Universidad Andrés Bello

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela de Ingeniería en Biotecnología

Aplicación de bacterias resistentes a metal(oid)es para la remoción de estos contaminantes desde matrices acuosas.

Proyecto de Tesis presentado como parte de los requisitos para optar al Grado de **Magíster en Biotecnología**.

Director de Tesis: Dr. Felipe Arenas Salinas

Facultad de Química y Biología

Universidad de Santiago de Chile

Profesor Patrocinante: Dr. José Manuel Pérez Donoso

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad Nacional Andrés Bello

Santiago Tomás Valenzuela Mejías

Santiago, Chile.

Marzo, 2018.

UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO
Facultad de Ciencias Biológicas

Ingeniería en Biotecnología

"Aplicación de bacterias resistentes a metal(oid)es para la remoción de estos contaminantes desde matrices acuosas."

Santiago Tomás Valenzuela Mejías

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión del Director de Tesis Dr. Felipe Arenas, en el laboratorio de Microbiología Molecular, Universidad de Santiago de Chile, aprobado por los miembros de la Comisión de evaluación.

_____	_____
Dr. Iván Calderón	Dr. Fernando Gil
Comisión de Tesis	Comisión de Tesis

_____
Dr. Felipe Arenas
Director de Tesis

SANTIAGO-CHILE
Año 2018

Dedicado a mi familia,

a Apolito

a los Dioses y

aquellos que vinieron antes de mí…

a todos ellos por guiar mi camino.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer inicialmente a mi tutor Dr. Felipe Arenas, por confiar en mí, darme la oportunidad de llevar a cabo este mini proyecto y apoyarme durante todo el proceso, por ser un ejemplo de calidad humana. A los telurianos, guiados por el Dr. Claudio Vásquez, por ser un equipo con mucha vida y telurito en sus venas, además de otros metales pesados, los cuales llevare en mi organismo por mucho tiempo. Agradecimientos especiales a Clamuvi, por su eterna paciencia, por enseñarme y ayudarme cuando lo necesité. A Mirtha, ¡por todo! la buena onda, la maldad, las reflexiones, el apoyo, el entendimiento, las risas, las enseñanzas de vida y también de ciencia. A Vale y a Michell, por las risas, la compañía y los almuerzos de verano.

Le agradezco a mis amigos, a Maca por ser la más comprensiva, por las tardes de té y el apoyo incondicional. A todo el grupito de la universidad que sufrió y disfrutó conmigo: Gabo, Karla, Coni, Daniel, Enzo, Fran C., Fran G., Pauli, Pieri y Max.

A Caro y Felipe, por ser los más geniales, si esta Tesis gestó cambios en mí, ustedes fueron la guía, el aliento y el alimento para que esos cambios fueran lo mejor para mí. A Mel, por sus palabras y consejos.

Finalmente, y no menos importante, a mi familia, a mi mamá y a mi papá, aunque no sabían muy bien lo que estaba haciendo, ellos estaban para apoyarme de todas las formas posibles cuando llegaba a la casa para tomar once. A mi hermano Diego, por ser un guía, un soporte y un compañero en este proceso crecimiento. A mi gato Apolo, por su inmenso amor, será amado eternamente. Por último, a Hékate, por ser la luz, el camino y la guía en este proceso, sin ella la Tesis solo hubiera sido un proceso mundano.

"Nadie nace sabiendo nada y el que quiere, puede"

-Adela Mejías S.

ÍNDICE

RESUMEN 8

ABSTRACT 9

INTRODUCCIÓN 10

Metales pesados y metaloides: implicancia en humanos y el medio ambiente 10

Arsénico 10

Cadmio 11

Cobre 12

Teluro 12

Biorremediación de metal(oid)es 13

Condiciones anaeróbicas y biorremediación de metales 15

Consorcios microbianos en biorremediación 16

Hipótesis 17

Objetivo general 18

Objetivos específicos 18

MATERIALES Y MÉTODOS 19

Condiciones de anaerobiosis 19

Concentración mínima inhibitoria (MIC) para metal(oid)es 19

Curvas de crecimiento 19

Condiciones de cultivo para ensayos de remoción 19

Cuantificación de Telurio 20

Cuantificación de Cobre 20

Cuantificación de Arsénico y Cadmio 21

Formulación del medio SV.3 21

Condiciones de cultivo en biorreactor 21

Ensayos de viabilidad 22

Análisis estadístico de los datos 22

RESULTADOS 23

Determinación de la resistencia bacteriana a metal(oid)es en aerobiosis y anaerobiosis y selección. 23
Formulación de un medio de cultivo y determinación de la resistencia a metal(oid)es en el medio formulado para las cepas anteriormente seleccionadas. 24
Estandarización de métodos colorimétricos para cuantificar metales 31
Cuantificación de la remoción de arsenito, telurito, cobre y cadmio usando bacterias independientes y/o mezcla. 34
Cuantificación de la remoción en escala de biorreactor considerando lo obtenido en 2.1. 40
DISCUSIÓN 42
Determinación de la resistencia a metal(oid)es en condiciones aeróbicas y anaeróbicas 42
Formulación del medio SV.3 44
Estandarización de métodos para la cuantificación de arsenito, cobre, telurito y cadmio. 46
Cuantificación de la remoción de $NaAsO_2$, K_2TeO_3, $CdCl_2$ y $CuSO_4$ por *Staphylococcus sciuri* y *Acinetobacter schindleri*. 48
Cuantificación de la remoción de $NaAsO_2$ y $KTeO_2$ por *Acinetobacter schindleri* en biorreactor. 52
CONCLUSIONES Y PROYECCIONES 54
ANEXOS 55
BIBLIOGRAFÍA 59

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Curva de crecimiento de las cepas 2 (PR1) y cepa 5 (RP4) utilizando el medio mínimo SV.1 ……. 22

Figura 2: Medio SV.1 frente a distintos metale(oid)es …… 24

Figura 3: Curva de crecimiento de las cepas 2 (PR1) y cepa 5 (RP4) utilizando el medio mínimo SV.2 …….. 24

Figura 4: Medio SV.2 frente a distintos metal(oid)es …….. 25

Figura 5: Curva de crecimiento de las cepas 2 (PR1) y cepa 5 (RP4) utilizando el medio mínimo SV.3 …….. 26

Figura 6: Medio SV.3 frente a distintos metal(oid)es ……. 27

Figura 7: Curva de calibración para cobre …… 29

Figura 8: Curva de calibración para telurito ……. 30

Figura 9: Curva de calibración para arsénico …… 31

Figura 10: Curva de calibración para cadmio …….. 31

Figura 11: Remoción de cobre …….. 34

Figura 12: Remoción de telurito ……... 35

Figura 13: Remoción de arsenito …….. 36

Figura 14: Remoción de cadmio ……... 37

Figura 15: Parámetros del cultivo de *A. schindleri* en biorreactor …… 39

Tabla 1: Características de las estrategias de biorremediación *ex situ*, *in situ* y por biorreactor .. 12

Tabla 2: Composición del medio SV.3 …….. 19

Tabla 3: Concentración mínima inhibitoria (MIC) de distintos aislados ambientales …….. 22

Tabla 4: Composición del medio SV.1 …….. 23

Tabla 5: Composición del medio SV.2 …….. 26

Tabla 6: Composición del medio SV.3 …….. 27

Tabla 7: Comparación de la composición de medio MOPS, M9, LB y SV.3 …… 28

Tabla 8: MIC de *A. schindleri* y *S. sciuri* en SV.3 y LB ……..... 28

Tabla 9: Datos de cuantificación de cadmio …….. 38

RESUMEN

El aumento en la contaminación del aire, suelos, aguas subterráneas y de regadío se ha convertido en un problema dado el impacto negativo que provoca en el ecosistema y que en el corto plazo podría afectar directamente la población humana. La mayoría de los contaminantes presentes en los ecosistemas acuáticos son compuestos orgánicos y/o metales pesados, una consecuencia de la actividad antropogénica no regulada. En esta línea, se ha desarrollado una amplia gama de alternativas tecnológicas entre las que destaca la biorremediación por sus características traducibles en bajos costos de operación y mantención respecto a métodos físicos y/o químicos.

Acorde con el creciente uso de microorganismos para remediar aguas contaminadas, el objetivo de esta Tesis fue analizar la remoción de metal(oides), específicamente telurito, arsenito, cadmio y cobre, por bacterias ambientales resistentes a estos compuestos en condiciones aeróbicas y anóxicas. La remoción se llevó a cabo utilizando medio mínimo SV.3, formulado específicamente para mantener la solubilidad de los metales a pH neutro. Los cultivos se llevaron a cabo en presencia o ausencia de oxígeno en ensayos de 24 h donde se cuantificó la concentración del tóxico al inicio y final del proceso.

En ambas condiciones de crecimiento, las bacterias removieron telurito > arsenito > cobre. No fue posible cuantificar la remoción de cadmio. Dado que promueve un mayor crecimiento bacteriano, la condición anaeróbica resultó más eficiente en la remoción de los tóxicos ensayados. Finalmente, este proceso de biorremediación permite recuperar el escaso metaloide teluro, de alto valor tecnológico. Además, se podría descontaminar arsenito, altamente tóxico y abundante en una variedad de ambientes que se encuentran en contacto con las poblaciones humanas.

ABSTRACT

The increasing contamination of air, soil and water has become a problem because they impact negatively different ecosystems that in the short term could affect directly human health. As consequence of a non-regulated anthropogenic activity, most contaminants present in aquatic ecosystems are organic compounds and/or heavy metals. In this line, a number of technological alternatives have emerged, including bioremediation, which exhibits rather low operation costs as compared to other chemical and physical methods.

In agreement with the increasing use of microorganisms to treat polluted water systems, the goal of this Thesis work was to assess removal of metal(loid)s, specifically tellurite, arsenite, cadmium and copper by toxicant-resistant environmental bacteria under aerobic and anaerobic conditions.

Removal was accomplished by using SV.3 minimal growth medium, specially designed to allow metal(loid) solubility at neutral pH values. Cultures were for 24 h in the presence or absence of oxygen and the toxicant´s concentration was assessed at the beginning and ending of the process.

In both conditions bacterial removal was tellurite > arsenite > copper. Cadmium removal could not be determined. Given it promotes a better bacterial growth, the anaerobic condition showed to be more efficient in toxicant removal.

Finally, while allowing the recovery of the scarce metalloid tellurium -which exhibits great technological value- this process, is also efficient to remove arsenic, a highly toxicant element that profuses in many places that are in contact with humans.

INTRODUCCIÓN

Metales pesados y metaloides: implicancia en humanos y el medio ambiente

Los metales pesados y metaloides, abreviados como metal(oid)es, son constituyentes naturales de la corteza terrestre, que ha visto alterado su equilibrio geoquímico por efecto de actividades humanas, conllevando la movilización de estas especies tóxicas y su acumulación en suelos, aguas e incluso organismos (bioacumulación) (Singh y Gautam, 2011)

Recientemente, entidades ecológicas y de salud han levantado la voz en relación a la contaminación por este tipo de tóxicos, dado el incremento de su uso en el área industrial, agrícola, tecnológico e incluso a nivel doméstico (Tchounwou y Yedjou, 2012).

Cabe destacar que muchos metales son utilizados en procesos biológicos, generalmente como elementos traza, actuando como cofactor de distintas enzimas o involucrados no enzimáticamente en reacciones redox a nivel celular (Tchounwou y Yedjou, 2012). Estos metales forman parte de la dieta regular y según la Organización Mundial de la Salud un desequilibrio de estos micro nutrientes podría favorecer el desarrollo de diversas enfermedades o síndromes (WHO, World Health Organization, 1996).

Por otra parte, se ha descrito que elevadas concentraciones de metales pesados, principalmente arsénico, cadmio, cromo, plomo y mercurio, debido a su alta toxicidad serían capaces de dañar organelos, componentes de la membrana celular, núcleo, ADN y enzimas asociadas al metabolismo, detoxificación y reparación de daños (Begg *et al*., 2015). Además, se han observado cambios en el ciclo celular (cáncer, apoptosis) y producción de especies reactivas de oxígeno (Hirner y Hendrik Emons, 2004; Waisberg *et al*., 2003)

Basados en la información disponible en el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), se logra identificar la presencia de contaminantes en suelos y aguas, haciendo enfoque en elementos tóxicos que han atraído el interés debido a su impacto tanto en el ecosistema como en la salud humana, como es el caso de arsénico, cadmio, cobre y teluro.

A continuación, se detallan algunas características de los elementos mencionados y que serán abordados en esta Tesis.

Arsénico: Se estima que millones de personas se encuentran expuestas de manera crónica a arsénico alrededor del mundo, especialmente países como Bangladesh, India, México, Uruguay, Taiwan y Chile, donde sus aguas poseen altas concentraciones de este metaloide (Tchounwou y

Yedjou, 2012). La exposición a arsénico puede ocurrir por vía oral, inhalación, contacto dérmico o por vía parenteral (Mandal, 2002). Las concentraciones de arsénico en el aire van desde 1 a 3 ng/m^3 en lugares remotos alejados de manipulación humana, y desde 20 a 100 ng/m^3 en ciudades. La concentración usual de arsénico en aguas es menor a 10 μg/L, niveles que pueden variar dependiendo de su cercanía a depósitos naturales de dicho metaloide. Por otro lado, la concentración en alimentos va desde 20 a 140 ng/kg, finalmente las concentraciones de arsénico en suelos varían desde 1 a 140 mg/kg. Estos valores pueden verse aumentados en suelos por el uso de pesticidas y/o aguas de desecho (Tchounwou y Yedjou, 2012). Particularmente en el caso de Chile, las concentraciones de arsénico cuantificadas en distintas localidades van desde 3 a 17 mg/kg, en Los Andes y El Trebal respectivamente (SAG, 2005).

En el ambiente, el arsénico se encuentra mayoritariamente como arseniato (AsO_4^{-3}), y en menor proporción en forma trivalente como arsenito (AsO_2^-), el cual es 60 veces más tóxico que arseniato (Neff, 1997). Se ha descrito el mecanismo de toxicidad de arsenito, en el cual este ingresa a la célula, a pH neutro, utilizando las aquaglucoproteínas presentes en bacterias, levaduras y mamíferos, residiendo su toxicidad en la habilidad de unirse a los grupos sulfhídrilos en los residuos de cisteínas de las proteínas, inactivándolas (Mukhopadhyay *et al*., 2002). Para resistir su toxicidad, las bacterias han desarrollado mecanismos de reducción de estas especies, las cuales incluyen la oxidación de arsenito por la enzima arsenito oxidasa (*asoA* y *asoB*), al participar como donador inicial en la cadena transportadora de electrones (Culotta y Scott, 2013; Satyapal y Rani, 2016).

Cadmio: Es un metal pesado que genera gran preocupación a nivel mundial debido a que es considerado altamente nefrotóxico (Jacobo-Estrada *et al*., 2016). Se encuentra ampliamente distribuido en la corteza terrestre a un promedio de ≈0,1 mg/kg, aunque el nivel más alto registrado corresponde a rocas sedimentarias y fosfatos marinos con un contenido de 15 mg/kg (GESAMP, Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution, 1987). La principal vía de exposición a este metal es la inhalación a través del humo del cigarrillo, ingestión de alimentos contaminados, industrias mineras y de fundición, manufactura de baterías, pigmentos, aleaciones y estabilizadores (Agarwal, 2009). En el caso de Chile, las concentraciones cuantificadas en distintas localidades van desde 0,7 a 6 mg/kg, correspondiente a Quillota y la VI región (SAG, 2005). Se ha descrito que el cadmio es introducido a la célula mediante transportadores de iones divalentes como Mn^{+2} (Begg *et al*., 2015), dentro de la célula muestra alta afinidad por grupos

tioles, principalmente glutatión (GSH), el cual se encuentra en altas concentraciones en las células. Como consecuencia de la eliminación de glutatión, se cataliza la generación de ROS conllevando un daño a nivel de proteínas, lípidos y ADN, implicando la destrucción de la célula. (Cuypers *et al*., 2010; Waisberg *et al*., 2003).

Cobre: En Chile, existe una alta concentración de este metal, observándose en varias localidades del país concentraciones que van desde los 50 a 3800 mg/kg de cobre (SAG, 2005). La ingesta prolongada de elevadas concentraciones de cobre en humanos, es capaz de producir desordenes gastro-intestinales, hemólisis, efectos hepato y nefrotóxicos (Shrivastava, 2009). A nivel ambiental, un aumento en las concentraciones de cobre impacta en la mayoría de los casos las aguas, lo que promueve la eliminación de invertebrados y algas, reduciendo de esta forma la biodiversidad y afectando las cadenas tróficas (Ramirez *et al*., 2005). En las células la especie predominante es Cu^{+}, el cual desestabiliza el cofactor hierro-sulfuro que está débilmente unido a deshidratasas del metabolismo primario. Adicionalmente se ven afectadas las enzimas 6-fofogluconato deshidratasa (Edd), fumarasa A (FumA) e isopropilmalato deshidratasa (LeuC) (Lemire *et al*., 2013). Por otra parte, Cu^{+} cataliza la formación de radicales libres produciendo alteraciones en lípidos y proteínas (Chillappagari *et al*., 2010; Volentini *et al*., 2011).

Teluro: El teluro es obtenido principalmente como subproducto en la minería y refinería de cobre, aunque se desconoce una función biológica para este metaloide, se ha descrito en hongos, a nivel experimental, el reemplazo de azufre por teluro en varios tipos de proteínas como teluro-cisteína, teluro-cistina, teluro-metionina y en algunos teluro-serina (Ramadan *et al*., 1989). La abundancia de teluro en la corteza terrestre es estimada entre 1-5 μg/kg, convirtiéndolo en el menos abundante de los elementos en la litósfera (Kabata-pendias, 2011). Independiente de su abundancia el teluro es considerado tóxico y teratogénico, la evidencia también describe efectos tóxicos en los niveles de yodo tiroidales, además se han visto efectos en el aprendizaje y memoria espacial en ratas (Widy-Tyszkiewicz *et al*., 2002). Entre los oxianiones de teluro, el telurito (TeO_3^{-2}) es más tóxico que el telurato (TeO_4^{-2}) a nivel bacteriano (Basnayake *et al*., 2001). Sin considerar la baja abundancia de este elemento, es posible encontrarlo en muestras de aire, suelo y aguas, aumentando su concentración en zonas colindantes a industrias mineras, principalmente de cobre (Belzile y Chen, 2015). Se ha observado que los oxianiones de teluro interactúan con los tioles celulares reducidos (RSH), siendo el glutatión (GSH) uno de los blancos más relevantes, lo que desencadena

la formación de ROS, provocando daño a proteínas, interferencia con la respiración celular y defensas antioxidantes (Turner *et al*., 2001; Wang *et al*., 2011)

Al observar la amplia distribución de los metales en el ambiente, las concentraciones en las que se encuentran y su capacidad de afectar los sistemas biológicos, se hace imperante tratar las áreas contaminados para mejorar la calidad de éstas. Para esto, es importante la utilización de sistemas con bajo impacto ambiental, como lo es el proceso de biorremediación.

Biorremediación de metal(oid)es

Por definición, biorremediación se extiende al uso de organismos vivos (microorganismos y plantas) y/o sus enzimas, para degradar contaminantes desde el medioambiente abarcando efluentes domésticos, agrícolas e industriales a formas menos tóxicas (Sharma, 2013). Por lo general, se utilizan especies nativas/endógenas del sitio contaminado o aislados resistentes para degradar y detoxificar substancias nocivas para el medioambiente y/o para la salud humana (Kensa, 2011).

La utilización de distintos organismos, se traduce en distintas características para el método de remoción. Entre ellos se encuentra la micorremediación, la que utiliza principalmente hongos, los cuales poseen mecanismos de reducción y/o destrucción de tóxicos por acción enzimática (Singh, 2006). La fitorremediación es un método que utiliza plantas para controlar y remover contaminantes desde suelos y aguas. Los principales mecanismos utilizados en esta estrategia incluyen absorción a nivel de raíces, acumulación en la biomasa, volatilización y/o destrucción del contaminante por el potencial metabólico de la planta (Ghosh y Singh, 2005). Es utilizado para tratar desechos orgánicos e inorgánicos, aguas servidas, lodos de procesos industriales, sales, metales, metaloides, compuestos lixiviados y xenobióticos (Eneh y Owo, 2008). Un tercer método incluye directamente bacterias, utilizado para tratar derrames de aceites, efluentes mineros e incluso desechos domésticos a través del aprovechamiento del metabolismo propio de estas bacterias (Kensa, 2011).

En relación a los métodos descritos, se utilizan distintas estrategias, dependiendo del grado de saturación y aireación del área afectada. En la Tabla 1, se comparan los beneficios, limitaciones de las técnicas, factores a considerar y ejemplos del uso de las estrategias *ex situ* e *in situ*, destacando la estrategia *ex situ* por biorreactor.

Tabla 1. Características de las estrategias de biorremediación *ex situ*, *in situ* y por biorreactor (Lemire *et al*., 2013)

Tecnología	Beneficios	Limitaciones	Factores a considerar	Ejemplos
In situ	·No invasivo ·Relativamente pasivo ·Proceso de degradación natural ·Tratamiento para aguas y suelos ·Mayor rentabilidad	·Coacción medioambiental ·Se extienden los tiempos de tratamiento ·Dificultades para monitorear	·Habilidades de biodegradabilidad de las especies nativas ·Parámetros ambientales ·Biodegradabilidad del/los contaminantes ·Solubilidad química ·Factores geológicos ·Distribución del/los contaminantes	·Bioaspersión ·Bioventilación ·Bioaumentación
Ex situ	·Rentable ·Bajo costo	·Requerimiento de espacios ·Tiempo de tratamiento extendido ·Se necesita control de pérdida abiótica ·Problemas de transferencia de masa ·Limitaciones de biodisponibilidad	·Involucra la excavación o remoción del suelo/agua contaminada ·Biodegradabilidad del/los contaminantes ·Solubilidad química ·Distribución del/los contaminantes	·Biopilas ·Compost ·Landfarming
Biorreactor	·Cinéticas de degradación rápidas ·Optimización de parámetros ambientales ·Aumenta la transferencia de masa ·Uso eficaz de los inoculos y surfactantes	·Se requiere transporte del material contaminado ·Alto costo de operación ·Se requiere un alto capital para financiamiento	·Bioaumentación ·Concentraciones tóxicas del/los contaminantes ·Toxicidad del proceso	· Biorreactores de lodos ·Biorreactores acuosos

Al destacar la modalidad en biorreactor, podemos encontrar varias ventajas asociadas a su uso, entre ellas: aumento de la transferencia de masa y contacto entre el microorganismo, los nutrientes y el contaminante; aumento de la velocidad de degradación/remoción del tóxico, comparado con metodologías *in situ*, consiguiendo acortar los tiempos de tratamiento; posibilidad de utilizar distintos aceptores finales de electrones (NO_3^-, SO_4^{-2}, O_2, CO_2); control y optimización de parámetros ambientales como el pH, la agitación y la temperatura; posibilidad de utilizar surfactantes o solventes para mejorar la disponibilidad del tóxico; y finalmente, la utilización eficaz de técnicas como bioaumentación y bioestimulación (Robles-González *et al*., 2008).

Esta modalidad, es ampliamente utilizada tanto en estudios como en procesos industriales, siendo descrita en la remoción de metales pesados (Fulekar, 2016; Serrano y Leiva, 2017), estudios de bioaumentación para desechos mineros (Llorens-Blanch *et al*., 2017), degradación de colorantes (Sandhya et al., 2005) e incluso la síntesis de nanopartículas (Brayner et al., 2007).

Condiciones anaeróbicas y biorremediación de metales

La biorremediación sólo es efectiva cuando las condiciones ambientales permiten un crecimiento y actividad óptimos del organismo utilizado (Balagurusamy, 2005). La mayoría de los procesos de biorremediación trabajan bajo condiciones aeróbicas, las que normalmente generan estrés oxidativo por la presencia o generación de especies reactivas de oxígeno (Lloyd, 2003; Lloyd y Lovley, 2001). Es por eso que, procesos de biorremediación anaeróbicos disminuyen el estrés oxidativo y permiten mejorar la degradación de tóxicos normalmente recalcitrantes en condiciones aeróbicas (Balapure *et al*., 2016; Sandhya *et al*., 2005).

Si bien la respiración anaeróbica es menos eficiente energéticamente, le permite a la bacteria crecer en ambientes con ausencia de oxígeno (Singh *et al*., 2009). En este sentido, las bacterias son capaces de utilizar distintos aceptores finales de electrones, dentro de los que se incluye: nitrato, sulfato, hierro (III), manganeso (IV), carbonato. Adicionalmente se ha observado la utilización de arsénico, cromo, selenio e incluso uranio (EPA, 2013).

Un proceso biológico de remoción anaeróbica de metal(oid)es, puede sustentarse a través de la utilización de estos como aceptores finales de electrones (Lloyd y Lovley, 2001), obteniéndose la inmovilización de estas especies por el cambio en el estado redox que esto implica. Por otro lado, la utilización de nitrato como aceptor final de electrones en ensayos anaeróbicos, es ampliamente utilizado ya que posee un potencial de redox (Eh) de 0,7 volts, muy cercano al valor del oxígeno 0,8 volts (Weber *et al*., 2006). Lo que claramente favorece el crecimiento del cultivo, permitiéndole remover las especies metálicas presentes en el medio.

Se han descrito diferentes mecanismos de resistencia bacteriana a metal(oid)es en anaerobiosis, los cuales son aprovechados para remover estas especies. Describiéndose entre otros, su utilización como aceptor final de electrones, reducción enzimática y no enzimática, bioacumulación y adsorción (Gupta y Joia, 2016). Además, entre otros mecanismos de resistencia se encuentra el *bypass* de vías metabólicas dañadas, bombas de expulsión o disminución en el flujo de entrada (Lemire *et al*., 2013).

Consorcios microbianos en biorremediación

Tomando en cuenta lo anterior y destacando el componente ambiental de estos procesos, es necesario considerar que la remoción de compuestos tóxicos ocurre naturalmente, por acción de microorganismos endógenos (Pérez-De-Mora *et al*., 2006). Estos, se encuentran en comunidades microbianas, misma modalidad presente en procesos de remoción (Bhakta *et al*., 2017; Hays *et al*., 2015; Jacques *et al*., 2008), emulando un sistema natural donde varias especies conviven. Debido a esto, se ha observado un creciente interés por el uso de consorcios/comunidades/mezclas microbianas en distintas áreas de la biotecnología, como lo son las problemáticas medioambientales y/o de salud humana. Si consideramos que un manejo adecuado de cepas individuales conduce a la obtención de altas productividades, del mismo modo a través del apropiado cultivo de las comunidades microbianas se busca aumentar aún más estos índices (de Roy *et al*., 2014). Las comunidades dominan el mundo microbiano, permitiendo a los organismos coexistir al interactuar entre sí. Esta interacción incluye respuestas táctiles, uso de señales específicas, transferencia horizontal de genes, escenarios competitivos o cooperativos donde los microorganismos compiten por recursos o los proveen. También pueden alterar el medioambiente influyendo en el crecimiento de organismos vecinos. Estas comunidades, que incluyen variadas especies microbianas, por definición, muestran un incremento en el rango de genes y capacidades metabólicas en comparación a monocultivos (Hays *et al*., 2015). Es común encontrar en comunidades, especies como, *Klebsiella* spp (Fulekar, 2016), *Pseudomonas* spp. (Kede *et al*., 2014; Malik, 2004), *Bacillus* sp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus cuagulans* (Kim *et al*., 2007; Nakajima *et al*., 2001; Robinson *et al*., 1990) y *Enterobacter cloacae* (Banerjee *et al*., 2015; Gupta y Joia, 2016; Malik, 2004). En este sentido, se ha observado que comunidades bacterianas despliegan mejores respuestas frente a distintos contaminantes, ya sean metales pesados (Fulekar, 2016), desechos oleaginosos (Mishra *et al*., 2001) o hidrocarburos y sus derivados (Jacques *et al*., 2008) en comparación a cepas independientes.

La robustez, habilidad para sobrevivir a una perturbación, es una propiedad en las comunidades microbianas y es necesaria para la supervivencia bajo los constantes cambios en el ambiente. En comparación a los monocultivos, las comunidades son capaces de resistir la invasión de otras especies al nicho, haciendo uso tanto de agentes físicos (biopelícula) y/o químicos (bacteriocinas) (Burmølle *et al*., 2006). Asimismo, son capaces de resistir eficazmente largos períodos de escases de nutrientes debido a sus diversos metabolismos, lo que conlleva a la posibilidad de generar

relaciones simbióticas, compartiendo metabolitos y/o nutrientes en el cultivo (LaPara *et al*., 2002). En el ámbito biotecnológico, los consorcios mantienen esas mismas ventajas, destacándose su capacidad de llevar a cabo más de una tarea, habilidad crucial al momento de biodegradar contaminantes, considerando en algunos casos la necesidad de múltiples enzimas para llevar a cabo este proceso (Song *et al*., 2014).

Considerando las características anteriormente mencionadas, en relación a las comunidades/consorcios, estas pueden ser extrapoladas a mezclas bacterianas. Esta denominación, se caracteriza por la mezcla de más de una especie bacteriana, dentro de la cual no se conoce la forma en la que interactuan dichas especies en cultivo (Song *et al*., 2014; Wintermute y Silver, 2010). Para efectos de esta Tesis, se postula el trabajo con la mezcla de bacterias, considerando una metodología *top-down* (Brenner *et al*., 2008; Song *et al*., 2014), en la cual se conocen las especies (previamente aísladas) y su resistencia a distintos metal(oid)es. Permitiendo mezclar aquellas con mejores características y así llevar a cabo la eficiente remoción de metales.

Basado en los antecedentes dispuestos, este proyecto de Tesis busca llevar a cabo un proceso de remoción en condiciones aeróbicas y anaeróbicas de metal(oid)es para revertir la creciente y preocupante contaminación de estas especies, utilizando cepas bacterianas resistentes a los metal(oid)es arsénico, cobre, cadmio y teluro. En este contexto la hipótesis de este proyecto de Tesis es:

Hipótesis

Bacterias resistentes a $NaAsO_2$, K_2TeO_3, $CdCl_2$ y $CuSO_4$ incrementan significativamente la remoción de metal(oid)es en condiciones anaeróbicas.

Objetivo general:

Determinar y comparar la capacidad de remoción de metal(oid)es (Cu^{2+}, Cd^{2+}, Te^{4+} y As^{3+}) por cepas bacterianas resistentes en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.

Objetivos específicos:

1.- Caracterizar la remoción de metal(oid)es por bacterias y/o mezcla en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.

1.1.- Caracterizar y seleccionar bacterias resistentes a metal(oid)es en aerobiosis y anaerobiosis.

1.2.- Formular un medio de cultivo para el proceso de remoción.

1.3.- Determinar la resistencia a metal(oid)es de las bacterias seleccionadas en el medio formulado.

1.4.- Estandarizar métodos colorimétricos para cuantificación de metales.

2.- Cuantificar el porcentaje de remoción de metal(oid)es por bacterias y/o mezcla en biorreactor en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.

2.1.- Cuantificación de la remoción de $NaAsO_2$, K_2TeO_3, $CdCl_2$ y $CuSO_4$ por *Staphylococcus sciuri* y *Acinetobacter schindleri*.

2.2.- Cuantificación de la remoción en escala de biorreactor considerando lo obtenido en 2.1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones de anaerobiosis

Se llevaron a cabo los cultivos anaeróbicos en una cámara Coy, conteniendo un 100% de N_2. Los medios de cultivo líquido y otras soluciones se introdujeron a la cámara 24 h previas a su uso permitiendo de esta forma equilibrarlos con la atmósfera anaeróbica, los medios sólidos se introdujeron 3-4 horas previas a su uso.

Concentración mínima inhibitoria (MIC) para metal(oid)es

Ensayo MIC modificado de (Wiegand *et al*., 2008). A partir de soluciones *stock* estériles de K_2TeO_3, $CdCl_2$, $NaAsO_2$ y Cu_2SO_4 se realizaron diluciones seriadas en concentraciones decrecientes (1:2) en 1 mL de medio LB o SV.3 en placas de cultivo de 48 pocillos. Se inoculó cada pocillo con 10 µl de cultivo de las distintas cepas crecidas en medio LB hasta un $DO_{600} \approx 0,6$ para LB y $DO_{600} \approx 0,25$ para SV.3, se incubó con agitación constante por 24 h a 37 ºC. Ensayo realizado en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.

Curvas de crecimiento

Cultivos de 1 mL crecidos durante toda la noche (ON) se diluyeron 1:100 en SV.3 fresco, se incubaron a 37 ºC con agitación constante hasta una $DO_{600} \approx 0,25$. Posteriormente, se agregó 10 µl de cultivo a 990 µL de medio SV.3 fresco. Se monitoreó el crecimiento a 600 nm cada 30 min durante 18 h en el multilector de placas TECAN Infinite M200 Pro. Las curvas se realizaron en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.

Condiciones de cultivo para ensayos de remoción

Se realizaron cultivos a 24 h con la siguiente metodología: se dejó un inóculo ON de 5 mL (denominado Inóculo I) por triplicado para cada cepa. Al día siguiente se traspasó el Inóculo I a un volumen final de 50 mL (denominado Inóculo II), éste es crecido hasta $DO_{600} \approx 0,25$ determinado como fase exponencial. Luego el Inóculo II se traspasó a un volumen final de 200 mL. Se adicionó previamente para los cultivos aeróbicos: 260 µg/mL de $CuSO_4$, 62,5 µg/mL de K_2TeO_3, 811 µg/mL de $NaAsO_2$ y 50 µg/mL de $CdCl_2$. Para las condiciones anaeróbicas se adicionó: 260 µg/mL de $CuSO_4$, 125 µg/mL de K_2TeO_3, 405,8 µg/mL de $NaAsO_2$ y 50 µg/mL de $CdCl_2$. Se recolectó una

alícuota del medio con el tóxico previo al inicio del cultivo para su posterior cuantificación. Dicho cultivo se mantiene en agitación constante durante 24 h a 37 ºC. Al final del cultivo se retira una alícuota del cultivo y se cuantifica el metal(oide) según la metodología correspondiente. Cada alícuota es centrifugada a 10000 rpm por 5 min con el fin de retirar las células en suspensión. El sobrenadante es filtrado con filtros de 0,2 μm. Este procedimiento es realizado a una muestra control, sin bacteria, con la misma concentración del metal(oide). Todos los ensayos son realizados condiciones aeróbicas y anaeróbicas.

Cuantificación de Telurio

Se utilizó el método descrito por (Molina *et al*., 2010). El método describe la cuantificación de telurio en medios de cultivo (LB o M9), el cual se lleva a cabo en 1 mL final como se describe a continuación: a 100 μL de una solución de K_2TeO_3 se adicionaron 35 μL de $NaBH_4$ 100 mM, se adicionaron 865 μL de ddH_2O para aforar a 1 mL. La reacción se calentó durante 10 min a 60 ºC, se enfria por 5 min a temperatura ambiente y se midió a 500 nm. Lográndose un límite inferior de detección de de 1μg/mL y superior de 200 μg/mL.

Cuantificación de Cobre

Se utilizó el método de detección por BCP (Batocuproina disulfonato) (Rapisarda *et al*., 1999; Volentini *et al*., 2011). Se utiliza batocuproína, compuesto quelante que genera un complejo coloreado marrón-dorado al interactuar con iones cuprosos (Cu^+), este complejo es medible espectrofotométricamente a 480 nm. El límite de detección de la técnica llega hasta los 5 μg/mL. La metodología original corresponde a Standard Methods for the Examination of Waters and Wastewaters (APHA/AWWA/WEF, 2012) la cual fue modificada para analizar volúmenes menores a 1 mL de muestra sin perder reproducibilidad, como se describe a continuación: a 100 μL de una muestra de $CuSO_4$, se adicionaron 20 μL de HCl 1:1, se homogenizo y se adicionaron en orden 100 μL de hidroxilamina clorhidrato 0,1% , 100 μL de citrato de sodio 30% y 100 μL de batocuproína disulfonato 10%. Finalmente se adicionaron 580 μL de ddH_2O libre de cobre para aforar a 1 mL, midiéndose a 480 nm posteriormente.

Cuantificación de Arsénico y Cadmio

Para la cuantificación de estas especies se utilizó un espectrómetro de absorción atómica (M5 Dual Atomizer AA Spectrometer, Thermo). Para arsénico se midió a 193,7 nm utilizando una llama de acetileno-óxido nitroso a un flujo entre 4,1-4,6 L/min y una lámpara de arsénico de 12 mA con un límite de detección de 0,4 mg/L (Hollow Cattode Lamp, Thermo). Para la cuantificación de cadmio se midió a 228,2 nm utilizando una llama de aire-acetileno a un flujo de 1-1,3 L/min y una lámpara de cadmio de 8 mA con un límite de detección de 0,013 mg/L (Hollow Cattode Lamp, Thermo).

Formulación del medio SV.3

Se formuló un medio mínimo suplementado basado en las características del medio M9 y un medio descrito para emular las características de aguas de desecho, es decir, compuesto por nutrientes similares a los encontrados en aguas contaminadas con metal(oid)es, incluyendo concentraciones de éstos (Yusof *et al*., 2010). A continuación, en la Tabla 2, se describe la composición del medio denominado SV.3:

Tabla 2. Composición del medio SV.3.

Nutriente	**Concentración**
$CaCl_2$	0,1 mM
$MgSO_4$	1 mM
Glucosa	0,2%
NH_4Cl	1 g/L
K_2HPO_4	0,5 g/L
NaCl	0,5 g/L
KNO_3	1g/L
Casamino ácidos	1 mM

Condiciones de cultivo en biorreactor

Todos los cultivos fueron realizados en condiciones aeróbicas en un biorreactor Winpact One System (FS-06 Series). Se realizaron cultivos a 24 h con la siguiente metodología: se cultiva un inóculo ON de 5 mL (Inóculo I) para cada cepa en SV.3. Al día siguiente se traspasa el Inóculo I a

un volumen final de 200 mL de SV.3 fresco (Inóculo II), éste es crecido hasta $DO_{600}\approx$ 0,25 determinado como fase exponencial. El Inóculo II se sumó a un volumen de 800 mL de SV.3, siendo el volumen final de trabajo del biorreactor 1000 mL. Previamente se agregó 62,5 μg/mL de K_2TeO_3 para el primer ensayo y 811 μg/mL de $NaAsO_2$ para el segundo ensayo. Recolectándose una alícuota para su posterior cuantificación. Dicho cultivo es mantenido con agitación constante de 140 rpm durante 25 h a 37 ºC, finalmente se retira una alícuota del cultivo y se cuantifica el metal(oide) según la metodología correspondiente. Cada alícuota para cuantificar es centrifugada a 10000 rpm por 5 min con el fin de retirar las células en suspensión, luego el sobrenadante es filtrado con filtros de 0,2 μm, el mismo procedimiento es realizado a una muestra control, sin bacteria, con la misma concentración del metal(oide).

Ensayos de viabilidad

Un inóculo de 1 mL se creció ON a 37 ºC con agitación constante. Luego 500 μL del cultivo inicial son transferidos a 5 mL de medio SV.3 fresco, éste se creció hasta $DO_{600}\approx$ 0,25 a 37 ºC con agitación constante. Este cultivo es llevado a un volumen final de 20 mL, adicionando para los cultivos aeróbicos: 260 μg/mL de $CuSO_4$, 62,5 μg/mL de K_2TeO_3, 811 μg/mL de $NaAsO_2$ y 50 μg/mL de $CdCl_2$. Para las condiciones anaeróbicas se adicionó: 260 μg/mL de $CuSO_4$, 125 μg/mL de K_2TeO_3, 405,8 μg/mL de $NaAsO_2$ y 50 μg/mL de $CdCl_2$. Se cultivó durante 24 h según condiciones mencionadas, al finalizar el cultivo una alícuota es sembrada en agar SV.3 y cultivada según condiciones establecidas, cuantificándose UFC transcurridas 24 h de crecimiento. El ensayo se realizó en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.

Análisis estadístico de los datos

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa GraphPadPrism 5.01 (GraphPad Software, Inc). El análisis de varianza (ANOVA) y t-test fue a un nivel de $p < 0,05$.

La significancia estadística fue indicada como: * para aquellos valores donde $p < 0,05$, ** para valores donde $p < 0,01$ y *** para valores donde $p < 0,001$, ns para valores que no son significativamente diferentes.

RESULTADOS

Determinación de la resistencia bacteriana a metal(oid)es en aerobiosis y anaerobiosis y selección.

Considerando aislados ambientales provenientes de distintas regiones de Chile: laguna Chaxa, laguna Céjar, géiser El Tatío, Valle de la muerte, Laguna del Maule y mina el Teniente. Además del salar de Uyuni (Bolivia) y Perú. Las cuales fueron pre-seleccionadas por su resistencia a distintos metales(oid)es y por crecer a 37 ºC, procediéndose a determinar la MIC (µg/mL) para 11 de estas, descritos en la Tabla 3. Se puede observar que en condiciones anaeróbicas muchas de estas resisten una mayor concentración que en condiciones aeróbicas, fenómeno ampliamente observado en el caso de telurito. Ahora bien, se seleccionan tres cepas (PR1, RP4 y RP) por describir resistencias superiores o iguales *E. coli* en la mayoría de los metal(oid)es para ambas condiciones y de manera uniforme descartando RP1 debido a dificultades en su cultivo, es decir, un lento crecimiento en tanto en medio líquido y agar LB, mismo comportamiento observado en el medio SV.3 posteriormente probado (Datos no mostrados). Del mismo modo, las cepas de *Exiguobacterium* se descartaron por tener una baja resistencia a telurito y cobre en condiciones aeróbicas. Igualmente, las cepas de *Enterobacter* no fueron seleccionadas por una baja resistencia a telurito en condiciones aeróbicas. Por lo tanto, se continúan los estudios únicamente con la Cepa 2 (*Staphylococcus sciuri*) y Cepa 5 (*Acinetobacter schindleri*), generando también la mezcla de ambas cepas (Mix 2+5). Adicionalmente, no se observó la inhibición del crecimiento de una cepa contra la otra en cultivos en medio sólido LB, al mismo tiempo se logró observar presencia y viabilidad de ambas en medio líquido LB (Datos no mostrados). Otro importante criterio de selección corresponde a la morfología de las colonias, donde la *Staphylococcus sciuri* describe una colonia redonda, globular, brillante y amarilla tanto en LB como en SV.3. Por otro lado, *Acinetobacter schindleri* describe una colonia con borde irregular, plana, de color blanco en LB y transparente en SV.3 (Datos no mostrados). Finalmente, al ser teñidas con tinción gram *S. sciuri* correspondería a una gram (+) y *A. schindleri* a una gram (-), lo que facilita su reconocimiento posterior.

Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria (MIC) de distintos aislados ambientales

Metal(oid)es (µg/mL)			Te (IV)		As (III)		Cd (II)		Cu (II)	
Nº	**Cepa**	**Bacteria**	$+O_2$	$-O_2$	$+O_2$	$-O_2$	$+O_2$	$-O_2$	$+O_2$	$-O_2$
1	MS6	*Enterobacter cloacae*	2	1000	406	3247	400	200	2083	1042
2	PR1	*Staphylococcus sciuri*	1000	1000	3246	3246	200	200	1042	1042
3	MS3_a	*Exiguobacterium acetylicum*	62,5	500	1786	1623	200	400	1042	1042
4	MS4_2a	*Enterobacter cloacae*	0,25	250	6493	1623	200	200	1042	1042
5	RP4	*Acinetobacter schindleri*	250	500	6493	1623	200	200	1042	1042
6	MN13	*Exiguobacterium aurantiacum.*	62,5	250	6493	6493	200	100	260	1042
7	MN5_b	*Staphylococcus warneri*	125	500	1623	1623	200	50	625	520
8	MS9_c	*Exiguobacterium profundum*	125	1000	6493	1623	200	100	520	1042
9	RP1	*Acinetobacter schindleri*	250	500	6493	6493	200	200	520	1300
10	Te2	*Staphylococcus warneri*	250	500	1623	ND	100	200	1042	520
11	BNF-1	*Staphylococcus haemolyticus*	225	500	1623	1623	128	12,5	1042	1042
	BW25113	*Escherichia coli*	1	125	1623	12987	200	200	1000	1042

Formulación de un medio de cultivo y determinación de la resistencia a metal(oid)es en el medio formulado para las cepas anteriormente seleccionadas.

Debido a que la mezcla entre el medio de cultivo LB y los metales(oid)es no permitía la completa solubilidad de todas las especies, se procedió a formular un nuevo medio de cultivo en base al medio mínimo M9 como se describe en la metodología. Como se ve en la Tabla 7, este medio posee dos fuentes de fosfato, de estas se eliminó la más abundante ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) y se redujo la segunda fuente en un 96,7%. En cuanto a NH_4Cl y NaCl, estos se redujeron en un 80%. Por otro lado, las concentraciones de $MgSO_4$ y $CaCl_2$ no fueron modificadas. A este primer medio se le denominó SV.1, su contenido es descrito en la Tabla 4. Con estas reformas se analizó el crecimiento de las cepas seleccionadas y la solubilidad los metal(oid)es utilizados. Como se puede ver en la Figura 1, tanto *S. sciuri*, *A. schindleri* y *E. coli* lograron llegar a fase estacionaria luego de 12 horas de cultivo, describiendo una $DO_{600} \approx 0{,}15$ como máximo. Se realizó un cultivo en condiciones anaeróbicas y no se observó crecimiento luego de 24 h de cultivo (Datos no mostrados). Como se observa en la Figura 2, cada metal independiente lograba mantenerse soluble pero no así la mezcla, produciéndose un precipitado verde azulado. Debido al lento crecimiento obtenido y la

precipitación de la mezcla, se busca adicionar nutrientes al medio para mejorar el crecimiento y la solubilidad de la mezcla.

Tabla 4. Composición del medio SV.1.

SV.1	$CaCl_2$	$MgSO_4$	Glucosa	NH_4Cl	K_2HPO_4	NaCl
Concentración	0,1 mM	1 mM	0,2%	1 g/L	0,5 g/L	0,5 g/L

En este sentido, al medio SV.1 se le adicionó nitrato de potasio (KNO_3), medio denominado SV.2; su contenido es descrito en la Tabla 5. Como se puede observar en la Figura 3, las tres cepas analizadas presentan una fase exponencial alargada que se extiende más allá de las 20 horas de crecimiento, describiendo una $DO_{600} \approx 0,2$ como máximo. Se realizó un cultivo en condiciones anaeróbicas utilizando esta versión y no se observó crecimiento luego de 24 h de cultivo (Datos no mostrados). Respecto a los metales, al igual que con el medio SV.1, se puede observar que cada metal independiente mantiene su solubilidad (Figura 4 A), pero la mezcla de metal(oid)es genera el precipitado verde azulado (Figura 4 B).

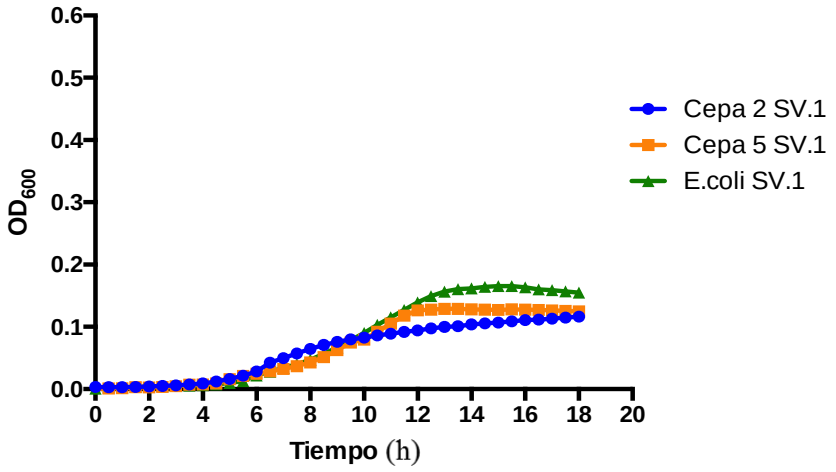


Figura 1. Curva de crecimiento de las cepas 2 (PR1) y cepa 5 (RP4) utilizando el medio mínimo SV.1. La curva se realizó durante 18 h, a 37 ºC con agitación constante. Se utiliza como comparación *E. coli*. Cada punto corresponde al promedio de tres ensayos independientes graficados con su respectiva desviación estándar.

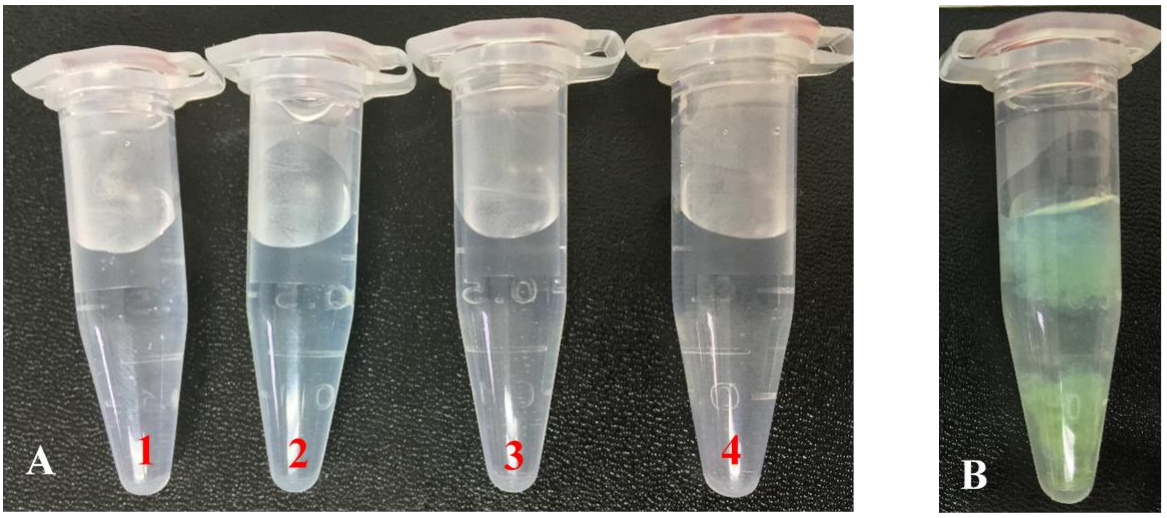


Figura 2. Medio SV.1 frente a distintos metale(oid)es A. 1) Medio SV.1 con 3666,4 µg/mL de $CdCl_2$ **2)** Medio SV.1 con 3990,25 µg/mL de $CuSO_4$ **3)** Medio SV.1 con 4000 µg/mL de K_2TeO_3 **4)** Medio SV.1 con 12991 µg/mL de $NaAsO_2$. **B.** Mezcla de los distintos metales(oid)es mencionados en medio SV.1, según las siguientes concentraciones: 1041 µg/mL $CuSO_4$, 200 µg/mL de $CdCl_2$, 250 µg/mL de K_2TeO_3 y 3246 µg/mL de $NaAsO_2$.

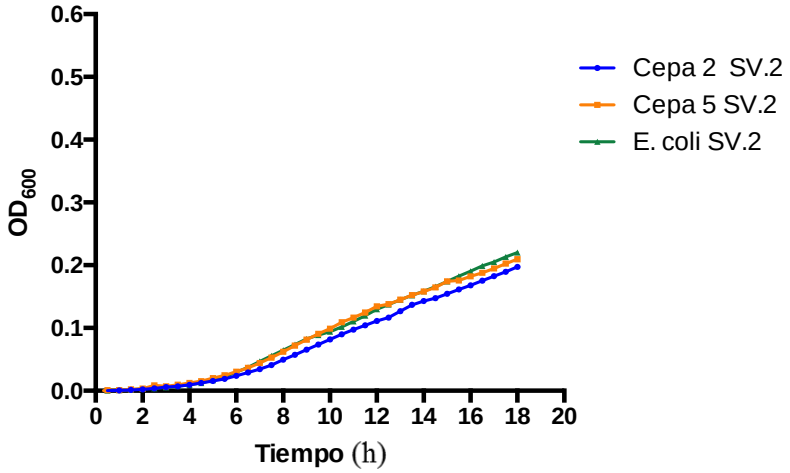


Figura 3. Curva de crecimiento de las cepas 2 (PR1) y cepa 5 (RP4) utilizando el medio mínimo SV.2. La curva se realizó durante 18 horas, a 37 ºC con agitación constante. Se utiliza como comparación *E. coli*. Cada punto corresponde al promedio de tres ensayos independientes graficados con su respectiva desviación estándar.

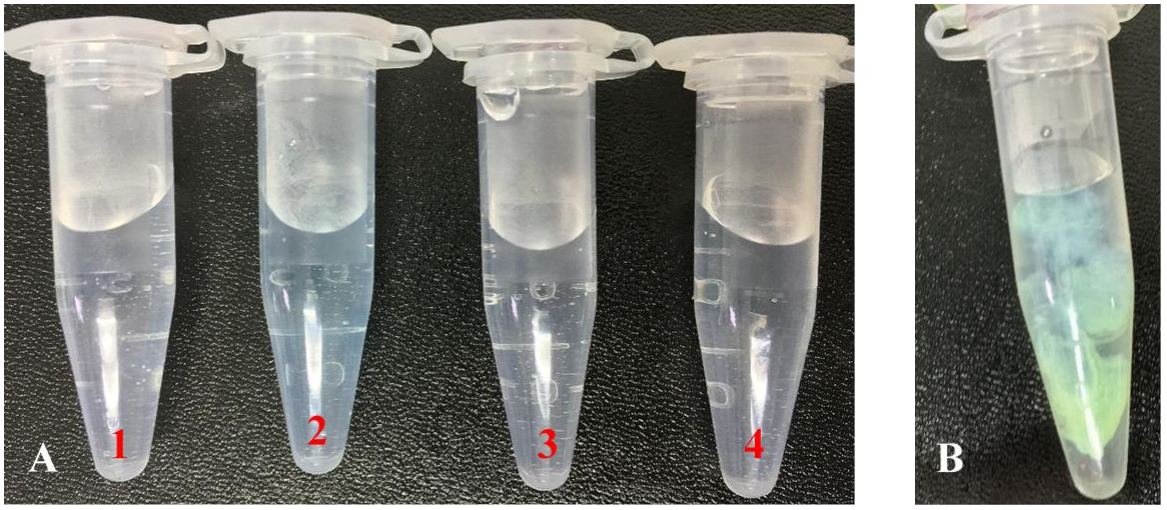


Figura 4. Medio SV.2 frente a distintos metal(oid)es. **A. 1)** Medio SV.2 con 3666,4 µg/mL de $CdCl_2$ **2)** Medio SV.2 con 3990,25 µg/mL de $CuSO_4$ **3)** Medio SV.2 con 4000 µg/mL de K_2TeO_3 **4)** Medio SV.2 con 12991 µg/mL de $NaAsO_2$. **B.** Mezcla de los distintos metales(oid)es mencionados en medio SV.2, según las siguientes concentraciones: 1041 µg/mL $CuSO_4$, 200 µg/mL de $CdCl_2$, 250 µg/mL de K_2TeO_3 y 3246 µg/mL de $NaAsO_2$.

Considerando el crecimiento de las cepas en el medio SV.2, se hizo una modificación suplementando el medio con casamino ácidos, esta versión es denominada SV.3 y su contenido es detallado en la Tabla 6. Por lo tanto, como se puede observar en la Figura 5 A, el crecimiento aeróbico de las tres cepas analizadas mejora respecto de las versiones anteriores de SV, a excepción de *S. sciuri* que mantiene una fase exponencial alargada, pero con un DO_{600} mucho mayor a los ensayos anteriores. Se puede concluir, que la adición de casamino ácidos mejora el crecimiento, lo cual sólo aplica a *A. schindleri* y *E. coli*, mientras que *S. sciuri* disminuye su tasa de crecimiento respecto a SV.1 y SV.2 en condiciones aeróbicas (Anexo 1). Además, se observa en la curva de crecimiento anaeróbica (Figura 5 B) para las tres cepas donde *S. sciuri* muestra una fase de latencia más larga, pero con un peack de crecimiento que la sitúa en un mayor DO_{600} respecto a las otras cepas. *A. schindleri* por otro lado llega rápidamente a la fase estacionaria e incluso luego de las 12 horas de cultivo se puede observar un leve decaimiento en el crecimiento. Adicionalmente, se observa una mejora sustancial en la tasa de crecimiento de las tres cepas en condiciones anaeróbicas (Anexo 1). Independiente de la cepa 2 en condiciones aeróbicas, se aceptó este medio como el definitivo para ser usado en los siguientes experimentos. Del mismo modo que con los otros

medios, se analizó el comportamiento del medio versus concentraciones correspondientes al MIC visto en LB (Figura 6 A) y la mezcla de metales (Figura 6 B).

Tabla 5. Composición del medio SV.2

SV.2	$CaCl_2$	$MgSO_4$	Glucosa	NH_4Cl	K_2HPO_4	NaCl	KNO_3
Concentración	0,1 mM	1 mM	0,2%	1 g/L	0,5 g/L	0,5 g/L	1 g/L

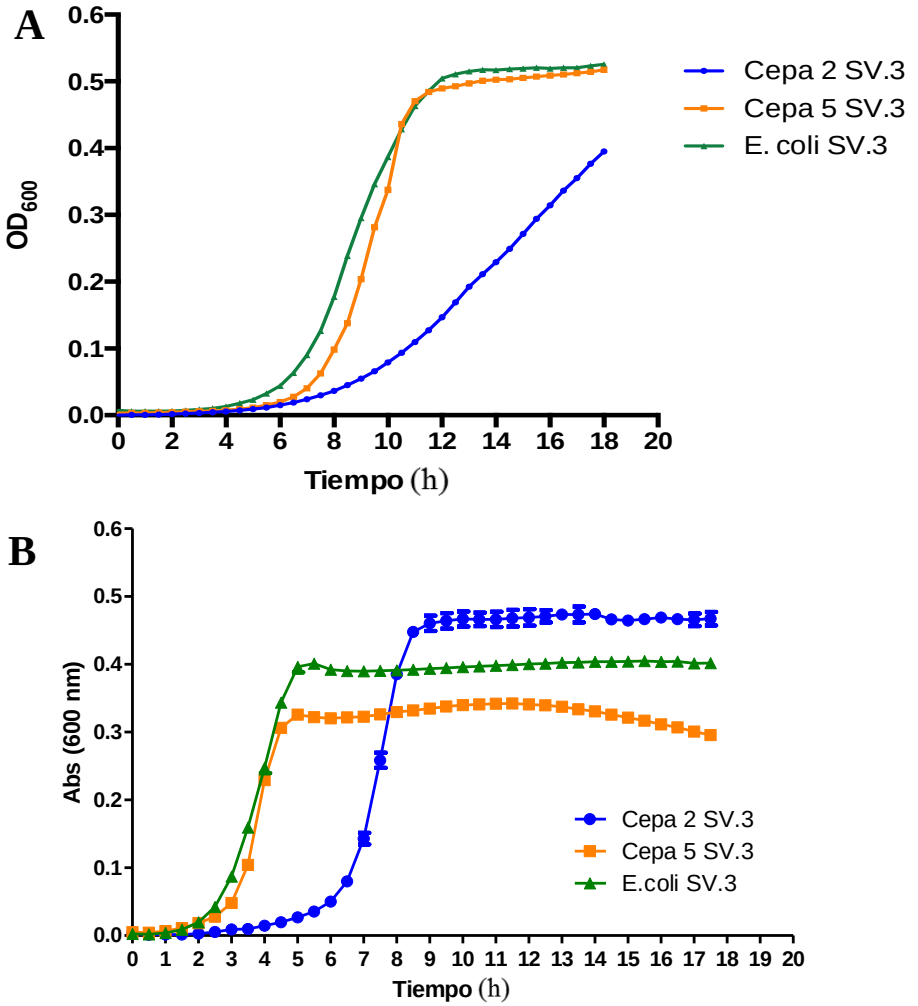


Figura 5. Curva de crecimiento de las cepas 2 (PR1) y cepa 5 (RP4) utilizando el medio mínimo SV.3. La curva se realizó durante 18 horas, a 37 ºC con agitación constante. Se utiliza como comparación *E. coli*. **A**. Curva de crecimiento aeróbica. **B**. Curva de crecimiento anaeróbica. Cada punto corresponde al promedio de tres ensayos independientes graficados con su respectiva desviación estándar.

Tabla 6. Composición del medio SV.3

SV.3	$CaCl_2$	$MgSO_4$	Glucosa	NH_4Cl	K_2HPO_4	NaCl	KNO_3	Casamino ácidos
Concentración	0,1 mM	1 mM	0,2%	1 g/L	0,5 g/L	0,5 g/L	1 g/L	1 mM

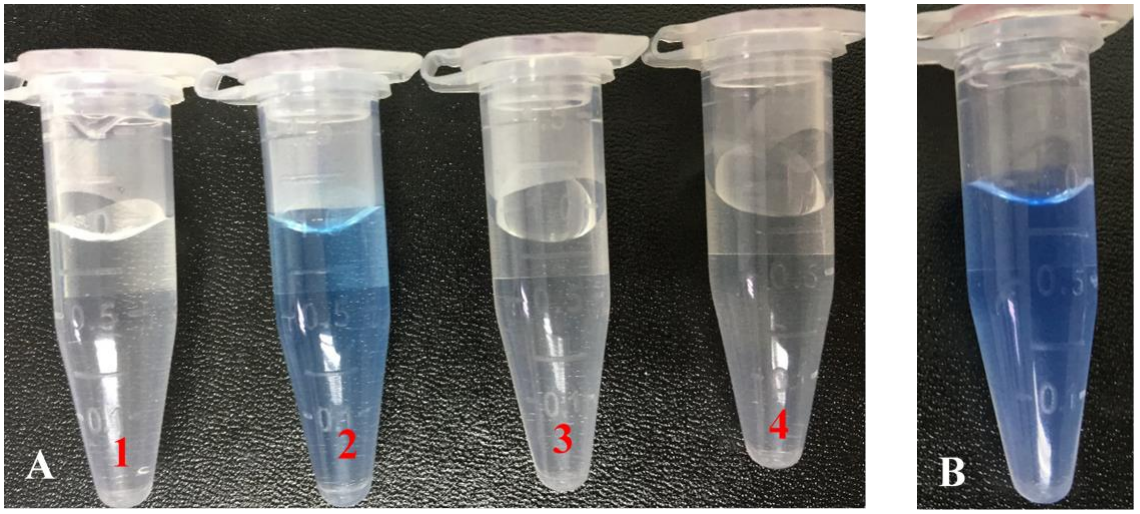


Figura 6. Medio SV.3 frente a distintos metal(oid)es A. 1) Medio SV.3 con 200 µg/mL de $CdCl_2$ **2)** Medio SV.3 con 1041 µg/mL de $CuSO_4$ **3)** Medio SV.3 con 250 µg/mL de K_2TeO_3 **4)** Medio SV.3 con 3246 µg/mL de $NaAsO_2$. **B.** Mezcla de los distintos metales(oid)es mencionados en medio SV.1, según las siguientes concentraciones: 1041 µg/mL $CuSO_4$, 200 µg/mL de $CdCl_2$, 250 µg/mL de K_2TeO_3 y 3246 µg/mL de $NaAsO_2$.

Como se observa en la Figura 6, el medio SV.3 es capaz de mantener solubles los metales en concentraciones iguales a la MIC de cada uno. Se observó, que el cadmio precipitaba a medida que aumentaba la concentración de éste, por lo que para los estudios posteriores se trabajó con valores no superiores a la MIC del mencionado metal. La Figura 6 B exhibe una estable relación entre los cuatro metal(oid)es, interacción inviable tanto en LB como en las versiones anteriores del medio SV.3.

En la Tabla 7, modificada (Neidhardt *et al*., 1974), se comparan los distintos medios de cultivo probados previo a la formulación del medio SV.3, esto con el fin de señalar las notables diferencias entre cada uno, especialmente las concentraciones de fosfatos del M9 y NaCl del LB (Sambrook, J., E. F. Fritsch, 1989).

Con el medio de cultivo definido, se procede a determinar nuevamente las concentraciones mínimas inhibitorias (µg/mL) para cada metal(oid)e tanto en condiciones aeróbicas como

anaeróbicas (Tabla 8). Se observa que en SV.3 disminuye la MIC para K_2TeO_3, $NaAsO_2$ y $CuSO_4$, siendo cadmio el único metal que mantiene su MIC para ambas condiciones, tanto en LB como en SV.3.

Tabla 7. Comparación de la composición de medio MOPS, M9, LB y SV.3

	Concentración en el medio (mM)			
Componente	M9	MOPS	LB	SV.3
Na_2HPO_4-$7H_2O$	238	-	-	-
KH_2PO_4	110,2	-	-	3,64
K_2HPO_4	-	1,32	-	-
NH_4Cl	91,75	9,52	-	18,69
KNO_3	-	-	-	9,89
$MgSO_4$	1	-	-	1
$MgCl_2$	-	0,523	-	-
K_2SO_4	-	0,276	-	-
$FeSO_4$	-	0,01	-	-
$CaCl_2$	0,1	0,0005	-	0,1
NaCl	42,8	50	171,2	8,56
MOPS	-	40	-	-
Tricina	-	4	-	-
Casamino ácidos		-		*
Triptona	-	-	*	-
Extracto de levadura	-	-	*	-
Micronutrientes	-	**		-

*Casamino ácidos 1 %, Triptona 10 g/L, Extracto de levadura 5%

**$(NH4)_6(MO_7)_{24}$ $3x10^{-6}$ mM; H_3BO_3 $4x10^{-4}$ mM; $CoCl_2$ $3x10^{-6}$ mM; $CuSO_4$ 10^{-5} mM; $MnCl_2$ $8x10^{-5}$ mM; $ZnSO_4$ 10^{-5} mM.

Tabla 8. MIC de *A. schindleri* y *S. sciuri* en SV.3 y LB.

Metal(oid)es (µg/mL)	Te (IV)		As (III)		Cd (II)		Cu (II)		
Condición experimental	$+O_2$	$-O_2$	$+O_2$	$-O_2$	$+O_2$	$-O_2$	$+O_2$	$-O_2$	
Staphylococcus sciuri (Cepa 2)	500	500	811	811	200	200	520	520	SV.3
Acinetobacter schindleri (Cepa 5)	250	500	1624	811	200	200	520	520	
Mix 2-5	500	500	811	1624	200	200	520	520	
E. coli BW25113	1	125	405	1624	200	200	520	520	
Staphylococcus sciuri (Cepa 2)	1000	1000	3246	3247	200	200	1042	1042	LB
Acinetobacter schindleri (Cepa 5)	250	500	6493	1624	200	200	1042	1042	
Mix 2+5	1000	500	1624	1624	200	200	1042	1042	
E. coli BW25113	1	125	1624	12987	200	200	1042	1042	

Estandarización de métodos colorimétricos para cuantificar metales

Para poder llevar a cabo la cuantificación de los metal(oid)es en los cultivos, luego de realizar el proceso de remoción de estos independientemente, se trató de estandarizar cuatro técnicas colorimétricas, sin embargo solo se logró implementar para dos de estos tóxicos.

Para el caso de cobre, este se cuantificó a través de la técnica de batocuproína disulfonato. En la Figura 7 se observa la curva de calibración que permite un rango lineal entre 5-25 µg/mL.

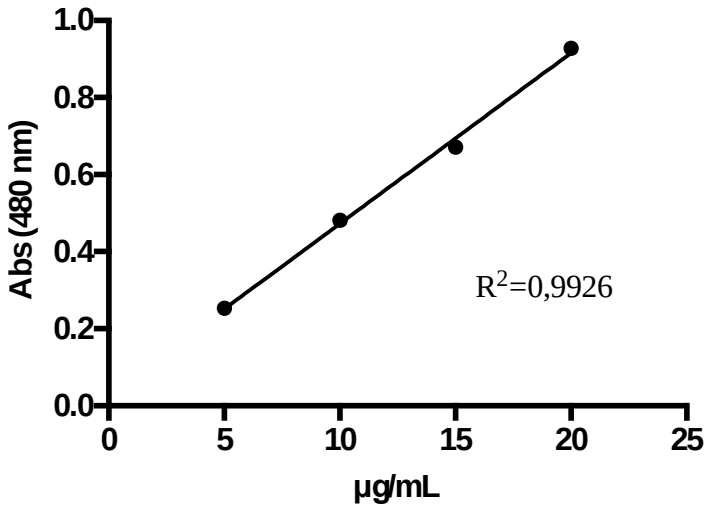


Figura 7. **Curva de calibración para cobre.** Curva de calibración para la técnica de cuantificación de cobre por batocuproína disulfonato, realizada en medio SV.3. Las desviaciones estándar corresponden al triplicado. R^2=0,9926.

El segundo método que se logró estandarizar con éxito, fue el de reducción de telurito por borohidruro de sodio, como se describe en la metodología. En la Figura 8, se observa la curva de calibración que permite un rango lineal entre 1-10 µg/mL, habiéndose observado que el rango puede extenderse hasta aproximadamente 200 µg/mL, aunque no es recomendable debido a que la técnica pierde linealidad a altas concentraciones.

Para la cuantificación de arsénico se pretendió estandarizar un método basado en la bromación de rojo de metilo (Pandurangappa y Kumar, 2012), dicho método permitiría detectar concentraciones en un rango lineal de 0,05-0,025 µg/mL. No fue posible su estandarización, por lo que las cuantificaciones de arsénico fueron llevadas a cabo mediante espectrometría de absorción atómica, como describe la metodología. En la Figura 3 se muestra la curva de calibración utilizada para esta técnica.

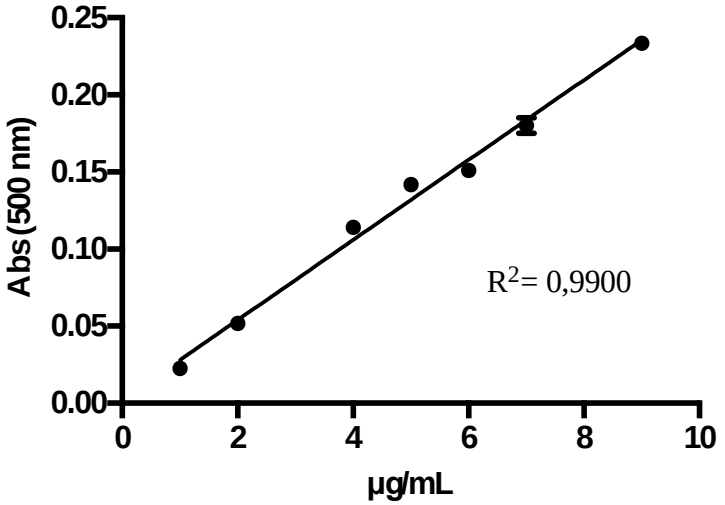


Figura 8. Curva de calibración para telurito. Curva de calibración para la técnica de cuantificación de telurito por reducción con borohidruro de sodio, realizada en medio SV.3. Las desviaciones estándar corresponden al triplicado. R^2=0,9900.

Para la determinación de cadmio se propuso el método de ditizona (Jankiewicz *et al*., 2000), que permitiría la detección de cadmio en un rango lineal entre 1-6 µg/mL. No fue posible su estandarización, por lo que las cuantificaciones de cadmio fueron llevadas a cabo mediante espectrometría de absorción atómica, como describe la metodología. En la Figura 9 se muestra la curva de calibración utilizada para esta técnica.

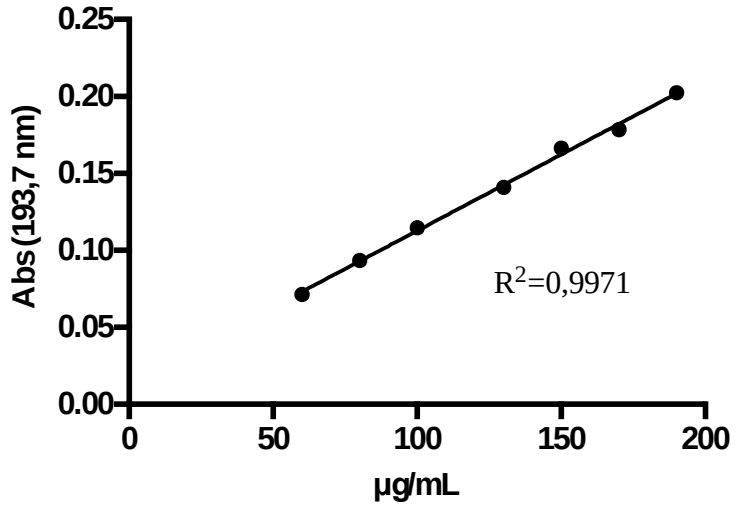


Figura 9. Curva de calibración para arsénico. Curva de calibración para la técnica de cuantificación de arsénico por espectrometría de absorción atómica, realizada en medio SV.3. Las desviaciones estándar corresponden al triplicado. R^2=0,9971.

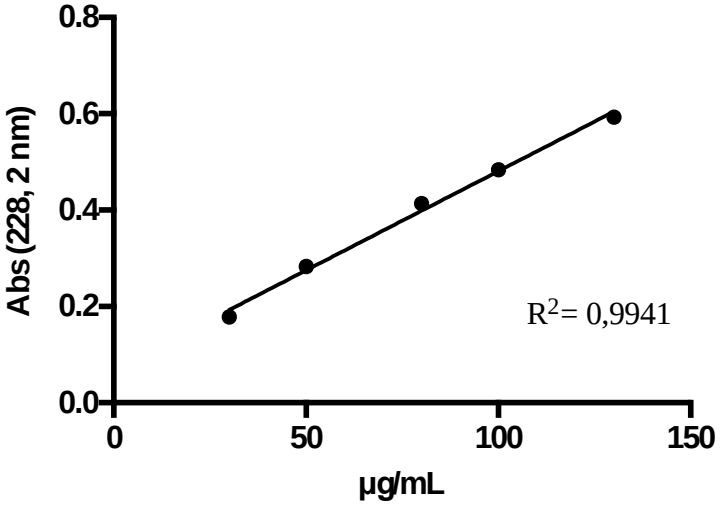


Figura 10. Curva de calibración para cadmio. Curva de calibración para la técnica de cuantificación de cadmio por espectrometría de absorción atómica, realizada en medio SV.3. Las desviaciones estándar corresponden al triplicado. R^2=0,9941.

Cuantificación de la remoción de arsenito, telurito, cobre y cadmio usando bacterias independientes y/o mezcla.

Para la remoción de cobre (Figura 11 A), el medio fue suplementado con 260 μg/mL de $CuSO_4$, concentración que corresponde a la mitad de la MIC en el medio SV.3. Este valor se seleccionó ya que se observó que la cepa no crecía en valores cercanos a la MIC, 10-20% menos (Datos no mostrados), por lo que para asegurar el crecimiento de la cepa se utiliza la concentración mencionada. En este sentido, se observa que *S. sciuri* (Cepa 2) logra una remoción no superior al 20% tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Para *A. schindleri* (Cepa 5), no se observa una variación significativa en las concentraciones de cobre, comparado con el control y tampoco entre condiciones experimentales. Para la mezcla de ambas cepas (Mix 2+5) se observa que aeróbicamente no hay cambios significativos en la remoción, pero sí en condiciones anaeróbicas. Asimismo, se observó que no hay una diferencia significativa en el crecimiento de las cepas independientes, por lo que no puede asociarse el crecimiento a un efecto de remoción (Figura 11 B). Para la mezcla se observa una predominancia de *A. schindleri* en condiciones aeróbicas (Figura 11 C), proporción que cambia en condiciones anaeróbicas, observándose la presencia de *S. sciuri* (Figura 11 D).

Para la remoción de telurito (Figura 12 A), el medio fue suplementado con 62,5 μg/mL de K_2TeO_3 para los ensayos aeróbicos, concentración que corresponde a ¼ de la MIC de *A.schindleri* y 125 μg/mL de K_2TeO_3 para los ensayos anaeróbicos, concentración que corresponde al ¼ de la MIC, tanto de las cepas independientes como de la mezcla. Esto considerando la alta toxicidad ejercida por el oxianión, de esta forma se asegura el crecimiento de ambas cepas y a mezcla. Por lo que, para los ensayos, se observa que *S. sciuri* logró un 20% de remoción en condiciones aeróbicas y hasta un 60% en condiciones anaeróbicas. Por otro lado, *A. schindleri* logró un 50% de remoción aeróbicamente y en condiciones anaeróbicas, aproximadamente un 70%. En la mezcla de ambas cepas, la remoción aeróbica alcanzó escasamente un 30%, a diferencia de la condición anaeróbica, donde llegó incluso al 80% de remoción del metaloide en el medio. Si observamos el crecimiento de los cultivos, se indica un mayor crecimiento en condiciones anaeróbicas para los cultivos independientes (Figura 12 B). En el caso de la mezcla, para condiciones aeróbicas es marcada la predominancia de *A. schindleri*, mientras que anaeróbicamente *S. sciuri* comparte el cultivo, en menor proporción (Figura 12 C y D).

La Figura 13 A muestra la remoción de arsenito, donde se suplementó el medio con 811 μg/mL de $NaAsO_2$ para condiciones aeróbicas, concentración igual a la MIC de *S. sciuri* y la mitad de *A. schindleri*. Se utiliza este valor, ya que se observa un crecimiento sin mayores inconvenientes en *S. sciuri* (Datos no mostrados) por lo que se pretende utilizar la mayor concentración posible y para *A. schindleri* se observa que a esta concentración es la mitad de la MIC por lo que su crecimiento tampoco se ve afectado. Para los ensayos anaeróbicos, se suplementa el medio con 405,8 μg/mL de $NaAsO_2$. Se observa que al utilizar el valor igual a la MIC o cercanos a este, 10-20% menos, los cultivos crecen más lento (Datos no mostrados). Por lo que se utiliza la mitad de la MIC para cepas independientes y para la mezcla este valor corresponde a ¼ la MIC.

En los ensayos, se observa que *S. sciuri* logró un 20% de remoción en ambas condiciones ambientales, mientras que *A. schindleri* logró un 30% en ambas condiciones. Siendo no significativas las diferencias en ausencia o presencia de oxígeno. Por otro lado, la remoción llevada a cabo por la mezcla, muestra que en condiciones aeróbicas se logró un 20% y en condiciones anaeróbicas un 30%. Según la Figura 13 B, hay una diferencia significativa en el crecimiento de *A. schindleri* en condiciones anaeróbicas. Para *S. sciuri* no hay diferencias significativas según las condiciones experimentales. En ambas cepas, no se puede asociar el crecimiento a un efecto de remoción. Como se observa, en el uso de la mezcla (2+5) para la remoción de arsenito, la remoción aeróbica fue similar a la remoción asociada a *S. sciuri* (Cepa 2), lo que se apoya en la Figura 13 C, donde se ve una prevalencia de esta cepa en el cultivo. Por otro lado, la remoción anaeróbica mostró un comportamiento más acorde al de *A. schindleri*, aunque en el análisis de la Figura 13 D esta cepa corresponde al 50% del cultivo.

En el caso de la remoción de cadmio, el medio fue suplementado con 50 μg/mL de $CdCl_2$ tanto para condiciones aeróbicas como anaeróbicas, esta concentración corresponde a ¼ de la MIC para ambas condiciones experimentales, ya que, al tratar las cepas con valores iguales o menores a la MIC, 10-20% menos, estas no crecían (Datos no mostrados). Por lo que se utiliza ¼ de la MIC para asegurar el crecimiento de las cepas y la mezcla.

En los ensayos de remoción (Figura 14 A), los datos son no concluyentes por lo que la remoción de este metal no se puede determinar. En los ensayos de crecimiento (B, C y D) se observa un crecimiento homogéneo, sin diferencias significativas entre condiciones experimentales.

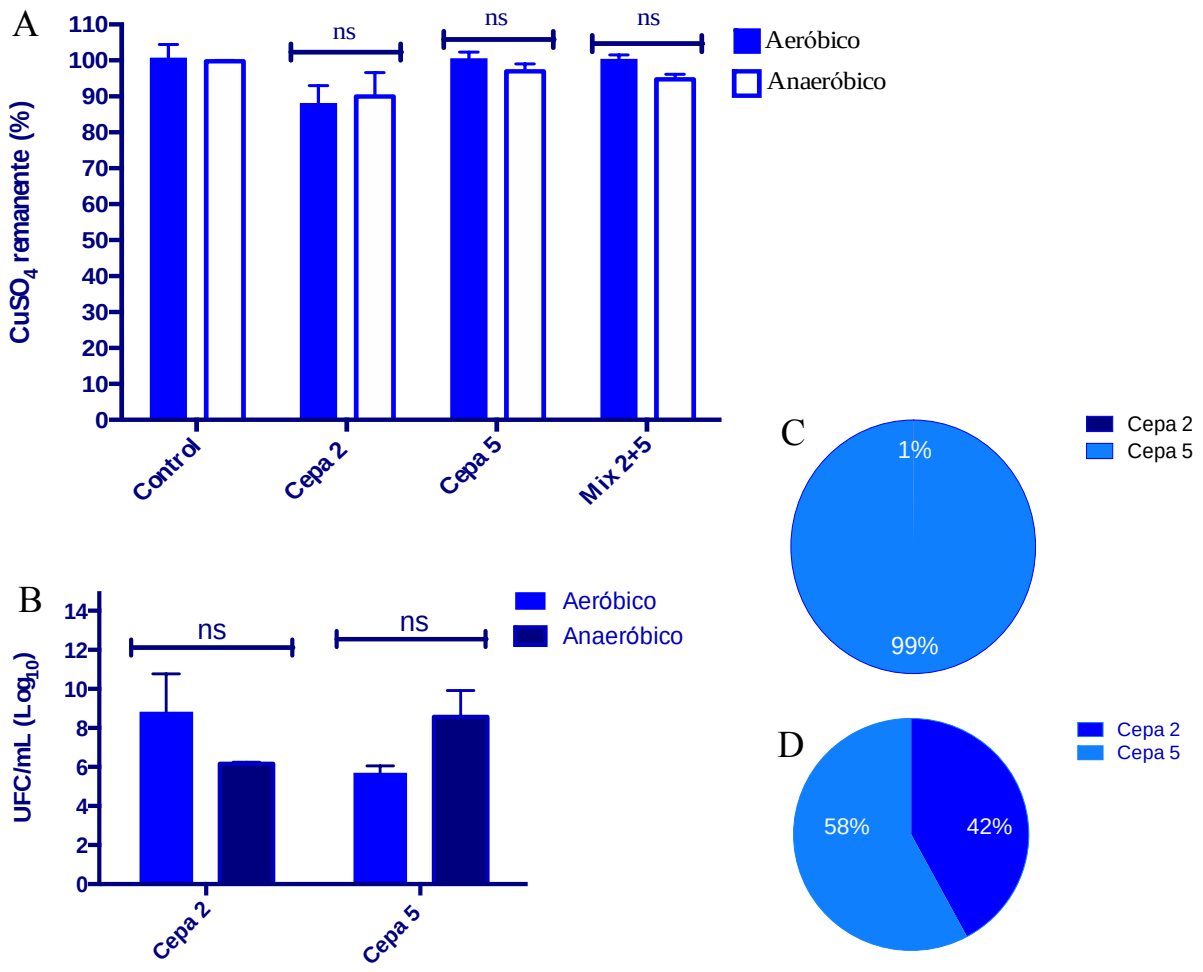


Figura 11. Remoción de cobre. Cultivos de *Staphylococcus sciuri* (Cepa 2) y *Acinetobacter schindleri* (Cepa 5) con 260 µg/mL de $CuSO_4$ en medio SV.3 a 37 ºC durante 24 h, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. A) Porcentaje remanente de cobre en cultivos utilizando cepas individuales y la mezcla de ambas cepas. El control corresponde únicamente al medio SV.3 con la concentración correspondiente de cobre bajo las mismas condiciones de cultivo. B) UFC/mL de los cultivos de cepas independientes en ambas condiciones ambientales. C y D) UFC/mL de los cultivos con la mezcla de las cepas en condiciones aeróbicas y anaeróbicas respectivamente, se gráfica en porcentaje la prevalencia de las cepas correspondientes en el cultivo. Las barras representan el promedio de 3 ensayos independientes ± la desviación estándar. *, indica diferencia estadísticamente significativa ($p<0,05$), ** ($p<0,01$), *** ($p<0,001$) y ns, (no significativo). Los análisis estadísticos de la figura 11 A, respecto al control, se encuentra en el Anexo 2.

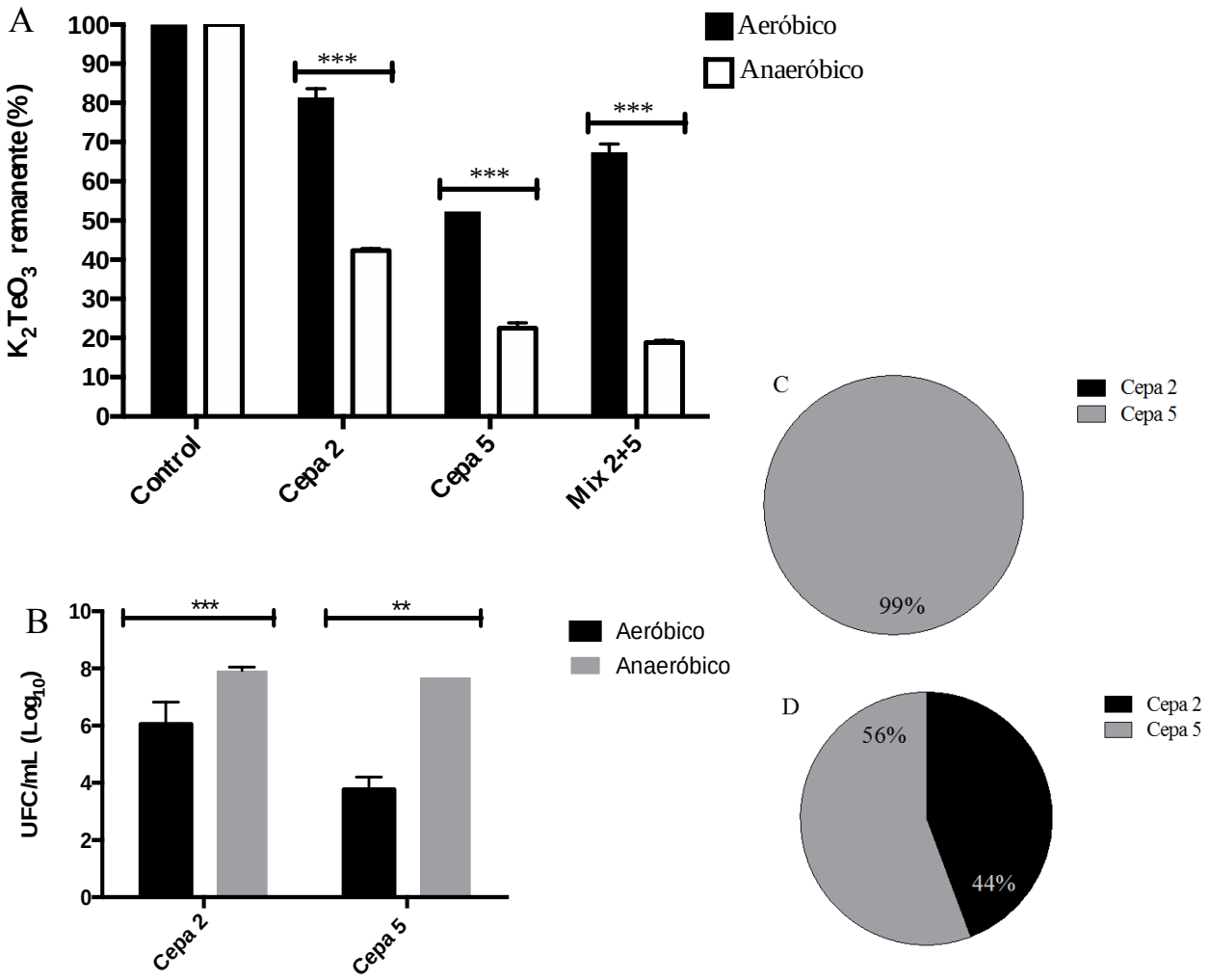


Figura 12. Remoción de telurito. Cultivos de *Staphylococcus sciuri* (Cepa 2) y *Acinetobacter schindleri* (Cepa 5) con 62,5 µg/mL de K_2TeO_3 aeróbicamente y 125 µg/mL anaeróbicamente en medio SV.3 a 37 ºC durante 24 h. A) Porcentaje remanente de telurito en cultivos utilizando cepas individuales y la mezcla de ambas cepas. El control corresponde únicamente al medio SV.3 con la concentración correspondiente de telurito bajo las mismas condiciones de cultivo. B) UFC/mL de los cultivos de cepas independientes en ambas condiciones ambientales. C y D) UFC/mL de los cultivos con la mezcla de las cepas en condiciones aeróbicas y anaeróbicas respectivamente, se gráfica en porcentaje la prevalencia de las cepas correspondientes en el cultivo. Las barras representan el promedio de 3 ensayos independientes ± la desviación estándar. *, indica diferencia estadísticamente significativa ($p<0,05$), ** ($p<0,01$), *** ($p<0,001$) y ns, (no significativo). Los análisis estadísticos de la figura 12 A, respecto al control, se encuentra en el Anexo 3.

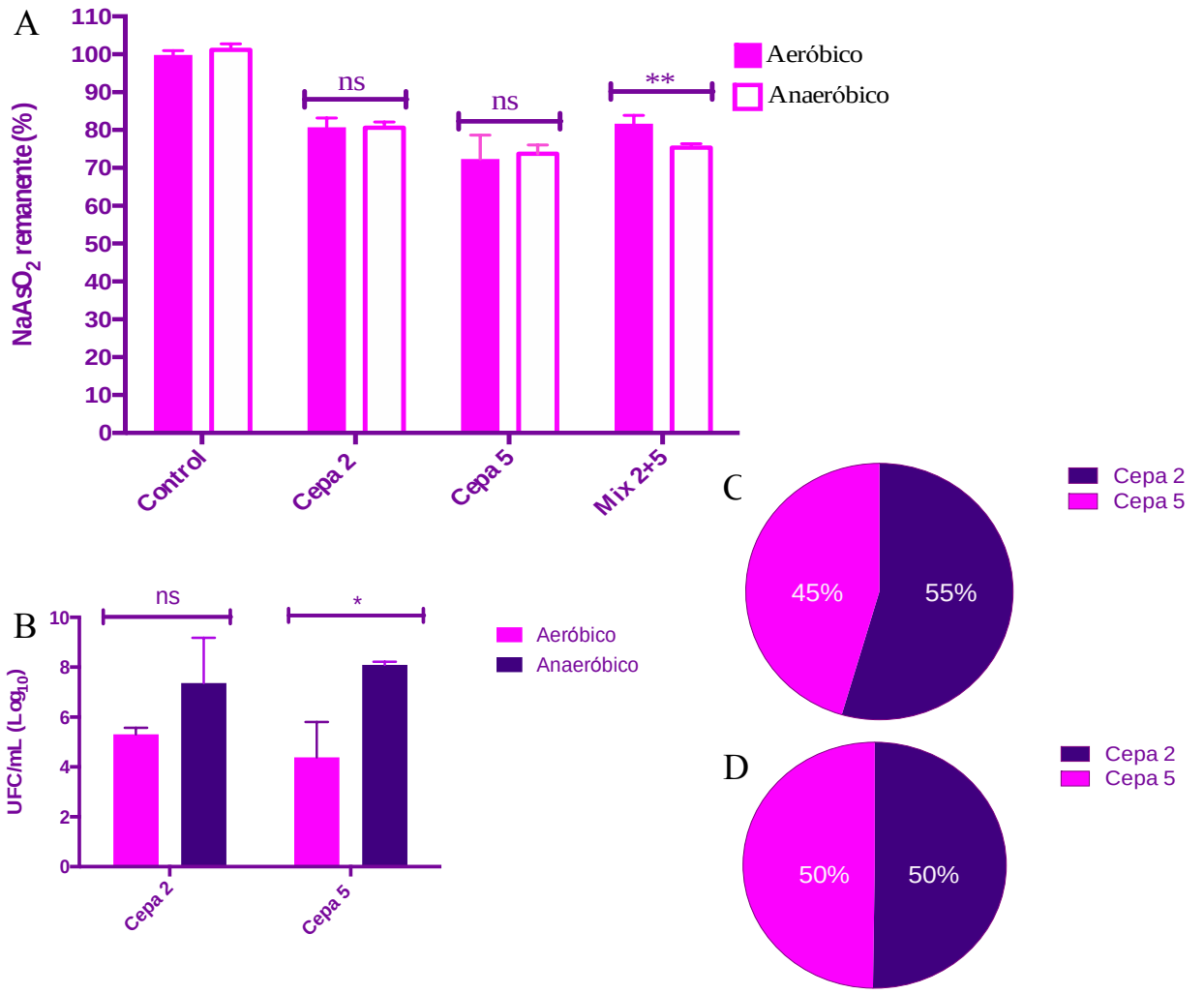


Figura 13. Remoción de arsenito. Cultivos de *Staphylococcus sciuri* (Cepa 2) y *Acinetobacter schindleri* (Cepa 5) con 811 µg/mL de $NaAsO_2$ aeróbicamente y 405,8 µg/mL anaeróbicamente en medio SV.3 a 37 ºC durante 24 h. A) Porcentaje remanente de arsenito en cultivos utilizando cepas individuales y la mezcla de ambas cepas. El control corresponde únicamente al medio SV.3 con la concentración correspondiente de arsenito bajo las mismas condiciones de cultivo. B) UFC/mL de los cultivos de cepas independientes en ambas condiciones ambientales. C y D) UFC/mL de los cultivos con la mezcla de las cepas en condiciones aeróbicas y anaeróbicas respectivamente, se gráfica en porcentaje la prevalencia de las cepas correspondientes en el cultivo. Las barras representan el promedio de 3 ensayos independientes ± la desviación estándar. *, indica diferencia estadísticamente significativa ($p<0,05$), ** ($p<0,01$), *** ($p<0,001$) y ns, (no significativo). Los análisis estadísticos de la figura 13 A, respecto al control, se encuentra en el Anexo 4.

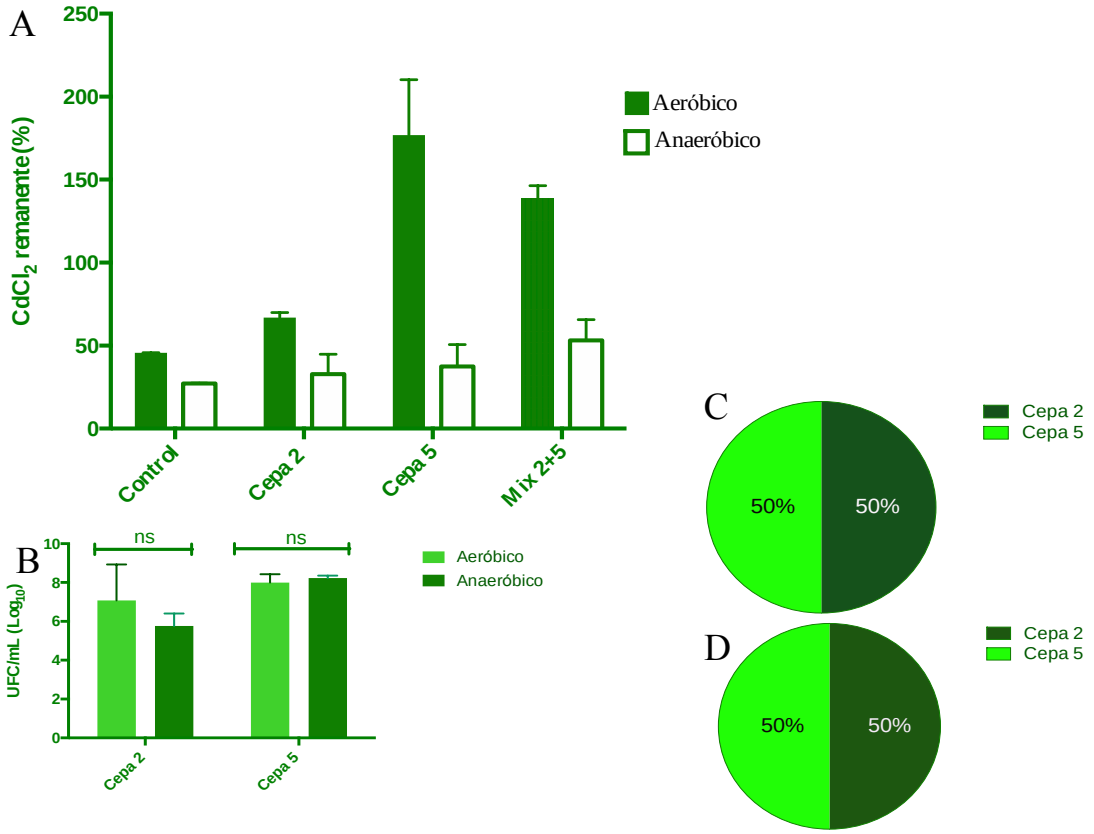


Figura 14. Remoción de cadmio. Cultivos de *Staphylococcus sciuri* (Cepa 2) y *Acinetobacter schindleri* (Cepa 5) con 50 µg/mL de $CdCl_2$ para ambas condiciones ambientales en medio SV.3 a 37 ºC durante 24 h. A) Porcentaje remanente de cadmio en cultivos utilizando cepas individuales y la mezcla de ambas cepas. El control corresponde únicamente al medio SV.3 con la concentración correspondiente de cadmio bajo las mismas condiciones de cultivo. B) UFC/mL de los cultivos de cepas independientes en ambas condiciones ambientales. C y D) UFC/mL de los cultivos con la mezcla de las cepas en condiciones aeróbicas y anaeróbicas respectivamente, se gráfica en porcentaje la prevalencia de las cepas correspondientes en el cultivo. Las barras representan el promedio de 3 ensayos independientes ± la desviación estándar. *, indica diferencia estadísticamente significativa ($p<0,05$), ** ($p<0,01$), *** ($p<0,001$) y ns, (no significativo).

Tabla 9. Datos de cuantificación de cadmio.

Condiciones aeróbicas	Control		*S. sciuri*		*A. schindleri*		Mix 2+5	
Muestreo	[Inicial]	[Final]	[Inicial]	[Final]	[Inicial]	[Final]	[Inicial]	[Final]
Concentración (µg/mL)	47,5 ± 0,24	21,68 ± 0,14	20,03 ± 2,15	14,14 ± 0,1	25,83 ± 0,14	44,11 ± 0,25	31,42 ± 0,25	43,47 ± 0,24

Cuantificación de la remoción en escala de biorreactor considerando lo obtenido en 2.1.

Considerando los resultados obtenidos en el objetivo anterior, se seleccionó la cepa con la mayor capacidad de remoción y el metal(oid)e con mayor proyección en este sentido. Se seleccionó *A. schindleri*, el cual logró remover hasta un 80% de telurito, por esta razón para el escalamiento en biorreactor se utilizó esta cepa para analizar la remoción de telurito.

Se realizó un cultivo de *A. schindleri* en biorreactor con un volumen final de 1 L (n=1) en presencia de 62,5 µg/mL de K_2TeO_3. Como se observa en la Figura 15 B, en las condiciones experimentales no hubo grandes variaciones en el pH del cultivo, observándose una leve disminución al momento de la inoculación. Para el caso de la temperatura, al inicio del cultivo esta fue de 37 ºC, la cual se mantuvo mediante el uso de un manto calefactor (Figura 15 D). El oxígeno disuelto (OD), al inicio fue de 129%, luego de la inoculación su valor fluctúo entre 127-128% manteniéndose durante el resto del cultivo (Figura 15 C). El crecimiento se midió espectrofotométricamente a 600 nm (Figura 15 A), donde se observa que este se mantuvo en $DO_{600} \approx 0{,}001$ desde la inoculación hasta el final del cultivo.

Otros ensayos fueron realizados a 24 h con las mismas condiciones de cultivo para verificar el crecimiento, además de la remoción de telurito, pero este se mantuvo según los parámetros descritos anteriormente, por lo que no fue posible determinar remoción del metaloide por la cepa seleccionada en un biorreactor.

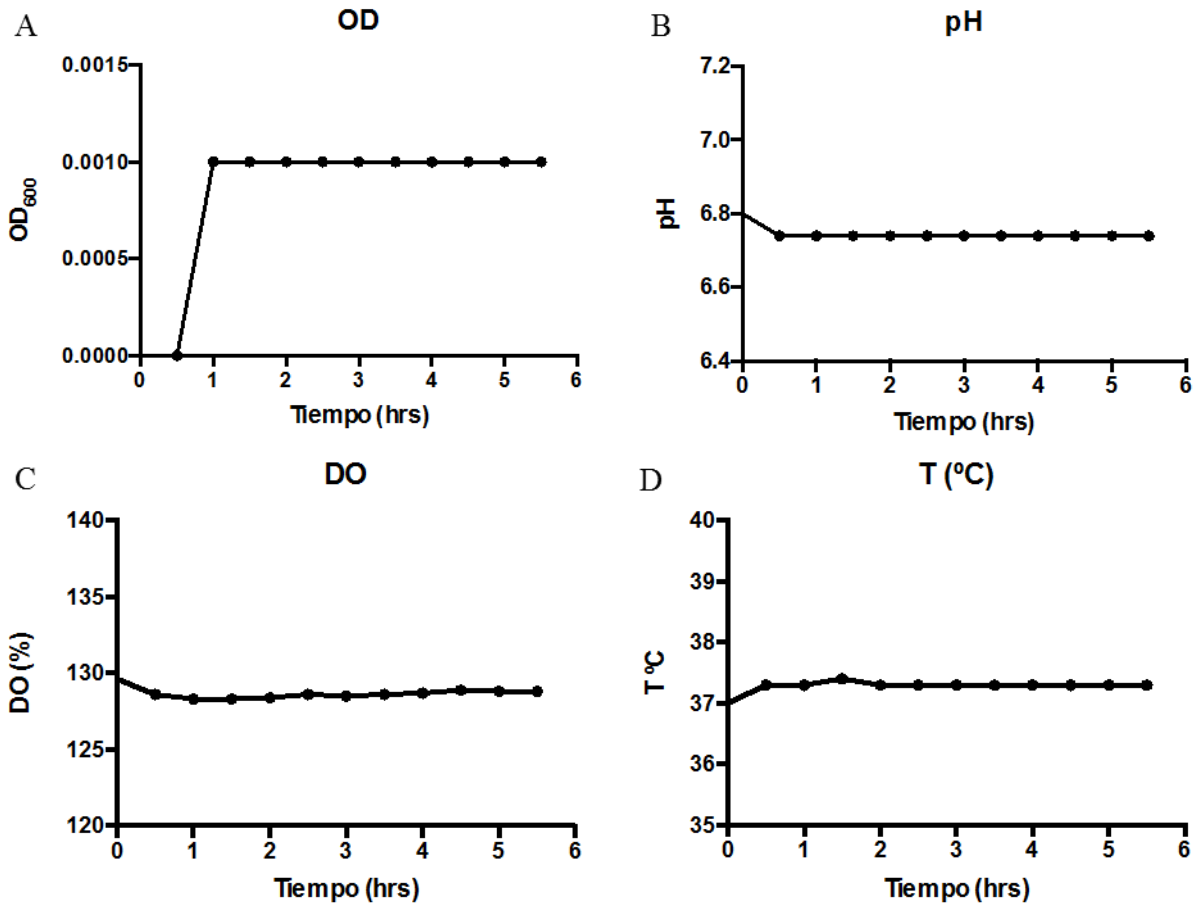


Figura 15. Parámetros del cultivo de *A. schindleri* en biorreactor. Cultivo en biorreactor, un inóculo de 200 mL de *A. schindleri* en $DO_{600} \approx 0{,}25$ se agregó a 800 mL de medio SV.3 fresco. El cultivo se llevó a cabo por 24 h a 37 ºC, agitación constante de 140 rpm. A) Crecimiento del cultivo en densidad óptica de 600 nm. B) Variación de pH del cultivo en biorreactor. C) Variación del oxígeno disuelto presente en el cultivo, medido en porcentaje respecto a saturación del ambiente mantenido por agitación. D) Temperatura del cultivo a través del tiempo. Todas las mediciones fueron realizadas cada 30 min hasta las 5,5 h de cultivo. El tiempo 0 corresponde al inicio del cultivo. Cada punto corresponde al promedio de tres mediciones independientes con su respectiva desviación estándar.

DISCUSIÓN

La baja calidad de los ecosistemas acuáticos debido al alto grado de contaminación, es una realidad a la que se enfrenta la sociedad actual, aumentando la preocupación debido al impacto negativo que esto puede tener en la salud humana y el equilibrio natural. En el marco de una descarga y manejo no controlado de residuos tóxicos, la actividad humana es el principal responsable, liberando al medio contaminantes orgánicos e inorgánicos, como los metales pesados los cuales son capaces de generar un alto impacto a nivel ambiental (Alencar et al., 2017).

Los metales pesados corresponden a elementos con alto peso atómico y alta densidad, son encontrados ampliamente en la industria de fertilizantes, refinerías mineras, empresas de plásticos, cauchos y baterías, cuyos desechos de carácter acuoso por lo general son descargados en causes de agua cercanos (Kaur y Sharma, 2017). En este sentido, plantas y especies microbianas al estar en contacto con áreas contaminadas han desarrollado altas tolerancias a metales pesados. Los microorganismos específicamente, han perfeccionado una variedad de estrategias para lidiar con altas concentraciones de metales, entre las que se encuentran: unión del tóxico a la membrana celular y/o pared celular, translocación del metal al interior de la célula, procesos de transformación incluyendo precipitación y volatilización. Estos fenómenos de resistencia son los que nos permiten desarrollar estrategias de biorremediación para diversos compuestos tóxicos (Crawford y Crawford, 2005). Como respuesta al creciente uso de microorganismos para remediar aguas contaminadas, el objetivo de esta Tesis fue analizar la remoción de metal(oid)es específicamente telurito, arsenito, cadmio y cobre, por bacterias ambientales resistentes a dichos tóxicos, analizando la implicancia de la presencia o ausencia de oxígeno en dicho proceso.

Determinación de la resistencia a metal(oid)es en condiciones aeróbicas y anaeróbicas

Inicialmente, se realizó el estudio de resistencia basado en la concentración mínima inhibitoria (MIC) para 11 cepas ambientales disponibles en el laboratorio, aisladas desde distintas zonas geográficas, sin embargo, estas no necesariamente están en contacto con altas concentraciones de metales pesados (Tabla 3).

La resistencia a metal(oid)es fue determinada -en medio LB- en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Se puede observar que en comparación a *E. coli* la mayoría de los aislados ambientales resiste altas concentraciones, a excepción de arsenito, donde *E. coli* resiste hasta el doble de las

cepas más resistentes en condiciones anaeróbicas, condición en la que se ha descrito una mayor resistencia debido a la ausencia de oxígeno y por lo tanto ausencia de ROS que puedan provocar daño a la célula, además de poder ser usados en el metabolismo disimilatorio (Bothast y Saha, 1997; Taylor y Francis Group, 2017). En este sentido, se ha observado la presencia de distintos genes asociados a la resistencia a arsenito, específicamente en la cepa de *E. coli* utilizada (BW25113) se encontró *arsR, arsB* y *arsC,* descritos en el Anexo 6 (Grenier and Matteau, 2014). Debido a la alta resistencia en anaerobiosis, se piensa que estos genes podrían estar ayudando, sumado a la ausencia de especies reactivas de oxígeno. Adicionalmente, se sabe que en condiciones anaeróbicas se promueve la presencia de la especie arsenito (As^{+3}) (Oremland and Stolz, 2003), donde se hipotetiza que al entrar al entrar a la célula podría sufrir algún cambio redox permitiendo su oxidación, donde la activación del gen *arsC* permitiría la utilización de esta especie (arseniato), para la generación de energía. Al mismo tiempo, la utilización de *arsB,* una bomba de expulsión específica para arsenito.

Considerando lo anterior y lo descrito en los resultados, se seleccionan las bacterias la *S. sciuri* (Cepa 2) y *A. schindleri* (Cepa 5). Ambas correspondientes a muestras ambientales provenientes de Bolivia, específicamente de un área intrahospitalaria. En este sentido, se ha observado la relación existente entre la resistencia a antibióticos y la multiresistencia a metal(oid)es (Koc et al., 2013; Seiler and Berendonk, 2012). Por lo que no es extraño que estas bacterias tengan tales características y alta resistencia a metal(oid)es.

Para las cepas seleccionadas, se procedió a analizar sus resistencias a los cuatro metal(oid)es utilizando el medio formulado SV.3, comparándose con los valores obtenidos en LB (Tabla 8). Se observa que en SV.3 hay una disminución de la resistencia respecto a LB, estos resultados pueden estar asociado a los escases de recursos necesarios para lograr una respuesta de resistencia adecuada. Se ha descrito anteriormente, que en condiciones de nutrición limitantes se ve alterado el crecimiento microbiano (Bren *et al*., 2013; Esteve-Núñez *et al*., 2005). El mismo fenómeno se puede observar al comparar los crecimientos en medio SV.1 y SV.2 (Figura 5 y 7), donde el crecimiento en el primer medio, en densidad óptica, no supera un máximo de $DO_{600} \approx 0{,}15$. Mientras que, en el segundo medio, el crecimiento llega a un máximo de $DO_{600} \approx 0{,}2$, aumento asociado a la adición de un nuevo nutriente (KNO_3) al medio nuevo formulado. En el mismo sentido, se observa un aumento en el crecimiento con la adición de casamino ácidos llegando a $DO_{600} \approx 0{,}5$, tanto aeróbica como anaeróbicamente (Figura 9). Asimismo, el medio SV.3 es un

medio mínimo comparado con LB, por lo tanto, se hipotetiza que la disminución en la resistencia vendría dada por una menor presencia de nutrientes, los cuales serían utilizados en primera instancia para crecimiento y en segundo lugar para los mecanismos asociados a la resistencia de metal(oid)es.

Se analizó la resistencia de las cepas 2 y 5 y la mezcla de estas (Mix 2+5) frente a la mezcla de metal(oid)es, obteniéndose resultados insatisfactorios al no lograr determinar una MIC en ninguno de los casos (Datos no mostrados). Esto como consecuencia de la alta toxicidad de la mezcla, generada incluso en bajas concentraciones. Debido a esto, los ensayos de remoción solo se llevaron a cabo utilizando metal(oid)es de manera independiente.

Formulación del medio SV.3

Uno de los primeros desafíos para lograr trabajar en la remoción de metales pesados, era lograr una mezcla homogénea de éstos en un medio de cultivo, con tal de lograr crecimiento y la posterior remoción deseada. Se observó que la mezcla de los metal(oid)es trabajados era altamente insoluble en el primer medio utilizado (LB), medio rico no definido. Si bien el medio era capaz de mantener la solubilidad de altas concentraciones de metal(oid)es independientemente, no así en la mezcla (Datos no mostrados). Debido a esto se procede a utilizar el medio M9, cuya composición definida podría mejorar los resultados de las interacciones entre metales. A pesar del cambio, se mantenía la precipitación de la mezcla y la precipitación de cadmio como metal independiente. Tomando esto en consideración se ha observado que la interacción de Cd^{+2} con grupos como fosfatos y carbonatos promueven la insolubilización del metal, por lo que ha sido utilizada la adición de fosfatos para la inmovilización del metal desde sitios contaminados (Bolan *et al*., 2003; Kim *et al*., 2015). Debido a esto fue necesario reformular la composición del medio M9, como se ve en la Tabla 7. Considerando el crecimiento de las cepas en SV.1 en la Figura 5, podemos ver un lento crecimiento, asociado a la escases de nutrientes como se observó anteriormente (Bren *et al*., 2013; Esteve-Núñez *et al*., 2005). Se analizó igualmente el crecimiento anaeróbico con este medio, no observándose crecimiento durante las 24 horas del cultivo (Datos no mostrados). Como se observa en la Figura 6, cada metal independiente lograba mantener su solubilidad, pero no así la mezcla, produciéndose un precipitado verde azulado. Dicho precipitado podría corresponder a la mezcla entre $CuSO_4$ y $NaAsO_2$, conocida como arsenito de cobre o popularmente descrita como *Scheele's Green* (Bartrip, 1994; Cullen y Reimer, 1989; Lo-Coco *et al*., 1977; O'Day, 2006). Por lo tanto, el

segundo paso fue mejorar el crecimiento mediante la adición de un nuevo nutriente. Se añadió KNO_3, fuente de nitrógeno adicional a NH_4Cl, la cual ha sido descrita en otros medios de cultivo para las cepas de *Staphylococcus* (Pogaku *et al*., 2010) y *Acinetobacter* (Grehn y Von Graevenitz, 1978). Además se ha descrito que la adición de nitrato al medio es capaz de optimizar los procesos de biorremediación (Wong *et al*., 2002; Yusof *et al*., 2010). Por último, considerando que las remoción de metales se hará igualmente en condiciones anaeróbicas se ha observado que tanto para bacterias anaerobias facultativas como anaerobias estrictas la adición de nitrato en forma de KNO_3 mejora el crecimiento debido a que este funciona como aceptor final de electrones (Bossert y Young, 1986; Vidal y Vidal, 1980). Como se puede observar en la Figura 7, las tres cepas analizadas presentan una fase exponencial alargada que se extiende más allá de las 20 horas de crecimiento. Anaeróbicamente, no se observó crecimiento dentro de las 24 h de cultivo (Datos no mostrados). Respecto a los metales, al igual que con el medio SV.1, se puede observar que cada metal independiente mantiene su solubilidad, pero la mezcla de metal(oid)es genera el precipitado ya mencionado *Scheele`s Green*.

Considerando este lento crecimiento y la alta presencia de componentes inorgánicos en el medio, se propuso la adición de casamino ácidos. Descrito como un hidrolizado de caseína refinado, con baja concentración de NaCl. Contiene además nitrógeno inorgánico y aminoácidos a excepción de triptófano, trazas de fosfato, azufre y micronutrientes como aluminio, boro, cobalto, manganeso y zinc (Mueller y Johnson, 1941; Nolan, 1971; Nolan y Nolan, 1972; Owens y Keddie, 1969). Siendo un componente ampliamente utilizado en microbiología. En los últimos años también se ha observado que puede mejorar procesos de biorremediación de metales pesados (Park *et al*., 2011). Como se observa en las figura 9 A y B, se describe un mejor crecimiento respecto a las otras versiones del medio, tanto aeróbica como anaeróbicamente, considerando esto, se ha visto en literatura que la adición de casamino ácidos mejora el crecimiento (Aly *et al*., 2017; Gehring *et al*., 2014). En el caso del cobre, en la Figura 10 A (tubo 2) y 10 B, se observa una coloración azul intensa, mucho más que en los otros medios (SV.1 y SV.2). Una posible explicación a este fenómeno vendría dado por la interacción de la solución de $CuSO_4$ con aminas presentes en el medio, formándose un complejo conocido como tetramina de sulfato de cobre, el cual es soluble y posee una coloración azul intenso (Barrett y Mounir A. Malati, 1998; Fajans, 1951). Dicho fenómeno no repercute en la resistencia de las bacterias al metal, aunque se desconoce su efecto sobre la remoción del cobre.

Por lo tanto, si analizamos la composición final del medio SV.3 y la comparamos con otros medios como el M9, MOPS y LB (Tabla 8), podemos ver claras diferencias en la concentración de las sales. Primero, se eliminó una fuente de fosfato (Na_2HPO_4-$7H_2O$) y se disminuye en un 96,6% el KH_2PO_4 del medio. En cuanto al nitrógeno en forma de NH_4Cl, se redujo un 79,6% en relación al M9 y se aumentó un 50% en relación a medio MOPS. La concentración de $CaCl_2$ no se modifica siendo igual a la de M9 y en comparación al medio MOPS es 99% más abundante. En cuanto a NaCl, podemos observar una disminución del 80% en comparación a M9 y 82,8% en comparación a MOPS, si comparamos la concentración en SV.3 de esta sal con su concentración en LB se observa una diferencia de un de 95% menos en SV.3. Finalmente, el medio SV.3 destaca su funcionalidad al mantener los metal(oid)es solubles para ensayos de remoción y permite el crecimiento de las cepas utilizadas, por lo cual fue seleccionado para realizar todos los procesos de remoción.

Estandarización de métodos para la cuantificación de arsenito, cobre, telurito y cadmio.

Una de las grandes dificultades que conlleva el trabajo con metal(oid)es es su correcta cuantificación, es decir, conocer la concentración real a la cual se trabaja, esto debido a su alta toxicidad, tanto para las bacterias como para los humanos. Según la Norma Chilena Nº 1.333/78 que habla sobre los estándares para aguas de regadío, la concentración permitida de cobre es de 0,20 mg/L (Comisión Nacional del Medio Ambiente, 2001) y según la Norma Chilena 409.01/84 que habla de estándares para agua potable, la concentración permitida de cobre es de 1 mg/L (Instituto Nacional de Normalización, 1984). Considerando esto y las concentraciones que son capaces de tolerar las bacterias analizadas, se buscó un método que fuera capaz de detectar estas concentraciones. Es así que, el método de cuantificación por batocuproína elegido ha sido utilizado en diversas publicaciones científicas (Rapisarda *et al*., 1999; Volentini *et al*., 2011) y libros especializados (APHA/AWWA/WEF, 2012; Cioffi *et al*., 2012; Culotta y Scott, 2013). En esta técnica, los iones de Cu^{+2} son llevados a estado Cu^{+}, los cuales forman un complejo especifico 2:1 con batocuproína disulfonato, este complejo adopta una coloración marrón dorada cuya absorción molar es de 13.500 L*mol*cm^{-1} a 480 nm *(*Rapisarda *et al*., 2002). Como se observa en la Figura 1, la curva obtenida muestra una pendiente con un R^2= 0,9926 lo que indica su correcta linealidad dentro del rango, el cual fue exitosamente reproducido de la metodología citada, aún más

considerando la modificación realizada al protocolo en el cual se redujo el volumen de trabajo a 1 mL final, siendo inicialmente 50 mL según lo descrito en la metodología original.

Para la cuantificación de teluro, se estandarizó la metodología basada en la reducción de TeO_3^{-2} por $NaBH_4$, lo que forma un precipitado negro, siendo este el telurio elemental, posible de medir espectrofotométricamente a 500 nm manteniendo un rango lineal entre 1-200 µg/mL (Molina *et al*., 2010). La eficacia, sencillez y reproducibilidad de la técnica la enmarca por sobre otras metodologías descritas como la espectrometría de fluorescencia atómica con un rango lineal de detección de 2-100 µg/L (Viñas *et al*., 2005). Asimismo técnicas como espectrometría de absorción atómica con un rango 0-2 µg/mL (Ollivier *et al*., 2008) no serían convenientes por el acotado rango de detección que permitiría muestras con concentraciones mucho menores a las descritas en la Tabla 1. También encontramos la utilización de técnicas como cromatografía iónica asociada a un espectrómetro de masa acoplado a un inductor de plasma (IC-ICP-MS) descrito para la detección de selenio y telurio en muestras biológicas, con un rango de detección para telurio de 0,01-0,08 ng/mL (Kuo y Jiang, 2008), nuevamente el rango es muy acotado y muy inferior a las concentraciones trabajadas en nuestra investigación. Como se aprecia en la Figura 2, la curva obtenida presenta un R^2= 0,9900, lo cual mejora respecto a lo obtenido en M9 según la descripción original del método donde se obtiene un R^2= 0,9740 (Molina *et al*., 2010), considerando que el medio SV.3 es también un medio mínimo, además es comparable debido a que se utiliza el mismo rango de concentración 1-10 µg/mL.

Para la cuantificación de arsénico inicialmente se propuso una metodología basada en espectrofotometría UV/VIS (Pandurangappa y Kumar, 2012), la cual no pudo ser replicada. Dicha clase de metodología es recurrente de encontrar en varias publicaciones intentando dar una solución simple al problema de la cuantificación de arsénico y sus especies, basadas en reacciones colorimétricas y cuantificaciones indirectas de dicho metal (Kundu *et al*., 2002; Narayana *et al*., 2006). No obstante las metodologías asociadas a dispositivos tecnológicos están más distribuidas y logran resultados altamente reproducibles, como lo es la espectrometría de absorción atómica (AAS) (Monteiro Bramante *et al*., 2008), ICP MS/OES (Gómez-Ariza *et al*., 2000; Inoue *et al*., 1999; Kirby y Maher, 2002) y espectrometría de absorción de fluorescencia (AFS) (Gómez-Ariza *et al*., 2000). Dichas metodologías permitirían asimismo analizar muestras dentro del límite máximo permitido de arsénico en aguas de regadío que es 0,1 mg/L (Comisión Nacional del Medio Ambiente, 2001) y 0,05 mg/L para agua potable (Instituto Nacional de Normalización, 1984).

Como se puede observar en la Figura 3, la curva de calibración obtenida para la cuantificación de arsenito, posee un R^2= 0,9971 dentro del rango lineal entre 50-200 µg/mL, aunque el rango es mucho menor a las concentraciones utilizadas, la dilución de las muestras permitió llegar al rango y ser cuantificadas.

Para cadmio se consideró, al igual que con arsénico, una metodología colorimétrica en base a espectrofotometría UV/VIS, la cual no logró ser estandarizada ni replicada (APHA/AWWA/WEF, 2012; Jankiewicz *et al*., 2000) debido a la dificultad de tratar con solventes orgánicos, además de necesitar grandes volúmenes de muestra para una determinación exitosa del metal. De esta forma se revisaron distintas metodologías, encontrándose cuantificaciones voltimétricas (Panteli *et al*., 2009), cuantificaciones mediante PIXE, capaz de determinar composición y concentración de metales (Ager *et al*., 2002) y finalmente espectrometría de absorción atómica (AAS) (Aleluia *et al*., 2017; Nazari *et al*., 2017; Olmedo *et al*., 2010; Pozzatti *et al*., 2017), la cual se consideró reproducible y confiable para las concentraciones trabajadas. Considerando, que la concentración máxima permitida en la legislación chilena tanto para aguas de regadío como agua potable es de 0,01 mg/L (Comisión Nacional del Medio Ambiente, 2001; Instituto Nacional de Normalización, 1984). Como se muestra en la Figura 4, se logró una curva con un R^2= 0,9941al cuantificar por la técnica AAS la cual permite trabajar dentro del rango entre 25-125 µg/mL, en este caso las concentraciones trabajadas no necesitaron de dilución ya que son contempladas en el rango lineal. Finalmente, los protocolos de cuantificación elegidos y estandarizados fueron reproducibles bajo nuestras condiciones de trabajo y permitieron determinar las concentraciones de los metal(oid)es analizados, destacando las metodologías colorimétricas por su fácil uso, sensibilidad y relación costo-beneficio.

Cuantificación de la remoción de $NaAsO_2$, K_2TeO_3, $CdCl_2$ y $CuSO_4$ por *Staphylococcus sciuri* y *Acinetobacter schindleri*.

Para los ensayos de remoción de cobre (Figura 11 A) se observó que ningún de las dos cepas logró una remoción superior al 50%. Para el caso de *S. sciuri*, no se ha encontrado evidencia directa de su uso en procesos de biorremediación o remoción de metales, aunque sí su uso en investigaciones preliminares asociadas (Robidillo *et al*., 2013). Además se encuentran otras especies del género como lo es *S. saprophyticus* (Ilhan *et al*., 2004), donde describen la remoción de aproximadamente 20-30% de cobre mediante la estrategia de adsorción, así también *S. aureus* descrito para la

adsorción de cromato (Wang *et al*., 2010). Particularmente, si analizamos el crecimiento de la cepa *S. sciuri*, podemos observar un mayor crecimiento en condiciones aeróbicas que anaeróbicas (Figura 11 B), lo cual puede deberse a lo observado en la Figura 9 B donde *S. sciuri* posee una fase exponencial mucho más larga que las otras cepas anaeróbicamente, sumado a la adición del tóxico que disminuiría mucho más la población viable para el proceso de remoción. Existe la posibilidad que la remoción sea dada por una adsorción del metal en la pared celular de esta bacteria Gram-positiva, dicha estrategia es denominada biosorción, en la cual los elementos metálicos se adhieren a la pared celular por fuerzas de Van der Waals, enlaces covalentes, enlaces iónicos o simple atrapamiento (Lloyd y Lovley, 2001; Singh *et al*., 2009). Por otro lado, se ha descrito la existencia del sistema de expulsión de cobre (cop) principalmente en *S. aureus* (Sitthisak *et al*., 2007), pudiendo mantenerse en la cepa aquí descrita, permitiendo una homeostasis del metal, aunque esto no favorecería la remoción del metal(oid)de, si no la sobrevida de la bacteria.

Para la cepa en estudio *A. schindleri*, se observa una remoción de no más del 5% en condiciones anaeróbicas, siendo no significativa frente a la remoción aeróbica. Una posible respuesta a este fenómeno, es la presencia de múltiples sistemas de regulación de la homeostasis de cobre descritos para el género *Acinetobacter*, como bombas de expulsión (ATPasa tipo-P), chaperonas de cobre (cusF) y oxidasas de cobre (PcoA) (Irawati et al., 2016; Montes, 2012; Williams *et al*., 2016). También se observa un mayor crecimiento en condiciones anaeróbicas, asociado principalmente a la capacidad de esta cepa de utilizar nitrato como aceptor final de electrones (Bergogne-Bérézin y Towner, 1996). Del mismo modo que *S. sciuri*, no se ha encontrado evidencia directa del uso *A. schindleri* en procesos de biorremediación, no así otra especie ampliamente utilizada como *A. calcoaceticus* y *A. baumannii* (Crawford y Crawford, 2005; Shukor *et al*., 2010).

Finalmente, para la remoción de cobre utilizando la mezcla de ambas bacterias, se puede observar que, aunque la remoción no es significativa entre condiciones, la mezcla en condiciones anaeróbicas si muestra significancia frente al control (Figura 11 A). Si analizamos la distribución de las cepas en el cultivo de la mezcla (Figura 11 C y D), podemos observar que aeróbicamente hay un predominio de un 99% de *A. schindleri*, lo que sería muy acertado ya que el resultado de remoción es similar al de esta misma cepa por si sola en condiciones aeróbicas. La disminución en la cepa de *S. sciuri* puede deberse a una competencia por los limitados nutrientes y la adición del tóxico. Anaeróbicamente, podemos ver una distribución porcentual 40-60 aproximadamente entre

ambas cepas, debido a la utilización del nitrato por parte de *A. schindleri* lo cual podría dejar más nutrientes disponibles para *S. sciuri* la cual llegaría a fase estacionaria de manera tardía.

Para los ensayos de remoción de telurito en su forma de K_2TeO_3 (Figura 12 A), se puede observar que *S. sciuri*, logra hasta un 40% más de remoción en condiciones anaeróbicas. Asimismo, *A. schindleri* logra remover hasta un 30% más en condiciones anaeróbicas, además de remover más que la cepa anterior en ambas condiciones. Se ha descrito anteriormente por el laboratorio la actividad telurito reductasa de las cepas utilizadas en este trabajo, donde se puede observar que *S. sciuri* presenta una menor actividad que *A. schindleri* (Figueroa *et al*., 2018), lo que se traduce en una mejor capacidad de *A. schindleri* para reducir el telurito a su forma elemental Te^0, capacidad que se ve reflejada en su alto porcentaje de remoción. La estrategia de reducción es una de tantas utilizadas por las bacterias para tratar con metal(oid)es (Alencar *et al*., 2017; Lemire *et al*., 2013).

Es posible apreciar en la Figura 12 B, que el crecimiento aeróbico de ambas cepas se reduce respecto de la condición anaeróbica, esto debido a la toxicidad ejercida por el oxianión al catalizar la generación de ROS (Chasteen *et al*., 2009; Lin *et al*., 2012), lo que se refleja en la menor remoción del metaloide. Como se ha descrito, una de las consecuencias de la toxicidad de telurito es la generación de especies reactivas de oxígeno, las cuales en condiciones anaeróbicas no podrían ser generadas, disminuyendo así su toxicidad, permitiendo a las cepas generar más biomasa para los procesos de reducción del metaloide (Arenas *et al*., 2014; Morales *et al*., 2017).

En el marco de la mezcla de cepas para la remoción de telurito, se observa que la remoción anaeróbica alcanza hasta un 80%, haciéndola altamente eficiente respecto a las cepas independientes. Se observa en la Figura 12 D, la presencia de ambas cepas y la predominancia de *A. schindleri* en la mezcla, la suma de ambas respondería a la mayor capacidad de remoción, generándose un efecto aditivo, donde ambas cepas colaboran en el proceso. En el caso de la mezcla aeróbica, se observa en un 99% la presencia de *A. schindleri*, mostrando una remoción de no más del 30%.

En la Figura 13.A se observa la remoción de arsénico en su forma trivalente como arsenito de sodio ($NaAsO_2$), donde *S. sciuri* alcanza un 20% de remoción sin diferencia entre una condición u otra, del mismo modo *A. schindleri* logra un 30% de remoción sin diferencia significativa entre condiciones, lo que sugeriría en primera instancia que la remediación de arsénico no vendría ligada a un componente ambiental como la presencia o ausencia de oxígeno. Sin embargo, se debe considerar que las concentraciones iniciales de trabajo para ambas condiciones no son iguales, por

lo que, aunque ambos logran un 20% y 30% de remoción respectivamente, anaeróbicamente es la mitad de la concentración tratada de forma aeróbica, por lo tanto, es necesario aclarar que anaeróbicamente habría una menor remoción del tóxico o desde otro punto de vista, una remoción proporcional en porcentaje. En el análisis de la Figura 13 B podemos encontrar que las cepas crecen menos en condiciones aeróbicas que en condiciones anaeróbicas, esto vendría dado a que arsenito es capaz de catalizar la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) las cuales afectarían mucho más en condiciones aeróbicas (Lemire *et al*., 2013). Se ha descrito el uso del género *Staphylococcus* para remediación de arsénico en conjunto a cromato, basados en la reducción y oxidación de los tóxicos (Aryal *et al*., 2011; Rizvi *et al*., 2016), asimismo utilizado para la adsorción de arsenito y arseniato (Aryal *et al*., 2010), además se ha descrito su uso en fitorremediación de arsénico asociado a *Brassica juncea* (Srivastava *et al*., 2013). *Acinetobacter* por su parte ha sido descrito para la remoción de arsénico, tanto en su forma arsenito como arseniato, para el primero se describe la oxidación de este a su forma arseniato que es menos tóxica pero a la vez más proclive a ser asociada con fosfatos o carbonatos, además de existir sistemas especializados en la bacteria que son capaces de expulsar esta forma más eficientemente, como componentes del operón Ars (Karn y Pan, 2016; Mandal, 2002; O'Day, 2006). Para arseniato se describe la reducción de este a su forma trivalente de arsenito, el cual es más tóxico (Mukhopadhyay *et al*., 2002).

En la figura 14 A se muestra la remoción de cadmio, valores que se ven claramente alterados, donde el control no corresponde al valor del 100%. En la Tabla 9, se ofrecen los valores de las cuantificaciones de cadmio en µg/mL. En ésta, se puede observar que las concentraciones iniciales, marcadas en verde, son menores a las agregadas al inicio de los cultivos (50 µg/mL), más aún en los tratamientos con *A. schindleri* y la mezcla, los valores iniciales son mucho menores a los valores finales, es por esta razón que los porcentajes superan al 100% de metal en el medio. Adicionalmente, en el Anexo 5, se pueden encontrar las gráficas donde se muestran estas diferencias y las variaciones en las cuantificaciones de las réplicas biológicas.

Analizando el control, se sugiere una interacción de los componentes del medio con la solución de $CdCl_2$ lo que vendría a disminuir su disponibilidad en el medio y su consiguiente análisis erróneo con la técnica utilizada. Para este fenómeno se plantea la hipótesis de una interacción entre cadmio y azufre formando el complejo CdS, conocida nanoestructura de valor comercial (Sweeney *et al*., 2004; Thakkar *et al*., 2010). Dicho azufre podría venir de la fuente $MgSO_4$ aunque es muy poco

probable, por otra parte se plantea la interacción de cadmio con residuos de cisteína (Charerntanyarak, 1999; Cunningham y Lundie, 1993; Wang *et al*., 2001), los cuales poseen azufre en su estructura, secuestrando el metal y afectando su normal cuantificación.

Las cepas demostraron remover metal(oid)es de manera independiente, mostrando una pequeña tendencia a mejorar en condiciones anaeróbicas, asimismo la mezcla reveló iguales o mayores porcentajes de remoción que las cepas individuales. Destacándose *A. schindleri* en la remoción anaeróbica de telurito y de arsenito en ambas condiciones.

Cuantificación de la remoción de $NaAsO_2$ y $KTeO_2$ por *Acinetobacter schindleri* en biorreactor.

Considerando la información obtenida de los ensayos de remoción anteriores, se seleccionó la cepa con el mejor desempeño en la remoción de metal(oid)es, la cual fue *A. schindleri*. Asimismo, se seleccionó telurito como el tóxico elegido para escalar la remoción a biorreactor. Como se puede observar en la Figura 15, todos los parámetros de crecimiento del biorreactor (pH, DO, Tº y OD) se mantuvieron estables, principalmente la densidad óptica (Figura 15 A), la cual señala expresamente que no hubo crecimiento de la cepa durante las primeras horas de cultivo, bajo las condiciones ensayadas. Lo cual, es contradictorio a lo observado en la Figura 9 A, donde a las 3 h de crecimiento la cepa comienza a describir un crecimiento exponencial, sobre todo, considerando que provenía de un cultivo con una densidad óptica que la situaba en la mitad de la fase exponencial ($DO_{600} \approx 0{,}25$). Luego de 24 h de cultivo, esta cepa no fue capaz de crecer, observándose un estancamiento en la DO_{600} (Datos no mostrados). Existen diversas variables que pueden haber afectado el comportamiento de la bacteria al ser escalada a biorreactor. Primero se debe considerar que la utilización de *A. schindleri* en procesos de biorremediación no está descrito. Sin embargo, un estudio reciente describe la utilización de una cepa de *A. schindleri* a escala de biorreactor, utilizando acetato como fuente principal de carbono y una temperatura de crecimiento de 30ºC (Sigala *et al*., 2017). Se señala este punto, debido a que el medio SV.3 utiliza como fuente de carbono glucosa y se ha descrito que algunas cepas de *Acinetobacter* no crecen adecuadamente bajo esta fuente de carbono (Asperger y Kleber, 1991). Por lo tanto, se hipotetiza que bajo este régimen la cepa pudo no mantener un crecimiento adecuado, considerando las condiciones nutricionales. Contrariamente a lo observado en condiciones de laboratorio, donde se utilizó volúmenes menores a 1 L. De la misma manera, otro factor importante a analizar del proceso es la

temperatura; se creció a 37 ºC a nivel de laboratorio y en el ensayo de biorreactor, por otro lado se ha descrito que el género *Acinetobacter* es capaz de crecer en rangos temperatura de 30-41 ºC (Ensley y Finnerty, 1980; Nemec *et al*., 2001). Importante resaltar en el proceso de set-up de las condiciones de biorreactor, que el sensor de temperatura no había sido calibrado por lo que, en los cultivos iniciales a 24 h, se notó que la temperatura real era de 42 ºC, lo que claramente afecto el crecimiento. Sin embargo, luego de solucionar ese contratiempo, la bacteria seguía mostrando el comportamiento observado en la Figura 15. Además en literatura se identificó un crecimiento a 30 ºC al escalar esta bacteria en un biorreactor (Sigala *et al*., 2017), por lo que una proyección importante de este trabajo, sería evaluar esta temperatura junto con la fuente de carbono como factores relevantes en este proceso escalado. Finalmente, debido a que la cepa no presentó crecimiento no fue posible estudiar su efecto de remoción del metaloide elegido.

CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

La biorremediación, específicamente el proceso de remoción de metal(oid)es es de gran importancia nivel mundial, considerando que son especies que no pueden ser degradadas, por lo que la principal vía para poder remediar una zona afectada en este caso aguas, es la inmovilización del tóxico para su posterior remoción. En esta Tesis, se llevó a cabo la remoción de metal(oid)es solubles mediante estrategias microbianas de resistencia, entre las que se puede encontrar la adsorción, la mineralización y la reducción, para el posterior retiro del metal(oid)e insoluble inmovilizado.

Por lo tanto y considerando la hipótesis de trabajo, se logró remover telurito tanto por las cepas independientes de *A. schindleri* y *S. sciuri*, como por la mezcla de ambas. La remoción de este metaloide, se ve incrementada significativamente en condiciones anaeróbicas, logrando hasta un 80% de remoción. Del mismo modo, la mezcla de estas cepas logró remover significativamente arsenito en condiciones anaeróbicas, con un 30% de remoción.

Finalmente, se propone la utilización de *A. schindleri* en la remoción y recuperación de teluro desde pilas mineras o tranques de relave, considerando sus usos posteriores. Recordando que el teluro asociado a distintos metales es capaz de mejorar las características eléctricas y ópticas de estos. Asimismo, en su forma trivalente, telurito, posee propiedades ópticas, eléctricas y piezoeléctricas que lo vuelven comercialmente atractivo, considerando su escasa presencia en la corteza terrestre. Adicionalmente, el 40% del teluro a nivel mundial es utilizado exclusivamente para la construcción de paneles fotovoltaicos.

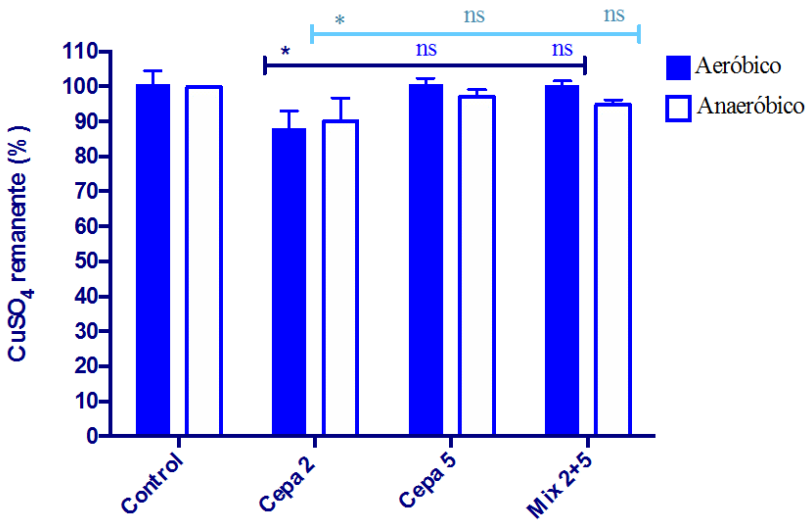
ANEXOS

μ (h^{-1})	SV.1	SV.2	SV.3 aeróbico	SV.3 anaeróbico
S. Sciuri	0,47 ± 0,1	0,51 ± 0,09	0,37 ± 0,01	0,80 ± 0,14
A. Schindleri	0,43 ± 0,06	0,47 ± 0,08	0,53 ± 0,03	1,02 ± 0,04
E. coli	0,39 ± 0,09	0,45 ± 0,05	0,78 ± 0,38	1,60 ± 0,58

Anexo 1. **Tasas de crecimiento en los distintos medios SV.**

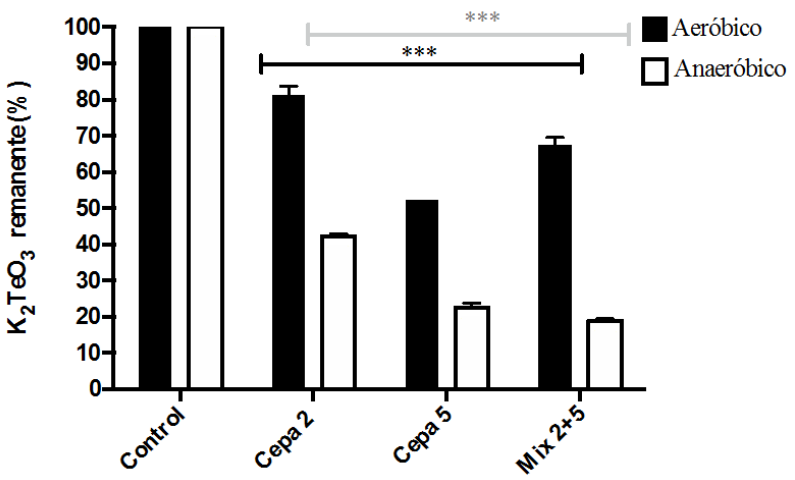
Valores calculados considerando la fase exponencial de cada cepa. Se observa una mejora en el crecimiento en el medio SV.2 respecto a la versión previa. Por otro lado, se observa una disminución del crecimiento para *S. sciuri* en el medio SV.3 respecto a las versiones anteriores.

Se observa un aumento de la tasa de crecimiento en condiciones anaeróbicas al utilizar el medio SV.3. Los datos corresponden al promedio de tres replicas técnicas para cada cepa, con su desviación estándar correspondiente.



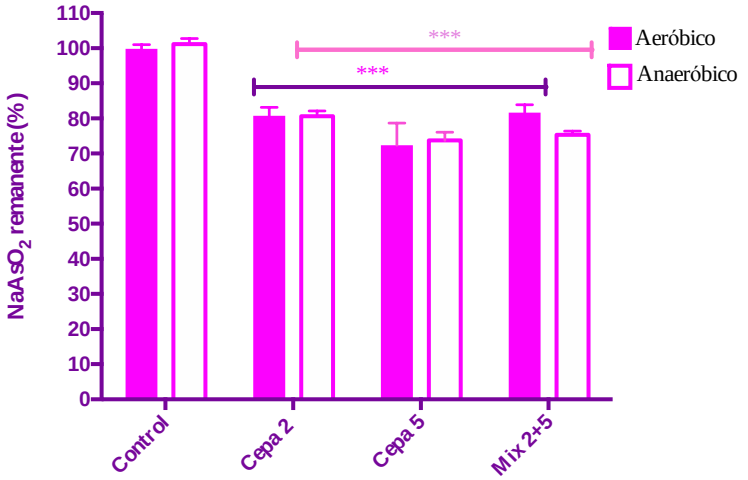
Anexo 2. Análisis estadístico complementario de la remoción de cobre.

El corchete color azul considera las barras asociadas a la remoción aeróbica, mientras que el corchete celeste considera las barras asociadas a la remoción anaeróbica. En este caso, sólo la remoción por la cepa 2 es significativa respecto al control, en ambas condiciones experimentales. Las barras representan el promedio de 3 ensayos independientes ± la desviación estándar. *, indica diferencia estadísticamente significativa ($p<0,05$), ** ($p<0,01$), *** ($p<0,001$) y ns, (no significativo).



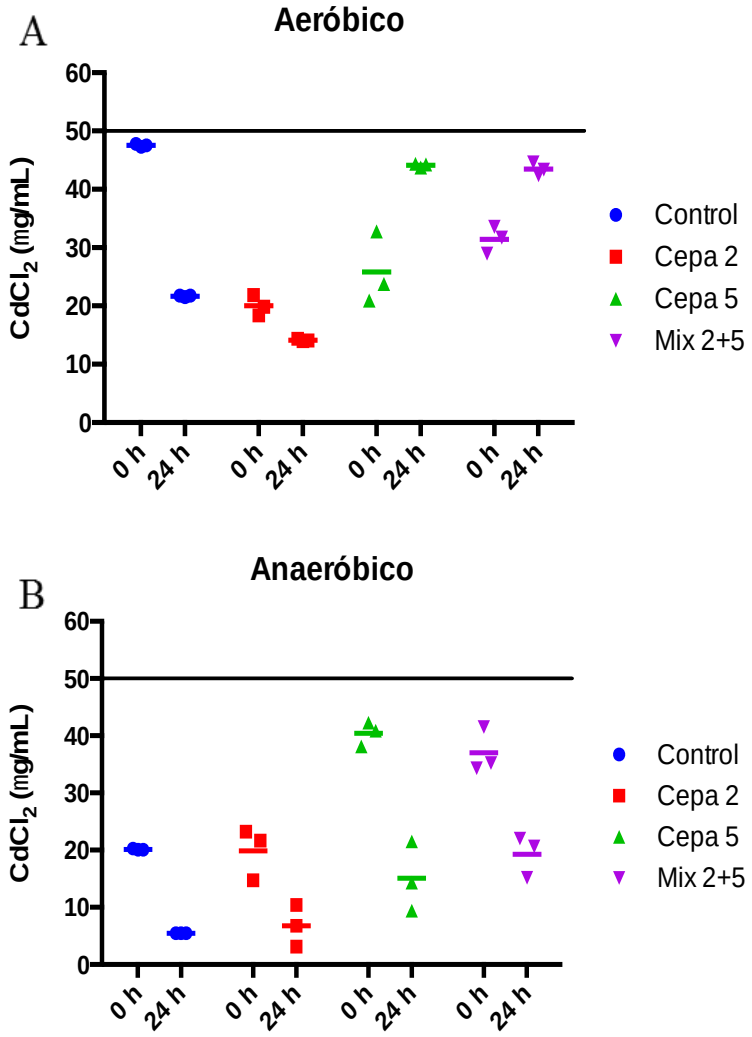
Anexo 3. Análisis estadístico complementario de la remoción de telurito.

El corchete color negro considera las barras asociadas a la remoción aeróbica, mientras que el corchete gris considera las barras asociadas a la remoción anaeróbica. En ambas condiciones experimentales, la remoción es significativa respecto de su control correspondiente. Las barras representan el promedio de 3 ensayos independientes ± la desviación estándar. *, indica diferencia estadísticamente significativa (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001) y ns, (no significativo).

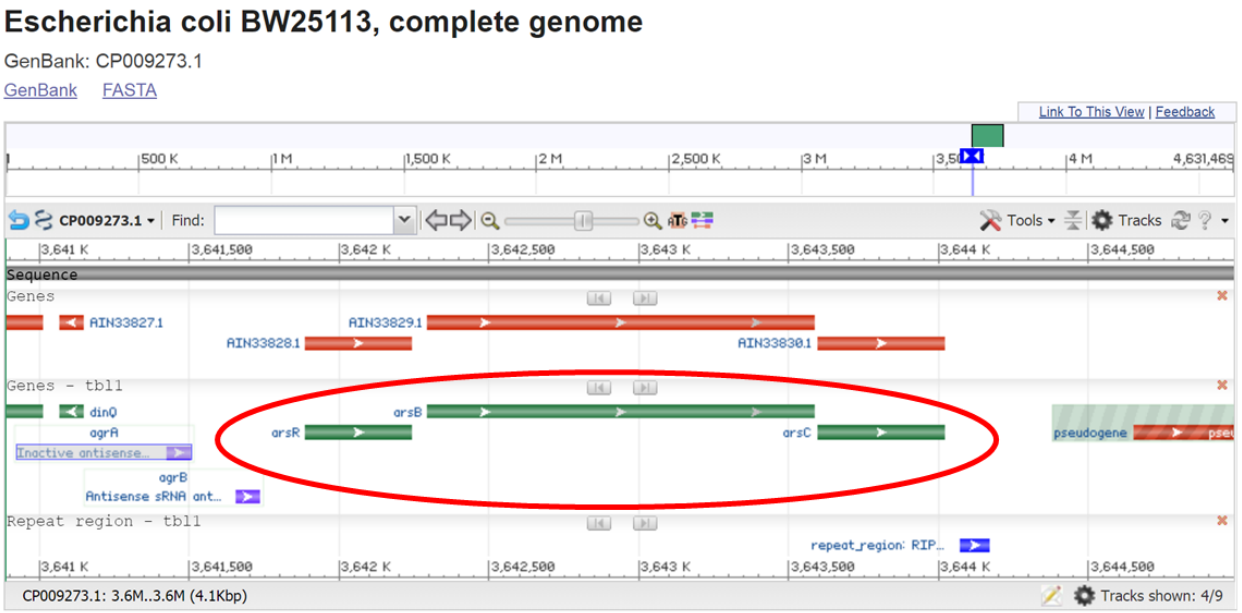


Anexo 4. Análisis estadístico complementario de la remoción de arsenito.

El corchete color morado considera las barras asociadas a la remoción aeróbica, mientras que el corchete rosa considera las barras asociadas a la remoción anaeróbica. En ambas condiciones experimentales, la remoción es significativa respecto de su control correspondiente. Las barras representan el promedio de 3 ensayos independientes ± la desviación estándar. *, indica diferencia estadísticamente significativa (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001) y ns, (no significativo).



Anexo 5. Datos crudos de la remoción de cadmio. A) Datos en concentración (µg/mL) de la remoción aeróbica de cadmio. B) Datos en concentración (µg/mL) de la remoción anaeróbica de cadmio. Se observa la concentración inicial (0 h) y final (24 h), de cultivos con las cepas independientes y la mezcla de cepas, crecido a 37 ºC por 24 h. La línea sólida, indica la concentración de cadmio inicial de todos los cultivos (50 µg/mL).



Anexo 6. Genes del operon Ars presente en *E. coli* BW25113.

En rojo se destaca la resencia de genes arsR, arsB y arsC, pertenecientes al operon Ars que confiere resistencia a arsenito y sus especies (arsenito y arseniato). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP009273.1?report=graph

BIBLIOGRAFÍA

Agarwal, S.K. (2009). Heavy Metal Pollution (New Delhi: APH Publishing).

Ager, F.J., Ynsa, M.D., Domínguez-Solís, J.R., Gotor, C., Respaldiza, M.A., and Romero, L.C. (2002). Cadmium localization and quantification in the plant Arabidopsis thaliana using micro-PIXE. Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms *189*, 494–498.

Aleluia, A.C.M., de Santana, F.A., Brandao, G.C., and Ferreira, S.L.C. (2017). Sequential determination of cadmium and lead in organic pharmaceutical formulations using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. Microchem. J. *130*, 157–161.

Alencar, F.L.S. de, Navoni, J.A., and do Amaral, V.S. (2017). The use of bacterial bioremediation of metals in aquatic environments in the twenty-first century: a systematic review. Environ. Sci. Pollut. Res. *24*, 16545–16559.

Aly, S.S., Imai, T., Hassouna, M.S., Kim Nguyen, D.M., Higuchi, T., Kanno, A., Yamamoto, K., Akada, R., and Sekine, M. (2017). Identification of factors that accelerate hydrogen production by Clostridium butyricum RAK25832 using casamino acids as a nitrogen source. Int. J. Hydrogen Energy 1–14.

APHA/AWWA/WEF (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Stand. Methods 541.

Arenas, F.A., Pugin, B., Henríquez, N.A., Arenas-Salinas, M.A., Díaz-Vásquez, W.A., Pozo, M.F., Muñoz, C.M., Chasteen, T.G., Pérez-Donoso, J.M., and Vásquez, C.C. (2014). Isolation, identification and characterization of highly tellurite-resistant, tellurite-reducing bacteria from Antarctica. Polar Sci. *8*, 40–52.

Aryal, M., Ziagova, M., and Liakopoulou-Kyriakides, M. (2010). Study on arsenic biosorption using Fe(III)-treated biomass of Staphylococcus xylosus. Chem. Eng. J. *162*, 178–185.

Aryal, M., Ziagova, M., and Liakopoulou-Kyriakides, M. (2011). Comparison of Cr(VI) and As(V) removal in single and binary mixtures with Fe(III)-treated Staphylococcus xylosus biomass: Thermodynamic studies. Chem. Eng. J. *169*, 100–106.

Asperger, O., and Kleber, H.-P. (1991). The Biology of Acinetobacter.

Balagurusamy, N. (2005). Biorremediación anaeróbica: Un potencial sin explotar. Rev. Mex. Ing. Química *4*, 273–287.

Balapure, K., Jain, K., Bhatt, N., and Madamwar, D. (2016). Exploring bioremediation strategies to enhance the mineralization of textile industrial wastewater through sequential anaerobic-microaerophilic process. Int. Biodeterior. Biodegrad. *106*, 97–105.

Banerjee, G., Pandey, S., Ray, A.K., and Kumar, R. (2015). Bioremediation of Heavy Metals by a Novel Bacterial Strain Enterobacter cloacae and Its Antioxidant Enzyme Activity, Flocculant Production, and Protein Expression in Presence of Lead, Cadmium, and Nickel. Water, Air, Soil Pollut. *226*, 91.

Barrett, J., and Mounir A. Malati (1998). Fundamentals of Inorganic Chemistry (England: Horwood Publishing Limited).

Bartrip, P.W.J. (1994). How Green was my Valance?: Environmental arsenic poisoning and the Victorian domestic ideal. Engl. Hist. Rev. *111*, 891–913.

Basnayake, R.S.T., Bius, J.H., Akpolat, O.M., and Chasteen, T.G. (2001). Production of dimethyl telluride and elemental tellurium by bacteria amended with tellurite or tellurate. Appl. Organomet. Chem. *15*, 499–510.

Begg, S.L., Eijkelkamp, B. a, Luo, Z., Couñago, R.M., Morey, J.R., Maher, M.J., Ong, C.-L.Y., McEwan, A.G., Kobe, B., O'Mara, M.L., et al. (2015). Dysregulation of transition metal ion homeostasis is the molecular basis for cadmium toxicity in Streptococcus pneumoniae. Nat. Commun. *6*, 6418.

Belzile, N., and Chen, Y.-W.W. (2015). Tellurium in the environment: A critical review focused on natural waters, soils, sediments and airborne particles. Appl. Geochemistry *63*, 83–92.

Bergogne-Bérézin, E., and Towner, K.J. (1996). Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: Microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin. Microbiol. Rev. *9*, 148–165.

Bhakta, J.N., Lahiri, S., Bhuiyna, F.A., Rokunuzzaaman, M., Ohonishi, K., Iwasaki, K., and Jana, B.B. (2017). Profiling of heavy metal(loid)-resistant bacterial community structure by

metagenomic-DNA fingerprinting using PCR–DGGE for monitoring and bioremediation of contaminated environment. Energy, Ecol. Environ.

Bolan, N.S., Adriano, D.C., Duraisamy, P., Mani, A., and Arulmozhiselvan, K. (2003). Immobilization and phytoavailability of cadmium in variable charge soils-1: Effect of phosphate addition. Plant Soil *250*, 83–94.

Bossert, I.D., and Young, L.Y. (1986). Anaerobic oxidation of p-cresol by a denitrifying bacterium. Appl. Environ. Microbiol. *52*, 1117–1122.

Bothast, R.J., and Saha, B.C. (1997). Advances in Applied Microbiology. In Advances in Applied Microbiology, A.I. Laskin, J.W. Bennett, and Geoffrey M. Gadd, eds. pp. 261–286.

Brayner, R., Barberousse, H., Hemadi, M., Djedjat, C., Yéprémian, C., Coradin, T., Livage, J., Fiévet, F., and Couté, A. (2007). Cyanobacteria as bioreactors for the synthesis of Au, Ag, Pd, and Pt nanoparticles via an enzyme-mediated route. J. Nanosci. Nanotechnol. *7*, 2696–2708.

Bren, A., Hart, Y., Dekel, E., Koster, D., and Alon, U. (2013). The last generation of bacterial growth in limiting nutrient. BMC Syst. Biol. *7*.

Brenner, K., You, L., and Arnold, F.H. (2008). Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. Trends Biotechnol. *26*, 483–489.

Burmølle, M., Webb, J.S., Rao, D., Hansen, L.H., Sørensen, S.J., and Kjelleberg, S. (2006). Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. Appl. Environ. Microbiol. *72*, 3916–3923.

Charerntanyarak, L. (1999). Heavy metals removal by chemical coagulation and precipitation. Water Sci. Technol. *39*, 135–138.

Chasteen, T.G., Fuentes, D.E., Tantaleán, J.C., and Vásquez, C.C. (2009). Tellurite: history, oxidative stress, and molecular mechanisms of resistance. FEMS Microbiol. Rev. *33*, 820–832.

Chillappagari, S., Seubert, A., Trip, H., Kuipers, O.P., Marahiel, M.A., and Miethke, M. (2010). Copper stress affects iron homeostasis by destabilizing iron-sulfur cluster formation in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. *192*, 2512–2524.

Cioffi, N., Rai, M., and Nicola Cioffi, M.R. (2012). Nano-Antimicrobials (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg).

Comisión Nacional del Medio Ambiente (2001). Norma Chilena Oficial Nº 1.333. J.P.G. C., ed. (Diario Oficial), pp. 1–10.

Crawford, R.L., and Crawford, D.L. (2005). Bioremediation: Principles and Applications (Idaho).

Cullen, W.R., and Reimer, K.J. (1989). Arsenic Speciation in the Environment. Chem. Rev. *89*, 713–764.

Culotta, V., and Scott, R. (2013). Metals in Cells (United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd).

Cunningham, D.P., and Lundie, L.L.J. (1993). Precipitation of cadmium by Clostridium thermoaceticum. Appl. Environ. Microbiol. *59*, 7–14.

Cuypers, A., Plusquin, M., Remans, T., Jozefczak, M., Keunen, E., Gielen, H., Opdenakker, K., Nair, A.R., Munters, E., Artois, T.J., et al. (2010). Cadmium stress: An oxidative challenge. BioMetals *23*, 927–940.

Eneh, O.C., and Owo, N.J. (2008). Sustainable development: A review. Int. J. Dev. Stud. *3(3)*, 100–103.

Ensley, B.D., and Finnerty, W.R. (1980). Influences of growth substrates and oxygen on the electron transport system in Acinetobacter sp. HO1-N. J. Bacteriol. *142*, 859–868.

EPA (2013). Introduction to in situ bioremediation of groundwater. Epa 542-R-13-018 1–86.

Esteve-Núñez, A., Rothermich, M., Sharma, M., and Lovley, D. (2005). Growth of Geobacter sulfurreducens under nutrient-limiting conditions in continuous culture. Environ. Microbiol. *7*, 641–648.

Fajans, K. (1951). General Chemistry. By Linus Pauling.

Figueroa, M., Fernandez, V., Arenas, M., Ahumada, D., Muñoz-Villagrán, C., Cornejo, F., Morales, E., Vásquez, C., and Arenas, F. (2018). Isolation and characterization of environmental multi-metal resistant and reducing bacterial: identification of flavoprotein-mediated metal reduction. Front. Microbiol. En revisión.

Fulekar, M.H. (2016). Removal of Heavy Metals by Indigenous Microorganisms and Identification of Gene Responsible for Remediation. 1–8.

Gehring, A.G., Paoli, G.C., Reed, S.A., Tu, S.I., and Lindsay, J.A. (2014). Casamino Acids and Oxyrase enhance growth of Listeria monocytogenes in multi-pathogen enrichments. Food Control *40*, 93–99.

Ghosh, M., and Singh, S.P. (2005). A Review on Phytoremediation of Heavy Metals and Utilization of It's by Products. As. J. Energy Env *6*, 214–231.

Gómez-Ariza, J.L., Sánchez-Rodas, D., Giráldez, I., and Morales, E. (2000). A comparison between ICP-MS and AFS detection for arsenic speciation in environmental samples. Talanta *51*, 257–268.

Grehn, M., and Von Graevenitz, A. (1978). Search for Acinetobacter calcoaceticus subsp. anitratus: enrichment of fecal samples. J. Clin. Microbiol. *8*, 342–343.

Grenier, F., and Matteau, D. (2014). Complete genome sequence of Escherichia coli BW25113. Genome … *2*, 90005.

Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution (1987). Report of the seventeenth session. 48.

Gupta, A., and Joia, J. (2016). Microbes as Potential Tool for Remediation of Heavy Metals: A Review. J. Microb. Biochem. Technol. *8*, 364–372.

Hays, S.G., Patrick, W.G., Ziesack, M., Oxman, N., and Silver, P.A. (2015). Better together: engineering and application of microbial symbioses. Curr. Opin. Biotechnol. *36*, 40–49.

Hirner, A. V, and Hendrik Emons (2004). Organic Metal and Metalloid Species in the Environment.

Ilhan, S., Nourbakhsh, M.N., Kiliçarslan, S., Ozdag, H., Nourbaksh, M., Kilicarslan, S., and Ozdag, H. (2004). Removal of chromium, lead and copper ions from industrial waste waters by Staphylococcus saprophyticus. Turkish Electron. J. Biotechnol. *2*, 50–57.

Inoue, Y., Date, Y., Sakai, T., Shimizu, N., Yoshida, K., Chen, H., Koruda, K., and Endo, G.

(1999). Identification and Quantification by LC-MS and LC-ICP MS of Arsenic Species in Urine of Rats Chronically Exposed to Dimethylarsinic Acid (DMAA). Appl. Organomet. Chem. *88*, 81–88.

Instituto Nacional de Normalización (1984). Normas oficiales para la calidad del agua Chile. 1–10.

Irawati, W., Yuwono, T., and Rusli, A. (2016). Detection of plasmids and curing analysis in copper resistant bacteria Acinetobacter sp. IrC1, Acinetobacter sp. IrC2, and Cupriavidus sp. IrC4. Biodiversitas, J. Biol. Divers. *17*, 296–300.

Jacobo-Estrada, T., Cardenas-Gonzalez, M., Santoyo-Sánchez, M., Parada-Cruz, B., Uria-Galicia, E., Arreola-Mendoza, L., and Barbier, O. (2016). Evaluation of kidney injury biomarkers in rat amniotic fluid after gestational exposure to cadmium. J. Appl. Toxicol. *36*, 1183–1193.

Jacques, R.J.S., Okeke, B.C., Bento, F.M., Teixeira, A.S., Peralba, M.C.R., and Camargo, F.A.O. (2008). Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. Bioresour. Technol. *99*, 2637–2643.

Jankiewicz, B., Ptaszynski, B., and Wieczorek, M. (2000). Spectrophotometric determination of cadmium (II) in soil of allotment gardens in Lodz. Polish J. Environ. Stud. *9*, 83–86.

Kabata-pendias, A. (2011). Trace Elements in Soils and Plants (New York: CRC Press).

Karn, S.K., and Pan, X. (2016). Role of Acinetobacter sp. in arsenite As(III) oxidation and reducing its mobility in soil. Chem. Ecol. *32*, 460–471.

Kaur, A., and Sharma, S. (2017). Removal of Heavy Metals from Waste Water by using Various Adsorbents- A Review. Indian J. Sci. Technol. *10*, 1–14.

Kede, M.L. uiza F.M., Correia, F. V., Conceição, P.F., Junior, S.F.S., Marques, M., Moreira, J.C., and Pérez, D. V. (2014). Evaluation of mobility, bioavailability and toxicity of Pb and Cd in contaminated soil using TCLP, BCR and earthworms. Int. J. Environ. Res. Public Health *11*, 11528–11540.

Kensa, V. (2011). Bioremediation - An overview. J. Ind. Pollut. Control *27*, 161–168.

Kim, S.U., Cheong, Y.H., Seo, D.C., Hur, J.S., Heo, J.S., and Cho, J.S. (2007). Characterisation of heavy metal tolerance and biosorption capacity of bacterium strain CPB4 (Bacillus spp.). Water Sci. Technol. *55*, 105.

Kim, S.U., Owens, V.N., Kim, Y.G., Lee, S.M., Park, H.C., Kim, K.K., Son, H.J., and Hong, C.O. (2015). Effect of Phosphate Addition on Cadmium Precipitation and Adsorption in Contaminated Arable Soil with a Low Concentration of Cadmium. Bull. Environ. Contam. Toxicol. *95*, 675–679.

Kirby, J., and Maher, W. (2002). Measurement of water-soluble arsenic species in freeze-dried marine animal tissues by microwave-assisted extraction and HPLC-ICP-MS. J. Anal. At. Spectrom. *17*, 838–843.

Koc, S., Kabatas, B., and Icgen, B. (2013). Multidrug and heavy metal-resistant Raoultella planticola isolated from surface water. Bull. Environ. Contam. Toxicol. *91*, 177–183.

Kundu, S., Ghosh, S.K., Mandal, M., Pal, T., and Pal, A. (2002). Spectrophotometric determination of arsenic via arsine generation and in-situ colour bleaching of methylene blue (MB) in micellar medium. Talanta *58*, 935–942.

Kuo, C., and Jiang, S. (2008). Determination of selenium and tellurium compounds in biological samples by ion chromatography dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry. J. Chromatogr. A *1181*, 60–66.

LaPara, T.M., Zakharova, T., Nakatsu, C.H., and Konopka, A. (2002). Functional and structural adaptations of bacterial communities growing on particulate substrates under stringent nutrient limitation. Microb. Ecol. *44*, 317–326.

Lemire, J.A., Harrison, J.J., and Turner, R.J. (2013). Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. Nat. Rev. Microbiol. *11*, 371–384.

Lin, Z.H., Lee, C.H., Chang, H.Y., and Chang, H.T. (2012). Antibacterial activities of tellurium nanomaterials. Chem. - An Asian J. *7*, 930–934.

Llorens-Blanch, G., Parladé, E., Martinez-Alonso, M., Gaju, N., Caminal, G., and Blánquez, P. (2017). A comparison between biostimulation and bioaugmentation in a solid treatment of

anaerobic sludge: Drug content and microbial evaluation. Waste Manag.

Lloyd, J.R. (2003). Microbial reduction of metals and radionuclides. FEMS Microbiol. Rev. *27*, 411–425.

Lloyd, J.R., and Lovley, D.R. (2001). Microbial detoxification of metals and radionuclides. Curr. Opin. Biotechnol. *12*, 248–253.

Lo-Coco, F., Avvisati, G., Vignetti, M., Thiede, C., Orlando, S.M., Iacobelli, S., Ferrara, F., Fazi, P., Cicconi, L., Di Bona, E., et al. (1977). ARSENIC: Medical and Biologic Effects of Environmental Pollutants.

Malik, A. (2004). Metal bioremediation through growing cells. Environ. Int. *30*, 261–278.

Mandal, B. (2002). Arsenic round the world: a review. Talanta *58*, 201–235.

Mishra, S., Jyot, J., Kuhad, R.C., and Lal, B. (2001). In Situ Bioremediation Potential of an Oily Sludge-Degrading Bacterial Consortium. Curr. Microbiol. *43*, 328–335.

Molina, R.C., Burra, R., Pérez-Donoso, J.M., Elías, A.O., Muñoz, C., Montes, R. a, Chasteen, T.G., and Vásquez, C.C. (2010). Simple, fast, and sensitive method for quantification of tellurite in culture media. Appl. Environ. Microbiol. *76*, 4901–4904.

Monteiro Bramante, C., Demarchi, A.C.C.O., de Moraes, I.G., Bernadineli, N., Garcia, R.B., Spångberg, L.S.W., and Duarte, M.A.H. (2008). Presence of arsenic in different types of MTA and white and gray Portland cement. Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology *106*, 909–913.

Montes, G.H.- (2012). Evolution and diversity of periplasmic proteins involved in copper homeostasis in gamma proteobacteria Evolution and diversity of periplasmic proteins involved in copper homeostasis in gamma proteobacteria.

Morales, E.H., Pinto, C.A., Luraschi, R., Muñoz-Villagrán, C.M., Cornejo, F.A., Simpkins, S.W., Nelson, J., Arenas, F.A., Piotrowski, J.S., Myers, C.L., et al. (2017). Accumulation of heme biosynthetic intermediates contributes to the antibacterial action of the metalloid tellurite. Nat. Commun. *8*.

Mueller, J.H.J., and Johnson, E.R.E. (1941). Acid hydrolysates of casein to replace peptone in the preparation of bacteriological media. J. Immunol. *40*, 33–38.

Mukhopadhyay, R., Rosen, B.P., Phung, L.T., and Silver, S. (2002). Microbial arsenic: From geocycles to genes and enzymes. FEMS Microbiol. Rev. *26*, 311–325.

Nakajima, A., Yasuda, M., Yokoyama, H., Ohya-Nishiguchi, H., and Kamada, H. (2001). Copper biosorption by chemically treated Micrococcus luteus cells. World J. Microbiol. Biotechnol. *17*, 343–347.

Narayana, B., Cherian, T., Mathew, M., and Pasha, C. (2006). Spectrophotometric determination of arsenic in environmental and biological samples. Indian J. Chem. Technol. *13*, 36–40.

Nazari, Z., Taher, M.A., and Fazelirad, H. (2017). A Zn based metal organic framework nanocomposite: synthesis, characterization and application for preconcentration of cadmium prior to its determination by FAAS. RSC Adv. *7*, 44890–44895.

Neff, J.M. (1997). Ecotoxicology of arsenic in the marine environment. Environ. Toxicol. Chem. *16*, 917–927.

Neidhardt, F.C., Bloch, P.L., and Smith, D.F. (1974). Culture Medium for Enterobacteria Culture Medium for Enterobacteria. J Bacteriol *119*, 736–747.

Nemec, A., Baere, T. De, Tjernberg, I., Vaneechoutte, M., Reijden, T.J.K. Van Der, and Dijkshoorn, L. (2001). Acinetobacter schindleri sp . nov ., isolated from human clinical specimens within the genus Acinetobacter , designated phenon 1 and phenon 2 , was new genomic species . Furthermore , 16S rRNA gene sequence analysis of three. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *51*, 1891–1899.

Nolan, R.A. (1971). Amino Acids and Growth Factors in Vitamin-Free Casamino Acids. *63*, 1231–1234.

Nolan, R. a, and Nolan, W.G. (1972). Elemental analysis of vitamin-free casamino acids. Appl. Microbiol. *24*, 290–291.

O'Day, P.A. (2006). Chemistry and mineralogy of arsenic. Elements *2*, 77–83.

Ollivier, P.R.L., Bahrou, A.S., Marcus, S., Cox, T., Church, T.M., and Hanson, T.E. (2008). Volatilization and precipitation of tellurium by aerobic, tellurite-resistant marine microbes. Appl. Environ. Microbiol. *74*, 7163–7173.

Olmedo, P., Pla, A., Hernández, A.F., López-Guarnido, O., Rodrigo, L., and Gil, F. (2010). Validation of a method to quantify chromium, cadmium, manganese, nickel and lead in human whole blood, urine, saliva and hair samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. Anal. Chim. Acta *659*, 60–67.

Oremland, R.S., and Stolz, J.F. (2003). The ecology of Arsenic. Biologist *50*, 63–68.

Owens, J.D., and Keddie, R.M. (1969). The nitrogen nutrition of soil and herbage bacteria. J. Appl. Bacteriol. *32*, 338.

Pandurangappa, M., and Kumar, K.S. (2012). Trace Level Arsenic Quantification through Methyl Red Bromination. Am. J. Anal. Chem. *3*, 455–461.

Panteli, V.S., Kanellopoulou, D.G., Gartaganis, S.P., and Koutsoukos, P.G. (2009). Application of anodic stripping voltammetry for zinc, copper, and cadmium quantification in the aqueous humor: Implications of pseudoexfoliation syndrome. Biol. Trace Elem. Res. *132*, 9–18.

Park, J.H., Lamb, D., Paneerselvam, P., Choppala, G., Bolan, N., and Chung, J.W. (2011). Role of organic amendments on enhanced bioremediation of heavy metal(loid) contaminated soils. J. Hazard. Mater. *185*, 549–574.

Pérez-De-Mora, A., Burgos, P., Madejón, E., Cabrera, F., Jaeckel, P., and Schloter, M. (2006). Microbial community structure and function in a soil contaminated by heavy metals: Effects of plant growth and different amendments. Soil Biol. Biochem. *38*, 327–341.

Pogaku, P., Suresh, a., Srinivas, P., and Reddy, S.R. (2010). Optimization of lipase production by Staphylococcus sp. Lp12. African J. Biotechnol. *9*, 882–886.

Pozzatti, M., Nakadi, F. V., Vale, M.G.R., and Welz, B. (2017). Simultaneous determination of nickel and iron in vegetables of Solanaceae family using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sample analysis. Microchem. J. *133*, 162–167.

Ramadan, S.E., Razak, A.A., Ragab, A.M., and El-Meleigy, M. (1989). Incorporation of tellurium into amino acids and proteins in a tellurium-tolerant fungi. Biol. Trace Elem. Res. *20*, 225–232.

Ramirez, M., Massolo, S., Frache, R., and Correa, J.A. (2005). Metal speciation and environmental impact on sandy beaches due to El Salvador copper mine, Chile. Mar. Pollut. Bull. *50*, 62–72.

Rapisarda, V.A., Montelongo, L.R., Farías, R.N., and Massa, E.M. (1999). Characterization of an NADH-linked cupric reductase activity from the Escherichia coli respiratory chain. Arch. Biochem. Biophys. *370*, 143–150.

Rapisarda, V.A., Volentini, S.I., Farías, R.N., and Massa, E.M. (2002). Quenching of bathocuproine disulfonate fluorescence by Cu(I) as a basis for copper quantification. Anal. Biochem. *307*, 105–109.

Rizvi, F.Z., Kanwal, W., and Faisal, M. (2016). Chromate-reducing profile of bacterial strains isolated from industrial effluents. Polish J. Environ. Stud. *25*, 2121–2128.

Robidillo, C.J.T., Villarante, N.R., and Trinidad, L.C. (2013). Biosorption of copper (II) by live biomasses of two indigenous bacteria isolated from copper-contaminated water. Philipp. Sci. Lett. 356–371.

Robinson, N.J., Gupta, A., Fordham-Skelton, A.P., Croy, R.R.D., Whitton, B.A., and Huckle, J.W. (1990). Prokaryotic Metallothionein Gene Characterization and Expression: Chromosome Crawling by Ligation-Mediated PCR. Proc. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci. *242*, 241–247.

Robles-González, I. V., Fava, F., and Poggi-Varaldo, H.M. (2008). A review on slurry bioreactors for bioremediation of soils and sediments. Microb. Cell Fact. *7*, 1–16.

Roy, K. De, Marzorati, M., Van den Abbeele, P., Van de Wiele, T., and Boon, N. (2014). Synthetic microbial ecosystems: an exciting tool to understand and apply microbial communities. Environ. Microbiol. *16*, 1472–1481.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T.M. (1989). Protocol 20: Dephosphorylation of Plasmid DNA. Mol. Cloning A Lab. Man. 1.93-1.97.

Sandhya, S., Padmavathy, S., Swaminathan, K., Subrahmanyam, Y. V., and Kaul, S.N. (2005). Microaerophilic-aerobic sequential batch reactor for treatment of azo dyes containing simulated wastewater. Process Biochem. *40*, 885–890.

Satyapal, G.K., and Rani, S. (2016). Potential Role of Arsenic Resistant Bacteria in Bioremediation: Current Status and Future Prospects. J. Microb. Biochem. Technol. *8*, 256–258.

Seiler, C., and Berendonk, T.U. (2012). Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. Front. Microbiol. *3*, 1–10.

Serrano, J., and Leiva, E. (2017). Removal of Arsenic Using Acid/Metal-Tolerant Sulfate Reducing Bacteria: A New Approach for Bioremediation of High-Arsenic Acid Mine Waters. Water *9*, 994.

Servicio Agrícola y Ganadero (2005). Criterios de Calidad de Suelos y Aguas de Riego.

Sharma, A. (2013). Role of microbes as cleaning degrading industrial wastes for environmental. Recent Res. Sci. Technol. *5*, 21–25.

Shrivastava, A.K. (2009). A review on copper pollution and its removal from water bodies by pollution control technologies. Indian J. Environ. Prot. *29*, 552–560.

Shukor, M.Y., Rahman, M.F., Suhaili, Z., Shamaan, N.A., and Syed, M.A. (2010). Hexavalent molybdenum reduction to Mo-blue by Acinetobacter calcoaceticus. Folia Microbiol. (Praha). *55*, 137–143.

Sigala, J.C., Suárez, B.P., Lara, A.R., Borgne, S. Le, Bustos, P., Santamaría, R.I., González, V., and Martinez, A. (2017). Genomic and physiological characterization of a laboratory-isolated Acinetobacter schindleri ACE strain that quickly and efficiently catabolizes acetate. Microbiol. (United Kingdom) *163*, 1052–1064.

Singh, H. (2006). Mycoremediation: Fungal Bioremediation.

Singh, R., and Gautam, N. (2011). Heavy metals and living systems: An overview. Indian J. Pharmacol. *43*, 246.

Singh, A., Kuhad, R.C., and Ward, O.P. (2009). Advances in Applied Bioremediation (Berlin,

Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg).

Sitthisak, S., Knutsson, L., Webb, J.W., and Jayaswal, R.K. (2007). Molecular characterization of the copper transport system in Staphylococcus aureus. Microbiology *153*, 4274–4283.

Song, H., Ding, M.-Z., Jia, X.-Q., Ma, Q., and Yuan, Y.-J. (2014). Synthetic microbial consortia: from systematic analysis to construction and applications. Chem. Soc. Rev. *43*, 6954–6981.

Srivastava, S., Verma, P.C., Chaudhry, V., Singh, N., Abhilash, P.C., Kumar, K. V., Sharma, N., and Singh, N. (2013). Influence of inoculation of arsenic-resistant Staphylococcus arlettae on growth and arsenic uptake in Brassica juncea (L.) Czern. Var. R-46. J. Hazard. Mater. *262*, 1039–1047.

Sweeney, R.Y., Mao, C., Gao, X., Burt, J.L., Belcher, A.M., Georgiou, G., and Iverson, B.L. (2004). Bacterial Biosynthesis of Cadmium Sulfide Nanocrystals. Chem. Biol. *11*, 1553–1559.

Taylor & Francis Group, L.C. (2017). Handbook of Metal-Microbe Interactions and Bioremediation (CRC Press).

Tchounwou, P.B., and Yedjou, C.G. (2012). Heavy Metal Toxicity and the Environment. Nih *100*, 133–164.

Thakkar, K.N., Mhatre, S.S., and Parikh, R.Y. (2010). Biological synthesis of metallic nanoparticles. Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. *6*, 257–262.

Turner, R.J., Aharonowitz, Y., Weiner, J.H., and Taylor, D.E. (2001). Glutathione is a target in tellurite toxicity and is protected by tellurite resistance determinants in Escherichia coli. Can. J. Microbiol. *47*, 33–40.

Vidal, F. V., and Vidal, V.M.V. (1980). Arsenic metabolism in marine bacteria and yeast. Mar. Biol. *60*, 1–7.

Viñas, P., López-García, I., Merino-Meroño, B., and Hernández-Córdoba, M. (2005). Ion chromatography-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry speciation of tellurium. Appl. Organomet. Chem. *19*, 930–934.

Volentini, S.I., Farías, R.N., Rodríguez-Montelongo, L., and Rapisarda, V.A. (2011). Cu(II)-

reduction by Escherichia coli cells is dependent on respiratory chain components. BioMetals *24*, 827–835.

Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., and Beyersmann, D. (2003). Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. Toxicology *192*, 95–117.

Wang, C.L., Lum, A.M., Ozuna, S.C., Clark, D.S., and Keasling, J.D. (2001). Aerobic sulfide production and cadmium precipitation by Escherichia coli expressing the Treponema denticola cysteine desulfhydrase gene. Appl. Microbiol. Biotechnol. *56*, 425–430.

Wang, X., Liu, G., Zhou, J., Wang, J., Jin, R., and Lv, H. (2011). Quinone-mediated reduction of selenite and tellurite by Escherichia coli. Bioresour. Technol. *102*, 3268–3271.

Wang, X.S., Li, Y., Huang, L.P., and Chen, J. (2010). Adsorption of Cr(VI) from Aqueous Solutions by Staphylococcus aureus Biomass. CLEAN - Soil, Air, Water *38*, 500–505.

Weber, K.A., Achenbach, L.A., and Coates, J.D. (2006). Microorganisms pumping iron: Anaerobic microbial iron oxidation and reduction. Nat. Rev. Microbiol. *4*, 752–764.

WHO (1996). Trace elements in human nutrition and health World Health Organization. World Heal. Organ. 1–360.

Widy-Tyszkiewicz, E., Piechal, A., Gajkowska, B., and Śmiałek, M. (2002). Tellurium-induced cognitive deficits in rats are related to neuropathological changes in the central nervous system. Toxicol. Lett. *131*, 203–214.

Wiegand, I., Hilpert, K., and Hancock, R.E.W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nat. Protoc. *3*, 163–175.

Williams, C.L., Neu, H.M., Gilbreath, J.J., Michel, S.L.J., Zurawski, D. V., and Merrell, D.S. (2016). Copper resistance of the emerging pathogen Acinetobacter baumannii. Appl. Environ. Microbiol. *82*, 6174–6188.

Wintermute, E.H., and Silver, P. a (2010). Dynamics in the mixed microbial concourse. Genes Dev. *24*, 2603–2614.

Wong, J.W.C., Lai, K.M., Wan, C.K., and Fang, M. (2002). Isolation and optimization of PAH-degradative bacteria from contaminated soil for PAHs bioremediation. Water. Air. Soil Pollut. *139*, 1–13.

Yusof, N., Hassan, M.A., Phang, L.Y., Tabatabaei, M., Othman, M.R., Mori, M., Wakisaka, M., Sakai, K., and Shirai, Y. (2010). Nitrification of ammonium-rich sanitary landfill leachate. Waste Manag. *30*, 100–109.