bacteriana en la biopelícula; los eventos de señalización extracelular que afectan la fisiología de la biopelícula (cómo la regulación de la producción de EPS que facilita la biosorción de metales); la inmovilización de metales y metaloides mediante biosorción; las reacciones bioinorgánicas de iones metálicos con los metabolismos producidos por la biopelícula (que provocan la precipitación de complejos bioinorgánicos metálicos); las respuestas de aclimatación a iones metálicos; la producción de células dormantes (que es entre 100 y 1000 veces mayor en biopelículas que en estado planctónico, representan entre el 0,1 y el 10% de la población total de una biopelícula bacteriana, y media la tolerancia dependiente del tiempo a

cationes y oxianiones metálicos); y los rearrreglos genéticos, mutaciones y variaciones fenotípicas (Harrison y col., 2005).

Por otro lado el hecho de que el aumento en la C/C_0 sea menor en presencia de arseniato que en presencia de arsenito, puede estar relacionado con el crecimiento bacteriano en forma de biopelícula y con la cinética de formación de cristales de calcita. Al crecer como biopelícula, en primera instancia hay un aumento en la densidad poblacional bacteriana metabólicamente activa, y además el EPS genera un efecto protector frente al arsénico. En presencia de arseniato, estas dos características podrían no tener relación, ya que la remoción de este catión estaría dada principalmente por la formación de calcita. En presencia de arsenito, por otro lado, la protección que otorga el EPS podría permitir que la toxicidad del As(III) no tenga un efecto tan significativo en el crecimiento celular, como en el cultivo en estado planctónico, ya que retardaría el contacto celular con este catión, permitiendo aumentar la biomasa disponible y metabólicamente activa para oxidar el arsenito. Lo que podría estar ocurriendo es que desde el inicio del crecimiento bacteriano se están formando cristales de calcita, pero no la biomineralización del arsénico, puesto que sólo hay arsenito disuelto en el medio. Cuando la biomasa comienza a aumentar formando la biopelícula, en la fase exponencial, se activa el metabolismo arsenito-oxidante comenzando una conversión constante a arseniato. Como la formación de cristales de calcita depende del metabolismo ureolítico, que está activo desde el inicio del cultivo, cuando comienza a

producirse el As(V), la cantidad de calcita disponible para biomineralizarlo es suficiente para lograr una velocidad de remoción a una alta tasa. En cambio, en el ensayo en presencia de arseniato, la biomineralización, es decir, la remoción de arsénico de la fase acuosa del medio de cultivo, ocurre de forma paralela a la formación de cristales, resultando en una velocidad de remoción constante, pero menor.

La oxidación heterotrófica de As (III) es considerado como un mecanismo de detoxificación que convierte el As (III) que se encuentra en la membrana externa de la célula (periplasma) en la forma menos tóxica, As (V), sin obtener energía de la reacción exergónica. La oxidación quimiolitotrófica es un mecanismo dónde los microorganismos usan la energía obtenida de la oxidación del arsenito para el crecimiento celular, utilizando el arsenito como donador de electrones, el oxígeno como aceptor de electrones y CO₂ como fuente de carbono (Santini y col. 2000; Battaglia-Brunet y col., 2002). Zeng y col. (2018) aislaron cinco bacterias arsenito-oxidantes (*Arsenite-Oxidizing Bacteria*, AOB) formadoras de biopelícula, desde suelos contaminados con arsénico en China, y probaron su capacidad de formar biopelícula en presencia de arsenito. Determinaron que el As(III) inhibe la formación de biopelícula de las cepas AOB heterótrofas, pero promueve la formación de biopelícula de las cepas AOB quimiolitotróficas. Este es el primer reporte sobre la correlación entre el arsénico presente en el ambiente, la formación de biopelículas bacterianas y la actividad bacteriana arsenito-oxidante. *P. arsenicoxydans* es una cepa

bacteriana AOB heterótrofa (Campos y col., 2010; Valenzuela y col., 2015). Los resultados del presente trabajo demuestran que en ausencia de arsénico y en presencia de arsenito, *P. arsenicoxydans* es capaz de formar biopelícula (Figura 15). Además, la velocidad de crecimiento (k) y la biomasa máxima alcanzada (Y_m) son, respectivamente, 1,3 veces mayor ($p < 0,0001$) y significativamente mayor ($p = 0,0001$), en presencia de arsenito que las k e Y_m del control en ausencia de arsénico. Esto quiere decir que cultivar la cepa bacteriana AOB heterótrofa, *P. arsenicoxydans*, en presencia de As(III) promueve la formación de biopelícula, resultado que contrasta con el estudio realizado por Zeng y col. (2018). Por otro lado, es interesante destacar que al comparar el crecimiento en presencia de As(III) en estado planctónico con el crecimiento en presencia de As(III) en estado sésil, la k y la Y_m aumentan 1,8 y 1,1 veces respectivamente, durante el crecimiento como biopelícula.

Se ha demostrado que existen diferencias en el estado de oxidación del arsénico adsorbido o co-precipitado a los cristales de calcita (Yokoyama y col., 2012; Renard y col., 2015; Catelani y col., 2018). La calcita microbiológicamente producida puede adsorber o co-precipitar tanto As(III) como As(V), a diferencia de la calcita producida abióticamente, que principalmente adsorbe o co-precipita con As(V). Se postula que la presencia de As(III) en la calcita producida por bacterias se debe a la reducción bacteriana de arsénico (Bardelli y col., 2011; Catelani y col., 2018). Catelani y col. (2018), evidenciaron que la naturaleza del medio de cultivo (líquido o sólido) influencia fuertemente la

mineralogía del carbonato precipitado. En cultivos bacterianos líquidos, se produce la precipitación tanto de vaterita como calcita, y en cultivos sólidos, sólo de calcita polimórfica. Además, la calcita producida por bacterias en cultivos líquidos sólo exhibió As(V) adherido y en cultivos sólidos (agar) de algunas cepas, se observa tanto As(V) como As(III) en la estructura de los cristales en una razón de uno es a cuatro y dos es a uno, respectivamente. Si fuese posible hacer análisis mediante XAS-XRF a los cristales de calcita producidos por *P. arsenicoxydans*, probablemente se encuentren ambas especies inorgánicas de arsénico, puesto que la bacteria es cultivada en estado sésil, es decir como biopelícula, al igual que el ensayo en agar de Catelani y col. (2018). Cabe mencionar que estos investigadores determinaron que la captación de arsénico inorgánico en la calcita fue hasta 2000 veces menor en medio sólido que en medio líquido. En contraste, *P. arsenicoxydans* en presencia de As(III), As(V) y As(III)-As(V), cultivada en un medio que permitió la MICP, y tanto en estado planctónico como en estado sésil, fue capaz de remover el 100% del arsénico presente en la fase acuosa del medio de cultivo en 60 horas. Es decir, no hubo diferencias en la co-precipitación de arsénico inorgánico con la calcita, entre los cultivos en estado planctónico y sésil. Se propone analizar los cristales producidos por *P. arsenicoxydans*, a través de algún método que permita diferenciar el tipo de arsénico unido a los cristales, como la espectroscopía de absorción de rayos X (XAS) acoplada a

fluorescencia de rayos x (XRF), con el fin de aportar con nueva evidencia a lo descrito por Catelani y col., 2018.

En presencia de arsénico orgánico, los análisis de crecimiento demostraron diferencias estadísticamente significativas entre las velocidades de crecimiento (k) de los cultivos con ROX, NIT, MSMA y el Control. Por otro lado, en presencia de la mezcla ROX-NIT-MSMA, *P. arsenicoxydans* mostró una cinética, cuya velocidad de muerte fue de $-0,026 \pm 0,002 \text{ Log}_{10}\text{UFC}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Además se determinó que con respecto a la biomasa máxima alcanzada (Y_m) hubo diferencias significativas entre Control vs. NIT ($p < 0,0001$), Control vs. MSMA ($p = 0,0007$) y NIT vs. MSMA ($p = 0,0043$). Además, el Control, ROX, NIT y MSMA mostraron diferencias significativas respecto del ensayo frente a la mezcla de organoarsenicales ($p < 0,05$), resultado esperado considerando que en presencia de ROX-NIT-MSMA *P. arsenicoxydans* presentó una cinética de muerte, cuya Y_m fue de $2,957 \pm 0,134 \text{ Log}_{10}\text{UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$. La importancia de estos ensayos para el presente trabajo, radicó en determinar si *P. arsenicoxydans* era capaz de crecer en presencia de estos compuestos organoarsenicales, puesto que en el sistema de tratamiento que se utilizaría posteriormente, el reactor de esta cepa bacteriana, sería alimentado con el efluente del reactor dónde el consorcio bacteriano crecería en presencia de una mezcla de ROX-NIT-MSMA con el fin de transformar estos compuestos en arsénico inorgánico. Sin embargo, era posible que aún después del proceso, cierta concentración remanente de ROX, NIT y MSMA permaneciera en el efluente sin ser

transformada, dependiendo del porcentaje de transformación de compuestos organoarsenicales que alcanzara el consorcio. Como se evidenció, *P. arsenicoxydans* es capaz de crecer en presencia de ROX, NIT y MSMA por separado, pero en presencia de una mezcla de estos compuestos, la biomasa disminuye generándose una cinética de muerte. Es importante considerar, que en este ensayo de caracterización, la concentración inicial utilizada de cada compuesto (0,5 mM, concentración final de cada compuesto), fue la misma que se utilizó posteriormente en el reactor del consorcio bacteriano, por lo que corresponde a la máxima concentración posible que podría tener el efluente, en caso de que el consorcio presentara un porcentaje nulo de remoción de los organoarsenicales.

Se realizó un ensayo antes de la implementación del sistema de tratamiento, para determinar si posteriormente en el sistema de tratamiento, sería necesario diluir el efluente del primer reactor antes de alimentar el segundo reactor. Para ello se cultivó *P. arsenicoxydans* en medio de cultivo Battaglia-Brunet modificado para MICP suplementado con el efluente final (EC) de un sistema discontinuo del consorcio bacteriano crecido en presencia de ROX-NIT-MSMA en concentraciones volumétricas crecientes (0-100% v/v). Cuatro de las concentraciones ensayadas mostraron un mayor aumento de biomasa que la concentración 0% v/v de EC. En orden creciente estas concentraciones fueron 50, 70, 12 y 6% v/v (Figura 17). El análisis estadístico mediante la prueba de t de Student arrojó diferencias significativas respecto al

control para las concentraciones 6% v/v ($p=0,0023$), 12% v/v ($p=0,0053$) y 70% v/v ($p=0,0152$). No hubo diferencias significativas entre la concentración 50 y 0% v/v ($p=0,3598$). El escalamiento de cultivos bacterianos a cultivos de mayor volumen, muchas veces presenta inconvenientes de reproducibilidad (Neubauer y Junne, 2010), por lo tanto, se decidió utilizar la concentración 12% v/v de EC como condición a implementar en el reactor semi-continuo de *P. arsenicoxydans*. La concentración de EC, en que se obtuvo mayor crecimiento fue 70% v/v, sin embargo no fue escogida para la implementación del reactor, pues la drástica disminución de nutrientes al 30% v/v del medio Battaglia-Brunet, podría afectar negativamente el crecimiento de la biomasa.



23. Sistema de tratamiento aeróbico secuencial

El sistema de tratamiento aeróbico secuencial fue un sistema de dos etapas. La primera etapa consistió en un biorreactor discontinuo (R1) que fue alimentado con un afluente artificial suplementado con una mezcla de ROX-NIT-MSMA (0,5 mM concentración final de cada compuesto). En este biorreactor la biomasa bacteriana correspondió al consorcio bacteriano caracterizado previamente, y el tiempo total de operación fue de 144 horas. El efluente final de este biorreactor (E1) fue filtrado (0,22 μm) y luego fue incorporado al afluente de la segunda etapa del sistema de tratamiento. Esta segunda etapa consistió en un reactor semi-continuo (R2), cuyo afluente fue el medio de cultivo

Battaglia-Brunet modificado para MICP suplementado con el EC a una concentración 12% v/v. En este biorreactor la biomasa bacteriana correspondió a un monocultivo de *Pseudomonas arsenicoxydans* caracterizada previamente. El tiempo total de operación de este reactor fue de 408 horas, sin embargo, durante las primeras 288 horas el reactor fue alimentado con medio Battaglia-Brunet modificado para MICP, sin adicionar el EC (recambio de medio cada 48 horas), por lo tanto las últimas 120 horas de funcionamiento de este reactor, fueron objeto de estudio principal respecto a la performance de remoción de arsénico.

En R1 el porcentaje de compuestos organoarsenicales transformados a arsénico inorgánico fue de 96,70% a las 144 horas. La velocidad máxima de aparición de arsénico inorgánico (C) producto de la degradación de los compuestos organoarsenicales mediada por el consorcio bacteriano fue $0,033 \pm 0,001 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. La concentración máxima de arsénico alcanzada (C_m) fue de $3352 \pm 32,46 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. La concentración relativa (C/C_0) fue $0,007 \pm 0,000 \text{ h}^{-1}$.

En R2 la velocidad de remoción de arsénico (C) producto de la oxidación de arsenito y biomineralización de arsénico-calcita mediada por *P. arsenicoxydans*, fue de $0,033 \pm 8,750 \text{ e-}007 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. La concentración máxima alcanzada (C_m) fue $-0,031 \pm 0,031 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. El porcentaje de remoción de arsénico fue de un 100% a partir de las 360 h de incubación (72 horas desde la incorporación del afluente suplementado con EC 12% v/v). Es importante recalcar que el límite de detección de la técnica es de $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ por lo que se

debe considerar la posibilidad de que aún exista una concentración de arsénico inorgánico igual o inferior a $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a partir de las 360 horas. No obstante, esta concentración es 20 veces menor que la concentración máxima de arsénico en el agua potable ($10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y permitida por la Norma Chilena de Calidad de Agua (INN, 2005; WHO, 2011).

En el ensayo de viabilidad celular realizado con células HUVEC para medir la toxicidad de los afluentes y el efluente final del sistema de tratamiento, se determinó que en el afluente inicial (A1) la viabilidad celular fue de $99,1 \pm 0,49\%$, en el afluente de R2 fue de $33,3 \pm 2,03\%$ y en el efluente final E2 fue de $99,3 \pm 0,51\%$. Existen diferencias estadísticamente significativas entre A1 y A2, y entre A2 y E2 ($p < 0,0001$), pero no entre A1 y E2 ($p = 0,6640$).

Zhu y col. (2018) diseñaron un sistema de tratamiento de aguas residuales basado en biochar y perifiton (*Biochar and Periphyton-Based system*, BPS), compuesto por una columna de biochar y un biorreactor de perifiton, para disminuir la toxicidad asociada al As(III) presente. El porcentaje de remoción de arsenito obtenido fue de $\sim 90.2\text{--}95.4\%$ a una tasa de flujo de $1.0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ utilizando una concentración inicial de As (III) de $2.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. En este sistema, aproximadamente el 60% del As(III) se trató previamente (adsorbió) en la columna de biochar y la remoción del As (III) restante se atribuyó al biorreactor de perifito. La calcita en las superficies de biopelículas perifíticas y los grupos

OH^- y $-\text{CO}$ fueron responsables de la eliminación de As(III) . Este estudio indica la viabilidad del BPS para la eliminación de As(III) en la práctica.

Otros bioprecesos para la remoción de arsénico en aguas residuales han sido estudiados (Battaglia-Brunet y col., 2006; Dastidar y Wang, 2009; Michon y col., 2010; Ahsan y col., 2012; Prabha y Natarajan, 2012; Srivastava y col. 2012; Majumder y col., 2013; Prieto y col., 2013). Las eficiencias de remoción de estos procesos van del 1,5% al 98,8% de eficiencia de remoción de arsénico. Sin embargo, estos procesos fueron hechos a escala de laboratorio y con un afluente controlado, a diferencia de la etapa R2 del sistema de tratamiento, que fue alimentado con un efluente proveniente de otro biorreactor. El presente trabajo, es el primer reporte de un sistema de tratamiento biológico con una eficiencia de remoción de arsénico del medio de cultivo líquido del 100%.

VI. CONCLUSIONES

- El consorcio bacteriano, aislado desde suelo agrícola, es capaz de crecer en presencia de metanoarsenato monosódico (MSMA) y en presencia de una mezcla de roxarsona (ROX), nitarsona (NIT) y metanoarsenato monosódico (MSMA).
- *Pseudomonas arsenicoxydans* es capaz de crecer en presencia de ROX, NIT, MSMA y en presencia de arsénico inorgánico.
- *P. arsenicoxydans* es capaz co-precipitar calcita y arsénico inorgánico, mediante el proceso de Precipitación de Calcita Inducida Microbiológicamente (MICP).
- El sistema de tratamiento aeróbico secuencial es capaz de remover el 100% del arsénico presente en el afluente del biorreactor semi-continuo.
- El sistema de tratamiento aeróbico secuencial permite abatir la toxicidad del arsénico presente en un afluente artificial contaminado con compuestos organoarsenicales de uso agrícola.

VII. PROYECCIONES

- Detectar metabolitos y productos arsenicales orgánicos e inorgánicos producidos durante la transformación de MSMA y la mezcla ROX-NIT-MSMA mediada por el consorcio bacteriano y así contribuir a la clarificación de rutas metabólicas de compuestos organoarsenicales.
- Estudiar la presencia de genes involucrados en el metabolismo del arsénico en los miembros del consorcio bacteriano para elaborar un mapeo de la sinergia metabólica entre los miembros del consorcio bacteriano.
- Determinar la cinética de formación de los cristales de calcita en el tiempo y el la tasa de adsorción de As(III) y As(V).
- Escalar el sistema de tratamiento aeróbico secuencial.

VIII. REFERENCIAS

AAPFCO, Association of American Plant Food Control Officials (2007) Statement of Uniform Interpretation and Policy (SUIP) #25 - The "Heavy Metal Rule". Official publication N° 60. American Association of Plant Food Control Officials [En línea] Recuperado de <http://www.aapfco.org/rules.html> [2016, 21 Julio].

Achal V., Mukherjee A., Basu P. C. y Reddy M. S. (2009) Lactose mother liquor as an alternative nutrient source for microbial concrete production by *Sporosarcina pasteurii*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36:433-438, doi: 10.1007/s10295-008-0514-7

Achal V., Pan X. y Zhang D. (2011) Remediation of copper-contaminated soil by *Kocuria flava* CR1, based on microbially induced calcite precipitation. *Ecological Engineering*, 37(10):1601-1605, doi: 10.1016/j.ecoleng.2011.06.008

Achal V., Pan X., Fua Q. y Zhang D. (2012a) Biomineralization based remediation of As(III) contaminated soil by *Sporosarcina ginsengisoli*. *Journal of Hazardous Materials*, 201–202: 178–184, doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.11.067.

Achal V., Pan P., Zhang D. y Fu Q. (2012b) Bioremediation of Pb-Contaminated Soil Based on Microbially Induced Calcite Precipitation. *Journal of*

Microbiology and Biotechnology, 22(2): 244–247, doi: 10.4014/jmb.1108.08033.

Achal V., Pan X., Lee D. J., Kumari D. y Zhang D. (2013) Remediation of Cr(VI) from chromium slag by biocementation. *Chemosphere*, 93(7):1352-1358, doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.08.008.

Achal V. y Pan X. (2014) Influence of Calcium Sources on Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation by *Bacillus sp.* CR2. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173: 307–317, doi: 10.1007/s12010-014-0842-1.

Adriano D. C. (2001) Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability, and Risk of Metals (2da. ed.) Nueva York: Springer-Verlag, doi: 10.1007/978-0-387-21510-5.

Aguas Antofagasta (2018) Ruta del agua. Recuperado en: <http://www3.aguasantofagasta.cl/empresa/ruta-del-agua.html> [2018, 19 de Mayo].

Aguilar M. V., Martinez M. C. y Masoud T.A. (1987) Effect of alcoholic fermentation on arsenic species content. *American Journal of Enology and Viticulture*. 38:282–286.

Ahsan N., Faruque K., Shamma F., Islam N. y Akhand A. A. (2012) Arsenic adsorption by bacterial extracellular polymeric substances. *Bangladesh Journal of Microbiology*, 28:80-83, doi: 10.3329/bjm.v28i2.11821.

- Akkari K. H., Frans R. E. y Lavy T. L. (1986) Factors affecting degradation of MSMA in soil. *Weed Science*, 34:781–88, doi: 10.1017/S0043174500067850.
- Anderson B. K. y Chamblee T. N. (2001) The effect of dietary 3-nitro-4-hydroxyphenylarsonic acid (roxarsone) on the total arsenic level in broiler excreta and broiler litter. *Journal of Applied Poultry Research*, 10: 323-328, doi: 10.1093/japr/10.4.323.
- Andra S. S., Makris K. C., Quazi S., Sarkar D., Datta R. y Bach S. B. (2010) Organocopper complexes during roxarsone degradation in wastewater lagoons. *Environmental Science and Pollution Research*, 17:1167-1173, doi: 10.1007/s11356-009-0281-7.
- Andres J. y Bertin P. N. (2016) The microbial genomics of arsenic. *FEMS Microbiology Reviews*, 40:299–32, doi: 10.1093/femsre/fuv050.
- Arias M. (2005) *Especiación de arsénico en el transporte a través de tejidos biológicos mediante HPLC-HG-QAAS*. Trabajo de Grado, Químico analista, Universidad de Concepción, Concepción.
- Aschbacher P. W. y Feil V. J. (1991) Fate of [14C] arsanilic acid in pigs and chickens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39: 146–149, doi: 10.1021/jf00001a028.
- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2010) *¿Cuáles son los efectos fisiológicos de la exposición a arsénico?* [En línea]. Recuperado en:

http://www.atsdr.cdc.gov/es/csem/arsenic/efectos_fisiologicos.html [2018, 22 de Noviembre]

Bahar M., Megharaj M. y Naidu R. (2013) Kinetics of arsenite oxidation by *Variovorax* sp. MM-1 isolated from a soil and identification of arsenite oxidase gene. *Journal of Hazardous Materials*. 262: 997-1003, doi: 10.1016/j.jhazmat.2012.11.064.

Bakhat H. F., Zia Z., Fahad S., Abbas S., Hammad H. M., Shahzad A. N., Abbas F., Alharby H. y Shahid M. (2017) Arsenic uptake, accumulation and toxicity in rice plants: Possible remedies for its detoxification: A review. *Environmental Science and Pollution Research*, 24 (10): 9142-9158, doi: 10.1007/s11356-017-8462.

Bardelli F., Benvenuti M., Costagliola P., Di Benedetto F., Lattanzi P., Meneghini C., Romanelli M. y Valenzano L. (2011) Arsenic uptake by natural calcite: An XAS study. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75 (11): 3011-3023, doi: 10.1016/j.gca.2011.03.003.

Baroni F., Boscagli A., Di Lella L. A., Protano G. y Riccobono F. (2004) Arsenic in soil and vegetation of contaminated areas in southern Tuscany (Italy). *Journal of Geochemical Exploration*, 81: 1–14, doi: 10.1016/S0375-6742(03)00208-5.

Battaglia-Brunet F., Dictor M. C., Garrido F., Crouzet C., Morin D., Dekeyser K., Clarens M. y Baranger P. (2002) An arsenic (III)-oxidizing bacterial population: selection, characterization, and performance in reactors. *Journal*

of *Applied Microbiology*, 93: 656–667, doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01726.x.

Battaglia-Brunet F., Joulain C., Garrido F., Dictor M. C., Morin D., Coupland K., Johnson D. B., Hallberg K. B. y Baranger P. (2006) Oxidation of arsenite by *Thiomonas* strains and characterization of *Thiomonas arsenivorans* sp. Nov. *Antonie van Leeuwenhoek*, 89: 99-108, doi: 10.1007/s10482-005-9013-2.

Baxter M. J., Crews H. M., Dennis M. J., Goodall I., Anderson D. (1997) The determination of authenticity of wine from its trace element composition. *Food Chemistry*, 60: 443–450, doi: 10.1016/S0308-8146(96)00365-2.

Ben Omar N., Arias J. M. y González-Muñoz M. T. (1997). Extracellular bacterial mineralization within the context of geomicrobiology. *Microbiologia*. 12: 161-172.

Berman A., Addadi L., Kvick A., Leiserowitz L., Nelson M. y Weiner S. (1990) Intercalation of sea urchin proteins in calcite: study of a crystalline composite material. *Science*. 250: 664-667, doi: 10.1126/science.250.4981.664.

Bertoldi D., Larcher R., Bertamini M., Otto S., Concheri G. y Nicolini G. (2011) Accumulation and Distribution Pattern of Macro- and Microelements and Trace Elements in *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (13): 7224–7236, doi: 10.1021/jf2006003.

- Bertoldi D., Román- Villegas T., Larcher R., Santato A., Nicolini G. (2013) Arsenic present in the soil-vine-wine chain in vineyards situated in an old mining area in Trentino, Italy. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32 (4): 773–779, doi: 10.1002/etc.2119.
- Beveridge T. J., Makin S. A., Kadurugamuwa J. L. y Li Z. S. (1997) Interactions between biofilms and the environment. *FEMS Microbiology*, 20: 291–303, doi: 10.1111/j.1574-6976.1997.tb00315.x.
- Biswas R., Vivekanand V., Saha A., Ghosh A. y Sarkar A. (2019) Arsenite oxidation by a facultative chemolithotrophic *Delftia* spp. BAs29 for its potential application in groundwater arsenic bioremediation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 136: 55-62, doi: 10.1016/j.ibiod.2018.10.006.
- Biswas R. y Sarkar A. (2018): Characterization of arseniteoxidizing bacteria to decipher their role in arsenic bioremediation. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 11: 1-8, doi: 10.1080/10826068.2018.1476883
- Bolan N., Mahimairaja S., Kunhikrishnan A. y Choppala G. (2013) Phosphorus–arsenic interactions in variable-charge soils in relation to arsenic mobility and bioavailability. *Science of The Total Environment*, 463–464: 1154–1162, doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.04.016.
- Braissant O., Decho A. W., Dupraz C., Glunk C., Przekop K. M. y Visscher P. T. (2007) Exopolymeric substances of sulfate-reducing bacteria: interactions

- with calcium at alkaline pH and implication for formation of carbonate minerals. *Geobiology*. 5: 401–411, doi: 10.1111/j.1472-4669.2007.00117.x.
- Bryan C. G., Marchal M., Battaglia-Brunet F., Kugler V., Lemaitre-Guillier C., Lievremont D., Bertin P. N. y Arsene-Ploetze F. (2009) Carbon and arsenic metabolism in *Thiomonas* strains: differences revealed diverse adaptation processes. *BMC Microbiology*, 9: 127, doi: 10.1186/1471-2180-9-127
- Burló F., Guijarro I., Carbonell-Barrachina A. A., Valero D. y Martínez-Sánchez F. (1999) Arsenic species: effects on and accumulation by tomato plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 1247–53, doi: 10.1021/jf9806560.
- Caceres D. D, Pino P., Montesinos N., Atalah E., Amigo H. y Loomis D. (2005) Exposure to inorganic arsenic in drinking water and total urinary arsenic concentration in a Chilean population. *Environmental Research*, 98 (2): 151-159, doi: j.envres.2005.02.007.
- Cai L., Liu G., Rensing C. y Wang G. (2009) Genes involved in arsenic transformation and resistance associated with different levels of arsenic-contaminated soils. *BMC Microbiology*, 9: 4, doi: 10.1186/1471-2180-9-4.
- California Code of Regulations (2001) Title 3: Food and agriculture, Division 4: Plant industry, Chapter 1: Chemistry, Subchapter 1: Fertilizing materials, Article 1: Standards and labeling, §2302: Non-nutritive standards. [En línea]. Recuperado en: <http://ccr.oal.ca.gov> [2016, 22 Julio].

- Campos V. L., Valenzuela C., Yarza P., Kämpfer P., Vidal R., Zaror C., Mondaca M. A., Lopez-Lopez A. y Rosselló-Móra R. (2010) *Pseudomonas arsenicoxydans* sp nov, an arsenite-oxidizing strain isolated from the Atacama desert. *Systematic and Applied Microbiology*, 33: 193–197, doi: 10.1016/j.syapm.2010.02.007.
- Casanello P., Krause B., Torres E., Gallardo V., González M., Prieto C., Escudero C., Farías M., Sobrevia L. (2009) Reduced Larginine transport and nitric oxide synthesis in human umbilical vein endothelial cells from intrauterine growth restriction pregnancies is not further altered by hypoxia. *Placenta*, 30: 625–633, doi: 10.1016/j.placenta.2009.04.010.
- Casiot C., Pedron V., Bruneel O., Duran R., Personne´ J. C., Grapin G., Drakide`s C. y Elbaz-Poulichet F. (2006) A new bacterial strain mediating As oxidation in the Fe-rich biofilm naturally growing in a groundwater Fe treatment pilot unit. *Chemosphere*, 64: 492–496, doi:10.1016/j.chemosphere.2005.11.072
- Castanier S., Levrel G. L. M. y Perthuisot J. P. (1999) Ca-carbonates precipitation and limestone genesis-the microbiogeologist point of view. *Sedimentary Geology*, 126: 9-23, doi: 10.1016/S0037-0738(99)00028-7.
- Catelani T., Perito B., Bellucci F., Lee S. S., Fenter P., Newville M., Rimondi V., Pratesi G. y Costagliola P. (2018) Arsenic uptake in bacterial calcite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 222: 642–654, doi: 10.1016/j.gca.2017.11.013.

- CFIA, Canadian Food Inspection Agency (1997) Tradememorandum T-4-9, Standards for metals in fertilisers and supplements [En línea]. Recuperado de: <http://www.inspection.gc.ca/plants/fertilizers/trade-memoranda/t-4-93/eng/1305611387327/1305611547479> [2016, 21 de Julio].
- Chang W. C., Hsu G. S., Chiang S. M. y Su M. C. (2006) Heavy metal removal from aqueous solution by wasted biomass from a combined AS-biofilm process. *Bioresource Technology*, 97(13):1503-1508, doi: 10.1016/j.biortech.2005.06.011
- Chapman H. D. y Johnson Z. B. (2002) Use of Antibiotics and Roxarsone in Broiler Chickens in the USA: Analysis for the Years 1995 to 2000. *Poultry Science*, 81: 356–364, doi: 10.1093/ps/81.3.356.
- Chen D., Zhang H., Tao Y., Wang Y., Huang L., Liu Z., Pan Y., Peng D., Wang X., Dai M. y Yuan Z. (2011) Development of a high-performance liquid chromatography method for the simultaneous quantification of four organoarsenic compounds in the feeds of swine and chicken. *Journal of Chromatography B*, 879: 716-720, doi: 10.1016/j.jchromb.2011.02.013.
- Chen G., Liu H., Zhang W., Li B., Liu L. y Wang G. (2018) Roxarsone exposure jeopardizes nitrogen removal and regulates bacterial community in biological sequential batch reactors. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 159: 232-239, doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.05.012

- Chen J., Madegowda M., Bhattacharjee H. y Rosen B. P. (2015) ArsP: a methylarsenite efflux permease. *Molecular Microbiology*, 98: 625–635, doi: 10.1111/mmi.13145.
- Cheng L., Fenter P., Sturchio N. C., Zhong Z. y Bedzyk M. J. (1999) X-ray standing wave study of arsenite incorporation at the calcite surface. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 63: 3153–3157, doi: 10.1016/S0016-7037(99)00242-2.
- Christen K. (2001) Chickens, manure, and arsenic. *Environmental Science and Technology*, 35: 184A–185A, doi: 10.1021/es012337m.
- Cid C., Herrera C., Rodríguez R., Bastías G. y Jiménez J. (2016) Assessing the economic impact of cancer in Chile: a direct and indirect cost measurement based on 2009 registries. *Medwave*, 16 (7): e6509, doi: 10.5867/medwave.2016.07.6509.
- Conklin S. D., Shockey N., Kubachka K., Howard K. D. y Carson M. C. (2012) Development of an ion chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry method to determine inorganic arsenic in liver from chickens treated with roxarsone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 9394-9404, doi: 10.1021/jf302366a.
- Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R. y Lappin-Scott H. M. (1995) Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49: 711-45 doi: 10.1146/annurev.mi.49.100195.003431.

- Corsini A., Zaccheo P., Muyzer G., Andreoni V. y Cavalca L. (2014) Arsenic transforming abilities of groundwater bacteria and the combined use of *Aliihoeflea sp.* strain 2WW and goethite in metalloid removal. *Journal of Hazardous Materials*, 269: 89–97, doi:10.1016/j.jhazmat.2013.12.037.
- Corsini A., Colombo M., Muyzer G. y Cavalca L. (2015) Characterization of the arsenite oxidizer *Aliihoeflea sp.* strain 2WW and its potential application in the removal of arsenic from groundwater in combination with Pf-ferritin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 108 (3): 673–684, doi: 10.1007/s10482-015-0523-2.
- Cortinas I., Field J. A., Kopplin M., Garbarino J. R., Gandolfi A. J. y Sierra-Alvarez R. (2006) Anaerobic biotransformation of roxarsone and related N-substituted phenylarsonic acids, *Environmental Science and Technology*, 40: 2951–2957, doi: 10.1021/es051981o.
- Craig P., Eng G. y Jenkins R. (1986) Occurrence and pathways of organometallic compounds in the environment—general considerations. *Organometallic compounds in the environment*. (pp. 1-55). (1ra. ed.) John Wiley & Sons, Ltd.
- Cullen W. R. y Reimer K. J. (1989) Arsenic speciation in the environment. *Chemical Reviews*, 89(4): 713-764, doi: 10.1021/cr00094a002.
- Dhami N. K., Reddy M. S. y Mukherjee A. (2013) Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: a review. *Frontiers in Microbiology*, 4: 314, doi: 10.3389/fmicb.2013.00314.

- Das S., Jean J. S., Kar S., Chou M. L. y Chen C. Y. (2014) Screening of plant growth-promoting traits in arsenic-resistant bacteria isolated from agricultural soil and their potential implication for arsenic bioremediation. *Journal of Hazardous Materials*, 272: 112-20. doi: 10.1016/j.jhazmat.2014.03.012.
- Das J. y Sarkar P. (2018) Remediation of arsenic in mung bean (*Vigna radiata*) with growth enhancement by unique arsenic-resistant bacterium *Acinetobacter lwoffii*. *Science of the Total Environment*, 624: 1106–1118, doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.12.157
- Dastidar A. y Wang Y. T. (2009) Arsenite oxidation by batch cultures of *Thiomonas arsenivorans* strain b6. *Journal of Environmental Engineering*, 135: 708-715, doi: 10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0000020.
- Dastidar A. y Wang Y. T. (2012) Modeling arsenite oxidation by chemoautotrophic *Thiomonas arsenivorans* strain b6 in a packed-bed bioreactor. *Science of The Total Environment*, 432: 113–121, doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.05.051.
- Datta R. y Sarkar D. (2005) Consideration of soil properties in assessment of human health risk from exposure to arsenic-enriched soils. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 1: 55–59, doi: 10.1897/IEAM_2004a-022.1.
- De Muyneck W., Verbeken K., De Belie N. y Verstraete W. (2013) Influence of temperature on the effectiveness of a biogenic carbonate surface treatment

- for limestone conservation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97: 1335–1347, doi: 10.1007/s00253-012-3997-0.
- Desheng Q. y Niya Z. (2006) Effect of arsenilic acid on performance and residual of arsenic in tissue of Japanese laying quail. *Poultry Science*, 85: 2097–2100, doi: doi.org/10.1093/ps/85.12.2097.
- Dey U., Chatterjee S. y Mondal N. K. (2016) Isolation and characterization of arsenic-resistant bacteria and possible application in bioremediation. *Biotechnology Reports*, 10: 1–7, doi: 10.1016/j.btre.2016.02.002.
- Dupraz C., Visscher P. T., Baumgartner L. K. y Reid R. P. (2004) Microbe-mineral interactions: early carbonate precipitation in a hyper-saline lake (Eleuthera Island, Bahamas). *Sedimentology*. 51: 745–765, doi: 10.1111/j.1365-3091.2004.00649.x.
- Dudas M. J. (1984) Enriched levels of arsenic in post-active acid sulfate soils in Alberta. *Soil Science Society of America Journal*, 48 (6): 1451–1452, doi: 10.2136/sssaj1984.03615995004800060049x.
- Dudas M. J. (1987) Accumulation of native arsenic in acid sulphate soils in Alberta. *Canadian Journal of Soil Science*, 67 (2): 317–331, doi: 10.4141/cjss87-028
- Ehrlich H. L. (1998) Geomicrobiology: its significance for geology. *Earth-Science Reviews*, 45: 45-60, doi: 10.1016/S0012-8252(98)00034-8.
- Farasin J., Koechler S., Varet H., Deschamps J., Dillies M. A., Proux C., Erhardt M., Huber A., Jagla B., Briandet R., Coppée J. Y. y

Arsène-Ploetze F. (2017) Comparison of biofilm formation and motility processes in arsenic-resistant *Thiomonas spp.* strains revealed divergent response to arsenite. *Microbial Biotechnology*, 10 (4): 789-803, doi: 10.1111/1751-7915.12556.

FDA, Food and Drug Administration (2013) FDA response to citizen petition on arsenic-based animal drugs. [En línea] Recuperado en: <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/ProductSafetyInformation/ucm370568.htm> [2014, 11 de Julio].

FDA, Food and Drug Administration (2014) Arsenic-based Animal Drugs and Poultry. [En línea] Recuperado en: <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/ProductSafetyInformation/ucm257540.htm> [2014, 28 de Abril].

Fei J., Wang T., Zhou Y., Wang Z., Min X., Ke Y., Hu Y. y Chal L. (2018) Aromatic organoarsenic compounds (AOCs) occurrence and remediation methods. *Chemosphere*, 207: 665-675 doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.05.145.

Feng M., Schrlau J. E., Snyder R., Snyder G. H., Chen M., Cisar J. L. y Cai Y. (2005) Arsenic transport and transformation associated with MSMA application on a golf course green. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 3556-3562, doi: 10.1021/jf047908j.

- Fiket Ž., Mikac N. y Kniewald G. (2010) Arsenic and other trace elements in wines of eastern Croatia. *Food Chemistry*, 126 (3): 941–947, doi: 10.1016/j.foodchem.2010.11.091.
- Fisher E., Dawson A. M., Polshyna G., Lisak J., Crable B., Perera E., Ranganathan M., Thangavelu M., Basu P. y Stoltz J. F. (2008) Transformation of inorganic and organic arsenic by *Alkaliphilus oremlandii* sp. nov. strain OhLAs. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125 (1): 230-41, doi: 10.1196/annals.1419.006.
- Fisher D. J., Yonkos L. T. y Staver K. W. (2015) Environmental Concerns of Roxarsone in Broiler Poultry Feed and Litter in Maryland, USA. *Environmental Science & Technology*, 49 (4): 1999–2012, doi: 10.1021/es504520w.
- Fitz W. J. y Wenzel W. W. (2002) Arsenic transformations in the soil/rhizosphere/plant system: Fundamentals and potential application to phytoremediation. *Journal of Biotechnology*, 99 (3): 259–278, doi: 10.1016/S0168-1656(02)00218-3.
- Flores A. (2007) *Puesta en Marcha de un Sistema de Tratamiento Biológico en Base a Bacterias Inmovilizadas, Capaces de Detoxificar Efluentes Arsenicales*. Informe de Memoria de Título, Ingeniería Civil Química, Universidad de Concepción, Concepción.
- Foust R. D., Phillips M., Hull K. y Yehorova D. (2018) Changes in Arsenic, Copper, Iron, Manganese, and Zinc Levels Resulting from the Application of

- Poultry Litter to Agricultural Soils. *Toxics*, 6 (2): 28, doi: 10.3390/toxics6020028.
- Frost D. V., Overby L. R. y Spruth H. C. (1955) Arsenicals in Feeds, Studies with Arsanilic Acid and Related Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 3: 235-243, doi: 10.1021/jf60049a005.
- Fujita Y., Ferris F. G., Lawson R. D., Colwell F. S. y Smith R. W. (2000) Subscribed content calcium carbonate precipitation by ureolytic subsurface bacteria. *Geomicrobiology Journal*, 17: 305–318, doi: 10.1080/782198884.
- Gadd G. M. (2010) Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*, 156: 609-643, doi: 10.1099/mic.0.037143-0.
- Gadd G. M., Rhee Y. J., Stephenson K. y Wei Z. (2012) Geomycology: metals, actinides and biominerals. *Environmental Microbiology Report*, 4: 270-296, doi: 10.1111/j.1758-2229.2011.00283.x.
- Gadd G. M., Bahri-Esfahani J., Li Q., Rhee Y. J., Wei Z., Fomina M. y Liang X. (2014) Oxalate production by fungi: significance in geomycology, biodeterioration and bioremediation. *Fungal Biology Reviews*, 28: 36-55, doi: 10.1016/j.fbr.2014.05.001.
- Galani-Nikolakaki S., Kallithrakas-Kontos N. y Katsanos A. A. (2002) Trace element analysis of Cretan wines and wine products. *Sciences of The Total Environment*, 285: 155–163, doi: 10.1016/S0048-9697(01)00912-3.
- Gao S. y Buran R. G. (1997) Environmental factors affecting rates of arsine evolution from mineralization of arsenicals in soil. *Journal of Environmental*

Quality Abstract, 26 (3): 753–63, doi:
10.2134/jeq1997.00472425002600030023x.

Garbarino J. F., Bednar A. J., Rutherford D. W., Beyer R. S. y Wershaw L. R. (2003) Environmental fate of roxarsone in poultry litter. I. Degradation of roxarsone during composting. *Environmental Science & Technology*, 37: 1509-1514, doi: 10.1021/es026219q.

González M., Flores C., Pearson J., Casanello P. y Sobrevia L. (2004) Cell signalling-mediated insulin increase of mRNA expression for cationic amino acid transporters-1 and -2 and membrane hyperpolarization in human umbilical vein endothelial cells. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 448 (4): 383–394, doi: 10.1007/s00424-004-1261-x.

Grumbein S., Opitz M. y Lieleg O. (2015) Selected metal ions protect *Bacillus subtilis* biofilms from erosion. *Metallomics*, 6: 1441-1450, doi: 10.1039/C4MT00049H.

Gupta G. y Karupiah M. (1996) Heavy metals in sediments of two Chesapeake Bay tributaries—Wicomico and Pocomoke Rivers. *Journal of Hazardous Materials*, 50 (1): 15–29, doi: 10.1016/0304-3894(96)01773-6.

Guzmán-Fierro V. G. (2011) Transformación de Acido 3-nitro-4-hidrofenilarsénico (roxarsona) por consorcios bacterianos aislados desde suelos agrícolas en condiciones aeróbicas. Tesis para optar al título de Bioingeniero, Bioingeniería, Universidad de Concepción, Concepción.

Guzmán-Fierro V. G. (2014) Abatimiento de compuestos organoarsenicales a través de un sistema de tratamiento aeróbico. Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias mención Microbiología, Universidad de Concepción, Concepción.

Guzmán-Fierro V. G., Moraga R., León C. G., Campos V. L., Smith C. y Mondaca M. A. (2015) Isolation and characterization of an aerobic bacterial consortium able to degrade roxarsone. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12 (4): 1353–1362, doi: 10.1007/s13762-014-0512-4.

Hammes F. y Verstraete W. (2002) Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 1 (1): 3–7, doi: 10.1023/A:1015135629155.

Hammes F., Boon N., de Villiers J., Verstraete W. y Siciliano S. D. (2003) Strain-Specific Ureolytic Microbial Calcium Carbonate Precipitation. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (8): 4901–4909. doi: 10.1128/AEM.69.8.4901–4909.2003.

Hanaoka K., Hasegawa S., Kawabe N., Tagawa S. y Kaise T. (1990) Aerobic and anaerobic degradation of several arsenicals by sedimentary microorganisms. *Applied Organometallic Chemistry*. 4 (3): 239–43, doi: 10.1002/aoc.590040310.

Hancock T. C., Denver J. M., Riedel G. F. y Miller C. V. (2001) Source, transport, and fate of arsenic in the Pocomoke River Basin, a poultry

dominated Chesapeake Bay Watershed. Proceedings of arsenic in the environment workshop. US Geological Survey. Open-File Report [En línea] Recuperado de: https://wwwbrr.cr.usgs.gov/projects/GWC_chemtherm/FinalAbsPDF/thancock.pdf [2019, 31 de Enero].

Harrison J. J., Turner R. J. y Ceri H. (2005) High-throughput metal susceptibility testing of microbial biofilms. *BMC Microbiology*, 5: 53, doi: 10.1186/1471-2180-5-53.

Hassan K. M., Fukuhara T., Hai F. I., Bari Q. H. y Islam K. M. S. (2009) Development of a biophysicochemical technique for arsenic removal from groundwater. *Desalination*, 249 (1): 224–229, doi: 10.1016/j.desal.2008.08.015Get.

Hu Y., Zhang W., Cheng H. y Tao S. (2017) Public health risk of arsenic species in chicken tissues from live poultry markets of Guangdong province, China. *Environmental Science & Technology*, 51: 3508–3517, doi: 10.1021/acs.est.6b06258.

Huang J. H., Scherr F. y Matzner E. (2007) Demethylation of dimethylarsinic acid and arsenobetaine in different organic soils. *Water, Air and Soil Pollution*, 182 (1-4): 31–41, doi: 10.1007/s11270-006-9318-4.

IARC, Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans (2012) Arsenic, Metals, Fibres and Dusts. Arsenic and Arsenic Compounds. En

IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 100C: 41-93.

Instituto Nacional de Normalización, INN (2005) Norma Chilena Oficial NCh 409/1Of.2005 Agua Potable - Parte 1: Requisitos. [En línea] Recuperado en: <https://ciperchile.cl/pdfs/11-2013/norovirus/NCh409.pdf> [2018, 6 de Diciembre]

Ito A., Miura J. I., Ishikawa N. y Umita T. (2012) Biological oxidation of arsenite in synthetic groundwater using immobilised bacteria. *Water Research*, 46 (15): 4825–4831, doi: 10.1016/j.watres.2012.06.013

Jackson B. P. y Bertsch P. M. (2001) Determination of arsenic speciation in poultry wastes by IC-ICP-MS. *Environmental Sciences & Technology*, 35 (24): 4868–4873, doi: 10.1021/es0107172.

Jackson B. P., Bertsch P. M., Cabrera M. L., Camberato J. J., Seaman J. C. y Wood C. W. (2003) Trace element speciation in poultry litter. *Journal of Environmental Quality*, 32 (2): 535–540, doi: 10.2134/jeq2003.0535.

Jianga Z., Li P., Wanga Y. H., Lia B. y Wanga Y. X. (2013) Effects of roxarsone on the functional diversity of soil microbial community. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 76: 32-35 doi: 10.1016/j.ibiod.2012.06.010.

Jones F. (2007) A broad view of arsenic. *Poultry Sciences*, 86 (1): 2–14, doi: 10.1093/ps/86.1.2.

- Kabata-Pendias A. (2001) Trace Elements in Soils and Plants (3ra. ed.) Florida: CRC Press.
- Kang C. H., Han S. H., Shin Y. J., Oh S. J. y So J. S. (2014) Bioremediation of Cd by Microbially Induced Calcite Precipitation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172 (6): 2907–2915, doi: 10.1007/s12010-014-0737-1.
- Kang C. H., Oh S. J., Shin Y. J., Han S. H., Nam Y. H. y So J. S. (2015) Bioremediation of lead by ureolytic bacteria isolated from soil at abandoned metal mines in South Korea. *Ecological Engineering*, 74: 402-407, doi: 10.1016/j.ecoleng.2014.10.009.
- Katsoyiannis I. A. y Zouboulis A. I. (2004) Application of biological processes for the removal of arsenic from groundwaters. *Water Research*, 38: 17–26, doi:10.1016/j.watres.2003.09.011.
- Katsoyiannis I. A., Zouboulis A. I. y Jekel M. (2004) Kinetics of bacterial As(III) oxidation and subsequent As(V) removal by sorption onto biogenic manganese oxides during groundwater treatment. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 43 (2): 486–493, doi: 10.1021/ie030525a.
- Katsoyiannis I. A., Hug S. J., Amman A., Zikoudi A. y Hatziliontos C. (2007) Arsenic speciation and uranium concentrations in drinking water supply wells in Northern Greece: correlations with redox indicative parameters and implications for groundwater treatment. *Science of The Total Environment*, 383 (1-3): 128–140, doi: 10.1016/j.scitotenv.2007.04.035.

- Kment P., Mihaljevič M., Ettler V., Sebek O., Strnad L. y Rohlova L. (2005) Differentiation of Czech wines using multielement composition: A comparison with vineyard soil. *Food Chemistry*, 91:157–165, doi: 10.1016/j.foodchem.2004.06.010.
- Ko B. G., Vogeler I., Bolan N., Clothier B., Green S. y Kennedy J. (2007) Mobility of copper, chromium, and arsenic from treated timber into grapevines. *Science of The Total Environment*, 388 (1-3): 35–42, doi: 10.1016/j.scitotenv.2007.07.041.
- Koechler S., Farasin J., Cleiss-Arnold J. y Arsène-Ploetze F. (2015) Toxic metal resistance in biofilms: diversity of microbial responses and their evolution. *Research in Microbiology*, 166 (10): 764-773, doi: 10.1016/j.resmic.2015.03.008.
- Kruger M. C., Bertin P. N., Heipieper H. J. y Arsène-Ploetze F. (2013) bacterial metabolism of environmental arsenic—mechanisms and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97 (9): 3827–3841, doi: 10.1007/s00253-013-4838-5
- Kulp T. R., Hoeft S. E. y Oremland R. S. (2004) Redox transformations of arsenic oxyanions in periphyton communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (11): 6428- 6434, doi: 10.1128/AEM.70.11.6428-6434.2004.

- Kumari D., Li M., Pan X. y Xin-Yi Q. (2014a) Effect of bacterial treatment on Cr (VI) remediation from soil and subsequent plantation of *Pisum sativum*. *Ecological Engineering*, 73: 404–408, doi: 10.1016/j.ecoleng.2014.09.093.
- Kumari D., Pan X., Lee D. J. y Achal V. (2014b) Immobilization of cadmium in soil by microbially induced carbonate precipitation with *Exiguobacterium undae* at low temperature. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 94: 98-102, doi: 10.1016/j.ibiod.2014.07.007.
- Kumari D., Qian X. Y., Pan X., Achal V., Li Q. y Gadd G. M. (2016) Microbially-induced Carbonate Precipitation for Immobilization of Toxic Metals. *Advances in Applied Microbiology*. 94:79-108, doi: 10.1016/bs.aambs.2015.12.002.
- La Favor J. D., Anderson E. J. y Hickner R. C. (2014) Novel method for detection of reactive oxygen species in vivo in human skeletal muscle. *Physiological Research*, 63 (3): 387-392, PMID: 24564604.
- Lakshminarayanan R., Kini R. M. y Valiyaveetil S. (2002) Investigation of the role of ansocalcin in the biomineralization in goose eggshell matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (8): 5155-5158, doi: 10.1073/pnas.072658899.
- León C. G., Ravanal J. F., Moraga R., Valenzuela C., Smith C. T., Yañez J. y Campos V. L. (2017) CAPÍTULO VII: Removal of As(III) and As(V) by arsenic resistant ureolytic-calcifying bacterial strain isolated from natural environments. *De Implementación de un sistema de tratamiento biológico*

para la detoxificación de arsénico utilizando bacterias ureolíticas-calcificantes arsenito-oxidantes, capaces de biomineralizar As(V) y As(III).

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología, Universidad de Concepción, Concepción.

León C. G., Valenzuela C., Gugliandolo C., Lo Giudice A., Papale M., Moraga R., Vilo C., Dong Q., Smith C. T., Rossello-Mora R., Yañez J. y Campos V. L. (2018) Effect of the natural arsenic gradient on the diversity and arsenic resistance of bacterial communities of the sediments of Camarones River (Atacama Desert, Chile). *PLoS ONE*, 13 (5): e0195080, doi: 10.1371/journal.pone.0195080.

Li H., Li M., Huang Y., Rensing C. y Wang G. (2013a) In silico analysis of bacterial arsenic islands reveals remarkable synteny and functional relatedness between arsenate and phosphate. *Frontiers of Microbiology*, 4:347, doi: 10.3389/fmicb.2013.00347.

Li M., Cheng X. y Guo H. (2013b) Heavy metal removal by biomineralization of urease producing bacteria isolated from soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 76: 81-85, doi: 10.1016/j.ibiod.2012.06.016.

Li Y., Ye F., Wang A., Wang D., Yang B., Zheng Q., Sun G. y Gao X. (2016) Chronic Arsenic Poisoning Probably Caused by Arsenic-Based Pesticides: Findings from an Investigation Study of a Household. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13 (1): 133, doi: 10.3390/ijerph13010133.

- Liang T., Ke Z., Chen Q., Liu L. y Chen G. (2014) Degradation of roxarsone in a silt loam soil and its toxicity assessment. *Chemosphere*, 112: 128–133, doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.03.103.
- Liesack W., Weyland H. y Stackebrandd E. (1991) Potential Risks of Gene Amplification by PCR as Determined by 16S rDNA Analysis of a Mixed-Culture of Strict Barophilic Bacteria. *Microbial Ecology*, 21: 191-198, doi: <http://sci-hub.tw/10.1007/BF02539153>.
- Liu H. y Fang H. H. P. (2002) Characterization of electrostatic binding sites of extracellular polymers by linear programming analysis of titration data. *Biotechnology and Bioengineering*, 80 (7): 806–811, doi:10.1002/bit.10432.
- Liu H., Wang G., Ge J., Liu L. y Chen G. (2014) Fate of roxarsone during biological nitrogen removal process in wastewater treatment systems. *Chemical Engineering Journal*, 255: 500–505, doi: 10.1016/j.cej.2014.06.030.
- Liu Y., Zhang Z., Li Y., Wen Y. y Fei Y. (2017a) Response of soil microbial communities to roxarsone pollution along a concentration gradient. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 52 (9), 819–827, doi: 10.1080/10934529.2017.1281687
- Liu J., Zhou L., Dong F. y Hudson-Edwards K. A. (2017b) Enhancing As(V) adsorption and passivation using biologically formed nano-sized FeS coatings on limestone: Implications for acid mine drainage treatment and

- neutralization. *Chemosphere*, 168: 529-538, doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.11.037.
- Lloyd J. R. y Oremland R. S. (2006) Microbial Transformations of Arsenic in the Environment: From Soda Lakes to Aquifers. *Elements*, 2 (2): 85–90, doi: 10.2113/gselements.2.2.85.
- Lowenstam H. A. y Weiner S. (1989) On biomineralization. (1ra. Ed.) Oxford: Oxford University Press.
- Lu, X., Zhang, Y., Liu, C., Wu, M., & Wang, H. (2018). Characterization of the antimonite- and arsenite-oxidizing bacterium *Bosea* sp. AS-1 and its potential application in arsenic removal. *Journal of Hazardous Materials*, 359: 527–534, doi:10.1016/j.jhazmat.2018.07.112.
- Madsen E. L. (2005) Identifying microorganisms responsible for ecologically significant biogeochemical processes. *Nature Reviews Microbiology*, 3 (5): 439-46, doi: 10.1038/nrmicro1151.
- Mafla S., Moraga R., León C. G., Guzmán-Fierro V. G., Yanez J., Smith C. T., Mondaca M. A. y Campos V. L. (2015) Biodegradation of roxarsona by a bacterial community of underground water and its toxic impact. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31 (8): 1267-1277, doi: 10.1007/s11274-015-1886-2.
- Majumder A., Bhattacharyya K. y Kole S. y Ghosh S. (2013) Efficacy of indigenous soil microbes in arsenic mitigation from contaminated alluvial soil

of India. *Environmental Science and Pollution Research*, 20 (8): 5645-5653, doi: 10.1007/s11356-013-1560-x.

Maki T., Hasegawa H., Watarai H. y Ueda K. (2004) Classification for dimethylarsenate-decomposing bacteria using a restrict fragment length polymorphism analysis of 16S rRNA genes. *Analytical Science*, 20 (1): 61–68, doi: 10.2116/analsci.20.61.

Maki T., Takeda N., Hasegawa H. y Ueda K. (2006a) Isolation of monomethylarsonic acid–mineralizing bacteria from arsenic contaminated soils of Ohkunoshima Island. *Applied Organometallic Chemistry*, 20:538–44, doi: 10.1002/aoc.1075.

Maki T., Watarai H., Kakimoto T., Takahashi M., Hasegawa H. y Ueda K. (2006b) Seasonal dynamics of dimethyl-arsenic acid degrading bacteria dominated in Lake Kibagata. *Geomicrobiology Journal*, 23: 311–18, doi: 10.1080/01490450600761953.

Maki T., Hirota W., Ueda K., Hasegawa H. y Rahman M. A. (2009) Seasonal dynamics of biodegradation activities for dimethylarsinic acid (DMA) in Lake Kahokugata. *Chemosphere*, 77 (1): 36–42, doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.06.016.

Makris K. C., Quazi S., Punamiya P., Sarkar D. y Datta R. (2008) Fate of arsenic in swine waste from concentrated animal feeding operations. *Journal of Environmental Quality*, 37 (4): 1626-1633, doi: 10.2134/jeq2007.0479.

- Mangalgiri K. P., Adak A. y Blaney L. (2015) Organoarsenicals in poultry litter: Detection, fate, and toxicity. *Environmental International*, 75: 68–80, doi: 10.1016/j.envint.2014.10.022.
- Manning B. A. y Goldberg S. (1997) Adsorption and stability of arsenic (III) at the clay mineral-water interface. *Environmental Science and Technology*, 31 (7): 2005-2011, doi: 10.1021/es9608104.
- Marchal M., Briandet R., Koechler S., Kammerer B. y Bertin P. N. (2010) Effect of arsenite on swimming motility delays surface colonization in *Herminiimonas sarsenicoxydans*. *Microbiology*, 156: 2336-2342, doi: 10.1099/mic.0.039313-0.
- Marchal M., Briandet R., Halter D., Koechler S., DuBow M. S., Lett M. C. y Bertin P. N. (2011) Subinhibitory arsenite concentrations lead to population dispersal in *Thiomonas* sp. *PLoS One*, 6: 23181, doi: 10.1371/journal.pone.0023181.
- Marshall K. C. (2013) Planktonic Versus Sessile Life of Prokaryotes. En *The Prokaryotes*. Berlin: Springer, doi: 10.1007/978-3-642-30123-0_49.
- McBride M. y Spiers G. (2001) Trace element content of selected fertilizers and dairy manures as determined by ICP-MS. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 32 (1-2): 139–156, doi: 10.1081/CSS-100102999.
- McLaughlin M., Tiller K., Naidu R. y Stevens D. (1996) Review: the behaviour and environmental impact of contaminants in fertilizers. *Australian Journal of Soil Research*, 34 (1): 1–54, doi: 10.1071/SR9960001.

- Melody S. M. y Johnston F. H. (2015) Coal mine fires and human health: What do we know? *International Journal of Coal Geology*, 152B: 1-14, doi: 10.1016/j.coal.2015.11.001.
- Michel C., Jean M., Coulon S., Dictor M. C., Delorme F., Morin D. y Garrido F. (2007) Biofilms of As(III)-oxidising bacteria: formation and activity studies for bioremediation process development. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77: 457–467, doi: 10.1007/s00253-007-1169-4.
- Michel C., Garrido F., Roche E., Belval S. C. y Dictor M. C. (2011) Role of exopolymeric substances (EPS) in the stability of the biofilm of *Thiomonas arsenivorans* grown on a porous mineral support. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21 (2): 183–186, doi: 10.4014/jmb.1001.01017.
- Michon J., Dagot C., Deluchat V., Dictor M. C., Battaglia-Brunet F. y Baudu M. (2010) As(III) biological oxidation by CAsO1 consortium in fixed-bed reactors. *Process Biochemistry*, 45 (2): 171–178, doi: 10.1016/j.procbio.2009.09.003.
- MINSAL, Ministerio de Salud, Subsecretaría de Salud Pública, División Planificación Sanitaria, Departamento de Epidemiología, Unidad de Vigilancia de Enfermedades No Transmisibles y Estudios (2012) Primer Informe de Registros Poblacionales de Cáncer de Chile, Quinquenio 2003-2007. Santiago de Chile: Vallebuona C, Coordinadora Nacional de los RPC de Cáncer, Unidad de Estudios y Vigilancia de Enfermedades No Transmisibles. [En línea] Recuperado en:

https://www.paho.org/chi/index.php?option=com_docman&view=download&alias=174-informe-rpc-chile-2003-2007&category_slug=cancer&Itemid=1145 [27 de Mayo, 2018]

- Molina M., Aburto F., Calderón R., Cazanga M., Escudey M. (2009) Trace Element Composition of Selected Fertilizers Used in Chile: Phosphorus Fertilizers as a Source of Long-Term Soil Contamination. *Soil and Sediment Contamination*. 18 (4): 497-511, doi: 10.1080/15320380902962320.
- Moody J. P. y Williams R. T. (1962) The fate of aryl arsonic acids in hens. *Biochemistry Journal*, 85: 4P-5P.
- Moody J. P. y Williams R. T. (1964) The metabolism of 4-hydroxy-3-nitrophenylarsonic acid in hens. *Food and Cosmetics Toxicology*, 2: 707–715.
- Morrison J.L. (1969) Distribution of arsenic from poultry litter in broiler chickens, soil, and crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 17 (6): 1288–1290, doi: 10.1021/jf60166a018.
- Muller D., Medigue C., Koechler S., Barbe V., Barakat M., Talla E., Bonnefoy V., Krin E., Arsene-Ploetze F., Carapito C., Chandler M., Curnoyer B., Cruveiller S., Dossat C., Duval S., Heymann M., Leize E., Lieutaud A., Lievremont D., Matika Y., Mangenot S., Nitschke W., Orte P., Pedrial N., Schoepp B., Siguier P., Simeonova D. D., Rouy Z., Segurens B., Turlin E., Vallenet D., Van Dorsselaer A., Weiss S., Weissenbach J., Lett M., Danchin A. y Bertin P. N. (2007) A tale of two oxidation states: bacterial colonization of arsenic-

rich environments. *PLoS Genetics*, 3(4): e53, doi:10.1371/journal.pgen.0030053.

Murphy E. A. y Aucott M. (1998) An assessment of the amounts of arsenical pesticides used historically in a geographical area. *The Science of the Total Environment*, 218 (2-3): 89-101, doi: 10.1016/S0048-9697(98)00180-6.

Muyzer G., De Waal E. C. y Uitterlinden A. G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology*, 59 (3): 695-700, PMID: 7683183.

Nachman K. E., Graham J. P., Price L. B. y Silbergeld E. K. (2005) Arsenic: a roadblock to potential animal waste management solutions. *Environmental Health Perspectives*, 113 (9):1123-4, doi: 10.1289/ehp.7834.

Nachman K. E., Raber G., Francesconi K. A., Navas-Acien A. y Love D. C. (2012) Arsenic species in poultry feather meal. *Science of The Total Environment*, 417-418: 183-188, doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.12.022.

NCh 2880. Of 2004 (2005) Compost - Clasificación y requisitos [En línea] Recuperado de <http://www.ingeachile.cl/descargas/normativa/agricola/NCH2880.pdf> [2018, 11 de Noviembre]

NCSL, National Conference of Standards Laboratories (2016) Concentrated animal feeding operations [En línea] Recuperado de <Http://www.ncsl.org/research/agriculture-and-rural->

development/concentrated-animal-feeding-operations.aspx [2016, 24 de Mayo]

Neubauer P. y Junne S. (2010) Scale-down simulators for metabolic analysis of large-scale bioprocesses. *Current Opinion in Biotechnology*, 21 (1): 114-121, doi:10.1016/j.copbio.2010.02.001.

Newman D. K., Beveridge T. J. y Morel F. M. M. (1997) Precipitation of arsenic trisulfide by *Desulfotomaculum auripigmentum*. *Applied Environmental Microbiology*, 63 (5): 2022–2028.

Obst M., Dynes J., Lawrence J., Swerhone G., Benzerara K. y Karunakaran C. (2009) Precipitation of amorphous CaCO₃ (aragonite-like) by cyanobacteria: a STXM study of the influence of EPS on the nucleation process. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 73 (14): 4180–4198, doi: 10.1016/j.gca.2009.04.013.

OCDE/FAO (2013) OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2013-2022, Texcoco, Estado de México, Universidad Autónoma Chapingo. [En línea] Recuperado de http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2013-es [2018, 27 de Noviembre].

OECD/FAO (2015), OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2015. París: OECD Publishing, doi: agr_outlook-2015-es.

Oremland R. S. y Stolz J. F. (2003) The ecology of Arsenic. *Science*, 300 (5621): 939–944, doi: 10.1126/science.1081903.

- Overby L. R. y Fredrickson R. L. (1963) Feed Additives, Metabolic Stability of Radioactive Arsanilic Acid in Chickens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 11 (5): 378-381, doi: 10.1021/jf60129a009.
- Overmann J., Abt B. y Sikorski J. (2017) Present and Future of Culturing Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 8 (71):711-730. doi: 10.1146/annurev-micro-090816-093449.
- Pais I. y Jones J. B. (1997) The Handbook of Trace Elements. New York: St. Lucie Press.
- Pavkov M. y Goessler W. (2001) Determination of organoarsenic compounds in finishing chicken feed and chicken litter by HPLC ICP-MS. En *Arsenic Exposure and Health Effects IV*. Oxford: Elsevier Science Ltd.
- Perito B. y Mastromei G. (2011) Molecular basis of bacterial calcium carbonate precipitation. En *Molecular biomineralization, aquatic organisms forming extraordinary materials*. Berlin: Springer.
- Peryea F. J. y Creger T. L. (1994) Vertical distribution of lead and arsenic in soils contaminated with lead arsenate pesticide residues. *Water, Air, and Soil Pollution*, 78 (3-4): 297-306, doi: 10.1007/BF00483038.
- Prabha C. y Natarajan K. (2012) Mechanism of arsenic tolerance and bioremoval of arsenic by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Biochemical Technology*, 3: 257-265.
- Prieto D., Devesa-Rey R., Rubinos D., Díaz-Fierros F. y Barral M. (2013) Arsenate retention by epipsammic biofilms developed on streambed

sediments: influence of phosphate. *BioMed Research International*, 2013 (2): 591634, doi: 10.1155/2013/591634.

Ramírez-Aldaba H., Vázquez-Arenas J., Sosa-Rodríguez F. S., Valdez-Pérez D., Ruiz-Baca E., Trejo-Córdoba G., Escobedo-Bretado M. A., Lartundo-Rojas L., Ponce-Peña P. y Lara R. H. (2018) Changes in biooxidation mechanism and transient biofilm characteristics by As(V) during arsenopyrite colonization with *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 45 (8): 669–680, doi: 10.1007/s10295-018-2051-3.

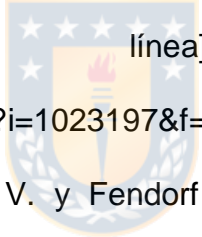
Rastelli S. E., Rosales B. M. y Viera M. R. (2015) Bacterial biofilms formed in arsenic-containing water: bacterial community characterization. *Journal of Water Supply: Research and Technology-Aqua*, 65 (1): 1-11, doi:10.2166/aqua.2015.137

Ravenscroft P., Brammer H. y Richards K. (2009) Introduction in Arsenic Pollution: A Global Synthesis. Oxford: Wiley-Blackwell, doi: 10.1002/9781444308785.ch1.

Reeburgh W. S. (2007) Oceanic methane biogeochemistry. *Chemical Reviews*, 107 (2): 486–513, doi: 10.1021/cr050362v.

Reisman H. B. (1993) Problems in Scale-Up of Biotechnology Production Processes. *Critical Reviews in Biotechnology*, 13 (3): 195–253, doi: 10.3109/07388559309041319.

Renard F., Putnis C. V., Montes-Hernandez G., Ruiz-Agudo E., Hovelmann J. y Sarret G. (2015) Interactions of arsenic with calcite surfaces revealed by in situ nanoscale imaging. *Geochimica et Cosmochimica*, 159: 61–79, doi: 10.1016/j.gca.2015.03.025.

Resolución N°1035 EXENTA, Ministerio de Agricultura, Servicio Agrícola y Ganadero, División Protección Agrícola y Forestal, Dirección Nacional (2011) Determina márgenes de tolerancia para productos fertilizantes que se internen, fabriquen y comercialicen en el país; para elementos acompañantes contenidos en ellos, y deroga resolución que indica. ID: 1023197 [En  línea] Recuperado de <https://www.leychile.cl/N?i=1023197&f=2011-02-18&p=> [2016,29 de Julio].

Reynolds J. G., Naylor D. V. y Fendorf S. E. (1999) Arsenate sorption in phosphate amended soils during flooding and aeration cycles. *Soil Sciences Society of America Journal Abstract*, 63 (5): 1149–1156, doi: 10.2136/sssaj1999.6351149x.

Rivera M. L. y Piña M. (2005) Tratamiento de agua para remoción de arsénico mediante adsorción sobre zeolita natural acondicionada. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. [En línea] Recuperado de <http://www.zeocat.es/docs/aguaarsenico2.pdf> [2019, 4 de Enero]

Rodriguez-Navarro C., Rodriguez-Gallego M., Ben Chekroun K. y Gonzalez-Munoz M. T. (2003) Conservation of ornamental stone by *Myxococcus*

- xanthus*-induced carbonate biomineralization. *Applied Environmental Microbiology*, 69: 2182–2193, doi: 10.1128/AEM.69.4.2182-2193.2003.
- Roychowdhury R., Roy M., Rakshit A., Sarkar S. y Mukherjee P. (2018) Arsenic Bioremediation by Indigenous Heavy Metal Resistant Bacteria of Fly Ash Pond. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 101 (4): 527–535, doi: 10.1007/s00128-018-2428-z.
- Rutherford D., Bednar A., Garbarino J., Needham R., Staver K. y Wershaw R. (2003) Environmental fate of roxarsone in poultry litter. Part II. Mobility of arsenic in soils amended with poultry litter. *Environmental Science Technology*, 37 (8): 1515-1520, doi: 10.1021/es026222+.
- Sadiq M. (1995) Arsenic chemistry in soils: An overview of thermodynamic predictions and field observations. *Water, Air and Soil Pollution*, 93 (1-4): 117–136, doi: 10.1007/BF02404751.
- Saluja B., Gupta A. y Goel R. (2011) Mechanism of arsenic resistance prevalent in *Bacillus* species isolated from soil and ground water sources of India. *Ekologija*. 57 (4): 155–161, doi: 10.6001/ekologija.v57i4.2273.
- Sancha A. M. y O' Ryan R. (2008) Managing Hazardous Pollutants in Chile: Arsenic. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 196: 123–146, doi: 10.1007/978-0-387-78444-1_5.
- Sanders J. G. (1979) Microbial role in the demethylation and oxidation of methylated arsenicals in seawater. *Chemosphere*, 8 (3): 135–37, doi: 10.1016/0045-6535(79)90061-4.

- Santini J. M., Sly L. I., Schnagl R. D. y Macy J. M. (2000) A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies. *Applied Environmental Microbiology*, 66 (1): 92, doi:10.1128/AEM.66.1.92-97.2000.
- Sarkar A., Kazy S. K. y Sar P. (2013) Characterization of arsenic resistant bacteria from arsenic rich groundwater of West Bengal, India. *Ecotoxicology*, 22 (2): 363-76, doi: 10.1007/s10646-012-1031-z.
- Selim H. M., Davidson J. M., Rao P. S. C. (1977) Transport of reactive solutes through multilayered soils. *Soil Science Society of America Journal*, 41 (1): 3-10, doi: 10.2136/sssaj1977.03615995004100010007x.
- Shi L., Wang W., Yuan S. J. y Hu Z. H. (2014) Electrochemical Stimulation of Microbial Roxarsone Degradation under Anaerobic Conditions. *Environmental Science and Technology*, 48 (14): 7951–7958, doi: 10.1021/es501398j.
- Sierra-Alvarez R., Yenal U., Field J. A., Kopplin M., Gandolfi A. J. y Garbarino J. R. (2006) Anaerobic biotransformation of organo-arsenical pesticides monomethylarsonic acid and dimethylarsinic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (11): 3959–66, doi: 10.1021/jf053223n.
- Sierra-Alvarez R., Cortinas I. y Field J. A. (2010) Methanogenic inhibition by roxarsone (4-hydroxy-3-nitrophenylarsonic acid) and related aromatic

- arsenic compounds. *Journal of Hazardous Materials*, 175 (1-3): 352–358, doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.10.010.
- Silbergeld E. K. y Nachman K. (2008) The environmental and public health risks associated with arsenical use in animal feeds. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1140: 346–357, doi: 10.1196/annals.1454.049.
- Silver S. y Phung L. T. (2005) Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (2): 599-608, doi: 10.1128/AEM.71.2.599-608.2005.
- Simeonova D. D., Lièvreumont D., Lagarde F., Muller D. A., Groudeva V. I. y Lett M. C. (2004) Microplate screening assay for the detection of arsenite-oxidizing and arsenate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 237 (2): 249-53., doi: 10.1016/j.femsle.2004.06.040.
- Slyemi D. y Bonnefoy V. (2012) How prokaryotes deal with arsenic. *Environmental Microbiology Reports*, 4 (6): 571–86, doi: 10.1111/j.1758-2229.2011.00300.x.
- Smith E., Naidu R. y Alston A. M. (1999) Chemistry of arsenic in soils: Sorption of arsenate and arsenite by four Australian soils. *Journal of Environmental Quality Abstract*, 28 (6): 1719–1726, doi: 10.2134/jeq1999.00472425002800060005x.
- Smith A H., Marshall G., Roh T., Ferreccio C., Liaw J. y Steinmaus C. (2017) Lung, Bladder, and Kidney Cancer Mortality 40 Years After Arsenic

- Exposure Reduction. *Journal of National Cancer Institute*, 110 (3): djx20, doi: 10.1093/jnci/djx201.
- Smedley P. L. y Kinniburgh D. G. (2002) A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry*, 17 (5): 517–568, doi: 10.1016/S0883-2927(02)00018-5.
- Srivastava S., Verma P. C., Singh A., Mishra M., Singh N., Sharma N. y Singh N. (2012) Isolation and characterization of *Staphylococcus sp.* strain NBRIEAG-8 from arsenic contaminated site of West Bengal. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95 (5): 1275-1291, doi: 10.1007/s00253-012-3976-5.
- Steinmaus C., Ferreccio C., Acevedo J., Balmesa J. R., Liawa J., Troncoso P., Dauphiné D. P., Nardone A. y Smitha A. H. (2016) High risks of lung disease associated with early-life and moderate lifetime arsenic exposure in northern Chile. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 313: 10-15, doi: j.taap.2016.10.006.
- Stolz J. F., Perera E., Kilonzo B., Kail B., Crable B., Fisher E., Ranganathan M., Wormer L. y Basu P. (2007) Biotransformation of 3-nitro-4-hydroxybenzene arsonic acid (roxarsone) and release of inorganic arsenic by *Clostridium* species. *Environmental Sciences and Technology*, 41: 818-823, doi: 10.1021/es061802i.
- Tani Y., Miyata N., Ohashi M., Ohnuki T., Seyama H., Iwahori K. y Soma M. (2004) Interaction of inorganic arsenic with biogenic manganese oxide

produced by a Mn-oxidizing fungus, strain KR21-2. *Environmental Sciences and Technology*, 38 (24): 6618–6624, doi: 10.1021/es049226i.

Teitzel G. M. y Parsek M. R. (2003) Heavy Metal Resistance of Biofilm and Planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (4): 2313–2320, doi: 10.1128/AEM.69.4.2313–2320.2003.

USEPA, United States Environmental Protection Agency (1999) Background Report on Fertilizer Use, Contaminants and Regulations, EPA 747- R-98-003. U.S. Washington: Environmental Protection Agency, Office of Pollution Prevention and Toxics.

USEPA, United States Environmental Protection Agency (2002) Zinc Fertilizers Made from Recycled Hazardous Secondary Materials, Federal Register, Vol. 57, No. 142, Final rule, 40 CFR parts 261, 266, 268, and 271. U.S. Washington: Environmental Protection Agency.

USEPA, United States Environmental Protection Agency (2006) Reregistration Eligibility Decision for MSMA, DSMA, CAMA, and Cacodylic Acid. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. [En línea] Recuperado en <https://www.regulations.gov/document?D=EPA-HQ-OPP-2006-0201-0079> [2016, 22 de Junio]

USEPA, United States Environmental Protection Agency (2009) Organic Arsenicals; Product Cancellation Order and Amendments to Terminate Uses (EPA–HQ–OPP–2009–0191; FRL–8437–7). [En línea] Recuperado en <https://www.federalregister.gov/articles/2009/09/30/E9-23319/organic->

arsenicals-product-cancellation-order-and-amendments-to-terminate-uses

[2016, 11 de Julio]

USEPA, United States Environmental Protection Agency (2014)

Biotransformation of Dimethylarsinic Acid. Engineering Issue. Disponible en:

National Service Center for Environmental Publications (NSCEP). [En línea]

Recuperado

en

<http://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockkey=P100MH3S.txt> [2016, 11 de

Julio]

Valenzuela C., Moraga R., León C. G., Smith C. T., Mondaca M. A. y Campos

V. L. (2015) Arsenite Oxidation by *Pseudomonas arsenicoxydans*

Immobilized on Zeolite and Its Potential Biotechnological Application.

Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 94 (5): 667-73, doi:

10.1007/s00128-015-1495-7.

Van Paassen L. A., Daza C. M., Staal M., Sorokin D. Y., Van Der Zon W., Van

Loosdrecht M. C. (2010) Potential soil reinforcement by biological denitrifica-

tion. *Ecological Engineering*, 36 (2): 168–175, doi:

10.1016/j.ecoleng.2009.03.026.

Venegas P. y CIAP-UTFSM (2014) Fertilización Fosforada y Liberación de

Arsénico en Suelos Agrícolas. Boletín Difusión 1-2014. [En línea]

Recuperado en <http://www.ciap.usm.cl/sitio/publicaciones.php?pagina=2>

[2016, 22 de Julio].

- Violante A. y Pigna M. (2002) Competitive Sorption of Arsenate and Phosphate on Different Clay Minerals and Soils. *Soil Sciences Society of America Journal*, 66 (6): 1788–1796, doi: 10.2136/sssaj2002.1788.
- Von Endt D. W., Kearney P. C. y Kafman D. D. (1968) Degradation of monosodium methanearsonic acid by soil microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 16: 17-20, doi: 10.1021/jf60155a017.
- Wang J., Ma T., Zhao L., Lv J., Li G., Liang F. y Liu R. (2008) PCR–DGGE method for analyzing the bacterial community in a high temperature petroleum reservoir. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24 (9): 1981-1987, doi: 10.1007/s11274-008-9694-6.
- Wang Q., Han Y., Shi K., Fan X., Wang L., Li M. y Wang G. (2017) An Oxidoreductase AioE is Responsible for Bacterial Arsenite Oxidation and Resistance. *Scientific Reports*, 7: 41536, doi: 10.1038/srep41536.
- Warren L. A., Maurice P. A., Parmar N. y Ferris F. G. (2001) Microbially mediated calcium carbonate precipitation: implications for interpreting calcite precipitation and for solid-phase capture of inorganic contaminants. *Geomicrobiology Journal*, 18 (1): 93–115, doi: 10.1080/01490450151079833.
- Wenzel W. W., Kirchbaumer N., Prohaska T., Stingeder G., Lombi E. y Adriano D. C. (2001) Arsenic fractionation in soils using an improved sequential extraction procedure. *Analytica Chimica Acta*, 436 (2): 309–323, doi: 10.1016/S0003-2670(01)00924-2.

- Wershaw R. L., Garbarino J. R. y Burkhardt M. R. (1999) Roxarsone in natural water systems. En *Effects of animal feeding operations on water resources and the environment*. Geological Survey: US. [En línea] Rescatado de https://water.usgs.gov/owq/AFO/proceedings/afo/OFR/OFR_00-204.pdf [2016, 11 de Noviembre]
- Woolson E. A. (1973) Arsenic phytotoxicity and uptake in six vegetable crops. *Weed Sciences*, 21 (6): 524–277, doi: 10.1017/S0043174500032409.
- Woolson E. A., Aharonson N. y Iadevaia R. (1982) Application of the high-performance liquid chromatography–flameless atomic absorption method to the study of alkyl arsenical herbicide metabolism in soil. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 30 (3): 580–84, doi: 10.1021/jf00111a041.
- Worden A. y Wood E. (1973) The effect of carbarsone (33.6% w/v p-ureidobenzene arsonic acid) on bodyweight gain, food conversion and tissue arsenic levels of turkey poults. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 24 (1): 35–41, doi: 10.1002/jsfa.2740240107.
- World Health Organization, WHO (2011) Arsenic in Drinking-water, Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. WHO reference number: WHO/SDE/WSH/03.04/75/rev1.
- Yang H. C. y Rosen B. P. (2016) New mechanisms of bacterial arsenic resistance. *Biomedical Journal*, 39 (1): 5-13, doi: j.bj.2015.08.003.
- Yang X., Li Q., Tang Z., Zhang W., Yu G., Shen Q. y Zhao F. J. (2017) Heavy metal concentrations and arsenic speciation in animal manure composts in

- China. *Waste Management*, 64: 333-339, doi: 10.1016/j.wasman.2017.03.015.
- Yáñez J., Fierro V., Mansilla H., Figueroa L., Cornejo L. y Barnes R. (2005) Arsenic speciation in human hair: a new perspective forepidemiological assessment in chronic arsenicism. *Journal of Environmental Monitoring*, 7 (12): 1335-1341, doi: 10.1039/B506313B.
- Yao L., Huang L., He Z., Zhou C., Lu W. y Bai C. (2016) Delivery of roxarsone via chicken diet→chicken→chicken manure→soil→rice plant. *Science of The Total Environment*, 566: 1152–1158, doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.05.157.
- Yokoyama Y., Tanaka K. y Takahashi Y. (2012) Differences in the immobilization of arsenite and arsenate by calcite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 91: 202-219, doi: 10.1016/j.gca.2012.05.022.
- Yoshinaga M., Cai Y. y Rosen B. P. (2011) Demethylation of methylarsonic acid by a microbial community. *Environmental Microbiology*, 13 (5): 1205–1215, doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02420.x.
- Zargar K., Hoeft S., Oremland R. y Saltikov C. W. (2010) Identification of a novel arsenite oxidase gene, *arxA*, in the haloalkaliphilic, arseniteoxidizing bacterium *Alkalilimnicola ehrlichii* strain MLHE-1. *Journal of Bacteriology*, 192 (14): 3755-3762, doi: 10.1128/JB.00244-10.
- Zargar K., Conrad A., Bernick D. L., Lowe T. M., Stolc V., Hoeft S., Oremland R. S., Stolz J. y Saltikov C. W. (2012) ArxA, a new clade of arsenite oxidase

- within the DMSO reductase family of molybdenum oxidoreductases. *Environmental Microbiology*, 14 (7): 1635-45, doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02722.x.
- Zeng X. C., Wang J., Wang N., Chen X., Mu Y., Li H., Yang Y., Liu Y. y Wang Y. (2016) Functions and unique diversity of genes and microorganisms involved in arsenite oxidation from the tailings of a realgar mine. *Applied Environmental Microbiology*, 82: 7019–7029, doi: 10.1128/AEM.02190-16.
- Zeng X. C., He Z., Chen X., Cao Q. A. D., Li H. y Wang Y. (2018) Effects of arsenic on the biofilm formations of arsenite-oxidizing bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 165: 1-10, doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.08.079.
- Zhang F. F., Wang W., Yuan S. J. y Hu Z. H. (2014) Biodegradation and speciation of roxarsone in an anaerobic granular sludge system and its impacts. *Journal of Hazardous Materials*, 279: 562–568, doi: 10.1016/j.jhazmat.2014.07.047.
- Zhu T. y Dittrich M. (2016) Carbonate Precipitation through Microbial Activities in Natural environment, and Their Potential in Biotechnology: A Review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 4 (4): 1-21, doi: 10.3389/fbioe.2016.00004.
- Zhu N., Zhang J., Tang J., Zhua Y. y Wu Y. (2018) Arsenic removal by periphytic biofilm and its application combined with biochar. *Bioresour Technol*, 248B: 49-55, doi:10.1016/j.biortech.2017.07.026.

Zouboulis A. y Latsoyiannis I. (2005) Recent advances in the bioremediation of arsenic-contaminated groundwaters. *Environment International*, 31 (2): 213-219, doi: 10.1016/j.envint.2004.09.018.

Zwietering M. H., Jongenburger I., Rombouts F. M. y Van't Riet K. (1990) Modeling of the bacterial growth curve. *Applied Environmental Microbiology*, 56 (6): 1875-1881.

