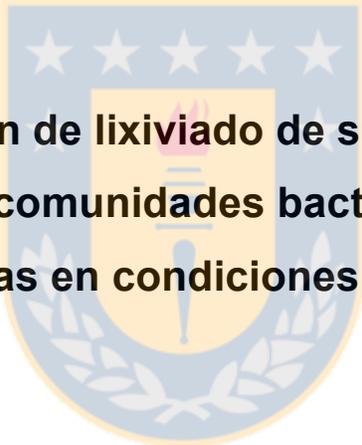




Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Programa de Magíster en Ciencias mención Microbiología



**Biotransformación de lixiviado de suelo impactado con  
roxarsona por comunidades bacterianas de aguas  
subterráneas en condiciones anaeróbicas.**

SANTIAGO XAVIER MAFLA ANDRADE  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2013

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

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

Profesor Tutor:

---

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

Profesor Co-Tutor:

---

Dra. María Angélica Mondaca Jara  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

---

Dr. Carlos González Correa  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

---

Dr. Roberto Urrutia Pérez  
Centro EULA  
Universidad de Concepción

Directora de Programa (s):

---

Dra. Mariana Domínguez Yévenes  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

## AGRADECIMIENTOS

Primeramente doy gracias a Dios por darme la oportunidad de desarrollarme profesional y personalmente.

A mis padres por todo el cariño, amor y esfuerzo que me han demostrado durante todos estos años. A mi hermano por su preocupación y ánimos que cada día me ha demostrado. A mi familia y amigos en Ecuador que a pesar de la distancia su afecto y preocupación han estado presentes para seguir cumpliendo mis sueños.

Agradezco también a mi tutor de tesis el Doctor Víctor Campos en el cual encontré más que un profesor, un amigo y guía, que con su apoyo conocimientos y consejos han logrado que pueda exceder mis límites y encaminarme en esta etapa como investigador y ser humano.

A mi co-tutora la Doctora María Angélica Mondaca que con su carisma y profesionalismo puso desde un comienzo la confianza en mi persona para poder culminar con éxito la etapa de Magister.

A los amigos de laboratorio, Iris, Carla Daza, Carla León, Guísela, Pablo, Víctor, Rodrigo, Benner y Luis que han hecho que los días en de trabajo en el laboratorio sean amenos y el trabajo no se vuelva una carga sino una diversión.

A mis compañeros y profesores del Magister por las charlas, convivencias y preocupaciones que hemos pasado logrando entre todos un grupo profesional humano de excelencia.

Finalmente agradezco al gobierno de Ecuador y su programa de becas Senescyt 2011, por apostar en el talento humano que posee mi país y en un futuro cercano poder desarrollarnos científica y tecnológicamente como país.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	XII
ABSTRACT .....	XIV
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 ROXARSONA Y SU USO EN LA PRODUCCIÓN AVÍCOLA .....	3
1.2 ROXARSONA Y SU PROBLEMÁTICA AMBIENTAL.....	4
1.3 LIXIVIACIÓN DE ROXARSONA.....	7
1.4 COMPONENTES DEL ARSÉNICO EN EL AMBIENTE.....	8
1.5 AS INORGÁNICO .....	9
1.6 AS ORGÁNICO.....	11
1.7 EFECTOS TÓXICOS DEL ARSÉNICO .....	12
1.8 BACTERIAS ARSÉNICO RESISTENTES .....	14
1.9 HIPÓTESIS DE TRABAJO .....	15
1.10 OBJETIVO GENERAL.....	16
1.11 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	17
2.1 TOMA DE MUESTRA.....	17
2.2 EXPERIMENTO DE MICROCOSMOS Y TRANSFORMACIÓN DEL LIXIVIADO DE SUELO, POR BACTERIAS DE AGUAS DE POZO.....	17
2.3 EVALUACIÓN DE LA TRANSFORMACIÓN DE ROXARSONA Y LIXIVIADO EN AMBIENTES ANAERÓBICOS .....	19
2.3.1 Detección y cuantificación de roxarsona .....	21
2.3.2 Determinación de arsénico total, arsenito y arseniato por Espectrofotometría de Absorción Atómica (AAS).....	21
2.4 DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD.....	22
2.4.1 Detección de la actividad tóxica de roxarsona y compuestos derivados de la biotransformación.....	22
2.4.2 Detección de la actividad tóxica de roxarsona y compuestos derivados de la biotransformación en células HUVECs.....	24

2.5	CARACTERIZACIÓN DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS DE AGUAS SUBTERRÁNEAS.	
	25	
2.5.1	Caracterización metabólica.....	25
2.5.2	Caracterización molecular .....	26
2.5.3	Amplificación del gen ADNr 16S.....	27
2.5.4	Electroforesis en gel con gradiente denaturante (DGGE).....	28
2.5.4	Electroforesis en gel de agarosa .....	31
3.	RESULTADOS .....	33
3.1	EVALUACIÓN DE LA TRANSFORMACIÓN DE ROXARSONA Y LIXIVIADO EN AMBIENTES ANAERÓBICOS .....	33
3.2	ANÁLISIS DE TRANSFORMACIÓN DE ROXARSONA Y ESPECIES ARSENICALES INORGÁNICAS POR HPLC.....	42
3.2.1	Detección y cuantificación de roxarsona .....	42
3.2.2	Determinación de arsénico total, arsenito y arseniato por Espectrofotometría de Absorción Atómica (AAS).....	43
3.3	DETERMINACIÓN DE TOXICIDAD .....	44
3.3.1	Detección de tóxicidad de roxarsona y compuestos derivados de la biotransformación. ....	44
3.3.2	Detección de la toxicidad de roxarsona y compuestos derivados de la biotransformación en células HUVEC. ....	50
3.4	CARACTERIZACIÓN DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS DE AGUAS SUBTERRÁNEAS	
	51	
3.4.1	Caracterización metabólica.....	51
3.4.2	Caracterización Molecular .....	57
	.....	60
4.	DISCUSIÓN.....	65
4.1	EVALUACIÓN POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE LA TRANSFORMACIÓN DE ROXARSONA Y LIXIVIADO EN AMBIENTES ANAERÓBICOS. ....	65

4.2 ANÁLISIS DE TRANSFORMACIÓN DE ROXARSONA Y ESPECIES ARSENICALES POR HPLC .....	69
4.2.1 Detección y cuantificación de roxarsona .....	69
4.2.2 Determinación de arsénico total, arsenito y arseniato por Espectrofotometría de Absorción Atómica (AAS).....	71
4.3 DETERMINACIÓN DE TOXICIDAD .....	72
4.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS DE AGUAS SUBTERRÁNEAS	74
4.4.2 Caracterización Molecular .....	77
5. CONCLUSIONES .....	80
6. PROYECCIONES .....	81
7. BIBLIOGRAFÍA.....	82



Figura 1. Esquema de los ensayos realizados.....	19
Figura 2. Porcentaje de roxarsona transformada en los microcosmos A (Control abiótico), B (Bacterias de suelo-estiércol), C (Bacterias de suelo), D(bacterias de estiércol).....	33
Figura 3. Porcentaje de roxarsona transformada por bacterias del microcosmo A3 (contiene roxarsona lixiviada de la columna A en agua de pozo con bacterias) durante 5, 10, 15 y 20 días.....	34
Figura 4. Porcentaje de roxarsona transformada por bacterias del microcosmo B2 (contiene lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias) durante 5, 10, 15 y 20 días.....	35

Figura 5. Porcentaje de roxarsona transformada por bacterias del microcosmo B3 (contiene lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de estiércol y suelo) durante 5, 10, 15 y 20 días.....	36
Figura 6. Porcentaje de roxarsona transformada por bacterias del microcosmo B4 (contiene lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo, estiércol y agua de pozo) durante 5, 10, 15 y 20 días.....	36
Figura 7. Porcentaje de roxarsona transformada por las bacterias presentes en el microcosmo C2 (lixiviado de la columna C en agua de pozo con bacterias de suelo) durante 5, 10, 15 y 20 días.....	37
Figura 8. Porcentaje de roxarsona transformada por bacterias del microcosmo C3 (bacterias de suelo) durante 5, 10, 15 y 20 días.....	38
Figura 9. Porcentaje de roxarsona transformada por bacterias presentes en el microcosmo C4 (bacterias de suelo y agua de pozo) durante 5, 10, 15 y 20 días. ...	38
Figura 10. Porcentaje de roxarsona transformada por las bacterias presentes en el microcosmo D2 (bacterias de agua de pozo) durante 5, 10, 15 y 20 días.....	39
Figura 11. Porcentaje de roxarsona transformada por bacterias presentes en el microcosmo D3 (bacterias de estiércol) durante 5, 10, 15 y 20 días. ....	40
Figura 12. Porcentaje de roxarsona transformada por las bacterias presentes en el microcosmo D4 (bacterias de estiércol y de agua de pozo) durante 5, 10, 15 y 20 días.....	40
Figura 13. Porcentaje de roxarsona remanente en agua de pozo a los 20 días.....	41
Figura 14. Concentración de roxarsona (ppm) en los microcosmo B (bacterias de estiércol y suelo), B1 (lixiviado de la columna B en agua de pozo estéril), B2 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias), B3 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo y estiércol) y B4 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo, estiércol y agua de pozo) detectada por HPLC después de 20 días. ....	42
Figura 15. Gráfico de peaks de detección de roxarsona por medio de HPLC.....	43
Figura 16 Concentración final de arsénico inorgánico (As total, As III y As V) después de 20 días en los ensayos B (bacterias de estiércol y suelo), B1 (lixiviado de la	

columna B en agua de pozo estéril), B2 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias), B3 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo y estiércol) y B4 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo, estiércol y agua de pozo) detectada por HPLC después de 20 días. ....	43
Figura 17. Porcentaje de inhibición de la actividad enzimática ( $\beta$ -galactosidasa) de los microcosmos A3 y A4. ....	45
Figura 18. Porcentaje de inhibición la actividad enzimática ( $\beta$ -galactosidasa) de los microcosmos B1, B2, B3 y B4. ....	46
Figura 19. Porcentaje de inhibición de la actividad enzimática ( $\beta$ -galactosidasa) de los microcosmos C1, C2, C3 y C4. ....	46
Figura 20. Porcentaje de inhibición de la actividad enzimática ( $\beta$ -galactosidasa) de los microcosmos D1, D2, D3 y D4. ....	47
Figura 21. Relación entre porcentaje de roxarsona transformada en agua de pozo y porcentaje de inhibición enzimática. ....	48
Figura 22. Porcentaje de células viables en muestras de microcosmo A1 (roxarsona lixiviada del control abiótico), B1 (lixiviado de la columna B en agua de pozo estéril), B2 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias), B3 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo y estiércol) y B4 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo, estiércol y agua de pozo) Control (agua estéril), Roxarsona 0,5mM, microcosmo A1 (abiótico) con roxarsona 0,5mM. ....	50
Figura 23 AWCD de las distintas fuentes de carbono a las 120 horas. P (agua de pozo sin roxarsona), K (suelo y estiércol sin agua de pozo), B1 (lixiviado de la columna B en agua de pozo estéril), B2 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias), B3 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo y estiércol) y B4 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo, estiércol y agua de pozo) . ....	52
Figura 24. Consumo de fuentes de carbono a las 120 horas. P (agua de pozo sin roxarsona), K (suelo y estiércol sin agua de pozo), B1 (lixiviado de la columna B en agua de pozo estéril), B2 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias),	

B3 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo y estiércol) y B4 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo, estiércol y agua de pozo) . . . . . 52

Figura 25. Consumo de carbohidratos a las 120 horas. P (agua de pozo sin roxarsona), K (suelo y estiércol sin agua de pozo), B1 (lixiviado de la columna B en agua de pozo estéril), B2 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias), B3 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo y estiércol) y B4 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo, estiércol y agua de pozo) . . . . . 54

Figura 26. Consumo de aminas a las 120 horas. P (agua de pozo sin roxarsona), K (suelo y estiércol sin agua de pozo), B1 (lixiviado de la columna B en agua de pozo estéril), B2 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias), B3 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo y estiércol) y B4 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo, estiércol y agua de pozo) . . . . . 54

Figura 27. Consumo de aminoácidos a las 120 horas. P (agua de pozo sin roxarsona), K (suelo y estiércol sin agua de pozo), B1 (lixiviado de la columna B en agua de pozo estéril), B2 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias), B3 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo y estiércol) y B4 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo, estiércol y agua de pozo). . . . . 55

Figura 28. Consumo de polímeros a las 120 horas. P (agua de pozo sin roxarsona), K (suelo y estiércol sin agua de pozo), B1 (lixiviado de la columna B en agua de pozo estéril), B2 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias), B3 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo y estiércol) y B4 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo, estiércol y agua de pozo) . . . . . 56

Figura 29. Consumo de ácidos carboxílicos a las 120 horas. P (agua de pozo sin roxarsona), K (suelo y estiércol sin agua de pozo), B1 (lixiviado de la columna B en agua de pozo estéril), B2 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias),

B3 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo y estiércol) y B4 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo, estiércol y agua de pozo) .....	56
Figura 30. Perfil de bandas de gradiente denaturante (DGGE) 20%-80% de las muestras de las columnas con roxarsona (A, B, C y D); de las muestras de los frascos con los lixiviados respectivos que contienen roxarsona (A2, A3, B2, B3, B4, C2, C3, C4, D2, D3 y D4); controles: columna de suelo y estiércol sin roxarsona (K) y agua de pozo sin roxarsona (P). .....	58
Figura 31. Escalamiento multidimensional del patrón de bandeo obtenidos mediante DGGE.....	60
Figura 32. Análisis de similitud (Bray-Curtis) del patrón de bandeo obtenido mediante análisis del gen ARNr 16s por DGGE. ....	61



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Índices de los perfiles metabólicos.....	26
Tabla 2 Secuencia de partidores y tamaño esperado de los productos de PCR de la amplificación del gen 16S rDNA y región V3 del mismo gen. ....	28
Tabla 3. Preparación de las soluciones stock de DGGE. ....	29
Tabla 4. Porcentaje de toxicidad, As III, As V, roxarsona inicial y roxarsona final para los microcosmos B, B1, B2, B3 y B4.....	48
Tabla 5. Matriz de correlación de PEARSON entre el porcentaje de toxicidad y porcentaje de As III, AsV, roxarsona inicial y final. ....	48
Tabla 6. Secuencias relativamente cercanas analizadas a partir del ensayo de DGGE.....	59
Tabla 7. Índices de Riqueza (S), índice de diversidad de Shannon-Weaver (H'), índice de equidad de Pielou (J') e índice de dominancia de Simpson (1-Lambda') del patrón de bandas (OTU's), obtenido mediante el análisis del gen ARNr 16S por DGGE.....	63
Tabla 8. Valores de Riqueza límite ponderada o capacidad de carga, de las comunidades bacterianas de las diferentes muestras evaluadas, derivado del patrón de bandas (OTU's), obtenido mediante el análisis del gen ARNr 16s por DGGE.....	64

## RESUMEN

La Roxarsona® se usa como un complemento nutricional y antiparasitario de manera frecuente en la industria agrícola. Las bacterias presentes en el estiércol, suelo y agua producen la transformación de la roxarsona en productos tóxicos, que pueden lixiviarse desde la superficie hacia las napas de agua produciendo una exposición crónica al arsénico inorgánico el cual es tóxico. El objetivo del trabajo fue evaluar la transformación del lixiviado del suelo por las comunidades bacterianas presentes en agua de pozo; determinando la concentración de roxarsona y compuestos inorgánicos (roxarsona final, As (III) y As (V)); identificar la presencia de bacterias arsénico resistentes y comprobar la toxicidad que presenta este lixiviado al ser transformado. Para ello se implementaron experimentos de transformación del lixiviado utilizando microcosmos, en presencia y ausencia de las comunidades bacterianas de agua de pozo. Las diferentes transformaciones fueron analizadas mediante espectrofotometría en un periodo de 20 días. Para la detección de la formación de compuestos intermedios se utilizaron ensayos químicos de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa con par iónico IP/RP/HPLC. La caracterización metabólica de las comunidades microbianas de aguas subterráneas se realizó utilizando el kit comercial BIOLOG MicroPlate™; y la identificación molecular, por medio del análisis del ADNr 16s. Finalmente, se evaluó la toxicidad de los compuestos presentes en el producto en condiciones anaeróbicas utilizando el kit TOXI-CHROMO TEST y células endoteliales del Cordón Umbilical (HUVEC)

Los resultados obtenidos demostraron que las comunidades microbianas de suelo, estiércol y agua de pozo en condiciones anaeróbicas (microcosmo B4) transformaron la roxarsona en un 97,67% encontrándose una concentración de roxarsona de 3ppm, 3,15 ppb de As (III) y 0,78 ppb de As (V). El análisis de toxicidad mostró valores mayores al 70% de inhibición de la  $\beta$ -galactosidasa en todos los microcosmos confirmando que los productos provenientes de la biotransformación de

la roxarsona, que se encuentran en el agua de pozo, pueden ser tóxicos para el hombre, y que esta se ve estrechamente relacionada con la concentración de arsenito (As III). De igual manera, se comprobó que la roxarsona y los compuestos de su transformación afectaron la capacidad metabólica de las comunidades bacterianas de estiércol, suelo y agua de pozo aumentando la oxidación de fuentes de carbono como carbohidratos, aminoácidos y polímeros. Además afectó la estructura de las comunidades bacterianas, especializando y reduciendo la diversidad de especies. En el ensayo de MDS obtenido del DGGE permitió identificar dos grupos de microorganismos con un 40% de similitud en sus comunidades, el primer grupo formado por los microcosmos que no poseían roxarsona y los microcosmos que presentaban bajo porcentaje de transformación (<50%); el segundo grupo estaba formado por microcosmos que poseían un porcentaje de transformación de roxarsona mayor al 50%. Además, se secuenciaron las principales bandas obtenidas por DGGE demostrándose la presencia de Proteobacteria (48,38%), Firmicutes (35,48%), Actinobacteria (9,67%), Planctomyces (3,22%) y Spirochaetes (3,22%).

Los resultados obtenidos sugieren que las comunidades bacterianas presentes en agua de pozo pueden transformar la roxarsona proveniente de los lixiviados de suelo y estiércol; incrementando la presencia de arsénico inorgánico en el agua.

Palabras clave: Roxarsona, comunidades microbianas, estiércol, lixiviado.

## ABSTRACT

Roxarsone ® is commonly used as a nutritional supplement and anti-parasite supplement in the agricultural industry. The bacteria present in manure, soil and water are able to transform roxarsone into toxic products that can leach from the surface to the groundwater, producing the chronic exposure of humans to inorganic arsenic. The aim of this work was to evaluate the transformation capacity of the leachate by bacterial communities present in well water, determining the concentration of roxarsone and inorganic compounds (final roxarsone, As (III) and As (V)); to identify the presence of arsenic-resistant bacteria, and to evaluate the leachate toxicity often been transformed. Transformation experiments using leachate microcosms with and without bacterial communities present in the well water were implemented. Transformations were analyzed by spectrophotometry. To detect the formation of chemical intermediates high-resolution liquid chromatography using reverse phase ion pair IP / RP / HPLC was used. Metabolic characterization of microbial communities in groundwater was performed using a commercial kit BIOLOG™ microplate, and molecular identification by 16S rDNA analysis. Finally the toxicity of compounds produced by anaerobic transformation of the leachate was evaluated by using the kit TOXI-CHROMO TEST.

The results showed that soil, manure and water well microbial communities were able under anaerobic conditions (microcosm B4) showing to transform 97,67 % roxarsone finding a concentration of 3 ppm of roxarsone, 3.15 ppb of inorganic arsenite (As III) and 0.78 ppb of inorganic arsenate (As V). Toxicity analysis showed higher values at 70% inhibition of  $\beta$ -galactosidase in all confirming microcosm products from the biotransformation of roxarsone, which are found in well water can be toxic to humans, and that this is closely related to the concentration of arsenite (As III). Similarly, it was found roxarsone and its products affected the metabolic capacity of bacterial communities from manure, soil and well water by increasing the oxidation capacity of carbon sources such as carbohydrates, amino acids and polymers, as well as by

modifying the structure of specialized bacterial communities and reducing species diversity. MDS banding pattern analysis from DGGE allowed two groups with 40 % similarity in their communities. The first group of microcosm had no roxarsone or low roxarsone conversion ability (<50%), and the second group consist of microcosm with increased degree of conversion of 50% roxarsone. The sequencing of the major bands obtained by DGGE showed the presence of Proteobacteria (48.38 %), Firmicutes (35.48%), Actinobacteria (9.67%), Planctonmycetes (3.22%) and Spirochaetes (3.22 %).

The result present suggest that bacterial communities present in well water of human consume in able to transform leached product from soil contaminated with poultry faecal material allowing the release of inorganic arsenic to water.

Keywords: roxarsone , microbial communities , manure, leachate.



## 1. INTRODUCCIÓN

El ácido (4-hidroxi-3-nitrofenil) arsónico, conocido como Roxarsona, es una droga de uso animal manufacturada por Alpharma, aprobado para prevenir la coccidiosis en animales de granja y además aumenta la eficiencia alimenticia y mejora la pigmentación de pollos (Yao, 2011). Estudio realizados por la Food and Drug administration de Estados Unidos (FDA) demostró la presencia de arsénico inorgánico en el hígado de pollos (Kitchin, 2001), por lo cual Alpharma, una subsidiaria de Pfizer Inc., decidió suspender voluntariamente la venta de roxarsona en el año 2011.

Más del 95% de la roxarsona suministrada a los pollos es excretada sin cambios en el estiércol de aves (Garbarino et al., 2003) el cual es regularmente utilizado como fertilizante en granjas aledañas, o en abonos comerciales (Yao, 2010). A consecuencia de las bacterias presentes en suelo se produce la transformación de la roxarsona en productos tóxicos, dichos productos pueden lixiviarse desde la superficie hacia las napas de agua produciendo una exposición crónica por ingesta de arsénico inorgánico el cual es causante de cáncer (Chen et al., 1988), y ha sido relacionado con enfermedades cardíacas, diabetes y es nocivo para las funciones cerebrales (Chen et al., 1992).

Las bacterias poseen diferentes mecanismos para transformar el arsénico siendo uno de ellos la metilación de los compuestos inorgánicos de arsénico formando intermediarios metilados de arsénico en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. La metilación microbiana de los oxianiones inorgánicos del arsénico forman metilarsénicos como el monometilarsénico, dimetilarsina un producto de las demetilación del trimetilarsénico, estos compuestos pueden desmetilarse a consecuencias de las bacterias presentes en el suelo (MacKenzie et al. 1979); los enlaces formados As-C se forman dentro de las vías metabólicas de las bacterias (Cullen y Reimer, 1989).

Se han estudiado tres mecanismos bacterianos diferentes para la transformación de la roxarsona: el primero se produce por una reducción de grupo  $\text{NO}_2$  de la roxarsona transformándose en ácido 3-amino-4hidroxi fenilarsénico luego se produce una desanimación y como producto final el ácido 4-hidroxifenilarsénico. La segunda biotransformación se produce por una ruptura del anillo aromático transformando al arsenito en arseniato y finalmente el arsenito producido por la ruptura del grupo aromático se metila para dar las diferentes formas de arsénico metilado como el ácido 5 monometil arsénico, ácido 3 monometil arsénico, ácido 5 dimetil arsénico, ácido 3 dimetil arsénico, el óxido trimetil arsina y finalmente el ácido 3 trimetil arsénico (Challenger y Higginbottom 1935).

Se han aislado diferentes bacterias capaces de transformar arsénico, las cuales afectan el comportamiento del metaloide tanto en su solubilidad, biodisponibilidad y toxicidad (Nriagu, 1994). La presencia de mecanismos de transformación de arsénico y resistencia en bacterias se hace evidente debido a su tolerancia en estos ambientes, las bacterias usan el arsenito como dador de electrones oxidándose a arseniato, el arseniato puede ser usado como aceptor final de electrones durante la respiración anaeróbica siendo menos tóxico y móvil en el ambiente (Stolz et al., 2002); el arsénico inorgánico puede acomplejarse con residuos de cisteína y transformarse en especies orgánicas a partir de cascadas de metilación (Páez et al., 2009). Los mecanismos de resistencia codificados por genes *ars* presentes en cromosoma o en plásmidos han sido los más estudiados (Escalante et al., 2006). El arsénico entra en la célula a través de canales para fosfato o de glicoproteínas, ya en el interior como arseniato es reducido a arsenito por *ArsC* (una arseniato reductasa) para ser expulsado luego por *ArsB*, este proceso es regulado por gen *arsR* (Silver y Phung, 2005).

En Chile se han aislado bacterias transformadoras de arsénico de diferentes fuentes como muestras de roca volcánica de la quebrada camarotes (Campos et al., 2011), sedimentos de los sectores Illapata, Esquiña y

Desembocadura del río Camarones y del río Lauca de la región Arica y Parinacota, respectivamente (Mellado et al., 2011; Escalante et al., 2006). Sitios donde la contaminación de arsénico geológico superan los límites permitidos por la Organización Mundial de la Salud de 10 ppb (Yáñez et al., 2005). De igual manera se han realizado estudios en España en el río Tinto, el cual posee similares características físico-químicas a los ríos presentes en Chile, en el cual se identificaron bacterias descomponedoras de compuestos órgano arsenicales (López et al., 2001) aplicando una aproximación a la meta genómica funcional para describir nuevos genes de resistencia al arsénico (Riesenfeld et al., 2004).

No obstante, no se han realizado estudios que indiquen la presencia de microorganismos resistentes a arsénico en cuerpos de agua subterráneas contaminadas por la presencia de roxarsona. Tomando en cuenta estos antecedentes el presente estudio se orientó hacia los procesos de biotransformación de los lixiviados de suelos que fueron tratados con roxarsona.

### **1.1 Roxarsona y su uso en la producción avícola**

Desde la década de 1940, se han usado ampliamente compuestos órganos arsenicales en la dieta de aves de corral. En 1944, el 3-Nitro se convirtió en el primer medicamento veterinario con arsénico aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) de EEUU. De acuerdo a Evisa (*European Virtual Institute for Speciation Analysis*) el producto también se vende en Canadá, México, Malasia, Indonesia, Filipinas, Vietnam, Chile, Argentina, Perú, Venezuela, Brasil, Australia, Pakistán y Jordania. Los investigadores han demostrado que la alimentación de pollos con el ácido (4-hidroxi-3-nitrofenil) arsónico (roxarsona), en combinación con antibióticos y compuestos anticoccidiales, mejora el crecimiento de las aves (Anderson y Chamblee, 2001; Alcaíno et al., 2002; Chapman et al., 2004). Bassu et al., (2008) realizó ensayos usando células endoteliales de pulmón y aorta

humana, las cuales fueron expuestas a diferentes concentraciones de roxarsona, los resultados demostraron que la roxarsona es un potente inductor de la angiogénesis y que éste a través de distintas vías promueve la formación de tubos o capilares sanguíneos ligados al proceso de crecimiento.

Los investigadores han demostrado que la dieta con roxarsona ha moderado los efectos anticoccidiales. La dieta con roxarsona también mejora la pigmentación de pollos de engorde (Fry et al., 1976). Actualmente se administra una combinación de salinomicina, roxarsona y bacitracina a aves en etapa de crecimiento temprano con el fin de aumentar su ganancia de peso y mejorar su conversión alimenticia. De esta forma se usa como promotor de crecimiento dado que también controla la flora bacteriana normal de estos animales (Chapman et al., 2002; 2004).

En muchos países se ha prohibido la venta de este compuesto, sin embargo la roxarsona sigue siendo utilizado en la industria avícola, recientemente (junio del 2011) se prohibió la venta de roxarsona en EEUU según la FDA. En Chile el uso de roxarsona está regulado en la elaboración de suplementos animales, su administración está autorizada solamente a pollos en etapa de crecimiento (SAG, 2006) y se comercializa como polvo mezclado con antibióticos.

## **1.2 Roxarsona y su problemática ambiental**

Los desechos de animales durante muchos años han sido utilizados como fertilizantes ya que poseen cantidades variables de nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio, azufre y otros elementos nutricionales para la vegetación. Tales contenidos varían según la especie, pero también en función de la edad del animal, la alimentación, las características del sitio en donde se acumulan los desechos y su manipulación. En general, los estiércoles suelen ejercer acciones

positivas sobre un variado conjunto de propiedades, esencialmente porque mejoran el contenido y la calidad de la materia orgánica del suelo (Pereira et al., 2008). Se ha demostrado que el abono es capaz de mejorar la condición física de las tierras, al aumentar la porosidad total, la macro porosidad, la estabilidad de los agregados, la capacidad de almacenaje de agua y disminuir la densidad aparente del suelo, entre otros.

Según varios autores la acumulación del compuesto arsenical (Roxarsona) se libera en su mayoría sin cambios en las deposiciones de los pollos, según Morrison, (1969) postula que el compuesto tiende acumularse en los desechos de las aves. Se han realizado diversos estudios que han determinado que durante el periodo de crecimiento de 42 días de administración de roxarsona, cada pollo excreta aproximadamente 150 mg del compuesto (Anderson and Chamblee, 2001); resultando una concentración de arsénico de 30 a 50 mg/kg en desecho (Garbarino et al., 2003). Una vez utilizado estos desechos como fertilizantes, la roxarsona se esparce en las praderas en un rango de dos toneladas métricas por hectárea. De esta forma, si la superficie de la pradera es de 100 Hectáreas cerca de 10 kilos de arsénico se introducen al medio ambiente mediante este procedimiento.

Varias especies de microorganismos como bacterias, hongos y levaduras poseen la capacidad de metilar compuestos arsenicales presentes en el suelo tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (NCRCC, 1978); las bacterias producen dimetilarsina, mientras que los hongos sintetizan trimetilarsina. La dimetilarsina es un producto de oxidación de compuestos trimetilarsenicales y estos dos subproductos pueden desmetilarse por acción bacteriana. Según Mackenzie (1979) se estima que  $2,1 \times 10^{10}$  gramos anuales de arsénico se pierden en la atmosfera desde la superficie terrestre debido a estos procesos bióticos.

Cortinas et al., (2006) mostraron que en ausencia de oxígeno la roxarsona se transforma rápidamente a la correspondiente amina aromática que es el ácido

4-hidroxi-3-aminofenilarsona (HAPA), la formación de HAPA se atribuía a la reducción del grupo nitro. Además demostró que después de un tiempo prolongado de incubación HAPA y el ácido 4-animofenilarsonico fue eliminado cerca de un 99% en condiciones metanogénicas y sulforeductoras. Conjuntamente indicó que algunos sustratos actúan como donantes de electrones, tales como gas hidrógeno, glucosa y lactato estimulando la tasa de reducción del grupo nitro, constituyéndose en el primer informe de una ruptura del grupo fenilarsonico catalizada biológicamente en condiciones anaeróbicas.

Stolz et al., (2007) evaluó la transformación de la roxarsona en condiciones anaeróbicas por especies de *Clostridium* presentes en desechos de pollo y en un cultivo puro de una especie de agua dulce (*Clostridium sp.* Cepa OhILAs) que respiran arseniato. Los principales productos fueron 3-amino-4-ácido hidroxibenceno arsónico y el arsénico inorgánico. Experimentos de crecimiento de la cepa OhILAs y análisis genómico indicaron el uso de la roxarsona como aceptor terminal de electrones para la respiración anaeróbica. Además se realizaron análisis de la estructura electrónica de los compuestos y estos sugieren que la reducción de los equivalentes reductores deben ir con el grupo nitro, mientras que la liberación de arsénico inorgánico del anillo bencénico por la ruptura del enlace C-As es poco probable. También determinó que la especie *Clostridium* y especies de *Lactobacillus* son comunes en los desechos de pollo. Además Stolz sugiere que el abono rico en materia orgánica y en conjunto con anaerobiosis suele proporcionar condiciones necesarias para que las poblaciones microbianas nativas puedan transformar la roxarsona, del estiércol de pollo, a arsénico inorgánico producto tóxico.

Por lo tanto, el riesgo asociado a este tipo de prácticas es alto, ya que una vez esparcida la roxarsona en el suelo es rápidamente transformada a los estados inorgánicos del arsénico (As III y As V). Aún faltan estudios más completos acerca de las comunidades bacterianas involucradas en la transformación de este compuesto; ya que la disposición en el suelo de estos residuos pueden

contaminar tanto aguas superficiales como subterráneas, contribuyendo a la contaminación por arsénico al ambiente además de poner en riesgo la integridad y bien estar de animales y humanos (Rutherford et al., 2003; Welch et al., 2000; British Geological Survey, 2001).

### **1.3 Lixiviación de roxarsona**

Al arsénico posee una alta afinidad por superficies minerales como arcillas, óxidos de hierro, aluminio y manganeso, por ello es difícil controlar la concentración de arsénico en el agua y suelo; aún más si las características físico-químicas como pH del suelo y densidad de carga son variables, los cuales pueden cambiar de estados de oxidación de forma rápida. La sorción de la roxarsona presenta características especiales debido a su composición orgánica y metálica.

Rutherford (2003), examinó las características de sorción de la roxarsona y determinó las zonas donde esta se secuestra más fácilmente. Descubrió que al incrementarse el pH de 2 a 8; la adsorción de la roxarsona disminuía siendo este más fácil para la lixiviación. También se demostró que la sorción de la roxarsona en óxidos de hierro es menor a la sorción de arseniatos en los mismos óxidos, sugiriendo que el tamaño de la molécula de roxarsona evita la unión con un hidroxilo de metal a diferencia de los iones arseniato. Incluso se señaló que la roxarsona poseía una mayor capacidad de absorción en la materia orgánica que el arseniato, debido a su parte orgánica en la molécula. Finalmente el estudio indicó que la roxarsona absorbida por la materia orgánica es de fácil lixiviación en comparación al arsénico absorbido por el hidróxido de hierro, indicando que los compuestos intermedios organoarsenicales transformados de la roxarsona pueden ser lixiviable y llegar a las napas de agua profundas.

## 1.4 Componentes del arsénico en el ambiente

El arsénico (As) es un elemento que se encuentra en los sistemas naturales en una gran variedad de formas químicas, incluyendo formas inorgánicas, As (III) y As (V), y formas orgánicas metiladas. El arsénico es un elemento del grupo V-A de la tabla periódica, se presenta en estado sólido como forma de sulfuro principalmente. El arsénico se une covalentemente con metales, no metales y pueden formar parte de moléculas orgánicas (Barán, 1995). El arsénico se encuentra en los estados de oxidación más común: -3, 0, +3, +5. El  $\text{As}^{3+}$  puede ser oxidado por las bacterias a pentaóxido de arsénico y el  $\text{As}^{5+}$  a ácido orto arsénico. En valores de pH hasta 2 el estado de oxidación dominante es  $\text{As}^{5+}$  y aparece como  $\text{H}_3\text{AsO}_4$ ; entre pH 2 y pH 11 se presenta como  $\text{H}_2\text{AsO}_4^-$  y  $\text{HAsO}_4^{2-}$ . Por otra parte los enlaces As-C son fáciles de formar, lo cual ha proporcionado diversos compuestos organoarsenicales y de fácil metilación (Barán, 1995).

La mayoría de los metales tóxicos están en solución en forma de cationes (p.ej.  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ), que generalmente son más insolubles cuanto más alto sea el pH. A valores de pH cercanos al neutro la solubilidad de la mayoría de estos cationes se encuentra limitada por la precipitación o co-precipitación formando óxidos, hidróxidos, carbonatos, fosfatos o más probablemente por la adsorción fuerte a los óxidos metálicos acuosos, incluido el arseniato, tienden a adsorberse menos fuertemente al aumentar el pH (Dzombak y Morel, 1990). Bajo ciertas condiciones, estos aniones pueden persistir en solución en concentraciones relativamente altas (decenas de mg/L) incluso a los valores de pH cercanos al neutro. Por lo tanto, los oxianiones que conforman los elementos tales como Cr, As, U y Se son algunos de los contaminantes más comunes en las aguas subterráneas y superficiales.

El arsénico se encuentra en el agua, suelo, aire y alimentos de manera que el hombre se encuentra expuesto al contaminante (Mandal et al., 2001; 2003). El

arsénico se une con azufre, hierro y fosfatos (Tamaki y Frankenberger, 1992). La forma predominante ya liberada en el medio es el arseniato  $\text{As}^{5+}$  o arsenito  $\text{As}^{3+}$  (Smith, 1998). El arsénico en el agua se carga negativamente formando los oxoaniones ( $\text{HAsO}_4^{-2}$ ,  $\text{H}_2\text{AsO}_4^-$ ,  $\text{H}_2\text{AsO}_3^-$  y  $\text{HAsO}_3^{2-}$ ) (Sadiq, 1997). Los cuales modifican su estado de valencia dependiendo del pH y el potencial redox del medio (Smith, 1998). En el suelo el  $\text{As}^{5+}$  es la forma predominante pero en condiciones reductoras este cambia de estado de oxidación a  $\text{As}^{3+}$  (Tamaki y Frankenberger, 1992).

### 1.5 As inorgánico

El arsénico en su forma inorgánica, puede presentarse en dos estados redox: la forma reducida, arsenito (As III), y la forma oxidada, arseniato (As V). Ambos estados son tóxicos para la mayoría de los organismos. En el ambiente, el arsenito es la forma química más soluble y más móvil y por lo tanto es la forma más tóxica. El arseniato, a diferencia del arsenito, se fija fuertemente a la superficie de varios minerales comunes tales como ferrihidrita y alúmina. (Smedley y Kinniburgh, 2002).

Los compuestos inorgánicos trivalentes como el tricloruro de arsénico ( $\text{AsCl}_3$ ) son utilizados en la industria cerámica y en la fabricación de arsenicales con contenido de cloro. El trióxido de arsénico ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) o arsénico blanco se utiliza en la purificación de gases sintéticos y como materia prima para todos los compuestos de arsénico; se utiliza también como conservante de cuero y madera, como mordente en la industria textil, como reactivo en la flotación de minerales y para la decoloración y refinamiento en la fabricación del vidrio. El arsenito cálcico [ $\text{Ca}(\text{As}_2\text{H}_2\text{O}_4)$ ] y el acetoarsenito cúprico (considerado generalmente como  $\text{Cu}(\text{COOCH}_3)_2 \cdot 3\text{Cu}(\text{AsO}_2)_2$ ) son insecticidas. El acetoarsenito cúprico se utiliza también en la fabricación de pinturas para barcos y submarinos. El arsenito sódico

( $\text{NaAsO}_2$ ) se utiliza como herbicida, como inhibidor de la corrosión y como agente de secado en la industria textil. El trisulfuro de arsénico es un componente del cristal de transmisión de infrarrojos y un agente para eliminar el pelo en el curtido de pieles; también se utiliza en la fabricación de material pirotécnico y de semiconductores.

Los microorganismos presentes en suelos y ambientes acuáticos juegan un rol fundamental en el ciclo biogeoquímico del arsénico lo que influye en el comportamiento ambiental de este, ya que las diferentes especies del metaloide muestran diferencias en la solubilidad o biodisponibilidad y toxicidad (Nriagu, 1994). Se han descrito diversas bacterias involucradas en los procesos de transformación que comprenden la oxidación, reducción y metilación del arsénico (Muller et al., 2003).

Los microorganismos han desarrollado diversos mecanismos de tolerancia para hacer frente a la toxicidad del arsénico. Mientras que algunas bacterias, son solo capaces de reducir el arseniato como forma de detoxificación. Otras bacterias utilizan el arseniato como aceptor terminal de electrones dentro del proceso de respiración anaeróbica. La oxidación microbiana de As (III) a As (V) también puede afectar la movilidad y la especiación del arsénico en el ambiente (Ehrlich, 2002). Los organismos capaces de realizar este proceso son fisiológicamente diversos, e incluyen a heterótrofos y quimiolitautótrofos oxidantes de arsenito. La oxidación heterotrófica de As (III), se ve como una reacción de detoxificación, que convierte el As (III), ubicado en el exterior de la membrana celular, en As (V) menos tóxico para la bacteria (Stolz et al., 2002).

## 1.6 As Orgánico

Existe una amplia gama de compuestos orgánicos de arsénico. El ácido cacodílico ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>AsOOH) se utiliza como herbicida y defoliante. El ácido arsenílico (NH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>AsO(OH)<sub>2</sub>) se utiliza como cebo para saltamontes. El gas arsina se utiliza en la síntesis orgánica y en el proceso de componentes electrónicos en estado sólido. Las arcinas sustituidas son compuestos arsenicales orgánicos trivalentes que, dependiendo del número de grupos alquilos o fenilos que tengan unidos al núcleo de arsénico, se conocen como arcinas mono, bi o trisustituidas. La dimetilarsina (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>AsH o cacodil hidruro y la trimetilarsina (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>As o trimetilarsénico son líquidos incoloros. Estos dos agentes se producen tras la transformación metabólica de los compuestos de arsénico en bacterias y hongos.

La metilación del arsénico es un fenómeno ampliamente distribuido en la Naturaleza. Desde bacterias hasta humanos, la gran mayoría de organismos son capaces de realizar esta reacción, aunque, si bien es un proceso bien documentado en hongos y eucariotas, es bastante desconocido aún en bacterias. Así, las rutas de metilación propuestas para procariotas son las mismas que aquellas que fueron descritas para el hongo *Scopulariopsis brevicaulis* (Challenger, 1951). Estos mecanismos implican un conjunto de etapas en las cuales, a la reducción de las formas pentavalentes de As le sigue la adición oxidativa de un grupo metilo (Dombrowski et al., 2005). Esto genera una cadena de productos metilados de especies químicas de arsénico: monometil arsenito (MMA), dimetil arseniato (DMA-V), dimetil arsenito (DMA-III) y óxido trimetil arsina (TMAO). Encontramos ejemplos de metilación de arsénico tanto en bacterias aerobias como anaerobias (Bentley y Chasteen, 2002), incluyendo *Clostridium collagenovorans*, *Desulfovivrio gigas*, capaz de producir cantidades medibles de TMA (Michalke et al., 2000), y *Methanobacterium formicium* (productor de arsina).

## 1.7 Efectos tóxicos del arsénico

La presencia de arsénico en aguas potables y de riego es un problema económico, social y ambiental de extrema importancia. En varios países de América latina (especialmente en el norte de Chile y de Argentina) por lo menos cuatro millones de personas beben en forma permanente agua con niveles de arsénico que ponen en riesgo su salud, presentando índices muy elevados de enfermedades ligadas a exposición prolongada a este elemento. El arsénico es uno de los elementos más tóxicos para el ser humano. Los humanos pueden estar expuestos al arsénico a través de la comida, el agua y el aire. La exposición también puede producirse a través del contacto de la piel con el suelo o el agua que contengan arsénico. Las principales actividades humanas fuentes de arsénico son la minería, la siderurgia, la agricultura, la silvicultura, las plantas de tratamiento de combustibles fósiles, los desechos urbanos y la ganadería (Adriano, 2001; Cullen y Reimer, 1989). La formulación de numerosos plaguicidas, fungicidas y biocidas utilizados para controlar enfermedades en cultivos tanto agrícolas como forestales que suelen contener arsénico (Lepp, 1981). A su vez, La exposición del hombre al arsénico en el agua continental se encuentra por debajo de 1ug/L (Smedley y Kinniburgh, 2002) en comparación al agua oceánica que la concentración de arsénico es cercano a 1,5ug/L (Biessen y Frimmel, 2003).

La organización mundial de la salud indica que el nivel máximo de arsénico es de 10ug/L; pero un estudio de las plantaciones agrícolas en Maryland que se habían expuestos a estiércol avícola que contenía roxarsona; indicaba que poseía concentraciones de arsénico más altas que a superficies las cuales no se habían tratado con el estiércol (Nachman et al., 2013). La roxarsona que posee el metal pesado se puede lixiviar a aguas profundas estando disponible para microorganismos que pueden transformar el compuesto en intermediarios más tóxicos además de disolverse en el agua siendo esta última no apta para el consumo humano (Krishnamurti y Naidu, 2008); indicando así que algunos fertilizantes derivados del estiércol contaminado pueden suponer un aporte de

arsénico al suelo (Matschullat, 2000). Las personas que no están expuestas a As muere con una concentración de 0,1 - 0,3 g/día, contrario a lo que sucede con personas que están expuestas crónicamente pudiendo resistir 1 g/día de  $H_3AsO_3$  sin presentar cambios de salud (Biessen y Frimmel, 2003). La exposición laboral al arsénico está presente en ciertos trabajos relacionados con la minería, la combustión de carbón rico en arsénico, uso de conservantes para la madera, producción y uso de pesticidas.

Además el arsénico es catalogado como un agente carcinógeno por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer International Agency for Research on Cancer (IARC, 1987), altos niveles de arsénico en el agua potable se han relacionado con cáncer de vejiga, pulmones y piel, así como efectos no cancerígenos, incluyendo enfermedades cardiovasculares, diabetes, queratosis y otras enfermedades a la piel (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2005), lo que también se ha sido descrito por Yoshida et al., (2004), el cual postula que la exposición crónica a As inorgánico está estrechamente relacionado a el desarrollo de varias enfermedades, incluyendo enfermedad cardíaca, diabetes, cáncer y lesiones en la piel en los individuos expuestos. En Chile, la mortalidad por cáncer a la vejiga y al pulmón ha incrementado por agua potable contaminada con arsénico (Marshall et al., 2007).

Si bien el modo preciso de acción de arsénico que induce a la enfermedad es desconocida, se ha demostrado que la exposición al arsénico altera los niveles de metilación de ADN y los promotores de genes; acetilación de las histonas, metilación, fosforilación y la expresión del mRNA (Ren et al., 2011). Estudios sistemáticos epigenómicos en las poblaciones humanas expuestas al arsénico o en pacientes con cáncer de arsénico asociados aún no se han realizado.

Los efectos toxicológicos del arsénico están relacionados a su forma química y a su estado de oxidación; las formas orgánicas como roxarsona por ejemplo, son menos tóxicas, sin embargo la exposición ambiental a compuestos

organoarsenicales comerciales es una preocupación cada vez mayor (Sapkota et al., 2007).

### 1.8 Bacterias Arsénico resistentes

Varios microorganismos han sido aislados de medios que son capaces de usar al arsénico como aceptor o donador de electrones. La oxidación del  $\text{As}^{3+}$  unido al  $\text{O}_2$  es energéticamente favorable para las bacterias heterótrofas y autótrofas que pueden fijar el  $\text{CO}_2$  en condiciones aeróbicas (Ilyaletdinov, 1981) y fijar al nitrato en condiciones reductoras (Oremland et al., 2000). Hasta cierto punto esto puede ser una manera para que los microorganismos puedan desintoxicar su entorno inmediato; por ejemplo las bacterias oxidarían al  $\text{As}^{3+}$  que es más estable y móvil a  $\text{As}^{5+}$  que es más fuertemente adsorbido y menos tóxicos (Oremland y Stolz, 2003). Por otra parte, el  $\text{As}^{5+}$  se reduce a  $\text{As}^{3+}$  en una reacción energética por medio del cual las bacterias anaeróbicas usan al  $\text{As}^{5+}$  como aceptor de electrones en la respiración (Ahmann et al., 1994).

Uno de los sistemas más conocidos es el de los genes *ars* (Götz et al., 1983) el cual consiste en una serie de genes que codifican un sistema de flujo transmembrana y una enzima arseniato reductasa. Este operón posee un gen regulador (*ars R*), un gen codificante para una bomba de expulsión transmembranal específica para arsenito (*ars B*) y un gen que codifica para una arseniato reductasa (*ars C*) (Ji et al., 1993). Se ha descrito varias cepas bacterianas como *S. barnesii* que reduce el  $\text{As}^{5+}$  a  $\text{As}^{3+}$  en presencia de lactato, *B. selenitireducens* y *B. arsenicoselenatis* tienen la misma funcionalidad (Switzer, 1998). Otras tres especies que son capaces de crecer en medio con  $\text{As}^{5+}$  son *Sulfurospirillum arsenophilum* (Steinberg et al., 1992), *Desulfotomaculum auripigmentum* (Newman et al., 1997) y *Chrysiogenes arsenatis* (Macy et al., 1993). Por otra parte el operón *ars* se ha descrito en *Escherichia coli* (Carlin et al.,

1995; Diorio et al., 1995), *Pseudomonas aeruginosa* (Cai et al., 1998), *Yersinia spp.* (Neyt et al., 1997; Bansal et al., 2000), *Acidiphilum multivorum* (Susuki et al., 1997) y *Thiobacillus ferrooxidans* (Butcher et al., 2000).

## 1.9 HIPÓTESIS DE TRABAJO

La roxarsona es usada en la industria avícola como aditivo alimenticio la cual contiene un 28,48% de su peso molecular en arsénico. Debido a la alta solubilidad de la roxarsona en el agua ésta podría movilizarse hasta llegar al agua subterránea, contaminando el agua de consumo humano y de riego. Además, este lixiviado podría ser transformado nuevamente por los microorganismos anaeróbicos presentes en las aguas subterráneas volviéndose aún más tóxico, ya que en estas condiciones predomina el  $As^{3+}$  responsable de provocar enfermedades cardiovasculares y diversos tipos de cáncer.

Estudios anteriores han comprobado que la roxarsona es transformada en compuestos arsenicales de fácil solubilidad y alta toxicidad por las bacterias que se encuentran en suelo.

El presente trabajo plantea la siguiente hipótesis:

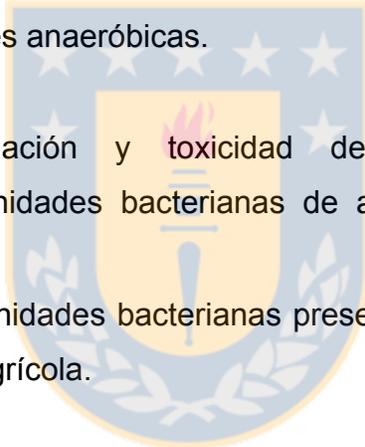
El lixiviado proveniente de suelos agrícolas, que dentro de sus constituyentes se encuentra roxarsona y compuestos arsenicales derivados de la biotransformación, es nuevamente transformado por las comunidades bacterianas, presentes en aguas subterráneas, aumentando la concentración de compuestos arsenicales tóxicos y móviles, en relación al lixiviado original.

## **1.10 OBJETIVO GENERAL**

Determinar la capacidad de transformación del lixiviado, proveniente del suelo impactado con Roxarsona, por comunidades bacterianas asociadas a aguas subterráneas y evaluar la toxicidad del lixiviado transformado.

## **1.11 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar la transformación de los compuestos arsenicales, presentes en el lixiviado de suelo, por las comunidades bacterianas asociadas a aguas subterráneas, en condiciones anaeróbicas.
- Evaluar la degradación y toxicidad del lixiviado de roxarsona biotransformado por comunidades bacterianas de aguas subterráneas y suelo agrícola.
- Determinar las comunidades bacterianas presentes en aguas subterráneas procedentes de un sector agrícola.



## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Toma de Muestra.**

Las muestras de suelo fueron obtenidas de suelos agrícolas de la Provincia de Ñuble, VIII Región del Bío-Bío, Chile. Estas se tomaron a una profundidad de 50 cm con cores de policarbonatos, de 5 cm diámetro. Las muestras fueron transportaron a 4°C al laboratorio de Microbiología Ambiental de la facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción.

Las muestras de agua subterránea se envasaron en frascos de vidrio neutro o plástico estériles (esterilizados a 120°C por 15 minutos), transportada a 4°C al laboratorio de Microbiología Ambiental de la facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción.

Muestras de estiércol de pollo se recolectaron en una avícola de la región del Bío-Bío, se almacenaron en bolsas estériles y transportadas a 4°C al laboratorio de Microbiología Ambiental de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción.

### **2.2 Experimento de microcosmos y transformación del lixiviado de suelo, por bacterias de aguas de pozo**

Los experimentos de microcosmos se realizaron en 4 columnas, las columnas fueron fabricadas en vidrio con un tamaño de 50 cm de largo y 4 cm de diámetro. Cada columna contenía 1 kg de suelo y 10 g de estiércol de pollo, previamente tratado con roxarsona (0.5 mM). El Microcosmo (A) (Control abiótico) tenía: suelo agrícola estéril y estiércol de pollo estéril. Microcosmo (B) tenía: suelo

agrícola y el estiércol de pollo sin esterilizar. Microcosmo (C): suelo estéril y estiércol pollo. Microcosmo (D): suelo con bacterias y estiércol de pollo estéril. A cada una de las columnas se agregó 45ml de agua estéril cada semana (Raizman et al., 2011), y fueron incubadas a temperatura ambiente y en oscuridad durante 15 días.

Los lixiviados proveniente de cada columna fueron colocados en 4 frascos de vidrio esterilizable (BOECO). 1) El primer frasco poseía el lixiviado filtrado y 100ml de agua de pozo estéril; 2) el segundo frasco contenía el lixiviado sin filtrar y 100ml de agua de pozo estéril; 3) el tercer frasco contenía el lixiviado filtrado y 100ml de agua de pozo sin esterilizar, y 4) el cuarto frasco contenía el lixiviado sin filtrar y 100ml de agua de pozo sin esterilizar. Todos estos ensayos se realizaron en condiciones anaeróbicas sellados con una tapa de goma y envueltos en papel aluminio. Para conseguir la anaerobiosis se bombeó CO<sub>2</sub> estéril a los frascos por 45 segundos. Posteriormente se agregó 8,25 ml del lixiviado filtrado y sin filtrar según correspondía el caso, (Rutherford et al., 2003; Alley et al., 1999). Los experimentos fueron realizados utilizando el lixiviado filtrado (por filtros de 0,22µm) y sin filtrar. Este ensayo demostró como actuaban las distintas comunidades bacterianas por separado (Figura 1).

El suelo y estiércol se secaron por 48 horas en estufa a 37°C, luego se realizaron tres ciclos de esterilización húmeda en autoclave a 121°C por 15 minutos y finalmente se esterilizó por calor seco en horno a 150°C por 150 minutos, obteniendo suelo y estiércol estéril. El agua de pozo fue esterilizada a 121°C por 15 minutos. Para obtener la esterilidad en los lixiviados se filtro por medio de filtros de jeringa con un poro de 0,22 µm.

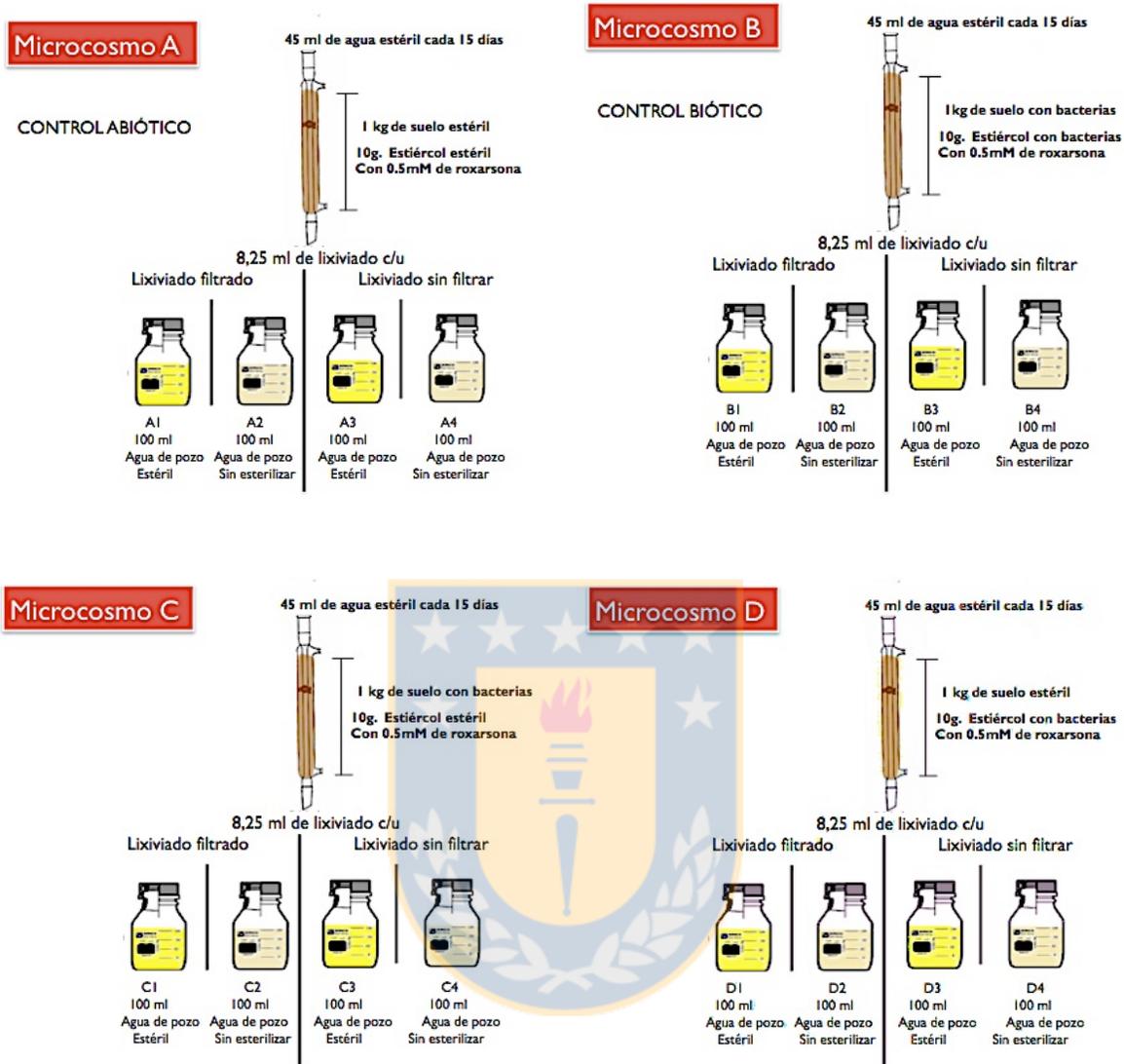


Figura 1. Esquema de los ensayos realizados.

### 2.3 Evaluación de la transformación de roxarsona y lixiviado en ambientes anaeróbicos

La transformación de la roxarsona fue determinada por espectrofotometría UV. Se tomó una alícuota de 10 ml del lixiviado de cada una de las columnas (A,

B, C, D) a los 20 días; después de colocar los primeros 45 ml de agua estéril. También se tomaron alícuotas de los microcosmos de los frascos (A1, A2, A3, A4, B1, B2, B3, B4, C1, C2, C3, C4, D1, D2, D3 Y D4) a los 0, 5 10, 15 y 20 días después de ser colocado el lixiviado en cada uno de los frascos. Posteriormente cada alícuota fue filtrada por un medio de un filtro de membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  para jeringa; obteniendo la esterilidad.

100  $\mu\text{l}$  de cada una de las muestras filtradas se colocaron en los pocillos de placas de lectura (placas de 96 pocillos fondo plano, Trueline) y fueron medidas en un espectrofotómetro de microplacas Epoch<sup>TM</sup> a una longitud de onda entre 300 y 500 nm.

Los microcosmos (A1, B1, C1, D1) se tomaron como control para su grupo correspondiente, las muestras (A1, B1, C1, D1) no cambiaron durante los 20 días ya que es estos ensayos no poseían bacterias que realicen una nueva transformación de la roxarsona remanente. Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente durante 20 días, bajo condiciones controladas en el laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad de Concepción.

La transformación de roxarsona fue analizada por medio de espectrofotometría, basada en el método del trapecioide el cual calcula el área formada bajo la curva que produce la lectura del espectrofotómetro, demostrando que existió una baja en la concentración de roxarsona ya que sus áreas también mostraron una reducción en su tamaño.

Los resultados obtenidos se analizaron a través del software estadístico Gen5<sup>TM</sup> (BIOTEK®).

### 2.3.1 Detección y cuantificación de roxarsona

Se utilizó cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con un detector UV (260 nm) según lo propuesto por Chen et al., (2011), para la determinación de roxarsona. Las muestras fueron separadas en una columna C-18 (Hibar RT 250-4,6mm Purospher Star RP\_18 endcapped 5um) usando una fase móvil compuesta de 1% de ácido acético y 3% metanol a una velocidad de flujo de 2,5 ml/min. Se realizó una curva de calibración de roxarsona (0,1-10 ppm). Bajo estas condiciones el tiempo de retención de roxarsona fue de 7,9 min y se obtuvo un  $R^2=0,99998$ . Las muestras fueron analizadas con un factor de dilución igual a 10.

### 2.3.2 Determinación de arsénico total, arsenito y arseniato por Espectrofotometría de Absorción Atómica (AAS).

Para la determinación y cuantificación de As (III) y As (V) se realizaron dos curvas de calibración (20-200ppb), la primera de arsénico total (As (III) y As (V)) a pH=0 ajustada con HCl, la cual fue reducida con un 4% de Ioduro de potasio y ácido ascórbico (ambos al 10%) dejando reposar 1 hora en oscuridad y la segunda de As (III) a pH=4,6 utilizando buffer de ácido acético-acetato de sodio (0,5 M). Se trabajó con una solución sodio borohidruro ( $\text{NaBH}_4$ ) al 0,2% y estabilizada con NaOH al 0,05% para la generación de hidruro de arsénico,  $\text{AsH}_3(\text{g})$ , el cual se forma al mezclarse la muestra con el carrier (HCl 10% a pH=0 y el buffer de ácido acético-acetato de sodio (0,5 M a pH= 4,6) para seguir avanzando hacia una segunda entrada donde se encuentra con el  $\text{NaBH}_4$ , en continuo a estas entradas para el flujo de reactivos se insertó un bucle de reacción con el fin de mezclar los reactivos y dar tiempo suficiente para la reacción de formación de hidruro, finalmente es seguido por un separador gas líquido, donde los productos resultantes que provienen del bucle de reacción ingresan desde una entrada inferior y entran en contacto frontal con el flujo de argón que viene en descenso.

Esta reacción consiste en la reducción del arsénico mediante hidrogeno elemental, el cual se origina por descomposición del NaBH<sub>4</sub> en medio ácido.

Formado el AsH<sub>3</sub>(g), es transportado hacia el espectrofotómetro mediante el gas de arrastre argón (Ar(g)), con un flujo de 50 ml/min. La absorción la realizan los átomos de la muestra, neutros, libres y en estado fundamental, los que son obtenidos en una cubeta de cuarzo, la cual se ubica sobre la llama para alcanzar la temperatura de atomización del arsénico (900°C) con llama reductora de acetileno–aire (Arias, 2005).

## **2.4 Determinación de la Toxicidad**

### **2.4.1 Detección de la actividad tóxica de roxarsona y compuestos derivados de la biotransformación.**

La toxicidad de las muestras (A, B, C, D, P, K, A1, A2, A3, A4, B1, B2, B3, B4, C1, C2, C3, C4, D1, D2, D3, D4) fueron analizados por medio de Toxi-ChromoTest™ kit de Enviromental Bio-detection Products Inc. (ebpi) siguiendo las instrucciones del fabricante. Toxi-ChromoTest™ es un kit basado en la capacidad de inhibir la síntesis de la β-galactosidasa de una cepa de *E. Coli*, esta cepa es altamente sensible a una amplia variedad de sustancias tóxicas tales como metales pesados, contaminantes orgánicos e inorgánicos (Kwan y Dutka 1992).

El método consiste en una placa de 96 pocillos que usa una sustancia blanco la cual fue colocada en la primera columna y un tóxico estándar Cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>) colocado en la segunda columna, este ultimo sirvió como control positivo y sirvió para la realización de una curva de calibración; el resto de pocillos fueron usados para análisis de las muestras.

Se colocó 100 µl del diluyente G en las dos primeras columnas, luego se colocó 200 µl de la solución tóxica en el primer pocillo de la primera columna, se transfirió 100 µl de la mezcla anterior al pocillo siguiente repitiéndose este paso hasta llegar al final de la columna, de esta forma se obtuvo una dilución seriada con una concentración máxima de 4 µg/ml de HgCl<sub>2</sub> y una concentración mínima de 0,06 µg/ml de HgCl<sub>2</sub>; en las siguientes columnas se dispensaron las muestras por duplicado.

A continuación se rehidrató la suspensión bacteriana de la botella B con la solución de la botella C dejando a temperatura ambiente por 15 minutos. A continuación se transfirió 1 ml de la suspensión bacteriana a la botella A, se dispuso 100 µl de la suspensión de la botella A a cada uno de los pocillos sin incluir a los de la primera columna; se incubó la placa a 37°C durante 90 minutos. Una vez retirada la placa de la incubadora se dispuso 100 µl del sustrato cromogénico (botella F) en todos los pocillos de la placa y se cultivó nuevamente a 37°C por 30 minutos. Finalmente por medio del espectrofotómetro de UV (EPOCH) se analizaron las muestras a una densidad óptica de 615 nm. Estos resultados fueron analizados posteriormente con el programa informático que contiene el kit Toxi-ChromoTest™. Donde la toxicidad de los materiales ensayados causa una densidad de color por debajo de los valores de densidad óptica de los controles y la toxicidad es calculada por la ecuación:

$$\%Toxicidad = \left[ \frac{(1 - D.Océlulas\ tratadas)}{D.Océlulas\ control} \right] \times 100$$

\* Las células tratadas fueron aquellas que se incubaron en presencia de las muestras en estudio (compuestos tóxicos). Las células control fueron aquellas incubadas en ausencia de las muestras en estudio.

#### **2.4.2 Detección de la actividad tóxica de roxarsona y compuestos derivados de la biotransformación en células HUVECs.**

Se utilizaron células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), las cuales fueron obtenidas mediante digestión con colagenasa tipo II (0,2 mg/mL) y mantenidas (37° C, 5% CO<sub>2</sub>) en medio de cultivo primario suplementado con suero.

Se procedió a transferir células HUVEC a placas de experimentación (96 pocillos). Luego que las células alcanzaron 100% de confluencia, estas fueron suplementadas con 50 ul de roxarsona (0,5 mM) (Rx), 50ul del microcosmo A1 (el lixiviado de la columna A en agua de pozo estéril) y 50 ul de lixiviados filtrados provenientes de los cuatro microcosmos (B1, B2, B3 y B4), cultivado bajo condiciones anaeróbicas por 14 días. Como control, se incubaron células HUVEC viables suplementadas con 50 ul de agua estéril.

El recuento celular se realizó utilizando una cámara de Neubauer utilizando azul de tripán. Se extrajo una muestra de células en suspensión (20 µl) durante la etapa de tripsinización, en el momento en que se inactivó el efecto de la tripsina con medio de cultivo M199 y 20% suero (10% suero bovino fetal y 10% suero de recién nacido). Se añadió 20 ul de la solución de azul tripán, la cual tiñe el medio y las células muertas, permitiendo diferenciarlas de las células vivas. Se contaron los cuadrantes superiores e inferiores, se obtuvo un número de células promedio por cuadrante y se multiplicó por el volumen final de células en suspensión (Morata, 2005). Los porcentajes de viabilidad obtenidos fueron analizados estadísticamente a través de ANOVA de una vía y test T de Student, utilizando el software GraphPad Prism 5®.

## **2.5 Caracterización de las comunidades microbianas de aguas subterráneas.**

### **2.5.1 Caracterización metabólica**

Se realizó la caracterización metabólica de los microcosmos asociados a las muestras B1, B2, B3, B4, P (agua de pozo) y K (microcosmos de suelo y estiércol sin roxarsona)., para el análisis metabólico se usó el kit BIOLOG EcoPlate™ siguiendo las instrucciones del fabricante (BIOLOG®, Hayward, CA, USA). (Garland y Mills, 1991). Biolog Ecoplate™ es un sistema de 96 pocillos los cuales contiene 31 fuentes de carbono y un pocillo control sin sustrato por triplicado. los al ser usados por las bacterias producen un color violeta el cual es medido por medio de un espectrofotómetro de placa a 590 nm. Se inoculó 150µl de cada muestra en cada pocillo y fueron incubadas a 25°C en ambiente húmedo con agua miliQ estéril. Se midió la densidad óptica de cada pocillo a  $\lambda = 590$  nm durante 96 horas con intervalos de 24 horas (Garland, 1997), usando el lector de micro placas (Epoch™ de BIOTEK®). Las muestras para la inoculación se tomaron a los 20 días de iniciado el experimento de transformación de la roxarsona en agua de pozo. Para este ensayo se midió una concentración de células de  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^6$  células/ml.

Por medio de este kit se pueden medir varios índices como: desarrollo de color en los pocillos de las micro placas (AWCD), índice de Shannon-Weaver (H') y el índice de riqueza (S) ( $OD > 0,25$ ) (Haack et al., 1990; Garland et al., 1997). Estos índices fueron posteriormente analizados en el software GraphPad Prism 5®.

Los resultados de AWCD, H' y E fueron analizados estadísticamente a través de un ANOVA de una vía y test T de Student con un 95% de confianza, utilizando el software GraphPad Prism 5® (Tabla 1).

Las fuentes de carbono se dividieron en carbohidratos (N=10), ácidos carboxílicos (N=9), aminoácidos (N=6), polímeros (N=4) y aminas (N=2) (Garland y Mills, 1991). Para luego obtener el índice AWCD de cada muestra.

Tabla 1. Índices de los perfiles metabólicos.

Índices	Abreviación	Fórmula	Variables
Desarrollo de color en los pocillos de las microplacas	AWCD	$OD = \frac{C-R}{\sum OD / N}$	C= densidad óptica de cada fuente de carbono. R= densidad óptica del pocillo control. N= número de fuentes de carbono
Enriquecimiento	S	OD>0,25	N= número de fuentes de carbono

## 2.5.2 Caracterización molecular

La caracterización molecular se realizó por medio de electroforesis en gel con gradiente denaturante (DGGE). La toma de muestras se realizó a 20 días iniciado el experimento. Para lo cual se extrajo el ADN bacteriano por medio del UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit (Mo Bio laboratorios Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la extracción de ADN se enriquecieron las muestras de agua de pozo con un medio químicamente definido MQD (Stolz y Oremland, 1999), este medio contenía 0,1544g  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ; 4,2g  $NaHCO_3$ ; 0,5g de extracto de levadura, 10 ml de elementos traza y 2,4 ml de lactato (10mM) en un litro de agua ultra pura.

Posteriormente se efectuó una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de la región V3 de la secuencia del ADNr 16s. La DGGE se ejecutó en un gradiente de desnaturalización del 10% al 80% para los análisis de los índices

ecológicos y de 20% al 60% para la extracción de bandas, purificación, amplificación y posterior secuenciación e identificación de las cepas presentes en las muestras (León, 2013; Escalante et al., 2006).

### **2.5.3 Amplificación del gen ADNr 16S**

La amplificación del gen ADNr 16s se la realizó en dos fases mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la primera fase se utilizaron partidores universales para el dominio bacterias, 907r (926r) y P3(341f) (Tabla 2). El mix de PCR fue realizado en un volumen total de 50  $\mu$ l, los cuales contenían 25  $\mu$ l SapphireAmp® Fast PCR Master Mix (TAHARA BIO INC.), 2  $\mu$ l de los partidores 907r (926r a una concentración de 0,10 $\mu$ M) y 2  $\mu$ l de P3 (341f a una concentración de 0,10 $\mu$ M), 4 $\mu$ l de DNA templado y 17  $\mu$ l con agua DEPC (Dietilpirocarbonato). Las condiciones para la PCR consistieron en una denaturación inicial a 94°C por 5 minutos; luego 35 ciclos de denaturación a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 55,6°C por 45 segundos y elongación a 72°C por 90 segundos y finalmente una extensión final a 72°C por 10 minutos.

El segundo paso consistió en una PCR anidada de la región V3 del gen 16S del ADNr; para esto se usó los partidores P3 (341f) y P2 (534r) y el ADN templado de la PCR del 907. El partidador P3 contiene 40 bases de GC los cuales ayudan a la disgregación en el análisis de DGGE (Tabla 2). La mix de la PCR anidada poseía un volumen total de 50  $\mu$ l, los cuales contenían 25  $\mu$ l SapphireAmp® Fast PCR Master Mix (TAHARA BIO INC.), 2  $\mu$ l de los partidores P2 (534r una concentración de 0.10  $\mu$ M) y 2  $\mu$ l de P3 (341f una concentración de 0,10  $\mu$ M), 4 $\mu$ l de DNA templado y 17  $\mu$ l con agua DEPC (Dietilpirocarbonato). A continuación la PCR-Touchdown poseía una denaturación inicial a 94°C por 5 minutos; luego 20 ciclos de denaturación a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 61°C por 45 segundos (la temperatura de alineamiento fue decreciendo 0,5°C en cada ciclo hasta llegar a 51°C) y elongación a 72°C por 90 segundos, finalmente se realizaron 10 ciclos de:

denaturación a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 51°C por 45 segundos y elongación a 72°C por 90 segundos.

Tabla 2 Secuencia de partidores y tamaño esperado de los productos de PCR de la amplificación del gen 16S rDNA y región V3 del mismo gen.

Partidores	Secuencia	Tamaño esperado	Referencia
907r	5'-AGT TTG ATC MTG GCT CAG-3'	926 pb	Muyzer <i>et al.</i> , 1995
P3	5'-CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT-3'		
P3	5'-40 GC+TAG GGG AGG CAG CAG-3'	193 pb	Wang <i>et al.</i> , 2008
P2	5'ATT ACC GCG GCT GG-3'		

#### 2.5.4 Electroforesis en gel con gradiente denaturante (DGGE)

Los productos de amplificación de PCR del dominio bacteria con el partidor 907r se sometieron a una electroforesis en gel con gradiente denaturante (DGGE).

Estos productos sirvieron para separar las diferentes bandas OTU's (Unidades operacionales taxonómicas) existentes en las muestras de los diferentes ensayo; el gel contenía un gradiente de denaturación del 10% al 60% preparado con las soluciones stock que se muestran en la Tabla 3. Para formar el gradiente se preparo un gel usando 15 ml de cada solución stock, para la polimerización de la acrilamida se usó 130 µl de per sulfato de amonio (BioRad®) al 10% y 13 µl de N'-Tetra-metil-etilendiamina [TEMED] (BioRad®), el gradiente vertical se obtuvo utilizando el formador de gradiente de proporcionado por el fabricante del equipo para DGGE (C.B.S Scientific Company®) siguiendo las indicaciones. Se cargó las muestras de la PCR de los partidores (907r-P3f ) para lo cual se uso 15 µl de los productos de la amplificación, mezclado con 3 µl buffer

de carga (Blue 6x Bio Labs Inc.) en una proporción 3:1, esta mezcla se cargo en los geles denaturantes por medio de una jeringa Hamilton

Los OTU's más representativos de este ensayo fueron cortados del gel para su purificación y colocando las bandas en tubos Eppendorf de 1,5 ml con 50 µl de agua DEPC en baño María a 65 °C por 15 minutos y posteriormente una centrifugación a 10000 rpm por 3 minutos. Finalmente estas secuencias se re amplificaron y fueron secuenciadas por MacroGen Inc. para a su identificación por medio de BLAST.

Tabla 3. Preparación de las soluciones stock de DGGE.

	<b>10%</b>	<b>20%</b>	<b>60%</b>	<b>80%</b>
Acrilamida Bis 30%	18.8 ml	18.8 ml	18.8 ml	18.8 ml
TAE 50X	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Formamida	4 ml	8 ml	24 ml	32 ml
Urea	4,2 g	8,4 g	25,2 g	33,6 g
Aforar a 100 ml con agua DEPC				

Para el análisis de la región v3 del ADNr 16s se prepararon geles con una concentración de agente denaturante del 20% al 80%. (Tabla 2) Los geles se prepararon con concentración en gradiente de agente denaturante entre el 20% al 80%. Para esto se usó 15 ml de cada solución stock para la formación del gradiente. La polimerización de la poliacrilamida se logró agregando 130 µl de persulfato de amonio (BioRad®) 10% y 13 µl de N'-Tetra-metil-etilendiamina (TEMED) (BioRad®), el gradiente vertical se obtuvo utilizando el formador de gradiente de proporcionado por el fabricante del equipo siguiendo sus indicaciones. Se uso 16 µl de los productos de la amplificación con los partidores P2-P3, mezclado con 3 µl de buffer de carga a una concentración 6x obteniendo una proporción 3:1, esta mezcla se cargo en los geles denaturantes por medio de

una jeringa Hamilton. A diferencia del gel anterior; este gel sirvió para realizar los estudios de los índices ecológicos y de diversidad bacteriana.

La técnica de Electroforesis en gel con gradiente de denaturación se realizó en el equipo DGGE-1001 (C.B.S Scientific Company®). Este equipo posee una cámara de electroforesis vertical cargada con buffer TAE 1X (40 mM Tris-acetato y 1mM EDTA, pH 8.3 a 25°C) el casete que contiene los geles son embebidos en esta solución y la electroforesis fue corrida a 82V por 18 horas a 56°C. El gel fue teñido con una solución de SYBR Gold Nucleic acid gel stain (Molecular Probes Invitrogen®) al 0,05% durante 1 hora en oscuridad, posteriormente la visualización de las bandas se las realizó en UltraBright LED Transilluminator, 470nm (LB-16 MAESTROGEN) y se fotografió con una cámara Canon PowerShot G12 de 10.0MP en formato RAW, para así obtener un registro de los patrones de las bandas de cada muestra y su posterior análisis informático.

Las imágenes del gel fueron reconstruidas con software Photoshop CS6.v13.0 (Adobe). Las bandas se analizaron usando el software Gel-Pro Analyzer 4.0 (Applied Math) definiendo las bandas como aquellas que poseían al menos 5% de intensidad de la banda más intensa, anotándose como presencia o ausencia de las bandas en cada posición del gel. Para la comparación se construyó una matriz binaria basada en la presencia (1) o ausencia (0) de cada banda individual por cada línea, los cuales son usados para la construcción de una matriz de distancia. La matriz de distancia fue usada para la construcción de un diagrama de escalamiento multidimensional (MDS) el cual es un mapa bidimensional con ejes artificiales X y el eje Y donde cada fingerprint de DGGE se coloca como un punto de forma que las muestras similares son representadas juntas. Clustering analysis y MDS se llevaron a cabo con el PRIMER V6 software package (Clarke y Gorley, 2001). Los patrones únicos de DGGE o unidades operacionales taxonómicas (OTU's) se examinaron usando dos índices que indican los aspectos de la diversidad microbiana. El índice de Shannon-Weaver

índice de diversidad H (Shannon y Weaver, 1963) y el índice de equidad E (Pielou, 1975) se calcularon para cada muestra de acuerdo a la fórmula:

$$H = - \sum (ni / N) \log(ni / N)$$
$$E = H / \log S$$

Donde *ni* es la intensidad relativa de cada superficie de la banda del DGGE, S es el número de banda de DGGE (usado para indicar el número de especie) y N la sumatoria de todas las bandas en la superficie en una muestra dada (usada para estimar la abundancia de especies).

El rango de riqueza ponderado (Rr) es el número total de bandas multiplicado por el porcentaje de gradiente de Denaturación necesario para describir la diversidad total de las muestras analizadas según la siguiente fórmula:

$$Rr = (C^2 \times Dg)$$

Donde C representa el número total de bandas en el patrón y Dg el gradiente de Denaturación comprendido entre la primera y la última banda del patrón (Marzorati *et al.*, 2008).

#### **2.5.4 Electroforesis en gel de agarosa**

Los amplicones de cada PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 2% al cual se le agrego 1,8 µl de MaestroSafe™ Prestained por cada 100 ml de solución, la electroforesis se corrió a 90V por 40 minutos, la electroforesis fue realizada a todos los productos de PCR del gen ADNr 16s con los partidores 907r-P3f y con los partidores P2r-P3f y ADN total extraído de las muestras enriquecidas con el MDQ.

Los productos de PCR contenían SapphireAmp® Fast PCR Master Mix (TAHARA BIO INC.) la cual poseía en su mezcla el Buffer de carga. Los fragmentos amplificados fueron comparados según el marcador de peso molecular de 100pb (CLEAVER) , posteriormente el gel se observo en un transiluminador.

Las electroforesis fueron realizadas, para el gen ADNr 16S (1500 pb) y para la región V3 del ADNr 16S (190 pb), cargando 5 µl del producto de PCR. El tamaño de los fragmentos amplificados se comprobó comparando con un marcador de peso molecular de 100 pb (New England, BioLabs®). La visualización fue realizada en UltraBright LED Transilluminator, 470 nm (LB-16 MAESTROGEN).



### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Evaluación de la transformación de roxarsona y lixiviado en ambientes anaeróbicos

Los valores obtenidos por el método del trapecioide fueron convertidos en porcentajes, siendo un valor de área de 186,97 equivalente al 100% de roxarsona a una concentración de 0,5mM, los datos obtenidos fueron analizados por medio de ANOVA con un 95% de confianza y un análisis de TUKEY de comparación entre variables.

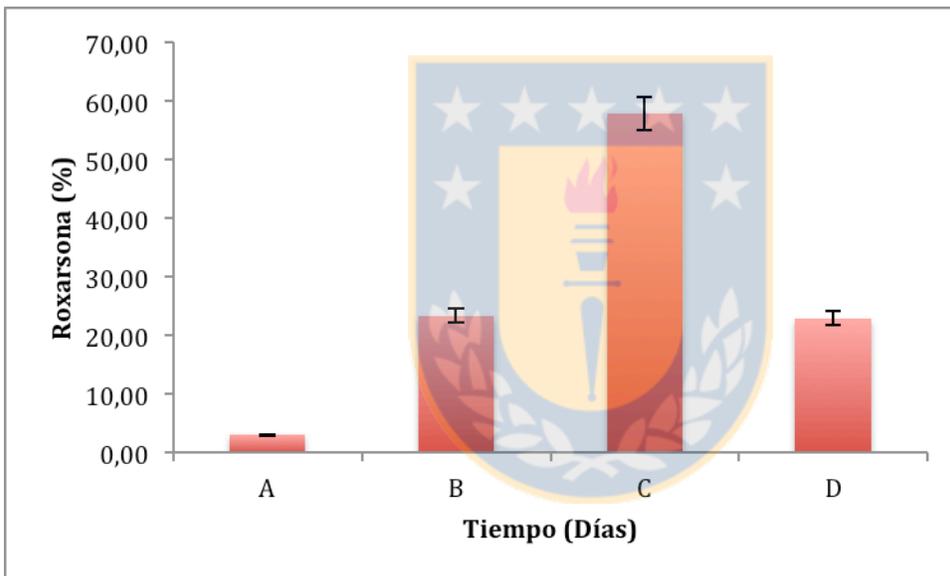


Figura 2. Porcentaje de roxarsona transformada en los microcosmos A (Control abiótico), B (Bacterias de suelo-estiercol), C (Bacterias de suelo), D(bacterias de estiercol).

El microcosmos A fue considerado como control, el cual no poseían bacterias para la transformación de roxarsona. El análisis de ANOVA mostró un  $R= 0,9804$  con un 95% de confianza entre los datos analizados. Los porcentajes de roxarsona transformada en los lixiviados de los microcosmos B, C y D (23,39%; 57,85%, 22,97%, respectivamente) mostraron una diferencia significativa en comparación con el porcentaje de roxarsona transformada del microcosmo A (3%).

Entre los microcosmos B y D no hubo una diferencia significativa entre los valores de transformación (23,39% y 22,97%, respectivamente); indicando que el microcosmo B, que tenía las bacterias de suelo y estiércol, obtuvieron el mismo nivel de transformación que el microcosmo D que poseía bacterias de estiércol. El microcosmo C que tenía bacterias de suelo obtuvo mayor porcentaje de roxarsona transformada (57,85) con respecto a los A, B y D microcosmos A, B y D (Figura 2).

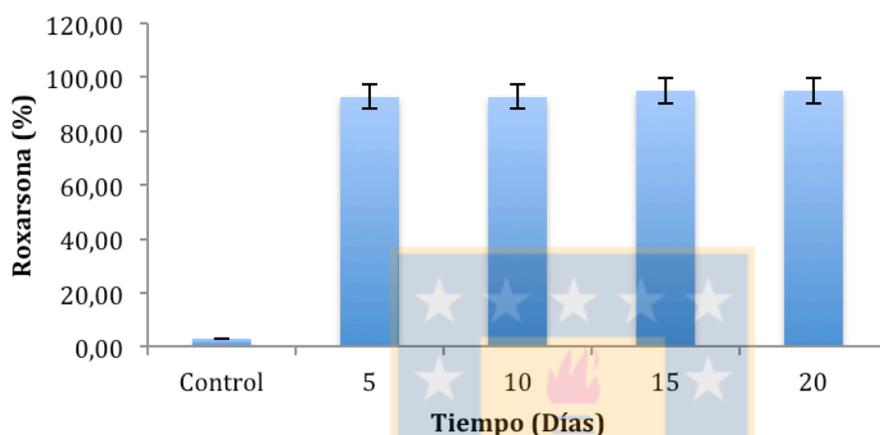


Figura 3. Porcentaje de roxarsona transformada por bacterias del microcosmo A3 (contiene roxarsona lixiviada de la columna A en agua de pozo con bacterias) durante 5, 10, 15 y 20 días.

El lixiviado del microcosmo A (control abiótico) se tomo como control para el microcosmo A3 (agua de pozo con bacterias. Los porcentajes de transformación del microcosmo A2 (lixiviado estéril y agua de pozo estéril) fueron estadísticamente similares a los porcentajes de transformación del microcosmo A1 ya que tenía las mismas condiciones de esterilidad (datos no mostrados). El porcentaje de transformación en el microcosmo A3 fueron estadísticamente similares a los porcentajes de transformación del microcosmo A4 (agua de pozo con bacterias) ya que también tenían las mismas condiciones. Las bacterias presentes en el microcosmo A3 que poseía 8,25 ml del lixiviado de la columna A en 100 ml de agua de pozo demostró una disminución significativa de roxarsona a

los 20 días obteniendo un 95,13% de roxarsona transformada en comparación con el control (3%). La roxarsona transformada a los 5 y 10 días (92,85% y 92,86%) no se obtuvo una diferencia significativa entre estos días; de igual forma la roxarsona detectada se mantuvo a los 15 y 20 días (95,08% y 95,13%) (Figura 3).

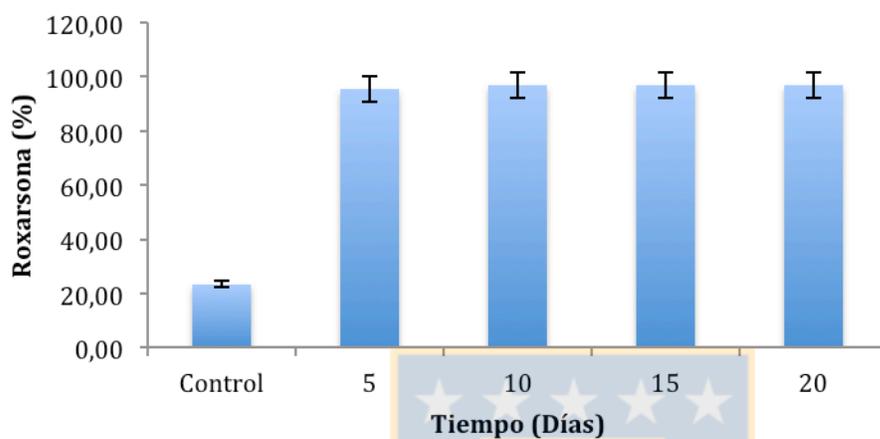


Figura 4. Porcentaje de roxarsona transformada por bacterias del microcosmo B2 (contiene lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias) durante 5, 10, 15 y 20 días.

El lixiviado del microcosmo B (bacterias de estiércol y suelo) fue considerado como control para B2, B3 y B4. En el microcosmo B2 (bacterias de agua de pozo) transformó la roxarsona en un 96,98% a los 20 días demostrando una reducción significativa en comparación con el control (23,39%). Entre los 10, 15 y 20 días existió una transformación de roxarsona del 95,65%; 95,68% y 96,27%; respectivamente sin ser estadísticamente significativa entre ella (Figura 4).

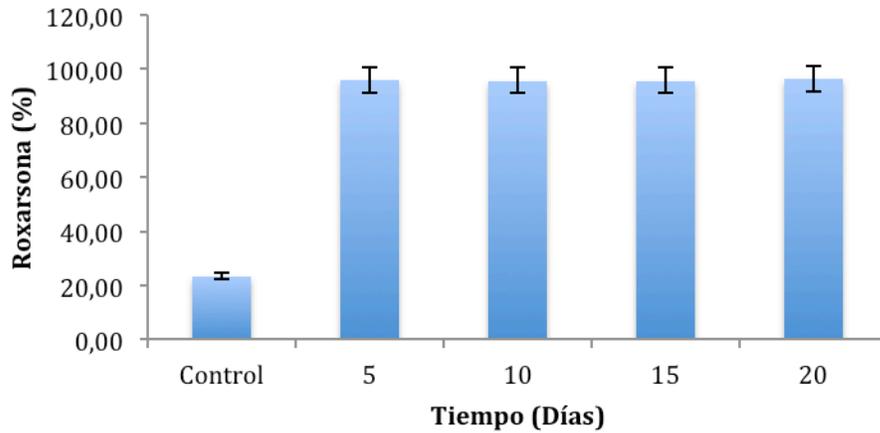


Figura 5. Porcentaje de roxarsona transformada por bacterias del microcosmo B3 (contiene lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de estiércol y suelo) durante 5, 10, 15 y 20 días.

Las bacterias presentes en el microcosmo B3 (agua de pozo con bacterias de estiércol y suelo) se demostró una transformación de roxarsona del 96,27% en comparación con el control (23,39%). Los valores a los 5, 10 y 15 días no demostraron una reducción significativa durante el tratamiento (95,79%; 95,68% y 95,65%, respectivamente) (Figura 5).

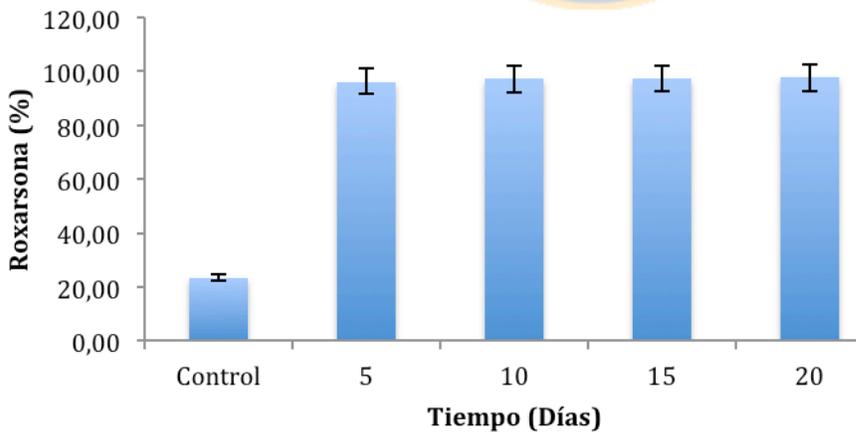


Figura 6. Porcentaje de roxarsona transformada por bacterias del microcosmo B4 (contiene lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo, estiércol y agua de pozo) durante 5, 10, 15 y 20 días.

Las bacterias presentes en el microcosmo B4 (bacterias de suelo, estiércol y agua de pozo) transformó la roxarsona en un 97,64% a los 20 días siendo estadísticamente significativo en comparación con el control (23,39% de roxarsona detectada).

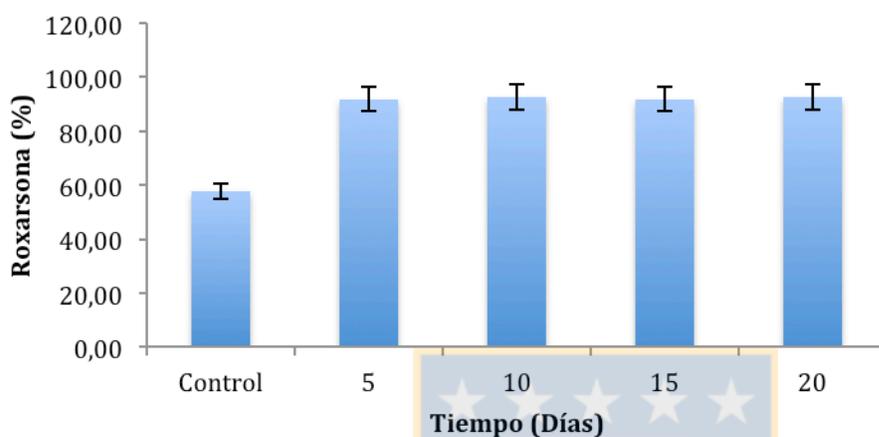


Figura 7. Porcentaje de roxarsona transformada por las bacterias presentes en el microcosmo C2 (lixiviado de la columna C en agua de pozo con bacterias de suelo) durante 5, 10, 15 y 20 días.

El lixiviado del microcosmo C (bacterias de suelo) fue considerado como control para C2, C3 y C4.

Las bacterias presentes en el microcosmo C2 (bacterias de agua de pozo) transformaron la roxarsona en un 92,55% durante los 20 días en comparación con el control (57,85%) (Figura 7).

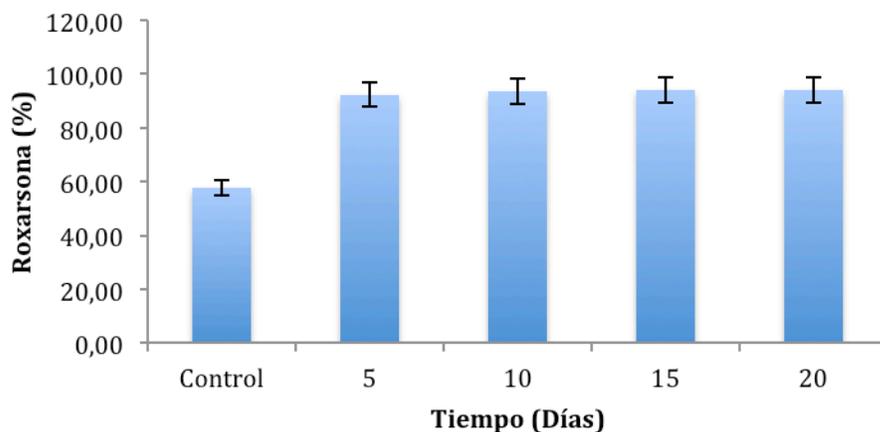


Figura 8. Porcentaje de roxarsona transformada por bacterias del microcosmo C3 (bacterias de suelo) durante 5, 10, 15 y 20 días.

Las bacterias presentes en el microcosmo C3 transformaron la roxarsona en un 94,12% a los 20 días siendo significativamente diferente al control (57,85%), de igual forma que en el microcosmo C2, el microcosmo C3 mantuvo el porcentaje de transformación de roxarsona, sin un cambio aparente durante los 20 días (Figura 8).

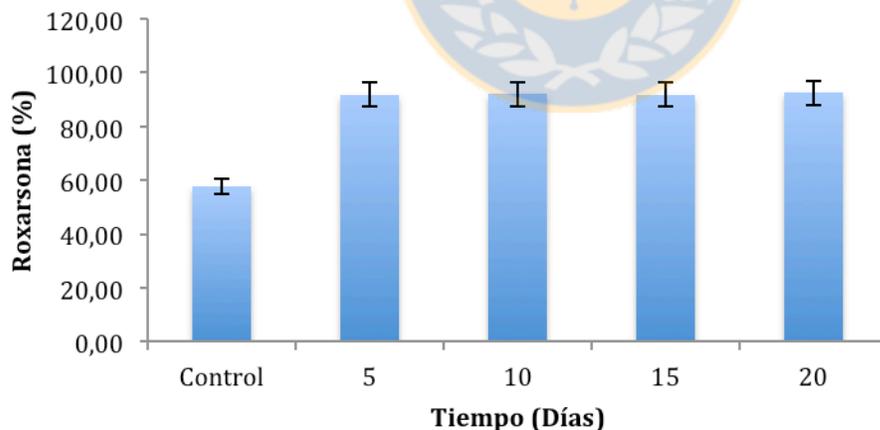


Figura 9. Porcentaje de roxarsona transformada por bacterias presentes en el microcosmo C4 (bacterias de suelo y agua de pozo) durante 5, 10, 15 y 20 días.

En el microcosmo C4 se obtuvo un porcentaje transformación de roxarsona del 92,46% comparación con el control (57,85%) (Figura 9).

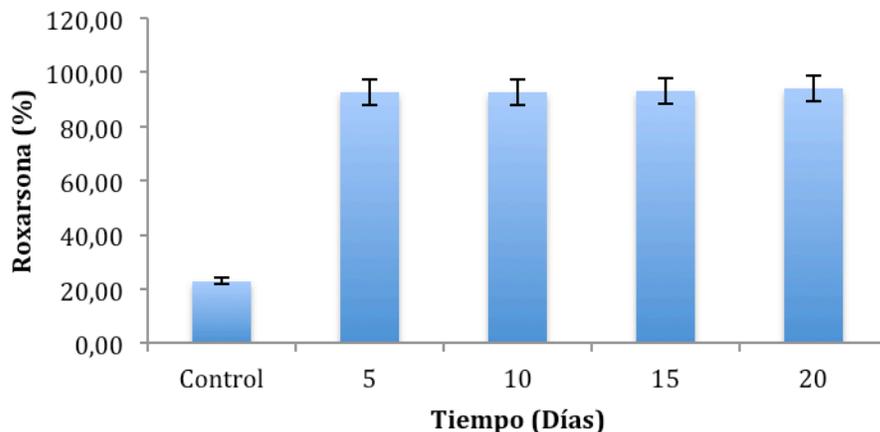


Figura 10. Porcentaje de roxarsona transformada por las bacterias presentes en el microcosmo D2 (bacterias de agua de pozo) durante 5, 10, 15 y 20 días.

El lixiviado del microcosmo D (bacterias de estiércol) fue considerado como control para D2, D3 y D4.

La bacterias presentes en el microcosmo D2 (bacterias de agua de pozo) transformaron la roxarsona en un 94,20% durante los 20 días obteniendo una diferencia de 71,23% con respecto a la roxarsona transformada en el control (22,97%) (Figura 10).

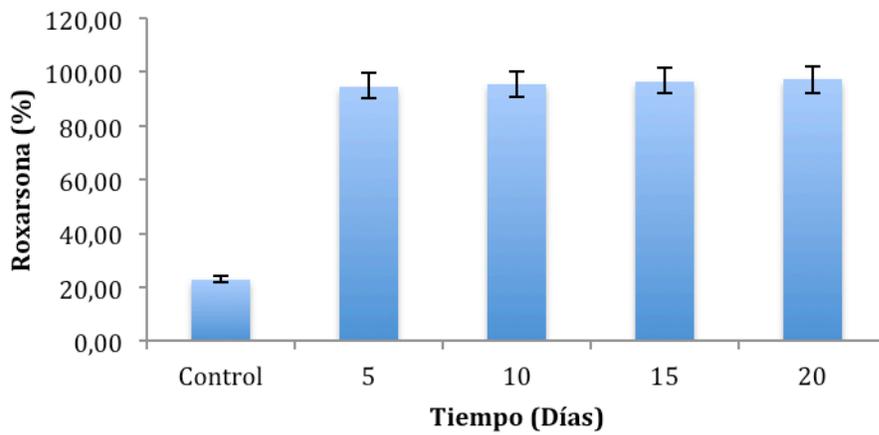


Figura 11. Porcentaje de roxarsona transformada por bacterias presentes en el microcosmo D3 (bacterias de estiércol) durante 5, 10, 15 y 20 días.

Se obtuvo una transformación de la roxarsona del 97,21% por parte de las bacterias presentes en el microcosmo D3 (Bacterias de estiércol) durante los 20 días del ensayo.

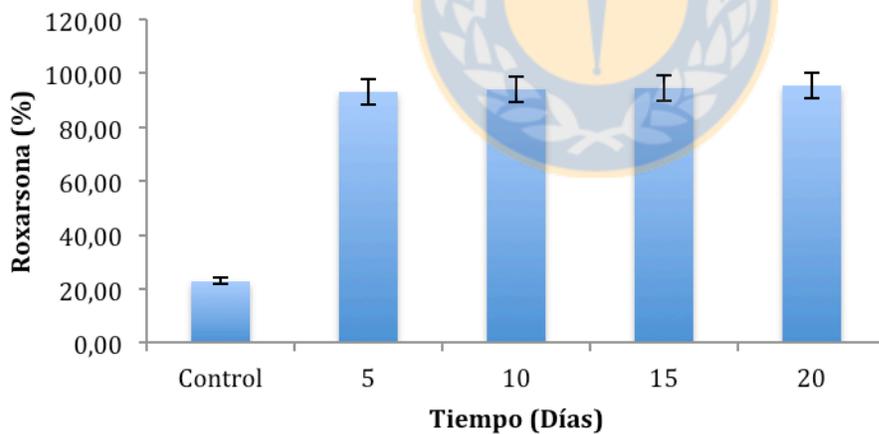


Figura 12. Porcentaje de roxarsona transformada por las bacterias presentes en el microcosmo D4 (bacterias de estiércol y de agua de pozo) durante 5, 10, 15 y 20 días.

Las bacterias presentes en el microcosmo D4 transformaron la roxarsona a los 10 días hasta el día 20. En relación al control existió una transformación de la roxarsona del 72,56% durante los 20 días. A los 20 días el porcentaje de roxarsona remanente fue de 4,47% (Figura 12).

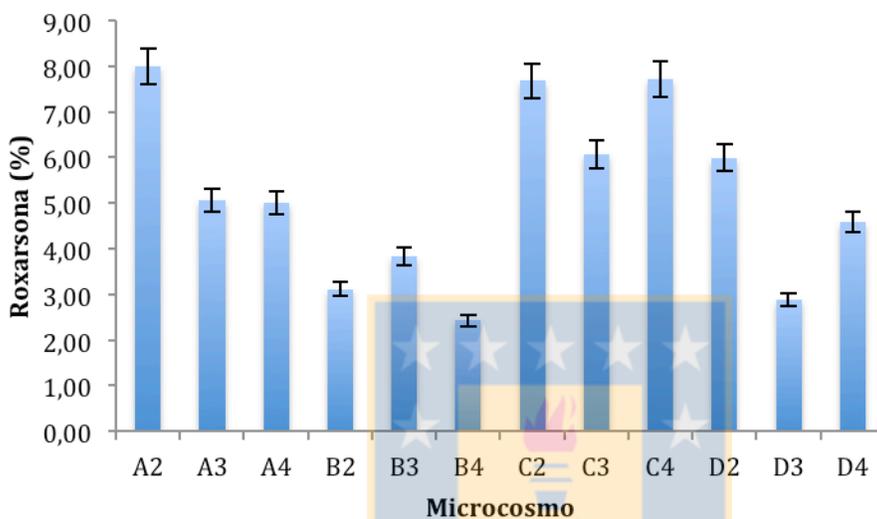


Figura 13. Porcentaje de roxarsona remanente en agua de pozo a los 20 días.

Como se menciona anteriormente, el lixiviado correspondiente a cada columna fue colocado en agua de pozo en diferentes condiciones: (1) esterilidad total; (2) con bacterias provenientes del lixiviado; (3) bacterias de agua de pozo; y (4) bacterias de agua de pozo junto con bacterias procedentes del lixiviado, los cuales produjeron diferentes porcentaje de transformación. A estos datos se les realizó el análisis de porcentaje de roxarsona remanente del cual se demostró que el microcosmo B4 fue el que obtuvo el menor porcentaje de roxarsona remanente (2,43%), este microcosmo poseía bacterias de agua y bacterias provenientes del lixiviado de la columna B (bacterias de suelo y estiércol). El segundo microcosmo con menor porcentaje de roxarsona remanente fue D3 con un porcentaje de 2,87%; el tercero fue el microcosmo B2 con 3,11% y el cuarto el microcosmo B3 con 3,84% (Figura 13).

## 3.2 Análisis de transformación de roxarsona y especies arsenicales inorgánicas por HPLC

### 3.2.1 Detección y cuantificación de roxarsona

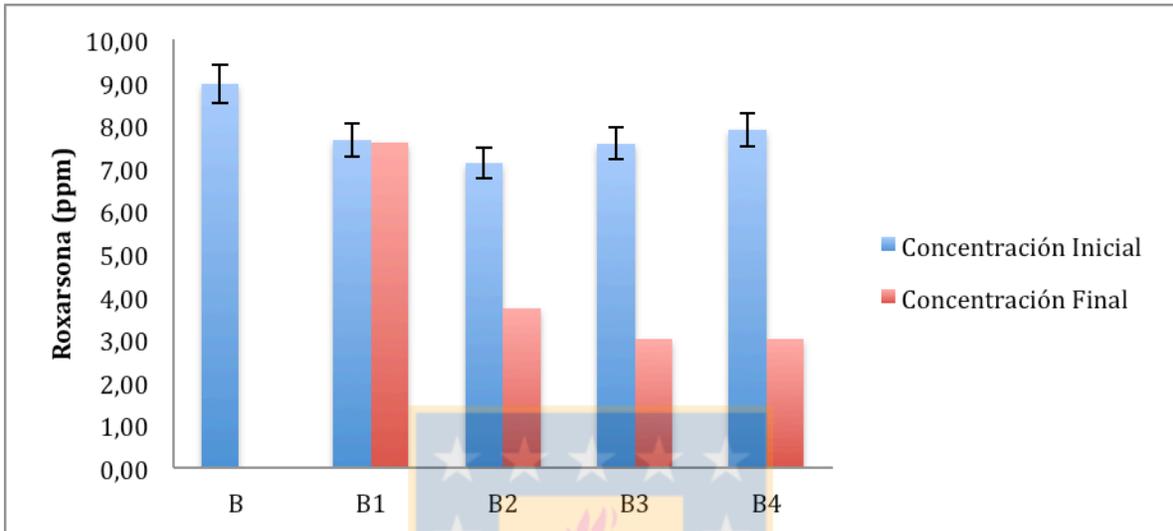


Figura 14. Concentración de roxarsona (ppm) en los microcosmos B (bacterias de estiércol y suelo), B1 (lixiviado de la columna B en agua de pozo estéril), B2 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias), B3 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo y estiércol) y B4 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo, estiércol y agua de pozo) detectada por HPLC después de 20 días.

Se realizó el análisis de ANOVA para los datos de roxarsona detectada por HPLC (Figura 15), demostrando que no existió una diferencia significativa entre el lixiviado del microcosmo B (8,97 ppm) y las muestras de los microcosmos B1, B2, B3 y B4 en el tiempo inicial ( $p < 0,05$ ). Pero si se demostró una diferencia entre las muestras de los microcosmos B y (B1, B2, B3 y B4) a tiempo final de 20 días ( $p < 0,001$ ). En el microcosmo B4 y B3 se detectó la menor concentración de roxarsona (3 ppm), la segunda concentración menor detectada fue del microcosmo B2 (3,73 ppm) y la tercera fue del microcosmo B1 (6,9 ppm) (Figura 14).

El análisis de ANOVA entre los tiempos iniciales y tiempos finales de B2, B3 y B4 también mostraron una diferencia significativa ( $p=0,001$ ) reafirmando que las bacterias presentes en los microcosmos transformaron la roxarsona.

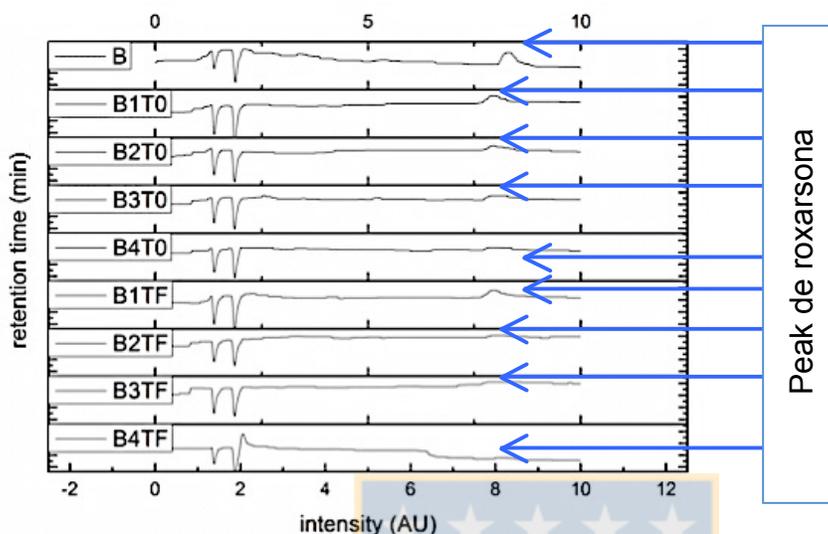


Figura 15. Gráfico de peaks de detección de roxarsona por medio de HPLC.

### 3.2.2 Determinación de arsénico total, arsenito y arseniato por Espectrofotometría de Absorción Atómica (AAS).

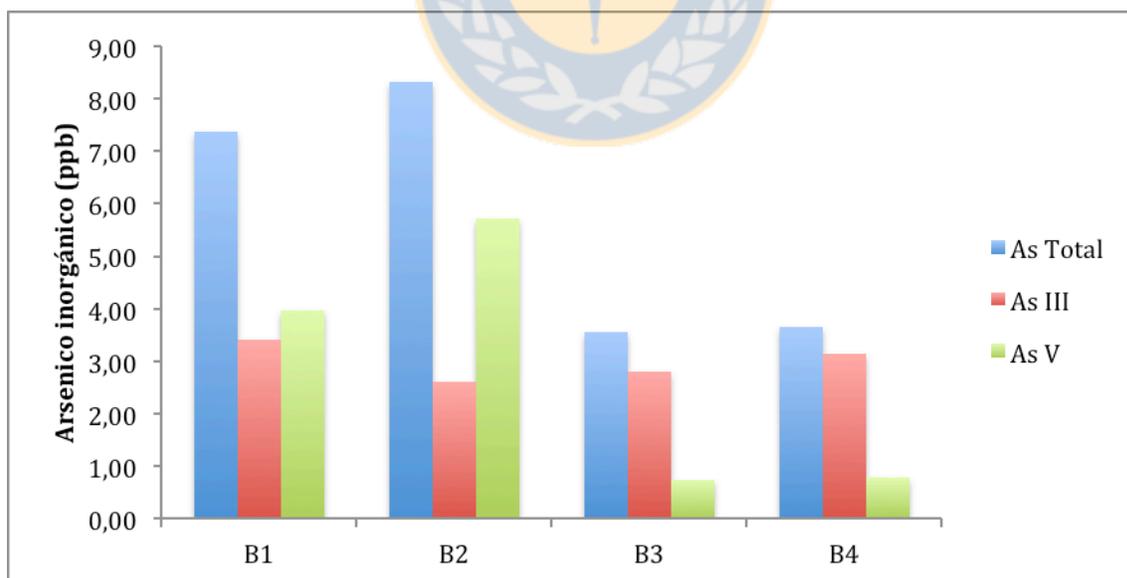


Figura 16 Concentración final de arsénico inorgánico (As total, As III y As V) después de 20 días en los ensayos B (bacterias de estiércol y suelo), B1 (lixiviado de la columna B en agua de pozo estéril), B2 (lixiviado de la columna B en agua

de pozo con bacterias), B3 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo y estiércol) y B4 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo, estiércol y agua de pozo) detectada por HPLC después de 20 días.

Los datos obtenidos de AAS fueron sometidos a un análisis de ANOVA y un test de comparación múltiple de Tukey con un  $p < 0,05$  lo que demostró que existe una diferencia estadística para el arsénico total entre las muestras, siendo la mayor concentración de arsénico total detectada en el microcosmo B2 (8,31 ppb) y la menor concentración de arsénico total detectada fue en el microcosmo B3 (3,56 ppb) (Figura 16).

Para el caso de arsenito (As III) se detectó la muestra de mayor concentración fue el microcosmo B4 (3,40 ppb) y la menor concentración fue de B2 (2,60 ppb) (Figura 16).

El arseniato (AsV) mostró una diferencia estadística entre las muestras B1-B2, B1-B3, B1-B4, B2-B3 y B2-B4. Mostrando la máxima concentración de As V en el microcosmo B2 (5,71 ppb) y la mínima concentración para el microcosmo B3 (0,75 ppb).

Finalmente el microcosmo B4 obtuvo una concentración de arsénico total de 3,65 ppb, arsenito de 3,15 ppb y arseniato de 0,78 ppb (Figura 16).

### **3.3 Determinación de toxicidad**

#### **3.3.1 Detección de toxicidad de roxarsona y compuestos derivados de la biotransformación.**

Los datos de la toxicidad encontrados por el kit comercial Toxi-ChromoTest™ fueron analizados por medio de un test de ANOVA.

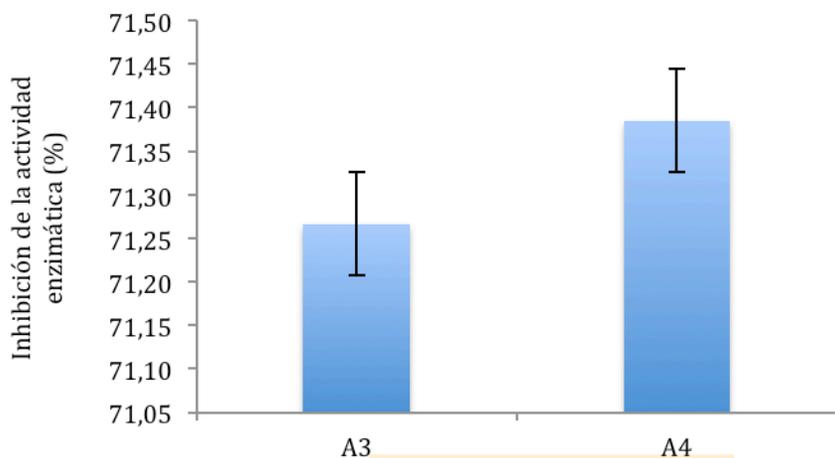


Figura 17. Porcentaje de inhibición de la actividad enzimática ( $\beta$ -galactosidasa) de los microcosmos A3 y A4.

En los ensayos de toxicidad de los productos obtenidos en los microcosmos A3 y A4; se pudo observar una inhibición de la actividad enzimática ( $\beta$ -galactosidasa) del 71,27% para A3 y de 71,38% para A4 valores que no son estadísticamente diferentes entre ellos. (Figura 17).

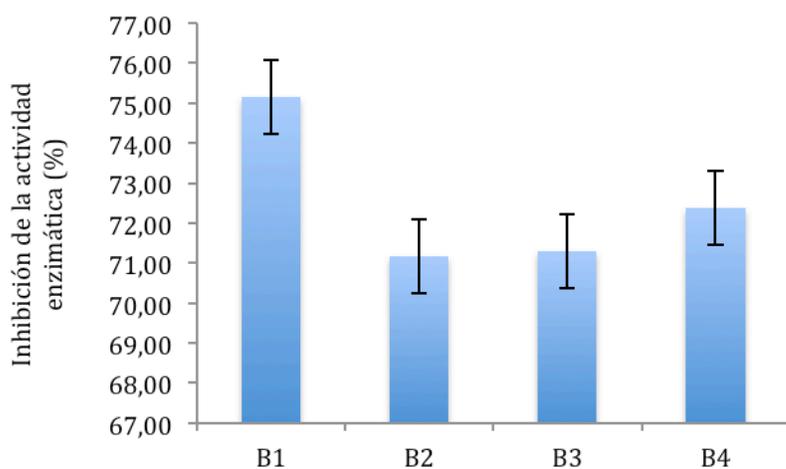


Figura 18. Porcentaje de inhibición la actividad enzimática ( $\beta$ -galactosidasa) de los microcosmos B1, B2, B3 y B4.

El microcosmo B1 que solamente era el lixiviado en agua de pozo obtuvo un 75,15% de toxicidad. El microcosmo B2 obtuvo un 71,17% de inhibición de la actividad enzimática. El microcosmo B3 obtuvo un 71,3% de inhibición de la actividad enzimática y para el microcosmo B4 un 72.39% de inhibición (Figura 18).

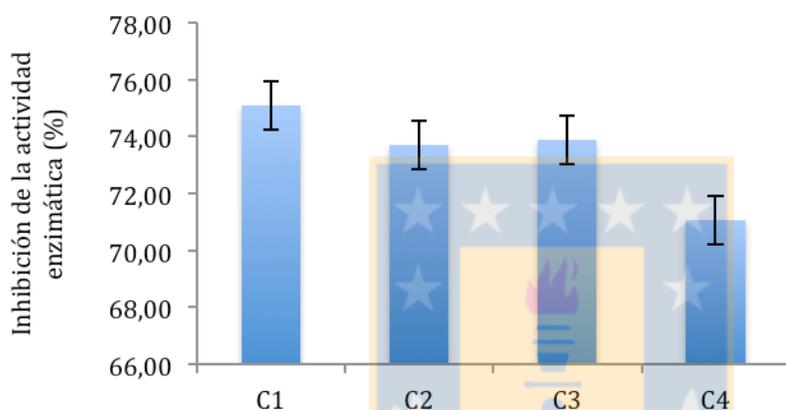


Figura 19. Porcentaje de inhibición de la actividad enzimática ( $\beta$ -galactosidasa) de los microcosmos C1, C2, C3 y C4.

El microcosmo C2 que poseía a bacterias de suelo obtuvo un 73,72% de inhibición de la actividad enzimática, el microcosmo C3, que poseía bacterias de agua de pozo juntamente con la roxarsona lixiviada de la columna C, tenía un 73,72%, finalmente para C4 que poseían bacterias de suelo y de agua de pozo obtuvo el menos porcentaje de inhibición con un 71,07% (Figura 19).

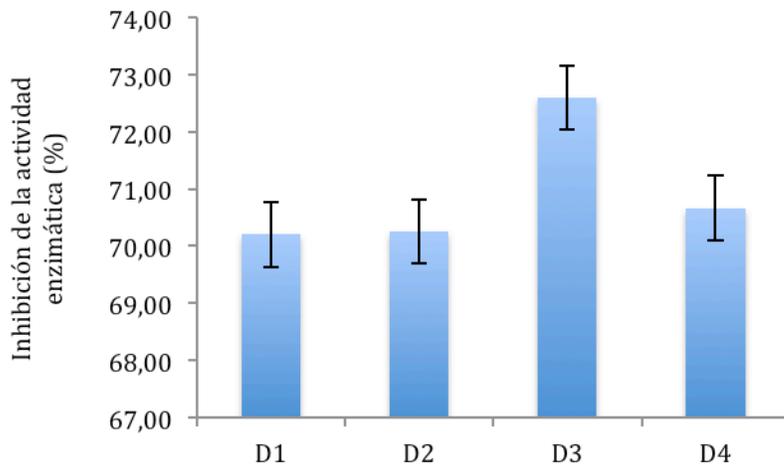


Figura 20. Porcentaje de inhibición de la actividad enzimática ( $\beta$ -galactosidasa) de los microcosmos D1, D2, D3 y D4.

Para el caso de los ensayos que contenían el lixiviado de la columna D (bacterias de estiércol) obtuvieron un porcentaje de inhibición enzimática del 70,21% para la muestra del microcosmos D1, 70,26% para D2, 72,6% para D3 y 70,67% para D4 (Figura 20).

Realizando una comparación entre los porcentajes de roxarsona detectada y porcentaje de inhibición enzimática se puede concluir que los microcosmos B2 (3,11% y 71,17%, respectivamente); B3 (3,84% y 71,30%, respectivamente); B4 (2,43% y 72,39%, respectivamente); D3 (2,87% y 72,60%, respectivamente) y D4 (4,58% y 70,67%, respectivamente) poseían los menores porcentajes de roxarsona detectada y el mayor porcentaje de inhibición enzimática en comparación con los otros ensayos (Figura 21). Al comparar estos resultados se observó que los microcosmos conformados por bacterias de agua de pozo-suelo y estiércol fueron los más eficientes en la transformación de roxarsona seguido del microcosmo de bacterias de agua de pozo y estiércol, de esta manera se pudo indicar que las especies bacterianas que se encuentran en el estiércol y agua de pozo son las principales responsables en la transformación de roxarsona y producción de compuestos tóxicos (Figura 21).

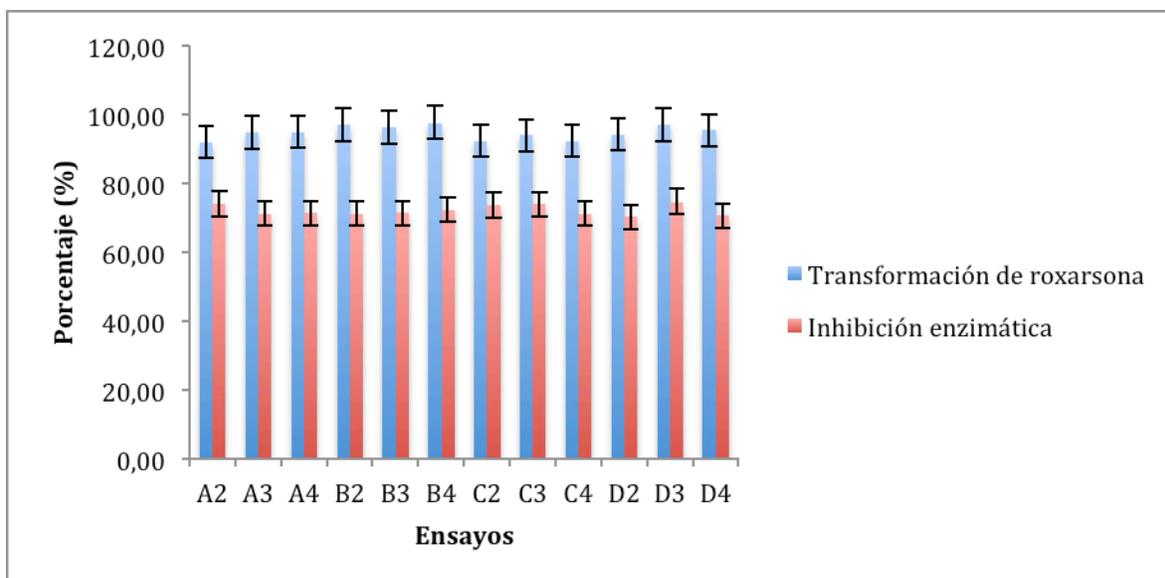


Figura 21. Relación entre porcentaje de roxarsona transformada en agua de pozo y porcentaje de inhibición enzimática.

Tabla 4. Porcentaje de toxicidad, As III, As V, roxarsona inicial y roxarsona final para los microcosmos B, B1, B2, B3 y B4.

Microcosmo	%Toxicidad	%As III	%AsV	% Roxarsona inicial	%Roxarsona final
B	36,9	43,93	56,08	100	76,91
B1	79,15	46,07	53,92	5,43	5,21
B2	71,17	31,28	68,71	4,95	3,11
B3	71,3	78,93	21,06	5,8	3,84
B4	72,39	86,3	21,36	4,42	2,43

Tabla 5. Matriz de correlación de PEARSON entre el porcentaje de toxicidad y porcentaje de As III, AsV, roxarsona inicial y final.

Microcosmo	%Toxicidad	%As III	%AsV	% Roxarsona inicial	%Roxarsona final
% As III	0,25	1,00			
% AsV	-0,25	-0,99	1,00		
% Roxarsona inicial	-0,98	-0,31	0,30	1,00	
% Roxarsona final	-0,97	-0,32	0,31	1,00	1,00

Además se realizó una correlación de PEARSON para los porcentajes de toxicidad, As III, AsV, roxarsona inicial y roxarsona final (Tabla 4). El índice de correlación indica que si  $r = 1$ , existe una correlación positiva perfecta es decir que cuando una variable aumente la otra variable aumentara en proporciones constantes.  $0 < r < 1$ , existe una correlación positiva es decir que cuando una variable aumente la otra variable aumentara en proporciones no constantes. Si  $r = 0$ , no existe relación lineal Si  $-1 < r < 0$ , existe una correlación negativa es decir que cuando una variable aumente la otra variable disminuye en proporciones constantes. Y si  $r = -1$ , existe una correlación negativa perfecta, es decir que cuando una variable aumente la otra variable disminuye en proporciones no constantes. La correlación de PEARSON se realizó a cada una de las variables, el valor de  $r=0,25$  para la correlación entre el porcentaje de toxicidad y el porcentaje de As III fue positivo indicando una relación positiva , es decir que al aumentar el porcentaje de AsIII el porcentaje de toxicidad también aumenta, el  $r$  para la correlación entre el AsV y la concentración final de la roxarsona detectada fue negativo demostrando que la toxicidad aumenta al disminuir el porcentaje de AsV el porcentaje de toxicidad aumenta, indicando que la toxicidad del producto está dada por la concentración de As III (Tabla 5).

### 3.3.2 Detección de la toxicidad de roxarsona y compuestos derivados de la biotransformación en células HUVEC.

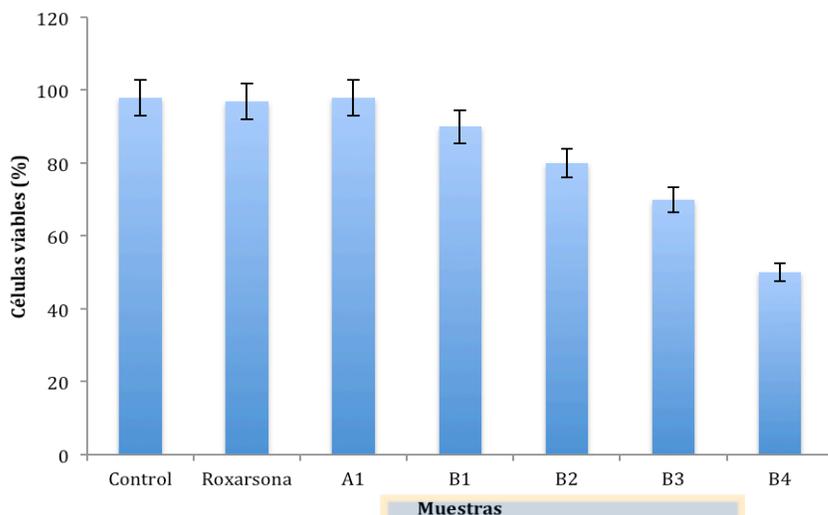


Figura 22. Porcentaje de células viables en muestras de microcosmo A1 (roxarsona lixiviada del control abiótico), B1 (lixiviado de la columna B en agua de pozo estéril), B2 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias), B3 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo y estiércol) y B4 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo, estiércol y agua de pozo) Control (agua estéril), Roxarsona 0,5mM, microcosmo A1 (abiótico) con roxarsona 0,5mM.

El ensayo de toxicidad en células eucariotas fue realizado a las muestras de roxarsona 0,5mM, microcosmo A1 B1, B2, B3 y B4, además se uso como control agua estéril.

En este ensayo según el análisis de Tukey demostró que la roxarsona 0,5mM como la muestras del microcosmo A1 (97% y 98% de células viables, respectivamente) no presentaron diferencias significativas con respecto al control indicando de esta manera que la roxarsona diluida o que no es transformada por las bacterias no presenta toxicidad alguna siendo inocua para células eucariotas.

De igual manera las muestras del microcosmo B1, que poseía bacterias de estiércol y suelo, demostró un porcentaje de 85% de células viables.

Los microcosmos B2, B3 y B4 que demostraron una reducción en el porcentaje células viables (80%,70% y 50%, respectivamente).

### **3.4 Caracterización de las comunidades microbianas de aguas subterráneas**

La caracterización de las comunidades bacterianas se las realizó por diferentes métodos, en el caso de la caracterización metabólica se uso el Kit comercial Biolog EcoPlate y para la caracterización molecular se uso la técnica de DGGE

#### **3.4.1 Caracterización metabólica**

La caracterización metabólica se realizó a los microcosmos B1, B2, B3, B4, además de agua de pozo sin roxarsona (P) y estiércol y suelo sin roxarsona (K). Todos los resultados de medición de fuentes de carbono e índices se obtuvieron a las 120 h.

El análisis del AWCD de los microcosmos K, B1, B2, B3 y B4 muestran diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en comparación con el microcosmo P (que es el microcosmo de agua de pozo sin roxarsona). Además el microcosmo P y B4 también poseía diferencia estadística ( $P < 0,05$ ). La comparación entre los demás microcosmos no se observó una diferencia de esta manera se pudo identificar que el microcosmo B4 es el que mayor capacidad de AWCD obtuvo ya que es el microcosmo que poseía las bacterias de suelo, estiércol y agua (Figura 23). Demostrándose así en el uso de las fuentes de carbono consumidas (índices) (Figura 24). Lo anterior queda demostró la cantidad de fuentes de carbono que fueron consumidas (índice S), alcanzando 28 fuentes de carbono para el

microcosmo B4 que posee roxarsona, para P 27 fuentes de carbono y para K 30 fuentes de carbono lo que representa 90,3%; 87,07% y 96,77% de actividad, respectivamente.

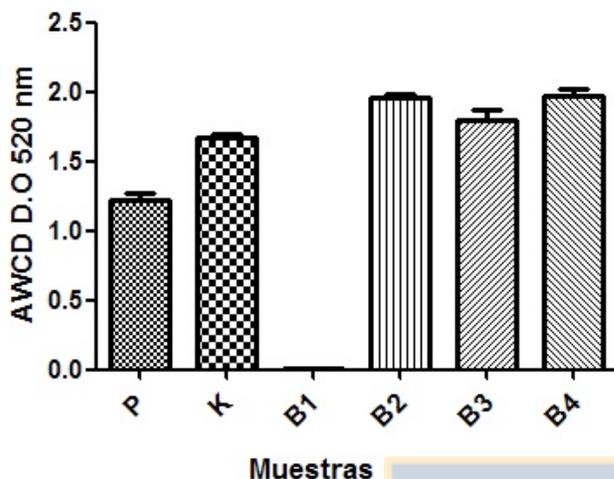


Figura 23 AWCD de las distintas fuentes de carbono a las 120 horas. P (agua de pozo sin roxarsona), K (suelo y estiércol sin agua de pozo), B1 (lixiviado de la columna B en agua de pozo estéril), B2 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias), B3 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo y estiércol) y B4 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo, estiércol y agua de pozo) .

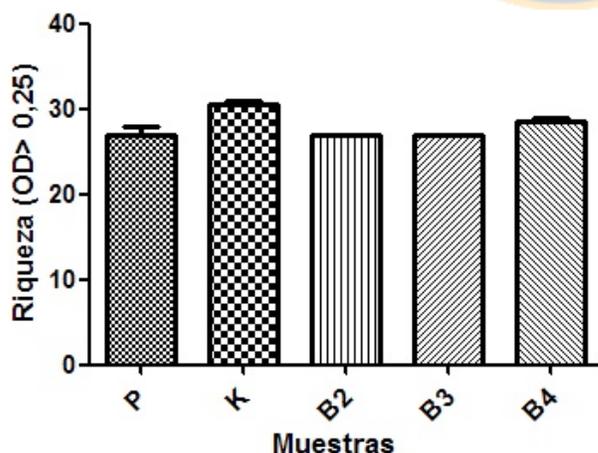


Figura 24. Consumo de fuentes de carbono a las 120 horas. P (agua de pozo sin roxarsona), K (suelo y estiércol sin agua de pozo), B1 (lixiviado de la columna B en agua de pozo estéril), B2 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con

bacterias), B3 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo y estiércol) y B4 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo, estiércol y agua de pozo) .

Se analizó por separado todas las fuentes de carbono dividiéndolas en grupos: Carbohidratos, aminoácidos, polímeros, aminas, ácido carboxílico, compuestos aromáticos y no aromáticos.

Para el caso de los carbohidratos y aminas se observó una diferencia estadística entre P y (B2, B3, B4) ( $P < 0,05$ ). Indicando así que el microcosmo B2, B3 y B4 usaban más carbohidratos que el control de agua de pozo (Figura 25). Además también existió una diferencia en el uso de aminas entre el microcosmo K (Bacterias de suelo y estiércol) y los microcosmos B2 y B3 (Figura 26), siendo el K el microcosmo que usó más aminas en comparación con los otros. En el caso de aminoácidos el microcosmo B2 obtuvo mayor diferencia estadística mostrando una media de AWCD de 2,22 ( $P < 0,05$ ) en comparación con los otros microcosmos. El consumo de aminoácidos reflejó una diferencia estadística ( $P < 0,05$ ) entre los microcosmos (P-B2); (B1-B2, B1-B3); (B2-B4) y (B3-B4) obteniendo B2 una media máxima de AWCD de 2,22 (Figura 27); para el consumo de polímeros existió diferencia estadística ( $P < 0,05$ ) entre los grupos formados por (P-B3, P-B4); (B1-B4) y (B2-B4) (Figura 28). Finalmente para los ácidos carboxílicos no existió diferencia estadística ( $P = 0.095$ ) entre los microcosmos (Figura 29).

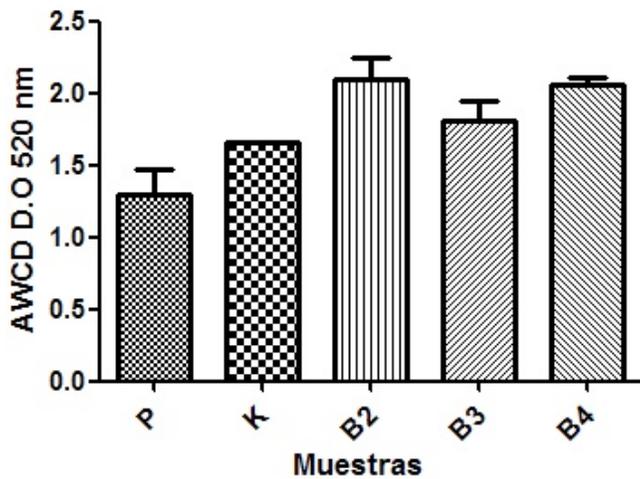


Figura 25. Consumo de carbohidratos a las 120 horas. P (agua de pozo sin roxarsona), K (suelo y estiércol sin agua de pozo), B1 (lixiviado de la columna B en agua de pozo estéril), B2 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias), B3 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo y estiércol) y B4 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo, estiércol y agua de pozo) .

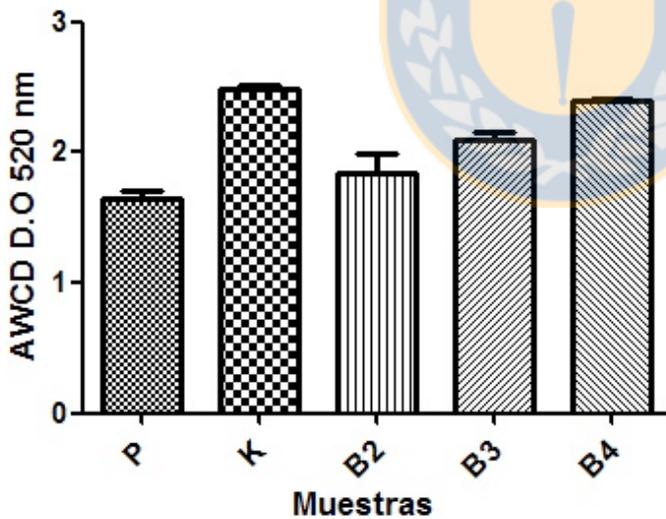


Figura 26. Consumo de aminas a las 120 horas. P (agua de pozo sin roxarsona), K (suelo y estiércol sin agua de pozo), B1 (lixiviado de la columna B en agua de pozo estéril), B2 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias), B3 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo y estiércol) y B4

(lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo, estiércol y agua de pozo) .

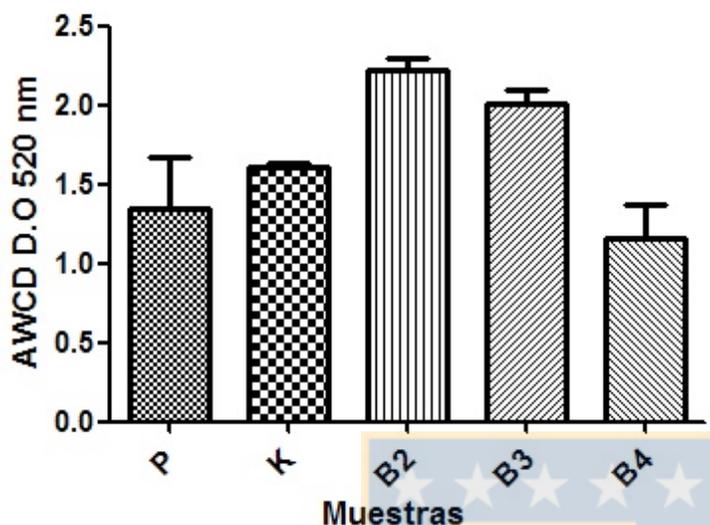


Figura 27. Consumo de aminoácidos a las 120 horas. P (agua de pozo sin roxarsona), K (suelo y estiércol sin agua de pozo), B1 (lixiviado de la columna B en agua de pozo estéril), B2 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias), B3 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo y estiércol) y B4 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo, estiércol y agua de pozo).

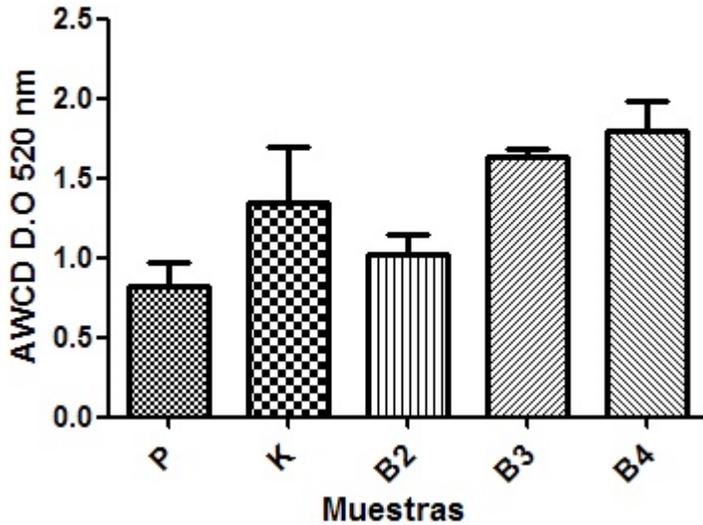


Figura 28. Consumo de polímeros a las 120 horas. P (agua de pozo sin roxarsona), K (suelo y estiércol sin agua de pozo), B1 (lixiviado de la columna B en agua de pozo estéril), B2 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias), B3 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo y estiércol) y B4 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo, estiércol y agua de pozo)

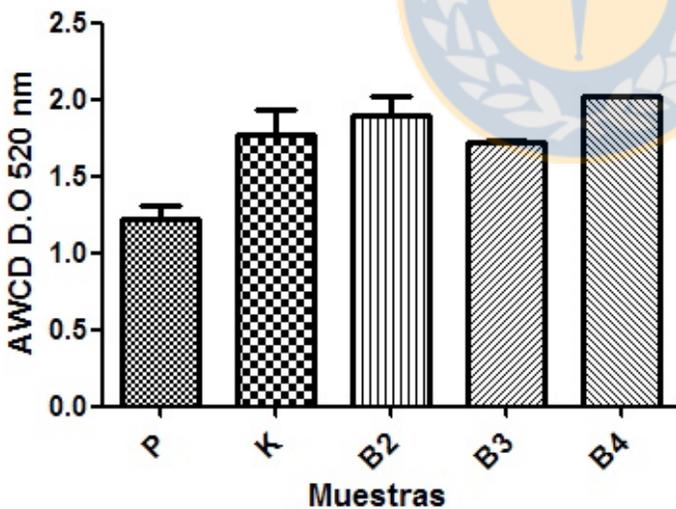


Figura 29. Consumo de ácidos carboxílicos a las 120 horas. P (agua de pozo sin roxarsona), K (suelo y estiércol sin agua de pozo), B1 (lixiviado de la columna B en agua de pozo estéril), B2 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias), B3 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo y

estiércol) y B4 (lixiviado de la columna B en agua de pozo con bacterias de suelo, estiércol y agua de pozo)

### 3.4.2 Caracterización Molecular

Las bandas obtenidas por DGGE se analizaron usando el software Gel-Pro Analyzer 4.0 (Applied Math) definiendo las bandas como aquellas que poseían al menos 5% de intensidad de la banda más intensa, anotándose como presencia o ausencia de las bandas en cada posición del gel. Para la comparación se construyó una matriz binaria basada en la presencia (1) o ausencia (0) de cada banda individual por cada línea. Para la comparación de perfiles de banda, se construyó una matriz binaria que representa los patrones de las bandas, los cuales son usados para la construcción de una matriz de distancia. La matriz de distancia fue usada para la construcción de un diagrama de escalamiento multidimensional (MDS) el cual es un mapa bidimensional con ejes artificiales X y el eje Y donde cada fingerprint de DGGE se coloca como un punto de forma que las muestras similares son representadas juntas. Clustering analysis y MDS se llevaron a cabo con el PRIMER V6 software package (Clarke y Gorley, 2001). Los patrones únicos de DGGE o unidades operacionales taxonómicas (OTU's) se examinaron usando dos índices que indican los aspectos de la diversidad microbiana. El índice de Shannon-Weaver índice de diversidad H (Shannon y Weaver, 1963) y el índice de equidad E (Pielou, 1975).

La presencia de las 20 bandas más representativas del gel de DGGE con un gradiente de denaturación del 20%-80% (Figura 30) fueron extraídas, purificadas, amplificadas y secuenciadas para ser analizadas por medio del BLAST. Las secuencias relativas más cercanas analizadas en el Gen Bank de demostraron que los principales *phylum* bacterianos encontrados fueron:

Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes, Planctonmycetes y Spirochaetes. (Tabla 6).



Figura 30. Perfil de bandas de gradiente denaturante (DGGE) 20%-80% de las muestras de las columnas con roxarsona (A, B, C y D); de las muestras de los frascos con los lixiviados respectivos que contienen roxarsona (A2, A3, B2, B3, B4, C2, C3, C4, D2, D3 y D4); controles: columna de suelo y estiércol sin roxarsona (K) y agua de pozo sin roxarsona (P).

Tabla 6. Secuencias relativamente cercanas analizadas a partir del ensayo de DGGE.

<b>Banda</b>	<b>Secuencia relativa más cercana</b>	<b>Grupo bacteriano</b>	<b>Gen Bank no. acceso</b>
1	<i>Nocardia cerradoensis</i>	Actinobacteria	NR_028704.1
2	<i>Kitasatospora setae</i>	Actinobacteria	NR_037063.1
3	<i>Streptomyces bingchenggensis</i>	Actinobacteria	NR_016582.1
4	<i>Desulfaticacillum alkenivorans</i>	Proteobacteria	NR_025795.1
5	<i>Lysinibacillus sp.</i>	Firmicutes	HE577173.1
6	<i>Pirellula staleyii</i>	Plactomycetes	NR_037109.1
7	<i>Spirochaeta africana</i>	Spirochaetes	NR_026302.1
8	<i>Acidovorax ebreus</i>	Proteobacteria	NR_074591
9	<i>Natranaerobius thermophilus</i>	Firmicutes	NR_074181.1
10	<i>Brevibacillus thermoruber</i>	Firmicutes	NR_026514
11	<i>Smithella propionica</i>	Proteobacteria	NR_024989
12	<i>Comamonas jiangduensis</i>	Proteobacteria	NR_109655
13	<i>Pseudorhodoferax soli</i>	Proteobacteria	NR_044574
14	<i>Pseudorhodoferax aquiterrae</i>	Proteobacteria	NR_108842
15	<i>Aquabacterium fontiphilum</i>	Proteobacteria	NR_044322
16	<i>Diaphorobacter nitroreducens</i>	Proteobacteria	NR_024782
17	<i>Simplicispira metamorpha</i>	Proteobacteria	NR_044941
18	<i>Diaphorobacter oryzae</i>	Proteobacteria	NR_044472
19	<i>Clostridium sulfidigenes</i>	Firmicutes	NR_044161
20	<i>Clostridium subterminale</i>	Firmicutes	NR_041795.1
21	<i>Brevibacillus agri</i>	Firmicutes	NR_040983
22	<i>Brevibacillus parabrevis</i>	Firmicutes	NR_040981
23	<i>Bacillus aquimaris</i>	Firmicutes	NR_025241
24	<i>Comamonas terrae</i>	Proteobacteria	NR_108609
25	<i>Acidovorax wautersii</i>	Proteobacteria	NR_109656

26	<i>Alicyclophilus denitrificans</i>	Proteobacteria	NR_074585
27	<i>Natranaerobius thermophilus</i>	Firmicutes	NR_074181
28	<i>Polaromonas aquatica</i>	Proteobacteria	NR_042404
29	<i>Bacillus alkalinitrilicus</i>	Firmicutes	NR_044204
30	<i>Agrobacterium sanguineum</i>	Proteobacteria	NR_036841
31	<i>Eubacterium nitritogenes</i>	Firmicutes	NR_024684

Las bandas del perfil de DGGE u OTU's presentes en cada una de las muestras se pudieron analizar la correlación de Bray-Curtis basado en la presencia o ausencia de bandas o OTU's; además de esto se realizó el estudio de su similitud por medio del método de escalamiento multidimensional (MDS) el cual utiliza una matriz de distancia que posee la correlación de Bray-Curtis.

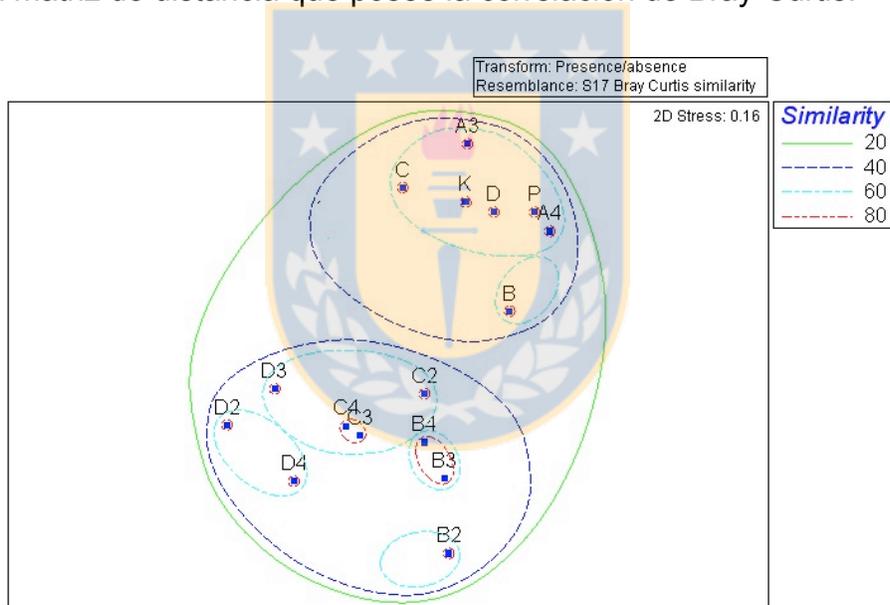


Figura 31. Escalamiento multidimensional del patrón de bandeo obtenidos mediante DGGE.

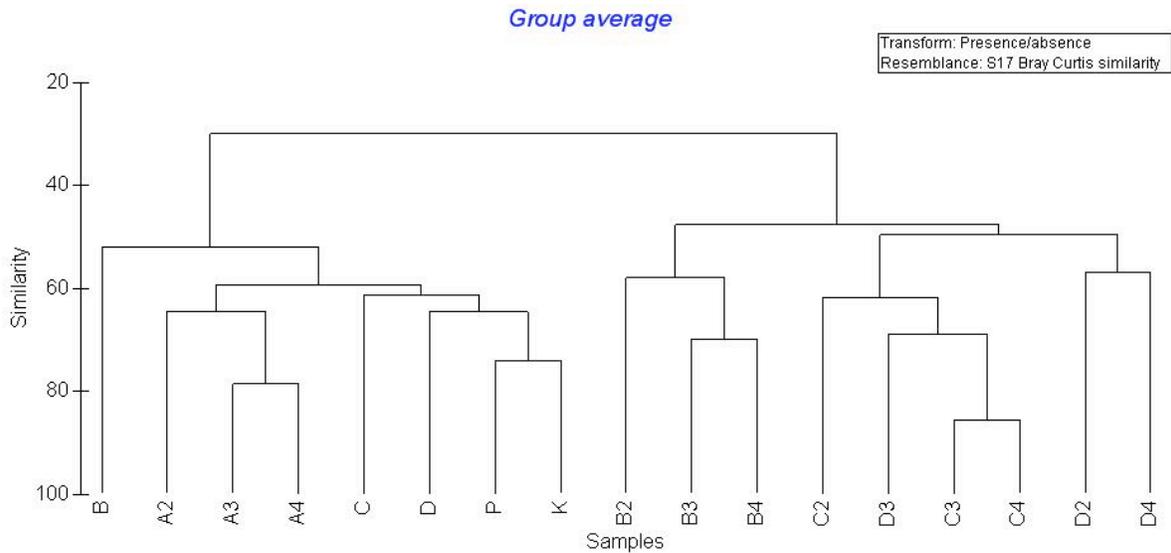


Figura 32. Análisis de similitud (Bray-Curtis) del patrón de bandeo obtenido mediante análisis del gen ARNr 16s por DGGE.

Los análisis de similitud, entre las comunidades bacterianas presentes en las muestras control, las columnas y los frascos con agua de pozo se estudiaron mediante el método de escalamiento multidimensional (MDS) el cual utiliza la matriz de Bray=Curtis. Este análisis mostro que al 60% de similitud en la estructura de las comunidades bacterianas existían 4 grupos definidos, siendo el primer grupo formado por las muestras (A3, A4, D, K, P y C); el segundo grupo fue formado por las muestras (C2, C3, C4 y D3); el tercer grupo formado por las muestras (B3 y B4) que además poseen un 80% de similitud; el cuarto grupo formado por (D2 y D4). Para el caso del 40% de similitud existen dos grandes grupos definidos siendo el primer grupo formado por las muestras (B, C, D, P, K, A3 y A4) el segundo grupo lo conformaron las muestras (B2, B3, B4, C2, C3, C4, D2, D3 y D4) (Figura 31). Finalmente existe un 20% de similitud entre todas las muestras. Estos patrones fueron confirmados por el análisis de índice de Bray-Curtis encontrándose el mismo orden jerárquico entre las muestras (Figura 32).

Los valores promedio de riqueza (S), diversidad de Shannon (H'), equidad de Pielou (J') y dominancia de Simpson, muestran diferencias significativas entre

el patrón de bandas (OTU's), obtenido mediante el análisis del gen ARNr 16S por DGGE, de las muestras evaluadas (Tabla 7).

Se observó que los índices de riqueza (S) como los de diversidad de Shannon (H') obtuvieron valores significativamente mayores en las muestras K, P Y B4 ( $S/H' = 21/3.045$ ,  $S/H' = 19/2.994$ ,  $S/H' = 19/2.994$ , respectivamente). Valores intermedios de riqueza (S) y H', fueron obtenidos para las muestras: B3, B, C, D, C4, D4 ( $S/H' = 18/2.890$ ,  $S/H' = 18/2.890$ ,  $S/H' = 18/2.890$ ,  $S/H' = 18/2.890$ ,  $S/H' = 17/2.833$  y  $S/H' = 17/2.833$ , respectivamente). Y bajos valores de riqueza, fueron encontrados para las muestras B2, D4, A4, A3, D3, C3, D2 ( $S/H' = 16/2.773$ ,  $S/H' = 16/2.773$ ,  $S/H' = 15/2.708$ ,  $S/H' = 15/2.708$ ,  $S/H' = 15/2.708$ ,  $S/H' = 13/2.565$  Y  $S/H' = 12/2.485$ , respectivamente) (Tabla 7).

Al analizar el índice de equidad de Pielou (J') se observó que no existió diferencias entre los valores de cada una de las muestras siendo el valor de  $J' = 1$  para todas las muestras mostrando una máxima diversidad (Tabla 7).

De igual manera el índice de dominancia de Simpson fue igual en todas las muestras teniendo como valor  $1 - \lambda = 1$ , lo que indica que posee un alto grado de similitud con respecto a su diversidad entre los microcosmos (Tabla 7).

Tabla 7. Índices de Riqueza (S), índice de diversidad de Shannon-Weaver (H'), índice de equidad de Pielou (J') e índice de dominancia de Simpson (1-Lambda') del patrón de bandas (OTU's), obtenido mediante el análisis del gen ARNr 16S por DGGE.

<b>Muestra</b>	<b>S</b>	<b>H'</b>	<b>J'</b>	<b>1-Lambda'</b>
K	21	3.045	1	1
P	19	2.944	1	1
B4	19	2.944	1	1
B3	18	2.890	1	1
B	18	2.890	1	1
C	18	2.890	1	1
D	18	2.890	1	1
C4	17	2.833	1	1
D4	17	2.833	1	1
B2	16	2.773	1	1
D4	16	2.773	1	1
A4	15	2.708	1	1
A3	15	2.708	1	1
D3	15	2.708	1	1
C3	13	2.565	1	1
D2	12	2.485	1	1

Los valores de capacidad de carga (Rr) son significativamente mayores en todas las muestras siendo el valor de Rr mayor a 30 para cada una de ellas (Tabla 8).

Tabla 8. Valores de Riqueza límite ponderada o capacidad de carga, de las comunidades bacterianas de las diferentes muestras evaluadas, derivado del patrón de bandas (OTU's), obtenido mediante el análisis del gen ARNr 16s por DGGE.

Muestra	Rr
K	330,75
P	270,75
B4	270,75
D	243
C	243
B3	243
B	243
D4	216,75
C4	216,75
D4	192
B2	192
D3	168,75
A4	168,75
A3	168,75
C3	126,75
D2	108

Donde los rangos establecidos son Rr <10 se refiere a un nivel de riqueza bajo, cuando el valor de Rr se encuentra entre 10 y 30 el nivel de riqueza es medio y si Rr >30 el nivel de riqueza de la comunidad será alto (Marzorati et al., 2008).

## **4. DISCUSIÓN.**

### **4.1 Evaluación por espectrofotometría de la transformación de roxarsona y lixiviado en ambientes anaeróbicos.**

Los análisis de biotransformación bacteriana de roxarsona, a los 20 días, bajo condiciones anaeróbicas de los microcosmos A, B, C y D demostraron que en ausencia de microorganismos de suelo y estiércol la roxarsona no sufre transformación (control abiótico A) teniendo un 97% de roxarsona, que representa un área de curva de 181,36; el 3% restante que no se lixivió pudo permanecer en los poros del estiércol o suelo, ya que esta puede permanecer en la materia orgánica, según estudios realizados por Rutherford (2003) señaló que la roxarsona poseía una mayor capacidad de absorción a pH 2-8 en la materia orgánica que el arseniato, debido a la parte orgánica que posee la molécula. Además señaló que la roxarsona absorbida por la materia orgánica es de fácil lixiviación en comparación al arsénico absorbido por el hidróxido de hierro, indicando que los compuestos intermedios organoarsenicales transformados de la roxarsona pueden ser lixiviable y llegar a las napas de agua profundas.

La transformación de roxarsona ocurrió cuando los microcosmos poseían bacterias como fue el caso del microcosmo B (bacterias de suelo y estiércol), el cual tenía 76,61% de roxarsona detectada que representa a una área de 143,24 pero las bacterias que transformaron la roxarsona en mayor porcentaje fueron las bacterias de suelo con un 42,15% (área de 78,81) y la de menor porcentaje de transformación fueron las bacterias de estiércol con un 77,02% (representa un área de 144,01); demostrando que las bacterias de suelo poseen mayor capacidad de transformación ya que estas se encuentran en condiciones anaeróbicas lo que no sucede en el caso de las bacterias de estiércol ya que estas se encuentran al ambiente expuestas al oxígeno y poseen una tasa menor de transformación

Stolz et al., (2007) en estudios con cepas del género *Clostridium* presentes en estiércol de pollo en condiciones anaeróbicas demostraron la capacidad de biotransformación de roxarsona obteniendo como subproductos ácido 4-hidroxi-3-aminofenilarsonico y arsénico inorgánico.

Los microcosmos A3 y A4 demostraron que las bacterias de agua de pozo por si solas pueden transformar la roxarsona, a los 20 días el porcentaje de transformación fue de 95,13% demostrando nuevamente que las bacterias en condiciones anaeróbicas poseen una alta capacidad de transformación y uso de la roxarsona.

El ensayo B1 que poseía el lixiviado de roxarsona transformado por las bacterias de estiércol y suelo llegó a un porcentaje de roxarsona remanente del 76,61% el cual no tuvo más transformación en el tiempo, esto se debía a que el agua de pozo, en el que fue diluido el lixiviado, no poseía bacterias (condiciones estériles) deteniendo la transformación. El ensayo B2 (bacterias percoladas de suelo y estiércol) comenzaron la segunda transformación de la roxarsona remanente a los 10 días, pero esta se mantuvo hasta los 20 días del ensayo llegando a tener un 3,02% de roxarsona remanente, demostrando que la cantidad de bacterias percoladas influye en el proceso de transformación de la roxarsona. El ensayo B3 que tenía el lixiviado del microcosmo B y bacterias de agua de pozo disminuyeron hasta el 3,73% de roxarsona, comparando los ensayos B2 y B3 (3,02% y 3,73% de roxarsona remanente, respectivamente) se pudo identificar que las bacterias percoladas poseían una mayor capacidad de transformación que las bacterias que se encuentran en el agua de pozo, posiblemente esto puede deberse a que las bacterias del ensayo B2 tuvieron una adaptación anterior a la roxarsona. Finalmente en el ensayo B4 que es la representación de lo que puede ocurrir *in situ*, demostró que las bacterias percoladas (Bacterias de suelo y estiércol) juntamente con las bacterias de agua de pozo lograron el mayor porcentaje de transformación llegando a tener un 2,36% de roxarsona remanente al final de los 20 días. Es decir que del 76,61% de roxarsona que poseía el

lixiviado y que llega a las napas subterráneas (*in situ*) sufrió una transformación del 74,25% de roxarsona solamente en el agua de pozo.

El ensayo C2 (bacterias percoladas de suelo) obtuvo una transformación de roxarsoma del 92,55% a los 20 días, además se evidencio un aumento en el porcentaje de roxarsona remanente del día 10 (7,42%) al día 15 (8,40%), esto puede deberse a los productos de transformación de la, ya que algunos de ellos poseen la misma absorbancia (310-500nm) aumentando así el área bajo la curva del pick detectado por el espectrofotómetro y aumentando el porcentaje de roxarsona; lo que concuerda con estudios realizados por Mackenzie (1979) el cual demostró la existencia de mecanismos de transformación de la roxarsona por bacterias presentes en el suelo, los cuales consisten en la metilación microbiana de los oxianiones inorgánicos del arsénico, los cuales forman metilarsénicos como el monometilarsénico, la dimetilarsina y el trimetilarsénico y detectables a la misma absorbancia que la roxarsona.

En el ensayo C3 se observo una transformación de roxarsona del 94,12% a los 20 días, indicando que las bacterias presentes en el agua de pozo continuaron la transformación, que realizaron inicialmente las bacterias de suelo. Comparando los microcosmos C2 y C3 a los 20 días se observo una porcentaje de roxarsona remanente de 7,45% y 5,88%, respectivamente. Esta diferencia pudo ser debido a que la cantidad de bacterias percoladas en el ensayo B2 fue menor a la cantidad de bacterias presentes en agua de pozo.

Finalmente el microcosmo C4 que poseía bacterias de suelo y de agua de pozo no mostró una transformación del 92,46% de roxarsona a los 20 días de iniciado el ensayo. De igual forma que el ensayo C2, el ensayo C4 demostró un alza en el porcentaje de roxarsona remanente entre el día 10 y el día 15 (8,02% y 8,24%), de igual forma pudo ser por la presencia de compuestos derivados de roxarsona, compuestos pueden ser sintetizados por las bacterias que se encuentran en el suelo como indica MacKenzie (1979).

En el ensayo D2 que poseía el lixiviado de la columna D con (77,03% de roxarsona remanente) y bacterias de agua de pozo mostró una diferencia estadística significativa reduciendo la roxarsona en un 94,20%. En el microcosmo D3, que poseía bacterias de agua de pozo alcanzó un porcentaje de roxarsona remanente del 3,69% es decir una transformación de roxarsona del 97,21%.

Finalmente en el ensayo D4 que poseía bacterias de estiércol y de suelo demostró una reducción estadísticamente significativa entre el control (22,97%) y el día 20 (95,53%) obteniendo un remanente de roxarsona del 2,42% el segundo porcentaje menor entre todos los microcosmos, demostrando que las bacterias de agua de pozo son las responsables en transformar la roxarsona de forma rápida. Comparando los resultados del microcosmo D4 con los del microcosmo D2 y D3 se puede decir que las bacterias que estaban presentes en el agua de pozo son responsables de la transformación de roxarsona, ya que el microcosmo D2 no obtuvo una diferencia significativa que indique que las bacterias de estiércol puedan ayudar a una rápida transformación de la roxarsona.

Overby (1962) describió por primera vez formas de arsénico derivada de la roxarsona proveniente de estiércol de pollo que pueden ser lixiviadas a aguas subterráneas debido a la solubilidad que estas poseían, lo que fue confirmado por Garbarino et al., (2003) que informaron que cerca del 71% del arsénico era soluble en el agua debido a su forma inorgánica y las concentraciones de fosforo que poseían los suelos gracias a la adición de la materia orgánica del estiércol de pollo. Han (2004), comparó las concentraciones de arsénico en muestras de suelo tomadas de 0 a 5 cm de profundidad, previamente modificado con desechos de aves. El arsénico encontrado en el suelo significativamente más baja que la concentración de arsénico en el estiércol de aves de corral lo que sugiere el arsénico de suelo arenoso puede migrar a las aguas subterráneas o lixiviar en forma de escorrentía. También se realizaron estudios en suministros de agua, en campos que fueron condicionados con roxarsona en Delaware y Virginia algunos

datos sobre los niveles de arsénico en el superficiales y subterráneas en la región encontrándose alto rango de concentración de arsénico (6,8-29 ppb) (Denver, 2004)

El análisis de los porcentajes de roxarsona entre los diferentes ensayos en agua de pozo demostraron que los ensayos B2, B3 y B4 obtuvieron los menores porcentajes de roxarsona remanente (3,11%; 3,84% y 2,43%, respectivamente); a pesar que el lixiviado proveniente del microcosmo B obtuviera un alto porcentaje de roxarsona remanente (76,61%). El ensayo B4 que poseía las bacterias de suelo, estiércol y agua de pozo obtuvo el menor porcentaje de roxarsona remanente siendo el 2,43%.

## **4.2 Análisis de transformación de roxarsona y especies arsenicales por HPLC**

### **4.2.1 Detección y cuantificación de roxarsona**

Una vez que fueron analizados los datos de transformación de roxarsona por espectrofotometría e identificados los ensayos en agua de pozo con mayor degradación de roxarsona (B2, B3 y B4) se midió la concentración de roxarsona por medio de HPLC. A tiempo inicial se pudo identificar que no existió una diferencia estadística entre el microcosmos B (lixiviado y control), y los ensayos en agua de pozo: B1 (Lixiviado en agua de pozo), B2 (lixiviado con bacterias percoladas de B), B3 (lixiviado con bacterias de agua de pozo) y B4 (lixiviado con bacterias percoladas y de agua de pozo) (8,97 ppm; 7,66 ppm; 7,12 ppm; 7,56 ppm; 7,88 ppm , respectivamente). Pero se observó una reducción de la roxarsona a los 20 días en todos los microcosmos. Para el microcosmo B1 la reducción de roxarsona (6,98 ppm) a los 20 días pudo deberse a varios factores como el pH, la cantidad de hierro en el agua o debido a la foto sensibilidad de la roxarsona como fue indicado por Arroyo et al., (2011) el que por irradiación a una solución acuosa

de roxarsona con de alta potencia de luz UV, demostró que la estructura orgánica de el compuesto fue completamente destruida en algunos minutos para formar arseniato como el principal producto de degradación.

Los ensayos B2, B3 y B4 obtuvieron concentración final de 3,73 ppm; 3 ppm y 3 ppm, respectivamente observándose una reducción de la roxarsona estadísticamente representativa respecto a los microcosmos B y B1 (8,97 ppm y 6,98 ppm). Los ensayos B3 y B4 obtuvieron la menor concentración de roxarsona (3 ppm), comprobando la capacidad de transformación de la roxarsona por las bacterias de agua de pozo, las cuales ayudaron reducir la roxarsona en 4,56 ppm para B3 y 4,88 ppm para B4, es decir 60% y 61% en cada caso.

Estudios realizados por diferentes autores indican que la transformación de la roxarsona esta mediada por microorganismos que se encuentran en el suelo o estiércol de pollo (Stolz et al., 2007 y Chovanec et al., 2010), mostraron *Alkaliphilus oremlandii* podía transformar la roxarsona en arsénico inorgánico por medio de la ruptura del anillo bencénico usando la enzima aldehído ferredoxina oxidorreductasa y proteínas que contienen molibdopterina. Fisher et al., (2008), identificó el operón ars en la cepa de *Alkaliphilus oremlandii* el cual dota de resistencia bacteriana al arsenito y arseniato.

Cortinas et al., (2006) y Stolz et al., (2007) demostraron que en condiciones anaeróbicas la roxarsona puede ser transformada en compuestos órgano-arsenicales intermedios como, ácido 4-hidroxi-3-amino fenil arsénico (4-HPAA) ácido monometilarsénico (MMA (V)), ácido monometilarsónico (MMA (III)), ácido dimetilarsínico (DMA (V)), ácido dimetilarsínico (DMA (III)), óxido de trimetilarsina (TMA (III)).

#### **4.2.2 Determinación de arsénico total, arsenito y arseniato por Espectrofotometría de Absorción Atómica (AAS).**

Los datos obtenidos por espectrofotometrías de masa fueron analizados con el test de comparación múltiple (TUKEY). Este demostró que existe una diferencia estadística para el arsénico total entre las muestras siendo de mayor a menor concentración los ensayos B2, B1, B4 y B3 (8,31 ppb; 7,38 ppb, 3,65 ppb y 3,56 ppb, respectivamente).

En este ensayo se observó que para As III, que es el de mayor toxicidad, el ensayo B4, a pesar de tener la menor concentración de roxarsona (3 ppm), la concentración de As III fue la segunda más alta (3,15 ppb). Indicando de esta forma que las bacterias presentes en agua de pozo juntamente con las bacterias de suelo y estiércol pueden ser un factor importante para la contaminación de arsénico en agua de consumo humano, generando así problemas de salud ocasionados por el mismo.

El arseniato (As V) mostro una diferencia estadística entre los ensayos indicando una máxima concentración de As V en la muestra B2 (5,71 ppb) y la mínima concentración para la muestra de B3 (0,75 ppb). El ensayo B4 obtuvo una concentración de arseniato de 0,78 ppb. La concentración más alta de As V se encontró en la muestra B2 (5,71ppb) puede ser un indicativo para que de esta forma se puede establecer un método para la bioestimulación de las bacterias presentes en suelo y estiércol y que estas aumenten la concentración de As V y así reducir la concentración de As III para que las bacterias de agua de pozo no puedan metabolizar la roxarsona y transformarla a As III que es mas toxico y móvil que el As V. Andreae, (1979) indicaba que la demetilación biológica es el proceso dominante para la generación de As inorgánico DMAA (V) que se degrada a As V en el suelo bajo condiciones aeróbicas. Otros autores (Woolson y Kearney, 1973 y Harada et al., 2010) demostraron que la degradación de MMAA (V) aumentaba a medida que aumenta el contenido de materia orgánica del suelo a partir de su

adición. *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas sp.*, *Arthrobacter sp.* y *Bacillus sp.* fueron algunas de las cepas aisladas de suelos contaminados, estas cepas demostrando la capacidad biodegradación de ácido difenilarsónico un compuesto organoarsenicales para ser transformado a As V.

La EPA permite 10 ppb de As como Nivel Máximo del Contaminante (NMC), el cual es el máximo nivel permitido de un contaminante en agua potable y se espera a tener la Meta del Nivel Máximo del Contaminante (MNMC) de 0 ppb, el cual es el nivel de un contaminante en el agua potable por debajo del cual no se conocen o no se esperan riesgos para la salud. En este estudio se demuestra que las concentraciones de arsénico total son menores a los establecidos por la EPA (B1= 7,36 ppb; B2= 8,31 ppb; B3= 3,56 ppb; y B4= 3,65 ppb), pero esto se debe a que la concentración inicial de roxarsona fue de 0,05mM si al incrementarse la concentración de roxarsona o la percolación de agua superficial (para este estudio fue del 18%) aumentaría la concentración de arsénico siendo un agua no apta para el consumo.

#### **4.3 Determinación de toxicidad**

La toxicidad fue analizada por medio Toxi-ChromoTest™ kit de Environmental Bio-detection Products Inc. (EBPI) el cual indica si un líquido es tóxico para hombre por medio de la capacidad de inhibición de la  $\beta$ -galactosidasa. Si la inhibición de la  $\beta$ -galactosidasa es mayor al 20% el test plantea que el líquido analizado es tóxico. Los datos resultantes fueron analizados por medio de un test de ANOVA. Los resultados demostraron un porcentaje mayor al 70% con excepción al microcosmo D1 (65%) que poseía el lixiviado de las bacterias de estiércol, aun con este resultado todos los análisis superaron el límite máximo permitido por el kit indicando la presencia de toxicidad de todos los microcosmos. Para los ensayos B1, B2, B3 y B4 el porcentaje de inhibición enzimática de  $\beta$ -

galactosidasa fue 3 veces superior al límite permitido (75,15%, 71,17%, 71,30% y 72,39%, respectivamente). Estos datos son concordantes con las concentraciones de As III; siendo B1 el que obtuvo mayor porcentaje de inhibición debido a la alta concentración de As III (3,40 ppb), el microcosmo B4 que representa a las condiciones *in situ* obtuvo el segundo porcentaje de inhibición (72,39%), mientras que B2 y B3 obtuvieron valores estadísticamente similares (71,17% y 71,30%, respectivamente). Como este kit es un método cualitativo para la identificación de sustancias tóxicas, se puede indicar que mientras la concentración de As III aumenta la inhibición de la  $\beta$ -galactosidasa aumenta, incrementando así el riesgo que los productos que generan las bacterias de agua de pozo pueden ser más tóxicos que los productos generados por las bacterias de suelo y estiércol.

El ensayo con células HUVEC demostraron que la roxarsona no presenta toxicidad para células eucariotas, pero al presentar una transformación por parte de las bacterias de suelo y estiércol, representado en el ensayo B2, comienza a disminuir la viabilidad celular en un 20%, de igual forma en el ensayo de agua de pozo B3 (bacterias de agua de pozo en condiciones anaeróbicas) disminuyeron la viabilidad celular en un 30%; y en el ensayo B4, que contenía bacterias de estiércol, suelo y agua, la viabilidad celular fue disminuida en un 50%. Esto demuestra nuevamente que los compuestos originados de la biotransformación de la roxarsona por comunidades bacterianas pueden producir compuestos tóxicos nocivos para el hombre reduciendo el porcentaje de viabilidad. Diferentes estudios han demostrado que las exposiciones a roxarsona pueden causar efectos morales en humanos incluyendo los cánceres de pulmón, vejiga, riñón y piel (Aderibigbe, 1983; Ahmad, 2001 y Arai, 2003), así como enfermedades cardiovasculares (Arunlertaree, 2008), diabetes tipo 2 (Association of American Plant Food Control Officials, 2011), déficits neurocognitivos y los resultados adversos en partos (Barone, 2006). La investigación hasta la fecha sugieren firmemente que la toxicidad de roxarsona es altamente dependiente de la especie arsenicales inorgánicas como es el As III (Chen, 2011; Church, 2010) además de varias especies de organoarsenicales derivados TMA, DMA, MMA (Dauwe, 2000).

Para analizar las relaciones entre el porcentaje de toxicidad y la presencia de roxarsona, AsIII y AsV se realizó un análisis de correlación de Pearson, el cual demostró relación positiva entre la toxicidad y la concentración de As III indicando que cuanto mayor sea el porcentaje de As III mayor será el porcentaje de toxicidad presentado por las células de *E. Coli*. Lo contrario se observó con AsV que mostró índices de correlación negativos lo que demuestra que la concentración de AsV es inversamente proporcional a la toxicidad.

También se ha descrito que el As III se une a los grupos sulfhidrilo (-SH) de las proteínas produciendo una alteración estructural en las proteínas alterando así los procesos metabólicos celulares (Kaltreider, 2001). Por otra parte el AsV puede causar alteraciones en la expresión génica, a través de la interrupción de la metilación del ADN, la inhibición de la reparación del ADN, del estrés oxidativo, o la alteración de la modulación de las vías de transducción de señales (Rosen & Liu, 2009).

#### **4.4 Caracterización de las comunidades microbianas de aguas subterráneas**

##### **4.4.1 Caracterización metabólica**

Los datos de los análisis de la caracterización metabólica del ensayo B1 desarrollo un AWCD de 0,01 el cual demuestra la ausencia de microorganismos que usen los sustratos ya que para que un sustrato sea considerado como utilizado de manera positiva, se requiere de valores de AWCD mayores a 0.25 (Garland, 1997). Los resultados de los ensayos P (bacterias de agua de pozo sin roxarsona), K (bacterias de suelo y estiércol sin roxarsona), B2, B3 y B4 demostraron un desarrollo de color (AWCD) el cual aumento durante el intervalo de tiempo de 24 a las 120 horas que dura el ensayo (dato no mostrado) este

período 24 horas representaría una fase adaptación, necesaria para que las células logren alcanzar una densidad de  $10^8$  células  $\text{ml}^{-1}$ , requerida para el desarrollo del color en un sistema Biolog (Konopka et al., 1998), indicando que el AWCD está directamente relacionado con la cantidad de bacterias presentes inicialmente en los sustratos. (Garland, 1996). Las comparaciones fueron realizadas después de un tiempo fijo de incubación, siendo este a las 120 horas, cuando la absorbancia de los sustratos está en aumento pero no llegan a la saturación del ensayo.

Los datos encontrados en el análisis del AWCD mostraron que los ensayos B2, B3 y B4, que poseían guano de pollo y roxarsona (0,5mM) fueron significativamente mayores a los microcosmos P (agua de pozo sin roxarsona) y K (suelo sin roxarsona). Diversos autores indican que el índice AWCD ha sido usado para identificar la funcionalidad de suelos que han sido alterados por el aumento de materia orgánica o contaminación por compuestos químicos (Albiach et al., 2000; Singh y Agrawal 2008; Fraç et al., 2012 y Carrera et al., 2012).

El análisis de AWCD de agua de pozo sin roxarsona ( $P=1,21$ ) indicó que posee una comunidad microbiana escasa ya que comparada con el índice AWCD de las bacterias de estiércol y suelo ( $K=1,67$ ), además el índice aumenta drásticamente en el caso de los ensayos B2, B3 y B4 (1,96; 1,79 y 1,97, respectivamente) evidenciando que la roxarsona y las bacterias percolladas de suelo y estiércol afectan la funcionalidad de los microcosmos. También se observó una diferencia estadística entre los ensayos K, B2, B3 y B4 indicando que la capacidad funcional se ve afectada por la presencia de roxarsona.

Los ensayos K, B1, B2, B3 y B4 mostraron diferencias significativas ( $p<0,05$ ) en comparación con el ensayo P (agua de pozo sin roxarsona), en la comparación entre los ensayos no se observó una diferencia de esta manera el ensayo B4 obtuvo el valor más alto de AWCD (1,97).

Se realizó el análisis de índice de diversidad de Shannon (H) y la riqueza (S) después de 120 horas de incubación, los cuales ayudaron a comparar la diversidad catabólica entre los diferentes ensayos. El índice de riqueza (S) demostró que el ensayo con estiércol y suelo sin roxarsona (K) poseía mayor riqueza microbiana que el agua de pozo sin roxarsona (P) y los ensayos que poseían roxarsona (B2, B3 y B4); concordando con estudios realizados por Zhou (2013) que demostró que el uso de roxarsona reduce la riqueza que se presentan en ambientes no contaminados.

Para identificar el número, actividad y tasa de uso de sustratos se dividió los sustratos de carbono presentes en la placa Biolog EcoPlate en 5 categorías, carbohidratos, polímeros, ácidos carboxílicos, aminoácidos y aminas, según lo descrito por Choi (1999).

El análisis de carbohidratos indicó que en presencia de roxarsona las bacterias de agua de pozo (B2) aumentan el consumo de carbohidratos con respecto a bacterias de agua de pozo que no tiene roxarsona (P) (2,09 y 1,28, respectivamente), lo que demuestra un cambio en el metabolismo a causa del contaminante externo, esto puede deberse los iones metálicos presentes en el medio que pueden formar compuestos complejos no específicos en la célula, pudiendo detener la proliferación celular, afectando el crecimiento, la morfología y metabolismo de los organismos (Giller et al., 1998; McGrath et al., 2001).

De igual forma que los carbohidratos, el uso de polímeros fue aumentado por la presencia de roxarsona para las bacterias de agua de pozo con roxarsona (B2=1,02) como para bacterias de suelo (B3=1,63); en comparación con los ensayos que de suelo y agua de pozo que no contenían roxarsona (K=1,34 y P=0,82). Además el ensayo B4 obtuvo un AWCD de 1,80; indicando que las bacterias de suelo, estiércol y agua de pozo aumentan drásticamente el uso de polímeros evidenciando nuevamente que la roxarsona afecta el metabolismo de las bacterias. Estudios anteriores demostraron que los valores AWCD pueden

disminuir en primer lugar y luego aumentar después de agregar altas concentraciones de roxarsona, estimulando la tolerancia a la roxarsona para los microbios del suelo durante períodos de incubación largos, datos similares se presentan en exposición en comunidades microbianas a metales (Rasmussen , 2001; Campbell, 2003; Catriona, 2010; Kristian, 2010; Kiran , 2011).

El uso de aminas y ácido carboxílico también se ve afectada por la roxarsona como sucedió con los carbohidratos. La roxarsona aumenta el uso de las aminas en las comunidades microbianas de agua de pozo con roxarsona y sin roxarsona (B3=2,09 y P=1,65 para aminas y B3=1,72 y P=1,21 para ácidos carboxílicos). En el caso de las comunidades de suelo sucede lo contrario reduciendo el uso de aminas y ácidos carboxílicos por parte de B3 con respecto a K (2,09 y 2,49 para aminas; 1,72 y 1,76 para ácido carboxílico, respectivamente). Para el microcosmo B4 (AWCD=2,40) el uso de aminas es similar a K esto puede deberse a que en B4 estaban presentes bacterias de suelo estiércol y agua que en conjunto pueden ayudar a aumentar su uso, de igual forma para el uso de ácidos carboxílicos. La disminución del AWCD en suelos adicionados con roxarsona demostraron que las comunidades microbianas del suelo fueron afectadas significativamente, varios autores indican que la roxarsona puede causar la muerte celular e inhibir el crecimiento de bacterias ROX-sensibles, debido a la formación de sustancia tóxica durante su transformación y descomposición (Konstantinos et. al., 2008; Yao et. Al., 2010)

#### **4.4.2 Caracterización Molecular**

El índice H' obtenido por el análisis de OTU's, demuestra que existe una mayor diversidad de especies en los microcosmos K y P lo que concordante con los resultados ya que estas comunidades de microorganismos de suelo, estiércol y agua de pozo no poseían roxarsona el microcosmo B4 también posee un índice H' alto demostrando así que la mezcla de las bacterias del microcosmo B y agua de

pozo estabilizan la disminución del índice causada por la roxarsona. El índice J' indica que las abundancias están más uniformemente distribuidas en todos los microcosmos. Además, el índice de dominancia de Simpson fue igual en todas las muestras teniendo como valor  $1-\text{Lambda}'=1$ , lo que indica que posee un alto grado de similitud en su diversidad entre los microcosmos. Estos resultados son característicos de ambientes, donde las condiciones del medio son adversas lo que permite el desarrollo de unas pocas especies dominantes. Sun et al., (2004) reportaron que en general la enmienda orgánica, promueve la diversidad y produce una distribución más equitativa de las especies bacterianas dentro de la comunidad.

Al analizar el patrón de bandeo u OTU's, mediante el método del escalamiento multidimensional (MDS). Se demostró que las muestras B4 y B3 además de C4 y C3 poseen un índice de similitud de un 80% en la estructura de sus comunidades bacterianas. Un segundo grupo de asociación se ve representado en el escalamiento multidimensional del patrón de bandeo, el cual está formado por las muestras P, K, C, D A3 y A4, con un 60% de similitud. Por otra parte, las muestras C2, C3, C4 y D3 forman un tercer grupo de asociación que también presenta un 60 % de similitud. Un cuarto grupo se ve representado por las muestras D2 y D4 además de B3 y B4, con un 60% de similitud. Por último, las muestra forman dos grandes grupos con un 40 % de similitud siendo el primer grupo P, K, B, C, D, A3 y A4 y el segundo grupo formado por B2, B3, B4, C2, C3, C4, D2, D3 y D4 Estos resultados concordaron con los análisis jerárquico de conglomerados (índice de Bray-Curtis), que señaló claramente la conformación de 2 grupos grandes (Figura 30).

El análisis de las comunidades bacterianas por DGGE indicó que tanto, la presencia de roxarsona, como la presencia de compuestos arsenicales de mayor toxicidad producto de la biotransformación de roxarsona (As III, As V) influyeron directamente en la estructura de las comunidades. Evidenciándose una disminución significativa, de la riqueza de especies de las comunidades

bacterianas en las muestras de agua de pozo A3, A4, C3 y D3. Por la misma razón se puede esperar que algunas vías metabólicas en los microorganismos fueran más sensibles a roxarsona y a los compuestos productos de su biotransformación. La toxicidad pudo ayudar a una inhibición selectiva de microorganismos en la comunidad, cuando aumentó la concentración de especies arsenicales inorgánicas en el medio. La inhibición selectiva de vías específicas daría lugar a la disminución del número y la diversidad de organismos que dependan de esas vías (Sobolev y Begonia, 2008).

El análisis filogenético mostró que el mayor porcentaje de taxones pertenecían al *phylum* Proteobacteria (48,38%), el segundo grupo mayoritario fue el de Firmicutes (35,48%) y un tercer grupo minoritario formado por Actinobacteria (9,67%), Planctomycetes y Spirochaetes (3,22%).

Wiegel (2006) demostró que el grupo de Firmicutes eran predominantes en suelos, sedimentos y heces de animales y que viven en condiciones anaeróbicas. De igual forma Stolz et al.,(2007) estudio la clase *Clostridium* que fue aislada de heces de pollo que son capaces de transformar la roxarsona en compuestos arsenicales inorgánicos. Otro grupo reconocido en suelo y agua es el de Proteobacteria en las cuales se han encontrado sistema de resistencia al arsénico(*ars*), estos genes se han descrito en bacterias como *Escherichia coli* (Carlin et al., 1995; Diorio et al., 1995), *Pseudomonas aeruginosa* (Cai et al., 1998), *Yersinia spp* (Neyt et al., 1997; Bansal et al 2000), *Acidiphilum multivorum* (Susuki et al. 1997; Susuki et al., 1998), *Thiobacillus ferrooxidans* (Butcher et al., 2000), *Acidithiobacillus caldus* (Dopson et al., 2001).

## 5. CONCLUSIONES

Las bacterias presentes en suelo obtuvieron un mayor porcentaje de transformación de la roxarsona (57,85%) en comparación con la transformación de roxarsona por parte del microcosmo de estiércol (22,97%) y el microcosmo formado por las bacterias de suelo y estiércol (23,39%).

La roxarsona no presenta toxicidad y es de fácil movilización hacia las napas de agua subterránea, en donde las bacterias presentes en agua subterránea transforman la roxarsona proveniente de estiércol y suelo contaminados, en productos altamente solubles y tóxicos para el hombre

La capacidad metabólica de las bacterias presentes en estiércol, suelo y agua de pozo fueron afectadas por la presencia de roxarsona y sus derivados de la transformación, alterando el metabolismo y el uso de las diferentes fuentes de carbono.

El análisis filogenético indicó que los principales *phylum* encontrados en los ensayos de transformación de roxarsona en condiciones anaeróbicas fueron: Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Planctomycetes y Spirochaetes.

## 6. PROYECCIONES

Identificar los microorganismos que sean capaces de transformar la roxarsona y obtener porcentajes de toxicidad bajos.

Establecer los mecanismos celulares que poseen las bacterias, para la resistencia, transformación y toxicidad del arsénico.

Desarrollar un método de remediación en cual permita reducir o anular la concentración de derivados arsenicales tóxicos



## 7. BIBLIOGRAFÍA

Achour, A. R., Bauda, P., Billard, P. 2007. Diversity of arsenite transporter genes from arsenic-resistant soil bacteria. *Research in Microbiology*. Volume 158. Issue 2. Pages 128-137

Aderibigbe, Church, 1983. Feather and hair meals for ruminants. III. Relationship between enzymatic or in vitro rumen digestibility and in vivo digestibility of diets containing feather and hair meals. *Journal Animal Science*. 57: 483-494.

Adriano, D.C. 2001. Trace elements in terrestrial environments. Biogeochemistry, bioavailability and risks of metals. Springer-Verlag, New York.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2005. Draft Toxicological Profile for Arsenic. United States Department of Health and Human Services.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2007. Draft Toxicological Profile for Arsenic. United States Department of Health and Human Services.

Ahmann D, Roberts AL, Krumholz LR y Morel FMM. 1994. .Microbe grows by reducing arsenic. *Nature*. **371**: 750

Ahmad, S.A., M.H. Sayed, S. Barua, M.H. Khan, M.H. Faruquee, A. Jalil, 2001. Arsenic in drinking water and pregnancy outcomes. *Environ Health Perspect*. 109: 629-631.

Alcaíno, H., González, J.P., Fredes, F., Gorman, T. 2002. Coccidias aviares de gallineros industriales de Chile. *Parasitología Latinoamericana* 57:34–39.

Alley, W., Reilly, E., Lehn Franke, O. 1999. Sustainability of ground-water resources U.S. Geological Survey circular 86:6-17

Anderson, B.K., Chamblee T.N. 2001. The effect of dietary 3-nitro-4-hydroxyphenylarsonic acid (roxarsone) on the total arsenic level in broiler excreta and broiler litter

Andreae, M. O. 1979. Arsenic speciation in seawater and interstitial water: the influence of biological-chemical interaction on the chemistry of a trace element. *Limnology and Oceanography*. 24: 440–452.

Arai, Y., A. Lanzirotti, S. Sutton, J.A. Davis, D.L. 2003. Arsenic speciation and reactivity in poultry litter. *Environmental Science Technology*. 37: 4083-4090.

Araya, R., Leiva, J., Valdes, J. 2008. Caracterización molecular de las comunidades bacterianas asociadas a sedimentos de un sistema costero del norte de la corriente de Humboldt bahía de Mejillones del Sur. Chile. *Revista biología marina y oceanográfica* **43**(3)

Arias M. 2005. Especiación de arsénico en el transporte a través de tejidos biológicos mediante hplc-hg-qaas. in Facultad de Ciencias Química. Universidad de Concepción: Memoria de Título.

Arunlertaree, C., Moolthongnoi, C. 2008. The use of fermented feather meal for replacement of fish meal in the diet of *Oreochromis niloticus*. *Environmental National Resource Journal*. 6: 13-24.

Association of American Plant Food Control Officials. 2011. State Internet Sites for Trace Metal Analysis of Fertilizer Products Registered in Those States. Disponible en: <http://offcamp.modares.ac.ir/http/www.aapfco.org/metals>  
Consultado:20/12/2012

Bansal, N., Sinha, I., Viridi, J.S. 2000. Arsenic and cadmium resistance in environmental isolates of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia intermedia*. *Canadian Journal Microbiology*. 46:481-492.

Baran, E.J. (1995). *Química Bioinorgánica*. 1ª Ed. Mc Graw Hill. Madrid. 190-192

Barone, J.R., Schmidt, W.F. 2006. Effect of formic acid exposure on keratin fiber derived from poultry feather biomass. *Bioresource Technology*, 97: 233-242.

Basu, P., Ghosh, R.N., Grove, L.E., Klei, L., Barchowsky, A. 2008. *Environmental Health Perspective*. 116:520–523.

Bentley, R., Chasteen, T.G. 2002. Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony, and bismuth. *Microbiology Molecular Biology Review* 66:250-271.

Bertin, P.N. 2011. Metabolic diversity among main microorganisms inside an arsenic-rich ecosystem revealed by meta- and proteo-genomics. *ISME Journal* 5:1735-1747.

Biessen, M., Frimmel, F.H. 2003. Arsenic a review Part I; Occurrence, toxicity, speciation, mobility. *Acta Hydrochimical et Hydrobiologica* 31(1):9-18.

Brinkhoff, T., Santegoeds, C.M., Sahm, K., Kuever, J., Muyzer, G. 1998. A polyphasic approach to study the diversity and vertical distribution of sulfur-oxidizing thiomicrospira species in coastal sediments of the German Wadden sea. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 4650-4657.

British Geological Survey, Bangladesh Department of Public Health Engineering. 2001. Arsenic Contamination of Groundwater in Bangladesh. Final Technical Report WC/00/19 (Kinniburgh DG, Smedley PL, eds). Keyworth, UK:British Geological Survey

Butcher, B.G., Deane, S.M., Rawlings, D.E. 2000. The Chromosomal Arsenic Resistance Genes of *Thiobacillus ferrooxidans* have an Unusual Arrangement and Confer Increased Arsenic and Antimony Resistance to *Escherichia coli*. *Applied Environmental Microbiology*. 66:1826.

Campbell, C.D., Chapman, S.J., Cameron, C.M.J., Davidson, M.S., Potts, J.M., 2003. A rapid microtiter plate method to measure carbon dioxide evolved from carbon substitute amendments so as to determine the physiological profile of soil microbial communities by using whole soil. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3593-3599.

Cai, J., Salmon, K., Dubow, M.S. 1998. A chromosomal *ars* operon homologue of *Pseudomonasaeruginosa* confers increased resistance to arsenic and antimony in *Escherichia coli* *Microbiology*, 14: 2705.

Campos, V.L., León, C., Mondaca, M.A., Yáñez, J., Zaror, C. 2011. Arsenic mobilization by epilithic bacterial communities associated with volcanic rocks from Camarones River, Atacama Desert, northern Chile. *Archives of environmental contamination and toxicology* 61:185-192.

Carlin, A., Shi, W., Dey, S., Rosen, B.P. 1995. The *ars* operon of *Escherichia coli* confers arsenical and antimonial resistance. *Journal Bacteriology*. 177: 981.

Catriona, A.M., Yang, X.Y., Ian, M.C., Zhao, F.G., Penny, R.H., Steve, P.M., 2010. Relative impact of soil, metal source and metal concentration on bacterial community structure and community tolerance. *Soil Biology & Biochemistry* 42: 1408-1417.

Cervantes, C., Guangyong ji, Ramirez, J.L., Silver, S. 1994. Resistance to arsenic compounds in microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*.15(4): 355-367

Chakraborti, D., Hussam, A., Alauddin, M. 2003. Arsenic: Environmental health aspects with special reference to ground water in South Asia. *Journal of Environmental Science and Health Part A* 38(1):11-15.

Challenger, F., Higginbottom. C 1935. The production of trimethylarsine by *Penicillium brevicaulis* (*Scopulariopsis brevicaulis*). *Biochemistry Journal* 29:1757-1778.

Challenger, F. 1951. Biological methylation. *Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry* 12:429-491.

Chapman HD, Johnson ZB. Use of antibiotics and roxarsone in broiler chickens in the USA: Analysis for the years 1995 to 2000. *Poultry Science*. 2002; 81:356-364.

Chapman, H.D., Marsler, P., LaVorgna, M.W. 2004. The Effects of Salinomycin and Roxarsone on the Performance of Broilers When Included in the Feed for Four, Five, or Six Weeks and Infected with *Eimeria* Species During the Starter or Grower Phase of Production. *Poultry Science* 83:761–764

Chen, C.J., Kuo, T.L., Wu, M.M. 1988. Arsenic and cancers. *Lancet* 1:414-425.

Chen, C.J., Chen, C.W., Wu, M.M., Kuo, T.L. 1992. Cancer potential in liver, lung, bladder and kidney due to ingested inorganic arsenic in drinking water. *British Journal of Cancer* 66:888-892.

Chen D, Zhang H, Tao Y, Wang Y, Huang L, Liu Z, Pan Y, Peng D, Wang X, Dai M, Yuan Z. 2011. Development of a high-performance liquid chromatography method for the simultaneous quantification of four organoarsenic compounds in the feeds of swine and chicken. *Journal of chromatography B, Analytical technologies*

in the biomedical and life sciences. 879(11-12):716-720.

Chen, Y., Factor-Litvak, P., Howe, G.R., Graziano, J.H., Brandt-Rauf, P., Parvez F. 2007. Arsenic exposure from drinking water, dietary intakes of B vitamins and folate, and risk of high blood pressure in Bangladesh: a population-based, cross-sectional study. *American Journal of Epidemiology* 165:541–552.

Chen, Y., Graziano, J.H., Parvez, F., Liu, M., Slavkovich, V., Kalra, T. 2011. Arsenic exposure from drinking water and mortality from cardiovascular disease in Bangladesh: prospective cohort study. *BMJ*. 342.

Chiou, H.Y., Hsueh, Y.M., Liaw, K.F. 1995. Incidence of internal cancers and ingested inorganic arsenic: a seven-year follow-up study in Taiwan. *Cancer Research* 55:1296-1300.

Choi, K.H., Dobbs, F.C., 1999. Comparison of two kinds of Biolog plates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities. *Journal of Microbiological Methods* 36: 202-213.

Church, C.D., P.J.A. Kleinman, R.B. Bryant, L.S. Saporito, A.L. Allen, 2010. Occurrence of Arsenic and Phosphorus in Ditch Flow from Litter-amended Soils and Barn Areas, *Journal Environmental Quality*, 39: 2080-2088.

Clarke, K., Gorley, R. 2001. *PRIMER v5: user manual/tutorial* PRIMER-E. Plymouth, UK

Cortinas I, Field J, Kopplin M, Garbarino J, Gandolfi A y Sierra-Alvarez R. 2006. Anaerobic biotransformation of roxarsone and related N-substituted phenylarsonic acids *Environ. Sci. Technol.* **40**: 2951-2957.

Cullen, W.R., Reimer, K.J. 1989. Arsenic speciation in the environment. *Chemical Reviews* 89:713–764.

Das, A.K., de la Guardia, M., Cervera M.L. 2001. Literature survey of on-line elemental speciation in aqueous solutions. *Talanta* 55:1–28.

Dauwe, T., L. Bervoets, R. Blust, R. Pinxten, M. Eens, 2000. Can excrement and feathers of nestling songbirds be used as biomonitors for heavy metal pollution?,

Denver, J.M. 2004. *Water Quality in the Delmarva Peninsula, Delaware, Maryland, and Virginia*.

Diorio, C., Cai, J., Marmor, J., Shinder, R., Dubow, M.S. 1995. An *Escherichia coli* chromosomal *ars* operon homolog is functional in arsenic detoxification and is conserved in gram-negative bacteria. *Journal Bacteriology*. 177: 2050.

Dombrowski P.M. Long, W., Farley, K.J., Mahony, J.D., Capitani, J.F., Di Toro, D.M. 2005. Thermodynamic analysis of arsenic methylation. *Environmental Science & Technology* 39:2169-2176.

Dzombak, D.A. Morel 1990. *Surface complexation modeling (hydrous ferric oxide)*, Wiley Interscience Publication. New York

Ehrlich, H.L. 2002. Bacterial oxidation of As (III) compounds. *Environmental Chemistry of Arsenic*. Marcel Dekker. New York. 313-327.

EPA 1988. Special report on ingested inorganic arsenic. Skin cancer, nutritional essentiality. US Environmental Protection Agency. EPA 625:3-87

Escalante, G., Campos VL., Valenzuela, C., Yañez, J., Zaror, C., Mondaca, MA. 2006. Rol de los microorganismos en la especiación química del arsénico: análisis de sedimentos del río camarones, I Región. Chile. Revista AIDIS.

Fitz, W.J., Wenzel, W.W. 2006. Sequestration of arsenic by plants. 209-222.

Fry, J.L., Harms, R.H., Moeller, M.W. and Kling H.F. (1976) Effect of flavomycin and 3-nitro-10 on broiler pigmentation when used with different coccidiostats. 2. Clopidol. Poultry Science 55:1112–1116.

Garbarino, J.R., Bednar, A.J., Rutherford, D.W., Beyer, R.S. and Wershaw, R.L. (2003) Environmental fate of Roxarsone in poultry litter. I. Degradation of Roxarsone during composting. Environmental Science & Technology 37:1509-1514.

Garland J. L. 1996. Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential C source utilization. Soil Biology and Biochemistry. **28**: 213-221.

Garland, J.L. 1997. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. FEMS Microbiol. Ecol. 24:289-300.

Garland, J. L., and A. L. Mills. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of communitylevel sole-carbon-source utilization. Appl. Environ. Microbiol. 57:2351–2359.

Götz, F., Zabielski, J., Philipson, L., Lindberg, M. 1983. DNA homology between the arsenate resistance plasmid pSX267 from *Staphylococcus xylosus* and the penicillinase plasmid pI258 from *Staphylococcus aureus* . Plasmid 9: 126.

Greenwood, N. and Earnshaw, A. 1997. Chemistry of the Elements. Butterworth-Heinemann; 2nd Edition.

Haack, S. K., H. Garchow, M. J. Klug, and L. J. Forny. 1995. Analysis of factors affecting the accuracy, reproducibility, and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1458–1468.

Han, F.X. 2004. Arsenic solubility and distribution in poultry waste and long-term amended soil. *Sci. Total Environ.* 320: 51–61.

Harada, N., Takagi, K., Baba, K., Fujii, K., & Iwasaki, A. (2010). Biodegradation of diphenylarsinic acid to arsenic acid by novel soil bacteria isolated from contaminated soil. *Bioremediation research.* 21: 491–499.

IARC. 2007. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk to humans: arsenic and arsenic compounds (group 1). *International Agency for research on Cancer* 23(7):100–103.

IARC. 1987. Arsenic and Arsenic Compounds Summary and Evaluation. *International Agency for research on Cancer* 7:1-456.

Ilyaletdinov, A.N. and Abdrashitova, S.A. 1981. Autotrophic oxidation of arsenic by a culture of *Pseudomonas arsenitoxidans*. *Mikrobiologiya.* 50:197–204.

Jl, G., Silver, S., Garber, E.A.E., Ohtake, H., Cervantes, C., Corbisier, P. 1993. *Biohydrometallurgical Techniques*, A.E. Torma, M.L. Apel, and C.L. Brierly (Ed.), The Minerals, Metals & Materials Society, Warrendale, 529.

Kiran, B., Thanasekaran, K., 2011. Metal tolerance of an indigenous cyanobacterial strain, *Lyngbya putealis*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65: 1128-1132.

Kitchin, K. 2001. Recent Advances in Arsenic Carcinogenesis: Modes of Action, Animal Model Systems, and Methylated Arsenic Metabolites. *Toxicology and Applied Pharmacology* 172:249-261.

Krishnamurti, G.S.R, Naidu, R 2008. Chemical speciation and bioavailability of trace metals.. In: A. Violante, P.M. Huang, G.M. Gadd (eds). *Biophysico-Chemical Processes of Heavy Metals and Metalloids in Soil Environments*. Wiley Interscience. 43: 419-466.

Kristian, K.B., Rasmus, J.N.F., Peter, E.H., Ole, N., 2010. Development of pollutioninduced community tolerance is linked to structural and functional resilience of a soil bacterial community following a five-year field exposure to copper. *Soil Biology & Biochemistry*. 42:748-757.

Konstantinos, C.M., Shahida, Q., Pravin, P., Dibyendu, S., Rupali, D., 2008. Fate of arsenic in swine waste from concentrated animal feeding operations. *Journal of Environmental Science*. 37:1626-1633.

Kwan, K. y Dutka B. (1992) Evaluation of Toxi-Chromotest Direct Sediment Toxicity testing procedure and mirotox solid-phase testing procedure. *Bulletin Enviromental Contamination Toxicology*. 49:656-662

León, C. 2013. Biotransformación de roxarsona por bacterias asociadas a suelo agrícola y su implicancia en la contaminación de los sistemas acuáticos. Tesis Magíster en Ciencias. Universidad de Concepción. Facultad de Ciencias Biológicas

Lepp, N.W. 1981. Effect of heavy metals pollution on plants. *Applied Science Publishers*. 145(1):100-101

Lopez-Archilla, A.I., Marín, I., Amils, R. 2001. Microbial community composition and ecology of an acidic aquatic environment: The Tinto River, Spain. *Microbial Ecology*. 41:20-35.

Mackenzie, F.T.; Lantzy, R.J. y Paterson, V. 1979. "Global trace metal cycles and predictions". *Journal International Association Mathematical and Geology* 11: 99-142.

Macy J M, Lawson S, DeMoll-Decker H. 1993. Bioremediation of selenium oxyanions in San Joaquin drainage water using *Thauera selenatis* in a biological reactor system. *Appl Microbiol Biotechnol*. 40:588–594.

Mandal, B.K., Ogra, Y. & Suzuki, K.T. (2001) Identification of dimethylarsinous and monomethylarsonous acids in human urine of the arsenic-affected areas in West Bengal, India. *Chemical Research and Toxicology*. 14: 371–378

Mandal, B.K., Ogra, Y. & Suzuki, K.T. 2003. Speciation of arsenic in human nail and hair from arsenic-affected area by HPLC-inductively coupled argon plasma mass spectrometry. *Toxicology and applied Pharmacology*. 189:73–83

Marshall, G., Ferreccio, C., Yuan, Y., Bates, M.N., Steinmaus, C., Selvin, S. 2007. Fifty-year study of lung and bladder cancer mortality in Chile related to arsenic in drinking water. *Journal of the National Cancer Institute* 99(12):920–928.

Marzorati, M., Wittebolle, L., Boon, N., Daffonchio, D., Verstraete, W. 2008. How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environmental Microbiology* 10:1571–1581

Mathis, G., M. LaVorgna. 2007. Benefects of the broiler feed additive Roxarsone. *Journal of Animal Science* 85 (1):130-142

Matschullat, J. 2000. Arsenic in the geosphere a review. *Science of the Total Environment* 249: 297-312.

McDougald, L.R., Gilbert, J.M., Fuller, L., Rotibi, A., Xie, M., Zhu, G. 1992. How Much Does Roxarcine contribute to coccidiosis control in Broilers when used in combination with ionophores?. *The Journal of Applied Poultry Research* 1:172-179.

Meharg, A.A., Harley-Whitaker, J. 2002. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytologist* 154:29–43.

Mellado, C., Campos, V., Mondaca, M. A. 2011. Distribución de genes de resistencia a arsénico en bacterias aisladas de sedimentos con concentraciones variables del metaloide. *Gayana Concepción* 75(2):131-137

Michalke, K., Wickenheiser, E.B., Mehring, M., Hirner, A.V., Hensel, R., 2000. Production of volatile derivatives of metal(loid)s by microflora involved in anaerobic digestion of sewage sludge. *Applied and Environmental Microbiology* 66(7):2791-2796.

Morata, A. 2005. Microscopía electrónica analítica de la célula endotelial, sistematización de los patrones microscópicos y microanalíticos. Universidad de Granada

Moreno E. 2010. Plant-based methods for remediating arsenic-polluted mine Soils in Spain.

Morrison J.L. 1969. Distribution of arsenic from poultry litter in broiler chickens, soil, and crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 17:1288–1290.

Muller, D., Lièvreumont, D., Simeonova, D., Hubert, J.C., Lett, M.C. 2003. Arsenite oxidase *aox* Genes from a Metal-Resistant B-Proteobacterium. *Journal Bacteriology* 185:135-141.

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

Nachman KE, Baron PA, Raber G, Francesconi KA, Navas-Acien A, Love DC. 2013. Roxarsone, inorganic arsenic, and other arsenic species in chicken: a U.S.-based market basket sample. *Environ Health Perspect* 121:818–824

Navas-Acien, A., Sharrett, A.R., Silbergeld, E.K., Swartz, B.S., Nachman, K.E., Burke, T.A. 2005. Arsenic exposure and cardiovascular disease: a systematic review of the epidemiologic evidence. *American Journal of Epidemiology* 162:1037–1049.

Neyt, C., Iriarte, M., Ha Thi, V., Cornelis, G.R. 1997. Virulence and Arsenic resistance in *Yersinia*. *Journal Bacteriology*, 179, 612.

Newman, D. K.; Beveridge, T. J.; Morel, F. M. 1997. Precipitation of arsenic trisulfide by *Desulfotomaculum auripigmentum*, *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 2022-2028.

Nriagu, J. O. 1994. *Arsenic in The Environment. Part I: Cycling and Characterization.* John Wiley & Sons, INC. New York. Vol 1, 1-417.

Oremland R.S., Dowdle PR, Hoefft S, Sharp JO, Schaefer JK, Miller LG, Switzer Blum J, Smith RL, Bloom NS y Wallschlaeger D. 2000. Bacterial dissimilatory

reduction of arsenate and sulfate in meromictic Mono Lake, California. *Geochim. Cosmochim.* **64**: 3073 – 3084.

Oremland R. S. y Stolz J. F. 2003. The ecology of arsenic. *Science.* **300**: 939–944.

Overby, L.R., 1962. Nonretention by the chicken of the arsenic in tissues of swine fed arsenic acid. *Toxicology Applied Pharmacology.* 4: 745–751.

Paez-Espino, D., Tamames, J., Lorenzo, V., Canovas, D. 2009. Microbial responses to environmental arsenic. *Biometals* 22:117-130.

Pereira, M.R., Montes, R., Gomes, M.E., Ferreira, A., Avila, P. 2008. Geochemistry of soils and waters from abandoned Freixeda Gold Mine, Northeast Portugal. *Macla*, 10: 136-137

Pielou, E.C. 1975. *Ecological diversity.* Wiley, New York.

Prusse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B., Ludwig, W., Peplies, J., Glockner, F. 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research* 35:7188-7196

Raizman, E.A., Habteselassie, M.Y., Wu, C.C., Lin, T.L., Negron, M. and Turco, R.F. 2011. Leaching of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in soil under *in vitro* conditions. *Veterinary Medicine International.* Article ID: 506239. doi:10.4061/2011/506239

Rasmussen, L.D., Sørensen, S.J., 2001. Effects of mercury contamination on the culturable heterotrophic, functional and genetic diversity of the bacterial community in soil. *FEMS Microbiology Ecology* 36. Pages 1-9.

Ren, X., McHale, C. M., Skibola, C. F., Smith, A. H., Smith, M. T., Zhang, L. 2011. An emerging role for epigenetic dysregulation in arsenic toxicity and carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives* 119:11–19.

Riesenfeld, C.S., Schloss, P.D., Handelsman, J. 2004. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annual Review of Genetics* 38:525-552.

Riquelme, R.E. 2011. Degradación de roxarsona por consorcio bacteriano anaeróbico, aislado desde fecas de pollo broiler.

Rutherford, D.W., Bednar, A.J., Garbarino, J.R., Needham, R., Staver, K.W., Wershaw, R.L. 2003. Environmental fate of roxarsona in poultry litter. Part II. Mobility of arsenic in soils amended with poultry litter. *Environmental Science & Technology* 37:1515–1520.

Sapkota AR, Lefferts LY, McKenzie S, Walker P (2007) What do we feed to food-production animals? A review of animal feed ingredients and their potential impacts on human health. *Environ Health Perspect* 115: 663–670.

Shannon, C.E., Weaver, W. 1963. *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press, Urbana

Silver, S., Phung, L.T. 2005. Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Applied and Environmental Microbiology* 71:599-608.

Smedley, P. L., Kinniburgh, D. G. 2002. A Review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemical*. 17:517-568.

Steinberg N A, Switzer Blum J, Hochstein L, Oremland R S. 1992. Nitrate is a preferred electron acceptor for growth of selenate-respiring bacteria. *Applied Environmental Microbiology* 58:426–428.

Stolz, J.F., Oremland, R.S. 1999. Bacterial respiration of arsenic and selenium oxyanions. ASM Conference on Microbial Biodiversity, Chicago, August 5-8.

Stolz, J.F., Basu, P., Oremland, R.S. 2002. Microbial transformation of elements: The case of arsenic and selenium: *International Microbiology* 5:201–207.

Stolz, J.F., Perera, E., Kilonzo, B., Kail, B., Crable, B., Fisher, E. 2007. Biotransformation of 3-nitro-4-hydroxybenzene arsonic acid (roxarsone) and release of inorganic arsenic by *Clostridium* species. *Environmental Science & Technology* 41:818–823.

Susuki, K., Wakao, N., Sakurai, Y., Kimura, T., Sakka, K., Ohmiya, K. 1997 Transformation of *Escherichia coli* with a large plasmid of *Acidiphilium multivorum* AIU 301 encoding arsenic resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 2089.

Switzer Blum, J., Bindi, A.B., Buzzelli, J., Stolz, J.F., Oremland, R.S. (1998) *Bacillus arsenicoselenatis* sp. nov.: two haloalkaliphiles from Mono Lake, California, which respire oxyanions of selenium and arsenic. *Arch. Microbiol.* **171**. 19–30.

Tamaki, S. and W.T. Frankenberger Jr. (1992) Environmental biochemistry of arsenic. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 124:79-110.

Uriel Arroyo U., Mattusch, J., Möder, M. González M., Wennricha R. 2011. Identification of roxarsone metabolites produced in the system: Soil–chlorinated water–light by using HPLC-ICP-MS/ESI-MS, HPLC-ESI-MS/MS and High

Resolution Mass Spectrometry (ESI-TOF-MS) Journal of Analytical Atomic Spectrometry. 2011.26. 171-177

Valdes, J., Roman, D., Alvarez, G., Ortlieb, L., Guinez, M. 2008. Metals content in surface waters of an upwelling system of the northern Humboldt Current (Mejillones Bay, Chile). Journal of Marine Systems 71:18-30.

Wang F, Zhao A, Meharg A, Raab J, Fieldmann y McGrath S. 2002. Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata*. Uptake kinetics, interactions with phosphate, and arsenic speciation. Plant Physiol. **130**:1552–1561

Welch, A.H., Westjohn, D.B., Helsel, D.R., Wanty, R.B. 2000. Arsenic in ground water of the United States: Occurrence and geochemistry. Ground Water 38 (4):589.

Woolson, E. A., Kearney, P.C. 1973. Persistence and reactions of <sup>14</sup>C-cacodylic acid in soils. Environmental Science & Technology, 7, 47–50.

Yañez, J., Fierro, V., Mansilla, H., Figueroa, L., Cornejo, L., Barnes, R. 2005. Arsenic speciation in human hair: a new perspective for epidemiological assessment in chronic arsenicism. Journal of Environmental Monitoring 7:1335-1341.

Yao, L., Li, G., Dang, Z., Yang, B., He, Z., Zhou, C. 2010. Uptake and transport of roxarsone and its metabolites in water spinach as affected by phosphate supply. Environmental Toxicology and Chemistry April; 29(4):947-51.

Yao, S. 2011. Media Inquiries: Pfizer will voluntarily suspend sale of animal drug 3-Nitro. Disponible en:

<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm258342.htm>

Consultado: 20/12/2013

Yoshida, T., Yamauchi, H., Fan Sun, G. 2004. Chronic health effects in people exposed to arsenic via the drinking water: doseresponse relationships in review. *Toxicology and Applied Pharmacology* 198:243– 252.

Zhou, J., Ping, L., YanHong, W., Bing, L., YanXin, W. 2013. Effects of roxarsone on the functional diversity of soil microbial community, *International Biodeterioration & Biodegradation*. 76: 32-35

